МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ГЕНЕТИКА

АДЕЛИНА ГОРАНОВА ЙОСИФОВА

Асоциативно проучване на кандидат гени и цялостен геномен скрининг при пациенти с биполарно афективно разстройство

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен “ДОКТОР”

шифър 7.1

НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ:

ПРОФ. Д-Р ДРАГА ТОНЧЕВА, ”ДОКТОР”

ПРОФ. Д-Р ЮСУКЕ НАКАМУРА, ”ДОКТОР”

София, 2011

Изказвам най – сърдечни благодарности на научния си ръководител Професор д-р Драга Тончева, за гласуваното ми доверие, предоставената ми възможност за обучение и цялостната й подкрепа в изработването, написването и оформянето на настоящата дисертация; на научния си ръководител Професор д-р Юсуке Накамура за възможността да усвоя най-съвременните подходи в молекулярната генетика за анализ на комплексни заболявания, за помощта при интерпретирането на резултатите. Благодаря на д-р Тайсей Муширода за обучението ми в методологията и подходите за анализ, за неговата подкрепа, помощ и безценни съвети при разработването на публикации. Благодаря на всички колеги от Лабораторията по Фармакогенетика към RIKEN институт, Yokohama, Япония, за цялостната им подкрепа в лабораторната работа, на колегите от Лабораторията по развитие на методите за генотипиране за безценната им помощ, както и на колегите си от Катедрата по Медицинска Генетика, Медицински Университет, София, за подкрепата и съветите.

Благодаря на семейството си и приятеля ми за това, че винаги са до мен и за непрекъснатата им подкрепа.

Списък на по –често използвани съкращения

ДНК	Дезоксирибонуклеинова киселина
ЦНС	Централна нервна система
цАМФ	Цикличен аденозин монофосфат
Bp	Базови двойки; base pairs
GWAS	Цялостно геномно асоциативно проучване (ЦГАП); Genome Wide Association Study
Kb	Килобази; kilobase
LD	Неравновесна скаченост; linkage disequilibrium
mPCR	Мултиплексна полимеразна верижна реакция
SNPs	Единични нуклеотидни полиморфизми; Single Nucleotide Polymorphisms
TDT	Тест за неравновесно предаване; Transmission Disequilibrium Test

Съдържание

1 ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР 6
1.1. Увод 6
1.2. Клинично описание 7
1.2.1 Исторически данни 7
1.2.2. Диагностични критерии 8
1.2.3. Епидемиология на биполарното разстройство 13
1.3. Етиология на биполарното разстройство 14
1.3.1 Фамилни проучвания 14
1.3.2 Проучвания на близнаци 14
1.3.3 Изследвания при осиновени деца 16
1.4. Фактори на средата 16
1.5. Унаследяване при биполарното афективно разстройство 17
1.6. Хромозомни нарушения свързани с биполарното разстройство 20
1.7. Подходи за картиране на гени при комлексните заболявания 22
1.7.1 Анализ за скаченост 23
1.7.1.1 *Параметричен анализ* 23
1.7.1.2 *Непараметричен анализ* 25
1.7.2 Преглед на кандидат райони за биполарно разстройство, получени чрез анализ за скаченост 26
1.7.3. Асоциативни проучвания 30
Неравновесна скаченост (Linkage Disequilibrium, LD) 30
Генетични маркери използвани при асоциативните проучвания 33
Дизайн на асоциативните проучвания 36
1.7.4. Асоциативни проучвания на кандидат гени при биполарното разстройство 38
Гени, свързани със серотониновата невротрансмисия 39
Гени, свързани с допаминергичната невротрансмисия 41
GABA свързани гени 44
Гени, свързани с глутаматергичната система 45
Гени, свързани със сигналната трансдукция 47
Гени, свързани с клетъчния растеж 48
Гени, свързани с циркадните ритми 49
1.8. Широко мащабни асоциативни изследвания (Genome Wide Association study, GWAS), избор на генетични варианти и платформи за генотипиране 49
Дизайн на GWAS 50
Избор на маркери и платформи за генотипиране 50
1.9. Преглед на проведените широко мащабни асоциативни проучвания при биполарно разстройство 52
2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ 56
3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ 57
3.1. Клиничен материал 57
3.2. Биологичен материал 58
3.3. Дизайн на експерименталната работа 60
3.4. Методи за генотипиране на генетични варианти 61

3.4.1. Метод за генотипиране на полиморфизми чрез алел – специфична хибридизация (TaqMan метод) 61
3.4.2. Принцип на метода 62
Разчитане и анализ на данните 64
3.4.3. Генотипиране на полиморфизми чрез Invader метод, комбиниран с мултиплексна полимеразна верижна реакция 65
3.4.3.1 Принцип на Invader метода 65
3.4.3.2 Дизайн на праймери за провеждане на мултиплексен PCR 69
3.4.3.3 Валидизиране на праймерите 70
3.4.3.4 Провеждане на мултиплекс PCR 73
3.4.3.5 Провеждане на Singleplex PCR (SPCR) 74
3.5. Хоризонтална гел електрофореза 76
3.6. Дизайн на алел специфични и Invader проби за провеждане на Inavder 77
3.6.1 Провеждане на Invader 79
Отчитане и анализ на резултатите от Invader 82
3.7. Цялостно геномно асоциативно проучване 82
3.8. Валидизиране и реплициране на резултатите от цялостното геномно асоциативно проучване 85
3.9. Статистически методи 85
3.9.1 Анализ на равновесието по закона на Харди-Вайнберг (Hardy-Weinberg equilibrium) 86
3.9.2 Точен тест на Фишер (Fisher's exact test) 86
3.9.3 Корекция при множествени изследвания 88
3.9.4 Други статистически методи 89
4. РЕЗУЛТАТИ 91
4.1. Резултати от асоциативното проучване на кандидат гени 91
4.2. Резултати от анализа на връзката между варианти в HTR5A и биполарното разстройство. Фино картиране и хаплотипен анализ 104
4.3. Резултати от широко мащабното асоциативно проучване 110
5 ОБСЪЖДАНЕ 133
5.1. Обсъждане на резултатите от асоциативното проучване на кандидат гени 133
5.2. Обсъждане на резултатите от цялостното геномно асоциативно проучване 149
6. ИЗВОДИ 154
7. ПРИНОСИ 156
8. ПРИЛОЖЕНИЯ 157
Приложение 1 157
Приложение 2 168
Приложение 3 185
Приложение 4 192
9. ЛИТЕРАТУРНА СПРАВКА 203
Декларация за оригиналност 224

1. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.1 Увод

Биполарното афективно разстройство, наричано още ”манийно – депресивна болест” е често срещано, тежко психиатрично заболяване, което засяга от 0.5% до 1.5% от общата популация [1]. Заболяването се характеризира с периодично повтарящи се епизоди на мания или хипомания и депресия, което води до нарушения в нормалния ритъм на живот.

Честата повтаряемост на двете фази, ранното начало, продължителната терапия, многократните хоспитализации, честата злоупотреба с различни лекарства, нарушената работоспособност и не на последно място, повишения риск от самоубийство, ако заболяването не бъде третирано, са тежко емоционално и финансово бреме, както за самия болен, така и за неговите роднини и за обществото като цяло.

Въпреки че до момента патогенезата на заболяването не е напълно изяснена, съществуват неоспорими доказателства за това, че биполарното афективно разстройство е комплексно заболяване, за развитието на което основна роля играят както генетични и биологични фактори, така и фактори на околната среда. Поставянето на диагнозата се извършва главно по клинични симптоми. Идентифицирането на гените отговорни за развитието на заболяването е от изключителна важност за постигане на по-точна диагностика и по-ефективно лечение. За тази цел се провеждат различни изследвания – цитогенетични, анализ за скаченост (Linkage analysis) за търсене на кандидат райони, асоциативни изследвания (Association analysis) на кандидат гени, изследвания на целия човешки геном (Genome wide association studies – GWAS, цялостен геномен скрининг). През последните години сканирането на целия човешки геном става все по-популярен, полезен и широко използван подход за идентифициране на генетични варианти, свързани с етиологията на различни заболявания в това число и на биполарното афективно разстройство.

С настоящата работа сме си поставили за цел идентифициране на генетични варианти в кандидат гени, неизследвани до момента в българска популация, които предразполагат към развитие на болестта, както и идентифициране и изследване на нови кандидат гени и доказване ролята им в етиологията на заболяването.

1.2 Клинично описание

Афективните разстройства са голяма група психични заболявания, при които основното нарушение е свързано с промяна на настроението (афекта), обикновено към потиснатост и по-рядко към приповдигнатост. По правило, промяната в настроението е първична, като се съпровожда с изменения в общото равнище на активност, както и други симптоми, които се оказват вторични по отношение на промените в настроението и активността. Афективните разстройства се характеризират с тенденция към повтаряемост, с фазово протичане и светли интервали, като в повечето случаи, началото на отделните епизоди е свързано със стресови събития или ситуации. За първи път те се проявяват обикновено в млада и зряла възраст, но тяхната поява е възможна във всички възрастови групи. Характерно за афективните разстройства е, че дори и след прекарани многобройни епизоди и многогодишно протичане не се наблюдават необратими остатъчни психични промени и нарушения в структурата на личността.

1.2.1 Исторически данни

Биполарното афективно разстройство или манийно-депресивното заболяване е познато от времето на Хипократ, който още тогава описва пациенти с мания и меланхолия (депресия), симптоми характерни за заболяването. За първи път Аретей (Aretaeus of Cappadocia), прочут древногръцки лекар приема и описва манията и меланхолията като две форми на едно и също заболяване, които до преди това са смятани за две отделни заболявания с различна етиология. По-късно Авицена (персийски учен и лекар) определя биполарното разстройство като манийно-депресивна психоза, което той ясно разграничава от другите форми на умопомрачение като мания, бяс и шизофрения. Историята на изграждането на манийно-депресивната психоза като отделна нозологична единица е свързана и с имената на други двама учени, J. Baillarger и J. Falret, които независимо един от друг през 1854 г. описват психично заболяване с редуване на мания и депресия: първият с названието folie à double forme (‘dual-form insanity’), а вторият като folie circulaire (‘circular insanity’). Години по-късно, K. Kahlbaum (1882) дава названието циклотимия (cyclothymia) на леките форми на манийно-депресивното заболяване. Съвременната представа за манийно-депресивната психоза като самостоятелна нозологична единица е създадена в края на 19-ти век от германският психиатър Emil Kraepelin, който въвежда названието “маниакално – депресивно побъркване” (manishdepressive irresein) в шестото издание на “Ръководство по Психиатрия” (1899). E. Kraepelin разкрива единството на това заболяване съставено

от две противоположни фази и го разграничава от шизофренията (“dementia praecox”). По-късно, Е. Ф. Рибаков (1914) предлага названието циклофрения. Леонхард (Leonhard 1979) пръв лансира идеята за разграничаване на биполарното и униполярното разстройства, която в последствие се приема и утвърждава и от други изследователи. Понятието афективни разстройства е въведено в десетото издание на международната класификация на болестите през 1992г. (МКБ-10).

1.2.2. Диагностични критерии

Диагностицирането на биполарното афективно разстройство не винаги е лека и безпроблемна задача. Основната причина за това могат да бъдат редица физически състояния, които имат симптоми характерни за тези при биполарното заболяване. Поставянето на диагнозата се затруднява и поради факта, че не съществуват лабораторни тестове за откриване на заболяването. В повечето случаи диагнозата се базира основно на това, което пациента споделя сам, на неговото поведение, на наблюдения на негови близки, приятели и колеги.

Един от основните проблеми в генетиката на психиатричните заболявания, в частност на биполарното разстройство, е определянето на фенотипа, поради липсата на биологични маркери или диагностично-информативни биохимични изследвания. Повечето генетични изследвания се базират на клиничната диагноза. Определянето на фенотипа значително се улесни с разработването и използването на изследователски интервюта SCAN (Schedule of Clinical Assesment in Neuropsychiatry; Скали за клинична оценка в невропсихиатрията) [2] и диагностични скали, които подпомагат лекарите в прецизирането на диагнозата. Най-широко използваните критерии днес са DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, IVed.; Диагностичен и статистически справочник на умствените заболявания, IV издание), BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale; Съкратена скала за психиатрична класификация), ICD-10 (10th edition of the International Classification of Disease; Международна класификация на заболяванията, 10то издание).

Съгласно DSM IV към групата на афективните разстройства се причисляват следните заболявания: биполарно разстройство (манийно-депресивна психоза), циклотимия, дистимия и униполярно разстройство или депресивна психоза. Биполарното афективно разстройство, от своя страна, се подразделя на биполарно разстройство тип I и биполарно разстройство тип II.

Характерни за циклотимията са периодите на хипомания. Със затихването на тези симптоми, могат да се наблюдават и симптоми на депресия, чиято продължителност и протичане не са толкова тежки, както тези при биполарното разстройство, но смущенията в настроението остават проблем за пациента и възпрепятстват изпълнението на ежедневните функции. Дистимията се характеризира с периоди на лека депресия, които могат да продължат до 2 години, без периоди на мания или хипомания. През това време могат да се наблюдават някои от следните симптоми: промяна в апетита, проблеми със съня, слабост, себеподценяване, липса на концентрация и трудности при вземане на решения, чувство на безнадежност. При униполярното разстройство се наблюдава хронична потиснатост на настроението за продължителен период от време. Биполарното разстройство тип I, означавано още като класическа маниакална депресия, се характеризира с периоди на мания, ярко контрастиращи с периоди на тежка депресия, като могат да се наблюдават и смесени епизоди. Биполарното разстройство тип II се характеризира с редуващи се епизоди на депресия и слаба мания (хипомания), която протича по-леко и за по-кратък период от време. Не се наблюдават епизоди на мания или смесени епизоди и повечето от пациентите възвръщат нормалното си състояние в периодите между отделните епизоди. Въпреки това, този тип заболяване се отличава с цикличен ход на протичане, значително повече епизоди на депресия и по-кратки периоди на пълно възстановяване между отделните епизоди, в сравнение с биполарното разстройство тип I.

Според DSM IV критериите, манийният епизод, който е характерен за биполарното разстройство тип I, представлява период на ненормално и постоянно приповдигнато, експанзивно или раздразнително настроение, който трае до една седмица. По време на този период, три или повече от следните симптоми са изразени в значителна степен:

- Прекомерна еуфория;
- Раздразнителност;
- Намалена нужда от сън;
- Речев напор;
- Хвърчащи мисли или субективно ускорен мисловен процес;
- Разсеяност;
- Повишена двигателна активност;

- Поведение без задръжки;
- Повишена самооценка или грандиозни идеи.

За пациенти в остра фаза на мания е характерно експанзивното и приповдигнато настроение, което може да достигне до еуфория, а в някои случаи да премине в силно раздразнение. Тази фаза се характеризира с няколко признака, които водят до сериозна промяна, както в настроението, така и в поведението на пациента, като например, липса на самокритичност, пълна невъздържаност, дръзко и предизвикателно поведение. Обикновено пациентът е словоохотлив повече от обичайното, има необходимост да говори непрекаснато на висок глас и доста по-бързо, като не позволява да бъде прекъсван. В тежките форми на фазата, ускореният мисловен процес и летящите идеи, могат да направят речта непоследователна и трудна за разбиране. С напредване на болестта, силното безпокойство и липсата на концентрация правят изпълнението на ежедневни задачи невъзможно. Пациентите често изпитват намалена потребност от сън. Дори да се чувстват физически изтощени, след продължителни периоди на безсъние, нямат желание за почивка. Болните имат неизчерпаема енергия и свръхактивност, като прекалено жестикулиране и ненужно суетене или нервничене. В някои случаи, пациентите могат да развият и психотични симптоми, като делюзии и халюцинации или да бъдат обхванати от натрапчиви мисли, че останалите се опитват да осуетят техните планове или да отнемат силата им. В повечето случаи, болните не съзнават, че тяхното поведение не е нормално и отказват всякакав вид лечение. Евентуални клинични интервенции могат да бъдат приети от болния, като опит да му се навреди и това може да провокира или да повиши още повече раздразнителността на пациента.

Всички тези признаци, характерни за фазата на мания, с изключение на психотичните симптоми, могат да бъдат наблюдавани и във фазата на хипомания, но в много по-лека степен. Според DSM IV критериите, продължителността на този период е до 4 дни, като характерно за него е отново приповдигнатото и експанзивно настроение, което в някои случаи може да прерасне в раздразнение. Промяната в поведението и настроението се забелязва от околните, но не засяга драстично социалния и професионалния живот на болния.

Въпреки че, симптомите на мания и хипомания са водещи и характерни за биполарното разстройство, епизодите на депресия, макар и не задължителни за диагнозата на биполарното разстойство тип I, са доста често срещани при това

заболяване. Те са почти идентични с тези при униполарното депресивно заболяване, като продължителността на един епизод, според DSM IV критериите трае до две седмици и се характеризира с пет или повече от следните симптоми, които се наблюдават през по-голямата част от деня, почти всеки ден:

- Потиснатост и тъга;
- Умора или загуба на енергия;
- Проблеми със съня (безсъние или хиперсомния);
- Намален или повишен апетит със загуба или надаване на тегло (до 5% от телесната маса на месец);
- Липса на концентрация и нерешителност;
- Понижена двигателна активност (не само като субективно усещане, а също забелязана у пациента и от близките);
- Чувство на вина, песимизъм, безпомощност;
- Липса на интерес и загуба на удоволствие от живота;
- Суицидни мисли и опити.

Разграничаването на биполарната от униполарната депресия, доста често е трудна задача, особено при пациенти страдащи от биполарно разстройство тип II. Въпреки това съществуват някои основни различия между двете състояния. Най-общо за биполарната депресия са характерни силно пониженатa двигателна активност, чувство на безпомощност или безсилие, загуба на интерес към неща или действия, които преди това са доставяли удоволствие на пациента, атипична депресия (хиперсомния или надаване на тегло) [3], развитие на психотични симптоми (особено при пациенти в по-млада възраст) [4]. Значително се повишава рискът от самоубийство при депресия. Приблизително 17% от пациентите с биполарно разстройство тип I и 24% от тези с биполарно разстройство тип II извършват опит за самоубийство по време на тяхното заболяване [5]. Най-често това става в депресивната фаза на болестта, като пациентите с биполарно разстройство тип II са застрашени в изключително голяма степен.

В някои случаи се наблюдават и т.нар. смесени състояния, когато симптоми и от двата вида епизоди са представени едновременно в един пациент. Най-често срещаната картина при тези състояния е свръхактивност и ускорен мисловен процес, съчетани с депресивно настроение. Установено е, че 2/3 от пациентите с биполарно разстройство,

преминават през такова състояние в някакъв етап от заболяването си [6]. При някои пациенти могат да се наблюдават и психотични симптоми, като делюзии (налудности) и халюцинации, които са в съчетание с настроението на болния през този период. Психотични симптоми характерни за манийния епизод са налудностите за величие (за притежание на специални възможности, таланти), слухови и зрителни халюцинации. Типичните психотични симптоми за депресивния епизод са свързани главно с идеи за обедняване, силна виновност, недобро здраве (хипохондични делюзии).

Заболяването може да започне, както с мания така и с депресия, като съществува разлика по отношение на честотата на отделните цикли (периодът от началото на един епизод до преминаването му в друг или пълното му отзвучаване) и тяхната продължителност. При някои пациенти отделните епизоди се случват рядко (до един на година), като в периода между два епизода се наблюдава пълно възстановяване. При други се наблюдава по-честа смяна на епизодите, като не всички достигат пълно възстановяване между отделните епизоди. Съществува и друга група пациенти, при които се наблюдават минимум 4 епизода годишно (депресивни, манийни, хипоманийни или смесени). Това състояние е известно като бърза смяна на афективните епизоди (rapid cycling) и се наблюдава при около 15% от пациентите с биполарно разстройство. Описани са и пациенти с т.нар. ултра-бърза смяна на афективните епизоди, при които настроението се променя значително седмица за седмица или дори в рамките на един ден [7]. Проучвания върху пациенти с бърза смяна на епизодите и такива при които не се наблюдава такава смяна, направени през последните няколко години показват различия в развитието на заболяването и прогнозата [6]. Пациенти с бърза смяна на циклите се подават по-трудно на лечение, по-трудно понасят епизодите на депресия и имат по-голяма склонност към злоупотреба с вредни вещества. Въз основа на тези проучвания, днес вече се смята, че бързата смяна на циклите не зависи от пола и се среща еднакво както при пациенти от женски пол, така и при пациенти от мъжки пол, страдащи от биполарно разстройство [8].

В случаите, когато се наблюдава много бърза смяна на епизодите (наличие на манийни симптоми за няколко дни, сменящи се с типични депресивни симптоми в следващите няколко дни), чиято продължителност не отговаря на критериите за маниен или депресивен епизод (според DSM-IV) се диагностицира т. нар. биполарно разстройство от неспецифичен тип (Bipolar Disorder Not Otherwise Specified).

1.2.3. Епидемиология на биполарното разстройство

Проучване на Weissman и колеги, (1996) [9] показва, че разпространението на биполарното разстройство, в частност биполарното разстройство тип I, в различните расови групи и популации варира само в границите между 0.5 – 1.3%. Проведените по-късно редица епидемиологични изследвания показват риск от развитие на болестта между 1% и 2% [10], като въз основа на DSM-III-R и DSM-IV критериите, на биполарното разстройство тип I се пада приблизително 1%. В други европейски проучвания, процентът на разпространение на заболяването варира от 0.1% до 2.4% [11-13]. В своето проучване Weissman and Myers [14] установяват, че рискът от развитие на биполарно разстройство тип II е приблизително 0.6%, докато при други изследвания този риск варира от 0.2% до 2.0% [11].

Биполарното афективно разстройство може да има сравнително ранно начало, като първия епизод обикновено настъпва преди 30 годишна възраст. Проучване на националната асоциация за депресивни и манийно-депресивни заболявания (National Depressive and Manic-Depressive Association-NDMDA) открива, че 59% от пациентите изпитват първите симптоми на заболяването още по време на детските или юношеските си години. Въпреки тези данни е установено, че заболяването може да се манифестира и в по-късен етап от живота. Установено е, че при 9.3% от пациентите с афективни разстройства манийните епизоди могат да се проявят едва след 60 годишна възраст. Степента на повтаряемост на заболяването е доста висока, дори и при проведена терапия [10].

Биполарното разстройство тип I засяга еднакво и двата пола [15], като профила на симптомите може да се различава. Съществуват предположения, че жените имат склонност към повече смесени епизоди или епизоди на мания в сравнение с мъжете [16]. При изследване на голям брой пациенти с биполарно расзтройство, Baldassano и колеги [8] установяват значително по-висок процент на заболеваемост от биполарно разстройство тип II при жени (29%), в сравнение с мъжете (15.3%). В друго популационно проучване, базирано на DSM-III-R критериите (които изискват наличие на симптоми на хипомания най-малко 4 дни), Szadoczky и колеги [12] не установяват разлика между двата пола по отношение на заболеваемостта от биполарно разстройство тип II.

1.3. Етиология на биполарното разстройство

Биполарното афективно разстройство може да възникне в резултат от комбиниране на генетични, биологични, социални и психологични фактори, за изясняването на които са проведени редица проучвания. Резултатите от фамилни изследвания, изследвания на близнаци и осиновени деца сочат генетичния компонент като основен в етиологията на биполарното разстройство.

1.3.1 Фамилни проучвания

Големият брой фамилни изследвания проведени през последните години, недвусмислено сочи фамилният характер на заболяването, като се предполага, че родствениците от първа степен на пациенти с биполарно разстройство имат 5 -10 пъти по-висок риск за развитие на заболяването в сравнение с риска за общата популация [17]. Близките на болни от биполарно разстройство се намират в повишен риск от развитие на униполарно депресивно заболяване в сравнение с близките на незасегнати от заболяването. Според някои фамилни проучвания, рискът за развитие на биполарно разстройство тип II е по-висок сред роднини на пациенти с този тип заболяване в сравнение с роднините на болни с биполарно разстройство тип I [18-20]. Според други изследвания, родствениците на болни с биполарно разстойство тип II имат повишен риск за развитие и на биполарно разстройство тип I, което предполага, че тези афективни заболявания не са толкова различни в етиологично отношение [17].

Редица фамилни проучвания проследяват риска за заболяване сред роднини на болни в зависимост от началото на заболяването. Ранното начало на заболяването се свързва с повишен фамилен риск от развитие на афективно заболяване в редица проучвания [21-25]. При контролирано фамилно проучване, Geller и колеги [26] установяват, че рискът от развитие (prevalence) на биполарно разстройство тип I или униполарно депресивно заболяване за родственици от първа степен на болни с биполарно разстройство, чието начало е започнало в ранните юношески години възлиза на 46.5%. В допълнение, близките на болни със синдром на дефицит на вниманието и хиперактивността, имат повишен риск за развитие на биполарно разстройство.

1.3.2 Проучвания на близнаци

Наблюдаването на фамилност при едно заболяване може да подскаже участието на генетични фактори в неговата етиология, но не може да определи конкретната им роля и степен на влияние. За определяне на относителния дял на наследствените

фактори и факторите на околната среда в етиологията на комплексните заболявания (в това число и на биполарното разстройство), се използват проучванията на близнаци и на осиновени деца.

В основата на близначните проучвания е определянето на нивата на съвпадение (concordance (H)) по отношение на заболяването при монозиготни близнаци, (поделящи си еднакви гени - 100%) и при дизиготни близнаци (поделящи си само половината от гените - 50%), които обикновено имат доста сходни условия на живот.

При ранните близначни проучвания, също както и при фамилните изследвания, не се прави разлика между униполарното и биполарното заболяване. Поради тази причина, Tsuang and Faraone (1990) представят комбинирани резултати от 11 близначни проучвания, проведени в периода 1928-1986 г., при които пробандите имат "обобщен" фенотип: афективно разстройство. Според резултатите от тези изследвания, нивото на съвпадение (конкордантност) при биполарното разстройство е значително по-високо сред монозиготните близнаци (78%), в сравнение с дизиготните (29%). В най-обширното и информативно от тези проучвания, Bertelsen и колеги [27], използвайки данни от датския психиатричен регистър на близнаците, (пробандите са били диагностицирани с биполарно разстройство), установяват значително по-високо ниво на конкордантност за монозиготните близнаци (62%), в сравнение с дизиготните (8%). Друго близначно проучване [28] посочва нива на конкордантност от 38.5% и 4.5% за монозиготни и дизиготни близнаци, респективно. Резултатите от тези и други близначни проучвания проведени в последните години, базирайки се на съвременната класификация за биполарното разстройство, са обобщени в таблица 1.

Таблица 1: Изследвания на близнаци с биполарно афективно разстойство.

Проучване	Монозиготни близнаци (MZ)		Дизиготни близнаци (DZ)		Унаследяемост
	Брой близначни двойки	Конкордантност	Брой близначни двойки	Конкордантност	
Bertelsen et al., 1977	34	62%	37	8%	59%
Kendler et al., 1993	13	38.5%	22	4.5%	79%
Cardno et al., 1999	25	44%	33	9.1%	87%

McGuffin et al., 2003	30	40%	37	5.4%	85%
Kieseppa et al., 2004	7	42.9%	18	5.6%	93%

Тези изследвания установяват, че унаследяемостта (относителният принос на генетичния фактор по отношение на даден фенотипен белег) при биполарното разстройство варира в границите между 59% и 93%, което показва силното генетично присъствие в етиологията на заболяването. Въпреки това, фактът че наблюдаваната конкордантност дори при монозиготни близнаци е по-малка от 100%, недвусмислено показва въздействието на фактори и на околната среда [17].

1.3.3 Изследвания при осиновени деца

Адоптивните изследвания се оказват много полезни за разграничаване въздействието на генетичните фактори и факторите на околната среда в етиологията на биполарното разстройство. При тези проучвания се сравнява степента на заболеваемост при осиновени деца на засегнати родители и осиновени деца на нормални биологични родители или степента на заболеваемост между осиновени деца с болни биологични, но здрави приемни родители и осиновени деца със болни приемни родители (и здрави биологични родители) [17]. Броят на тези изследвания при афективните заболявания е доста малък, поради трудността при провеждането им, опасността от евентуално объркване и трудното им интерпретиране.

В две адоптивни изследвания участващите пробанди са с ясно определена диагноза – биполарно разстройство. В първото проучване, Mendlewicz и Rainer [29], сравняват нивата на заболеваемост между приемни и биологични родители на осиновени деца с биполарно разстройство и незасегнати осиновени деца. Резултатите показват, че честотата на афективните заболявания (униполарно, биполарно, циклотимия) е значително по – висока при биологичните родители на биполарни пробанди (31%) в сравнение с приемните родители на такива пациенти (12%) и в сравнение с биологичните родители на здрави осиновени деца (2%). Сходни са резултатите и от другото адоптивно проучване проведено от Wender и колеги [30].

1.4. Фактори на средата

Тъй като установената унаследяемост при комплексните заболявания, свързани с нарушения в невропсихическото развитие, е по – ниска от 100%, етиологията им очевидно включва и друг компонент, различен от генетичните фактори и това е главно

околната среда (т.е., стресови събития в живота). Редица фактори, действащи по време на ранното развитие на плода, могат да допринесат за развитие на заболяване, свързано с нарушения в невропсихическото развитие, включително недохранване на майката, всекидневно пушене, вирусни инфекции, многократен психологически стрес [31]. Повечето от тези фактори, обаче е трудно да бъдат определени.

Освен рискови фактори по време на ранното (пренатално) развитие, акушерските усложнения, които налагат реанимация, използването на кувьоз, преждевременното разкъсване на амниотичния сак и хориона, диабета, Rh несъвместимостта между майката и плода, кървенето, преждевременното раждане или раждане с цезарово сечение, могат да увеличат риска за развитие на психиатрично заболяване. [32, 33].

Редица изследвания предполагат, че сезонът на раждане също играе ролята на рисков фактор за развитието на умствено заболяване. В свое проучване Torrey и колеги (1996) [34] установяват, че повечето индивиди, страдащи от биполарно разстройство или шизофрения, са родени през зимно – пролетните месеци. Подобна тенденция е установена и при шизоафективното разстройство (периода от Декември до Март), униполарната депресия (Март – Май) и аутизма (Март) [35]. Освен сезона на раждане и мястото на раждане може да има отношение към заболяването. По – голям процент на заболели е отчетен сред хората родени в големите градове, в сравнение с тези родени в провинцията. [36]. Други рискови фактори могат да бъдат имиграция, осиновяване и т.н. [37, 38].

1.5. Унаследяване при биполарното афективно разстройство

Проведените през годините многобройни фамилни проучвания, проучвания на близнаци и осиновени деца категорично показват ролята на генетичните фактори в етиологията на биполарното заболяване, но не предлагат ясен модел за неговото унаследяване.

За дадено заболяване могат да се предположат три основни модела на унаследяване:

а) Заболяване, дължащо се на дефект в един единствен ген (single gene model).

b) Полигенен (многолокусен) модел, който предполага участието на голям брой гени в различни локуси, всеки от които индивидуално има малък ефект и сам по себе си не може да бъде причина за заболяване, но заедно всички тези гени водят до изява на болестта.

c) Заболяване, което се дължи на действието на факторите на околната среда.

На практика не съществува заболяване, което да се подчинява напълно на някой от гореспоменатите модели. Дори класически моногенни заболявания, напр. муковисцидозата, имат фенотипни модификатори, които може да са гени или фактори на околната среда. В този ред на мисли, биполарното афективно разстройство също не следва нито един от споменатите три модела изцяло. Ако се вземат предвид данните за рекурентния риск от многобройните генетични изследвания, рязкото намаляване на този риск в посока: монозиготни близнаци → роднини от първа степен → обща популация, по – скоро се обяснява с взаимодействието на няколко гена (епистаза). Това взаимодействие може да включва един ген с голям ефект и няколко с малък или няколко гена със среден ефект. Друга възможност е взаимодействие на голям брой гени, всеки от които е с малък ефект [39].

Въпреки голямата роля на генетичните компоненти в етиологията на заболяването се включват и фактори на околната среда, поради което се приема, че биполарното разстройство е мултифакторно заболяване. Според мултифакторния модел, предразположеността към дадено заболяване е променлива величина с Гаусов тип на разпределение в популацията и когато тази величина премине дадена граница (праг на развитие на болестта), заболяването се изявява [40].

Днес вече са познати генетични механизми, които не следват Менделовите закони, дават сложни модели на унаследяване и за които се предполага, че могат да бъдат свързани с биполарното разстройство. Пример в това отношение са динамичните мутации като експанзията на тринуклеотидни повтори, геномния импринтинг и митохондриалната наследственост [39].

Антиципацията е явление, което се характеризира с по – тежка клинична картина и по – ранно начало на заболяването с всяко следващо поколение Някои неврологични/невропсихиатрични заболявания като болестта на Хънтингтън, миотоничната дистрофия, синдрома на чупливата Х хромозома, при които се

наблюдава антиципация, се дължат на удължаване на тринуклеотидни повтори във всяко следващо поколение. Няколко проучвания разкриващи антиципация и при биполарното разстройство, предполагат, че експанзия на тринуклеотидни повтори може да играе роля в патогенезата на заболяването. В съгласие с тази хипотеза четири независими асоциативни проучвания показват, че тези повторени последователности са много по – големи при пациенти с биполарно разстройство в сравнение със здрави индивиди [41-44]. Тази асоциация обаче, не е потвърдена в други изследвания.

Геномният импринтинг е процес, при който се наблюдава различна експресия на болестни алели в зависимост от родителският им произход. Явлението е демонстрирано при хромозомни заболявания като синдрома на Prader-Willi/Angelman [45] и някои видове наследствен рак [46] и е свързано с метилиране на болестни алели по време на мейоза, което води до деактивация или намалена експресия на генния продукт [47], но може да зависи и от други механизми [48]. Въпреки проведените през годините изследвания [49-55], ролята на геномния импринтинг при унаследяване на биполарното разстройство все още не е категорично доказана. Изследвайки 31 семейства с болен пробанд и само един засегнат от болестта родител, McMahon и колеги (1995) [56] наблюдават по – висока (от очакваната) честота на засегнати майки в сравнение със засегнати бащи ($P < .04$), 2.3-2.8 пъти по – висок риск за развитие на болестта за роднини по майчина линия в сравнение с роднините по бащина линия ($P < .006$) и 1.3-2.5 пъти по – висок риск за заболяване за потомството на засегнатите жени ($P < .017$), в сравнение с това на засегнати бащи.

В друго изследване, Stine и колеги (1995) [57] анализират 28 семейства (болен индивид, лекуван за заболяването, със засегнати братя/сестри и само един засегнат родител) използвайки 31 полиморфни маркера по дължината на хромозома 18. Анализът на засегнатите сибси (ASP method) установява повече предадени в поколението бащини алели в сравнение с майчините за три маркера в дългото рамо на хромозома 18 (18q). Най – силно доказателство за скаченост е получено за семействата в които засегнат е бил бащата или негов брат/сестра. Противоречиви резултати относно ролята на геномния импринтинг при биполарното разстройство са получени и в две скорошни изследвания на серотониновия 2A рецепторен ген (*HTR2A*) [58, 59].

Под митохондриална наследственост се разбира предаването на даден белег, обусловен от митохондриалната ДНК (mtDNA) по майчина линия [60]. Допуска се, че митохондриалната дисфункция играе роля в патофизиологията на биполарното

разстройство на базата на: нарушен енергиен метаболизъм, акумулиране на митохондриални ДНК мутации в мозъка, ефект на лекарствата стабилизатори на настроението върху митохондриите и коморбидността на болестите на настроението (афекта) с митохондриалните заболявания [61]. Митохондриалната дисфункция е свързана с нарушен процес на енергийна продукция. Митохондриална дисфункция е изследвана при пациенти с мозъчни заболявания, включително невродегенеративни и психиатрични болести [62, 63]. Мутации в митохондриалната ДНК са причина за някои мозъчни заболявания, като митохондриалната енцефаломиопатия с лактатна ацидоза и инсулто-подобни епизоди (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes, MELAS) [64], заболявания, като наследствената очна невропатия на Leber (Leber hereditary optic neuropathy) [65], а също и за някои по – често срещани болести, като глухота [66]. Данни за наличие на митохондриална дисфункция има и при индивиди страдащи от Алцхаймер, Хънтингтън, Паркинсон. Варианти в митохондриалния геном са били свързани и с патогенезата на биполарното разстройство и шизофренията [61, 67-80]. Няколко проучвания разкриват асоциираност на полиморфизми в митохондриалните гени *MTND1*, *MTND3*, *MTND4* и *MTND5* с биполарното разстройство и шизофренията [73, 74, 81, 82]. Въпреки многобройните изследвания, все още остава неизяснен въпросът, дали при пациенти с митохондриални заболявания, наличието на психиатрични симптоми е просто случайност или двете състояния наистина са пряко свързани.

1.6. Хромозомни нарушения свързани с биполарното разстройство

Откриването на хромозомни нарушения при индивиди с умствено заболяване, може директно да насочи към определен хромозомен район, съдържащ кандидат гени, предразполагащи към развитие на съответното заболяване. Ако аномалията е унаследена, нейната ко – сегрегация със съответното заболяване може да бъде тествана чрез анализ за скаченост. В случаите, когато изследваното семейство е малко, вероятността тази асоциация да е истинска се увеличава при положение, че хромозомната аномалия се намира в район, за който предишни изследвания разкриват скаченост или асоциация [83].

St Clair и колеги [84] откриват балансирана реципрочна хромозомна транслокация t(1;11)(q42.1;q14.3), която ко – сегрегира с няколко психиатрични състояния, като униполарно разстройство и шизофрения в голяма шотландска фамилия. Blackwood и колеги [85], изследвайки същото това родословие откриват членове,

носещи транслокацията, болни от биполарно разстройство. Систематичното физическо картиране в точките на счупване на транслокацията, установява кандидат гените (DISC1, DISC2) за психоза в това семейство [86, 87].

Хромозомна аберация, засягаща девета и единадесета хромозоми, описана в малко родословие, ко – сегрегира с афективното разстройство. Изследването установява петима носители на транслокацията болни от биполарно разстройство, един от членовете на семейството, страдащ от депресивно разстройство с ранно начало и само един незасегнат носител на транслокацията [88]. Последвалото по – задълбочено проучване, включващо допълнително членове на фамилията, установява точките на счупване t(9;11)(p24;q23.1), но открива други четири здрави носители на транслокацията [89].

Calzolari и колеги [90] описват двама пациенти от едно семейство с частична тризомия на хромозоми 15 (pter-q13.3) и 18 (q23-qter), от които единият е с биполарно разстройство, а другият с шизоафективно заболяване. Въпреки това, проведените изследвания за скаченост при шизофрения не представят убедителни данни в подкрепа на тази находка [91, 92].

Цитогенетичните изследвания на пациенти с умствени заболявания, проведени през годините, установяват че хромозома 18 е една от първите хромозоми, идентифицирана като аберантна при тези пациенти [93].

При частична или пълна делеция на дългото рамо на 18-та хромозома, се наблюдават характерните за този делеционен синдром (18q- deletion syndrome) признаци, включващи: изоставане в различна степен в умственото развитие, езикови трудности, аутизъм [94]. При частична или пълна делеция на късото рамо на 18-та хромозома (18p - deletion syndrome) се наблюдават отново дисморфични черти, закъснение в развитието, умствено изоставане, речеви аномалии [95]. При наличие на пръстеновидна „ring” 18-та хромозома (Ring chromosome 18 syndrome) клиничната картина включва дисморфични черти, речеви дефекти, умствено изоставане, проблемно поведение, което се изразява в раздразнителност, агресивност или социална изолация [93].

Рядка хромозомна аномалия inv(18)(p11.3;q21.1) е описана в две фамилии, една датска и една шотландска, членовете на които са страдали от биполарно разстройство и

шизофрения. [96]. Предполага се, че в тези райони на 18-та хромозома има гени, които са свързани с тези заболявания [97].

Таблица 2 показва някои от аберациите в хромозома 18, открити при пациенти с афективно разстройство и шизофрения.

Таблица 2: Нарушения в хромозома 18 при пациенти с биполарно афективно разстройство и шизофрения

Заболяване	Хромозомно преустройство	Позиция
Афективно разстройство	r(18) [familial]	18p11-pter, 18q23-qter
	t(2;18)(q21q23) [familial]	18q23
	inv(18)(p11.3q21.1) [familial]	18p11.3, 18q21.1
Шизофрения	46,XX,del (18)(p1)	18p1
	inv(18)(p11.3q21.1) [familial]	18p11.3, 18q21.1
	t(15;18)(q13.3q22.3) [familial]	18q22.3

Висока честота на психиатрични заболявания (шизофрения) е наблюдавана при пациенти с вело – кардио – фациален синдром (Velo-Cardio-Facial Syndrome – VCFS). Заболяването е свързано с интерстициални делеции на 22q11.2 хромозомен район и се характеризира с множество тежки вродени малформации. Пациенти с този синдром имат повишен риск от развитие на шизофрения. При 30% от пациентите се наблюдава поне един епизод на психоза, а приблизително ¼ развиват шизофрения [98]. Повишеният риск от развитие както на шизофрения, така и на биполарно разстройство сред пациенти с VCFS синдром е потвърден и от други изследвания [99-101].

1.7. Подходи за картиране на гени при комлексните заболявания

Човешкия геном е изключително голям и съдържа хиляди гени. Поради тази причина, откриването на определен ген/гени, отговорни за дадено заболяване не винаги е лесна задача. Генното картиране има за основна цел да установи местоположението на генетични варианти в генома, използвайки други генетични маркери с известна локализация. Обикновено гените или локусите, които трябва да бъдат картирани са тези, които предразполагат към развитието на дадено заболяване (болестни локуси). Две са основните групи подходи, които се използват за постигане на тази цел: анализ за скаченост (Linkage mapping), който се провежда в големи родословия и асоциативни проучвания (Linkage disequilibrium mapping) на ниво популация. Двата подхода се различават значително по своя дизайн, статистическа сила за установяване на

асоциация, резолюция и риск от фалшиво позитивни резултати. Анализите за скаченост не изискват познаване патофизиологията на заболяването и при тях се детектират гени с голям ефект на големи разстояния. За разлика от тях, асоциативните проучвания откриват гени с малък ефект на малки разстояния, като при тях е необходимо да се познава добре биологията на изследваното заболяване. На практика двата подхода много често се комбинират [102].

1.7.1 Анализ за скаченост

1.7.1.1 Параметричен анализ

При анализа за скаченост се проследява ко-сегрегацията между даден фенотип и определен генетичен маркер в поколението. При този метод се изследват големи родословия с няколко засегнати от болестта индивида с помощта на голям брой генетични маркери (микросателити), разпръснати из целия геном. Ако един ген е отговорен за развитието на дадено заболяване, то се очаква, че засегнатите членове на изследваното родословие са унаследили един и същи болестен алел в дадения локус, а маркерите, намиращи се физически близо до болестния ген ще бъдат унаследени заедно с болестния алел. При използване на достатъчно голям брой генетични маркери, поне един от тях ще се окаже достатъчно близо до болестния локус, така че неговия начин на унаследяване ще съвпадне с начина на унаследяване на заболяването в семейството.

В основата на скачеността стои факта, че две ДНК секвенции (два гена) намиращи се на една хромозома са физически свързани в група и могат да бъдат разделени само чрез кросинговър (обмяна на генетичен материал между хомоложни двойки хромозоми) по време на мейоза.

Анализът за скаченост се основава на принципа, че вероятността за рекомбинация между два гена при мейозата е пропорционална на разстоянието между тях. Колкото по - близко разположени един до друг са два гена, толкова по – малка е вероятността по време на мейоза между тях да протече кросинговър и те ще се предават заедно (скачено) във всяко следващо поколение.

По честотата на рекомбинация между два гена може приблизително да се съди за разстоянието между тях. Ако между два гена се наблюдава рекомбинационна фракция $\theta = 0$, то това означава, че между тях не е протекла рекомбинация, т.е. разстоянието между тях е много малко. За такива гена се казва, че са в пълна скаченост (complete linkage). При рекомбинационна фракция 0.5, двата гена са много отдалечени

един от друг в рамките на хромозомата или са разположени на различни хромозоми и се предават независимо един от друг в 50% от случаите. Честотата на рекомбинация не е еднаква в целия геном. В някои райони на хромозомите се наблюдава увеличена честота на рекомбинация (т. нар. горещи рекомбинационни точки). Рекомбинационните честоти могат да варират между половете и в зависимост от това дали локусите са разположени в теломерните или центромерните участъци на хромозомата. Генетичните разстояния се измерват в cM, като 1 cM отговаря на честота на рекомбинация една на всеки 100 мейози (или рекомбинационна фракция 0.01).

Успешното прилагане на анализа за скаченост изисква уточняване стойностите на няколко променливи, а именно болестен статус, модел на унаследяване на заболяването (доминантен, рецесивен), както и честота и пенетрантност на болестния алел (т.е., вероятността даден индивид да е болен, ако се приеме, че е носител на този алел). Традиционният статистически подход, използван за оценка на значимостта на резултатите от параметричния анализ за скаченост е т.нар. LOD score анализ (Logarithm of the Odds) [103]. LOD стойността се изчислява като десетичен логаритъм от отношението между вероятността наблюдавания от анализа резултат да се дължи на истинска скаченост между двата изследвани локуса, при определена рекомбинационна фракция θ и вероятността, резултатът да се дължи на случайност и двата локуса да не са скачени (при θ=0.5) и се изразява със следната формула:

$$\text{LOD score} = \log_{10} \frac{\text{Вероятността } (\theta)}{\text{Вероятността } (\theta=0.5)}$$

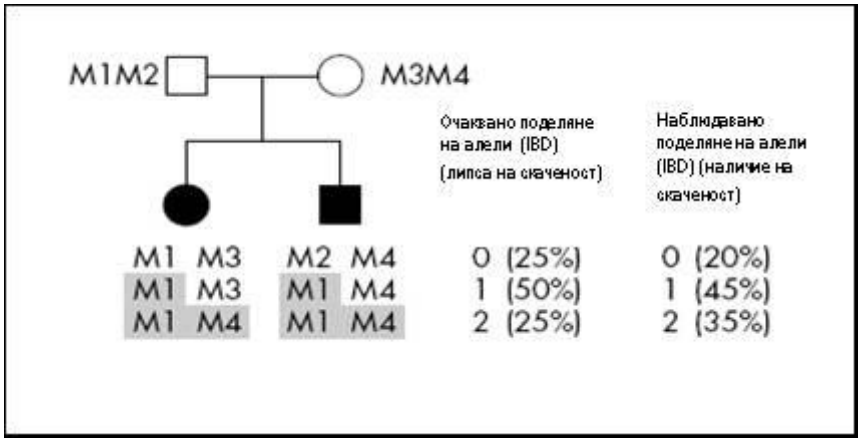
Тази LOD стойност се изчислява за широк диапазон от стойности на θ, а максималният получен резултат се приема като мярка за степен на скаченост. Максимална LOD стойност 3.0 или повече се приема като категорично доказателство за наличие на скаченост, докато стойност -2 при дадена θ, се приема като доказателство за абсолютна липса на скаченост. LOD стойността може да бъде изчислена въз основа на данни от анализа на един маркерен локус и болестния локус (single-point analysis), а могат да бъдат анализирани и повече маркерни локуси (multipoint analysis). Едно допълнение на традиционния LOD score анализ, включва и локусната хетерогенност (възможността едно заболяване да е резултат от мутации в различни локуси) като параметър и в тези случаи се изчислява т. нар. HLOD (heterogeneity LOD). [104].

LOD score анализът е изключително полезен при картиране на гени за моногенни заболявания, подчиняващи се на Менделовите закони, чиито параметри

лесно могат да бъдат определени. С помощта на този анализ са открити и картирани гените за около 1000 моногенни болести. При комплексните заболявания, каквото е биполарното афективно разстройство, този вид анализ няма такъв успех. Индивиди, смятани за незасегнати могат да развият заболяването в по – късен етап от живота си. Тук моделът на унаследяване на заболяването, пенетрантността и честотата на болестния алел не могат да бъдат определени със сигурност. Ето защо при изследването на тези заболявания по – подходящ е непараметричният анализ за скаченост [104].

1.7.1.2 Непараметричен анализ

Този анализ се основава на сравнение между наблюдаваното и очаквано поделяне на еднакви алели, известно като идентичност по произход (identity by descent, (IBD) между двойки засегнати родственици. Най – широко използваният метод при непараметричния анализ за скаченост е метода на засегнатите сибси (affected sib pair (ASP) method). Засегнатите сибси се генотипират за голям брой генетични маркери (няколко стотин). За заболявания, чието начало е сравнително късно, родителите на засегнатите индивиди не могат да бъдат анализирани, но поделянето на алелите между тях въпреки това може да бъде проследено. При липса на скаченост, степента на поделяне на маркерния алел M1-4 (Фигура 1) между засегнатите сибси е нула, един или два алела (идентични по произход, IBD), което е резултат от съвместния произход. Това се очаква да се случи в 25% (липса на поделяне), 50% (един поделен алел) или 25% (два поделени алела) от случаите, при положение, че е вярна нулевата хипотеза за липса на скаченост. Както се вижда от Фигура 1, при наличие на скаченост се наблюдава увеличаване на степента на поделяне на алелите и отклонение от очакваното разпределение.



Фигура 1: Принцип на непараметричния анализ за скаченост при използване на засегнати братя/сестри (ASP). Поделените алели са оцветени в сиво. Засегнатите индивиди от двата пола са изобразени с черно квадратче и кръгче. [105]

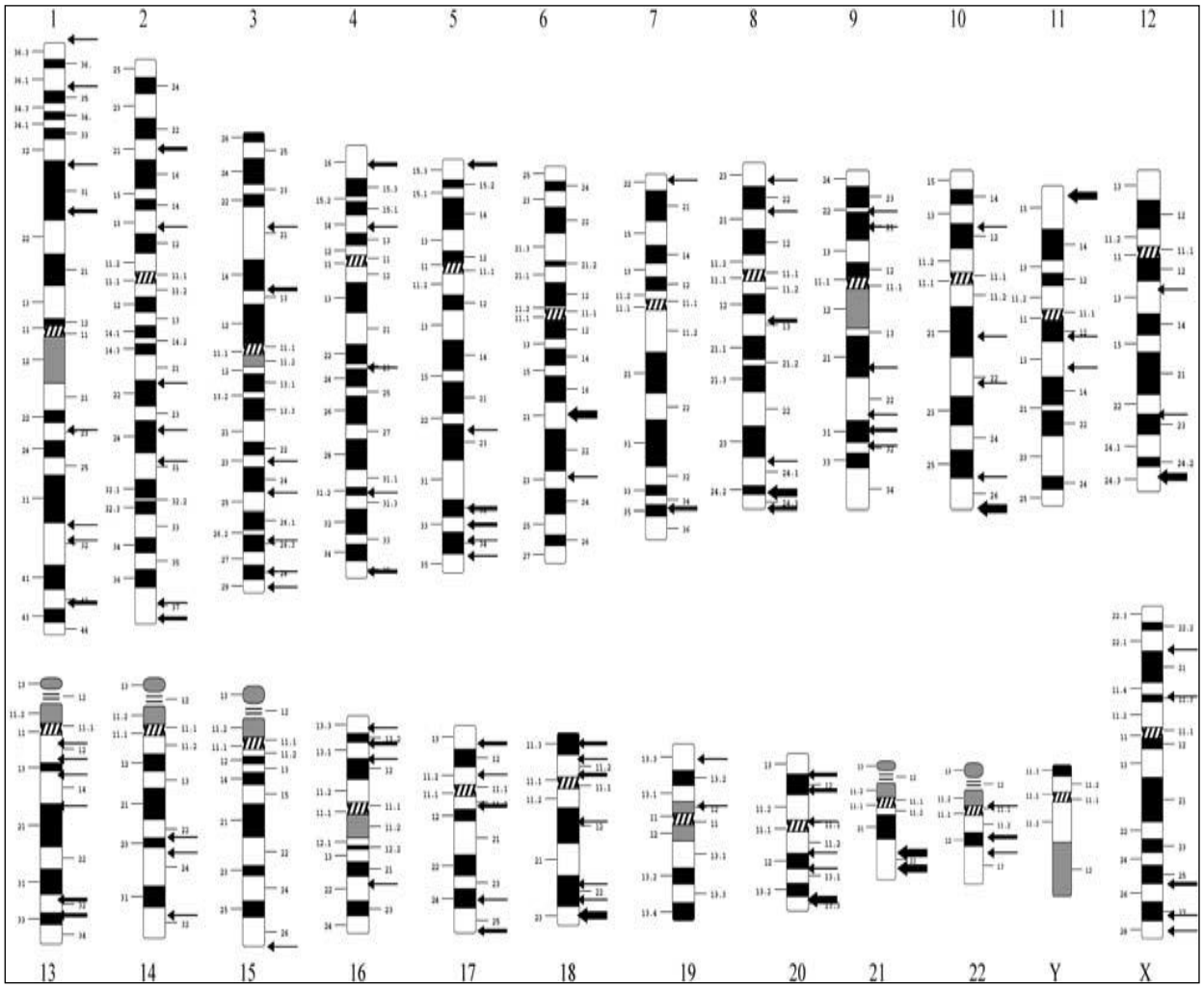
Този метод е изключително удобен при картиране на гени отговорни за комплексните заболявания, при които точният модел на унаследяване не е ясен. За категорично установяване на скаченост, обаче, тук е необходимо да се анализират голям брой засегнати сибси (500 – 1000). Тъй като реалното IBD поделяне не винаги може да бъде определено със сигурност, за преодоляване на този проблем са разработени различни методи на вероятностите. Те ползват т.нар. ЕМ алгоритъм (expectation-maximization algorithm), за да увеличат в най – голяма възможна степен наблюдаваните вероятности за поделяне, произвеждайки разновидност на LOD стойността, известна като максимална LOD стойност (**M**aximum **L**od **S**core, MLS). И тук, както при параметричния анализ за скаченост, изследването може да се проведе въз основа на данни от единичен маркерен локус (single – point analysis) или от голям брой локуси (multipoint analisys).

Друг вид анализ, позволяващ да се проследи поделянето на алелите между по – отдалечени родствено индивиди, е анализа на засегнатите членове на родословието (affected-pedigree-member (APM) method). Методът се базира на факта, че ако маркерния локус е близо до болестния, то тогава засегнатите индивиди в една фамилия би трябвало да проявяват повече сходство по отношение на маркерния локус, от колкото това би се очаквало при случайност на събитията. APM оценява сходството в маркерите от гледна точка на идентичността по положение (identity by state, IBS) на алелите на тези маркери. Два алела са IBS ако са идентични независимо от техния произход. Получената информация от всички маркери се тества за скаченост или в двойка засегнати индивиди (S_{pairs} statistic) или в пълната група от засегнати родственици във фамилията (S_{all} statistic) [104].

1.7.2 Преглед на кандидат райони за биполарно разстройство, получени чрез анализ за скаченост

И двата вида анализи за скаченост: параметричен и непараметричен са широко използвани при генетичните изследвания на биполарното разстройство. В резултат на многобройните изследвания проведени през годините, много райони от човешкия геном са били асоциирани с биполарното афективно разстройство (Фигура 2). Тези от

тях, за които е получен положителен резултат за скаченост със заболяването в повече от едно проучване са известни като ‘горещи точки’ в човешкия геном и са упоменати в Таблица 3



Фигура 2: Хромозомни райони показали скаченост с биполарното афективно разстройство. Удебелените черни стрелки, посочват районите показали по-силна скаченост със заболяването (Idiogram album (Human copyright 1994 David Adler), Department of Pathology, University of Washington)

Таблица 3: Хромозомни райони в човешкия геном, изследвани и потвърдени чрез анализ за скаченост, като асоциирани с биполарното разстройство.

Генен локус	*Изследване	Извадка	Lod score/ P-стойн.	**Независимо изследване	Извадка	Lod стойност/ P-стойн.
18p11.2	Berrettini et al., 1994	22 семейства	2.4	Stine et al., 1995;	28 семейства	P=.0003
				Nothen et al., 1999;	57 семейства (Германия)	2.5
21q22	Straub et al., 1994	Многочислено семейство (Израел)	3.4	Detera-Wadleigh et al., 1996;	22 семейства	P=0.049- .0008
				Smyth et al., 1997;	23 семейства	3.9
				Kwok et al., 1999;	12 родословия (Австралия)	P<0.001
				Kelsoe et al., 2001	20 северно-американски семейства	2.04
22q11–13	Kelsoe et al., 2001	20 северно-американски семейства	3.8	Detera-Wadleigh et al., 1999	22 семейства	2.1
				Lachman et al 1997	13 семейства (САЩ)	2.5
18q22	Stine et al., 1995	28 семейства	3.5	McMahon et al., 1997;	30 семейства	2.8
				Freimer et al., 1996	Родословия от Коста Рика	Z=4.06
12q24	Morissette et al., 1999	1 семейство от Канада	2.5	Ewald et al., 1998;	2 семейства (Дания)	3.4
				Curtis et al., 2003	7 семейства	2.8
4p16	Blackwood et al., 1996	Многочислено семейство (Шотландия)	4.8	Ewald et al., 1998;	2 семейства (Дания)	2.0
				Detera-Wadleigh et al., 1999	Родословие с 39 члена	3.2

* P=~0.00002; ** P=~0.001

Други хромозомни райони, представляващи интерес са: 5p15.33, 6q21, 8q24.22, 10q26.2, 11p15.5, 13q32.1–3, 17q25.3, 20q13.33, Xq26.1 [106].

Обединявайки данните от седем геномни скана при биполарното разстройство, Badner и Gershon [107] установяват, че два хромозомни района - 13q и 22q са най – силно скачени с биполарното афективно разстройство.

Segurado и колеги [108] също публикуват резултати от геномен мета-анализ, в който са използват данните от 18 предишни геномни изследвания за скаченост с биполарното разстройство. Не е намерен район, за който да са получени силни статистически значими P-стойности, за разлика от мета-анализа на родословия с болни от шизофрения. Единствено за 9p22.3-21.1, 10q11.21-22.1 и 14q24.1-32.12, P-стойността е <0.01 и за 18p11-q12.3 и 8q24.21-qter, P-стойността е <0.05, което показва, че е необходим по-голям брой семейства за този тип изследвания. Геномният мета-анализ би могъл да потвърди ролята на някои кандидат райони, но не и да отхвърли такива.

Хромозомен локус 6q16–q25 се смята също за един от добрите кандидат райони скачени с биполарното разстройство. Въпреки че този район не е включен в нито един от двата проведени мета – анализа, неговата асоциация със заболяването е потвърдена в два геномни скана [109, 110].

От по-горе изложените резултати могат да се направят следните заключения за търсенето на гени, отговорни за биполарното разстройство чрез анализ за скаченост:

(1) Не съществува един единствен локус, установен при всички изследвания. Освен това в редица проучвания са намерени повече от един локус в рамките на едни и същи изследвани семейства [111, 112]. Това ясно потвърждава, че биполарното разстройство не е свързано с дефект в единичен генен локус.

(2) Възможно е в големите семейства отделни гени да създават по-голямо предразположение на индивидите към заболяването. Все пак липсата на статистически значими резултати от изследвания на засегнати братя и сестри ($P<10^{-4}$) показват, че това рядко се случва. По-скоро става въпрос за голям брой гени, всеки от които има малък ефект. В този случай е необходимо да се изследват голям брой засегнати сибси за да може да се намерят отговорните гени.

1.7.3. Асоциативни проучвания

Успешното картиране на даден болестен ген в миналото се дължи най – вече на факта, че първите генетични заболявания, изучавани при хората са били моногенни болести, високо пенетрантни и са следвали Менделовия тип унаследяване. Повечето от гените отговорни за тези заболявания са идентифицирани именно чрез анализа за скаченост, който въз основа на данните, събрани от отделни засегнати семейства, определя районите които ко – сегрегират със заболяването в тези семейства или в отделните поколения при големи родословия. При често срещаните социално значими заболявания (шизофрения, афективни разстройства, аутизъм, астма, епилесия, мултиплена склероза), които засягат все по – голяма част от населението и имат комплексна генетична основа, фамилните проучвания чрез анализ за скаченост нямат този успех [113]. Типично за тези заболявания е, че получените положителни резултати за скаченост от няколко изследвания се отнасят за различни хромозомни райони и липсва повтаряемост на тези положителни резултати при други независими изследвания [114]. Ето защо, при картирането на болестните локуси за комлексните заболявания, като алтернативен подход се използват асоциативните проучвания, които се базират на предположението, че комплексните заболявания се причиняват от голям брой различни гени, всеки от които допринася по малко (има малък ефект) за развитието на заболяването.

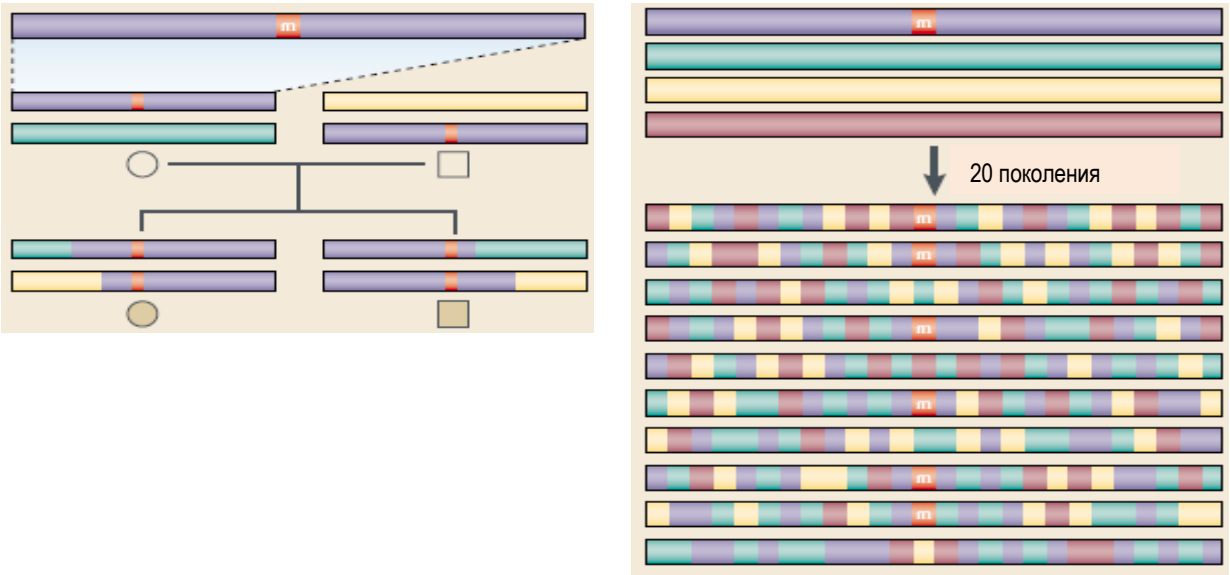
Като алтернативан подход, асоциативните изследвания имат някои предимства пред анализът за скаченост. При тях няма нужда от изследване на големи фамилии с множество засегнати родственици, както и не е необходимо предварителното задаване на модел на унаследяване на заболяването. Тези изследвания са по – мощни при детекцията на гени с малък ефект, при използване на достатъчно голяма извадка и при по – високи алелни честоти [115, 116].

Неравновесна скаченост (Linkage Disequilibrium, LD)

Както анализът за скаченост, така и генетичната асоциация се базират на сходни принципи: ко – унаследяване на свързани помежду си ДНК варианти, например мутация (m) и даден генетичен маркер. Докато при анализа за скаченост такива варианти се проследяват в рамките на няколко поколения от едно родословие, където съществуват значително по-малко възможности за протичане на рекомбинация, то асоциацията отразява степента на запазване на такива комбинации от варианти в рамките на много поколения, което зависи от много повече рекомбинантни събития,

случили се в популацията в исторически аспект. При анализът за скаченост, идентифицираните хромозомни райони, съдържащи потенциални болестни локуси, са много обширни (Mb) и могат да включват стотици, дори хиляди гени (фигура 3А). При изследвания на популации, в които протичат случайни кръстосвания между индивидите, с всяко следващо поколение рекомбинациите ще разделят мутантния вариант (m) от все повече маркерни варианти и само най-близко разположените ще се предават заедно през много поколения (фигура 3Б). Това явление е известно като неравновесна скаченост (Linkage Disequilibrium; LD) или алелна асоциация и предствлява методологичната основа на повечето асоциативни проучвания.

А Б



Фигура 3: Скаченост на ДНК варианти при А) анализ за скаченост и Б) асоциативни проучвания. (Cardon and Bell, 2001)

Неравновесната скаченост е нестабилна за дълъг период от време и се променя с всяко следващо поколение, като обикновено намалява. Районите с неравновесна скаченост са малки и обхващат един ген или дори част от ген [117].

Редица изследвания се опитват да открият на какво разстояние се простира неравновесната скаченост в човешкия геном. Оказва се, че тя показва значителна вариабилност: от няколко kb [118] до 60-100kb [119]. Reich и колеги [120] установяват, че за една и съща популация – напр. американци от северноевропейски произход, пълната неравновесна скаченост в някои части на генома покрива райони с дължина до 155 kb, докато в други части, районите в LD са не по-големи от 6 kb. Освен това, моделът на неравновесната скаченост е различен при различните популации. Например,

за африканските популации са характерни по-малки участъци в LD 5-8kb, за европейските и азиатските популации средната дължина на районите с LD е 22kb [120, 121]. Тези данни показват, че неравновесната скаченост освен от рекомбинацията се повлиява от редица други фактори: популационно специфични демографски събития (смесване, бракове между близки родственици, етническо разнообразие, миграции и избирателно кръстосване) и от биологични процеси (рекомбинация, генна конверсия, генетичен дрифт, естествен отбор) [122]. Тя зависи значително и от възрастта на популацията и броя на основателите ѝ.

Сред първите единици използвани за оценяване на степента на неравновесна скаченост е популационния генетичен параметър D. При наличие на два съседни локуса – А и В с алели *A*,*a* и *B*,*b* в съответния локус, наблюдаваната честота за хаплотипа, съдържащ алелите *A* и *B*, може да бъде представена като P_{AB}. При положение, че алелите в двата локуса се групират независимо, очакваната хаплотипна честота е произведение от алелната честота на всеки от двата алела (P_A x P_B), където P_A е честотата на алел *A* в първия локус, а P_B – честотата на алел *B* във втория локус. Оттук

$$D= P_{AB} - P_A \times P_B$$

Поради силната зависимост на този параметър от алелните честоти, днес едни от най – широко използваните единици за измерване на неравновесната скаченост между маркерите са D' и r^2. D' се определя от отношението на популационния генетичен параметър D, разделен на максималната стойност на D и се изразява със следната формула:

$$D'=D/Dmax$$

Стойността на D' може да варира от 0 до 1. D'=1 говори за пълно LD, което означава, че двата маркера не са били разделени от рекомбинация, мутация, или генна конверсия. D'=1, дори когато един хаплотип липсва и е по – малко от 1, когато всичките възможни четири хаплотипа (за два биалелни маркера) са представени в популацията. Стойности на D'<1 показват, че пълното LD е нарушено и не могат да бъдат интерпретирани ясно (трудно е да се каже каква е разликата между D'=0.3 и D'=0.7). Стойностите на D' зависят от размера на използваната извадка. При използване на малки извадки, оценката за D' е силно завишена, поради което високи стойности могат да се получат дори когато маркерите са в равновесие. Стойности на D' близки до 1 говорят за малък брой рекомбинации в исторически аспект. Средни

стойности на D’ не могат да бъдат използвани за сравняване силата на LD или за измерване степента на неравновесна скаченост. Ето защо при проучванията предпочитана единица за сравняване и определяне степента на неравновесна скаченост е корелационният коефициент r^2 (често отбелязван като Δ^2). Този коефициент, който до известна степен е алтернативен на D’, отразява връзката между алелите в два локуса и се изчислява като отношение между D^2 и произведението от четирите алелни честоти в локусите, изразено със следната формула:

$$r^2=D^2/P_AP_aP_BP_b$$

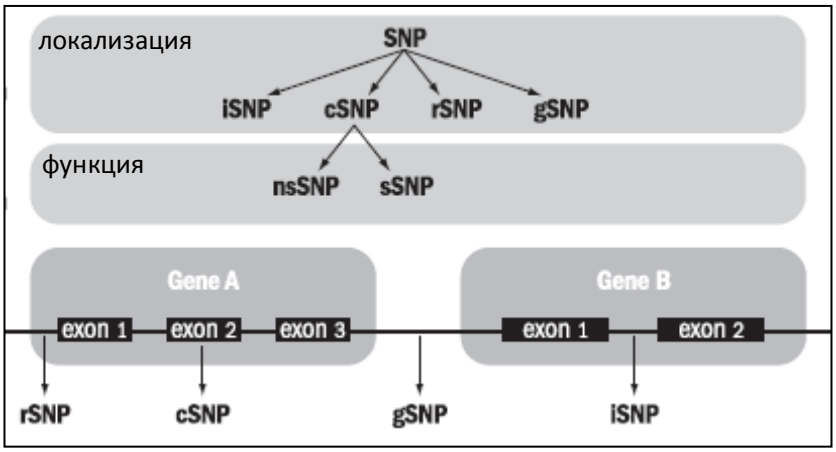
$r^2=1$ се означава като абсолютно LD (perfect LD) и се наблюдава само при положение, че двата маркера не са били разделени от рекомбинация и имат еднакви алелни честоти. В този случай ще се наблюдават точно два от четири възможни хаплотипа (*A, B* и *a, b*). Когато два маркера са в абсолютно LD данните от единия маркер са напълно достатъчни, за да се получи пълна информация за другия маркер, което прави излишно неговото генотипиране. Стойностите на r^2 не се влияят от размера на извадката, но зависят от алелните честоти на маркерите [113].

Генетични маркери използвани при асоциативните проучвания

Поради своето изобилие и гъстота в човешкия геном, SNPs са идеални полиморфни маркери при асоциативни изследвания на комплексните заболявания и се използват за установяване на гените, отговорни за дадено заболяване, както и за идентифициране на мутациите в тези гени. Те представляват замени на единични нуклеотиди, които се срещат с честота >1% в поне една популация. Поради изключително голямата роля на този вид полиморфизми за генетичните проучвания на болестите при човека и фармакогенетиката, през 1999 год. е учреден т.нар. SNP Consortium, с цел да се създаде библиотека на всички SNPs в човешкия геном [123]. До момента в общо достъпната база данни dbSNP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/, Genome build 36.3, dbSNP build 130) са открити и депозирани над 10 млн. SNPs.

Според местоположението си SNPs биват: *интронни* (iSNPs, разположени в интронните участъци на гените), *кодиращи* (cSNPs – в екзоните), *регулаторни* (rSNPs – в регулаторните райони на гените) и *интергенни* (gSNPs – в районите между два гена). В зависимост от функцията, която изпълняват, кодиращите SNPs се подразделят на синонимни (sSNP, synonymous SNP) –водещи до замяна на еднотипни аминокиселини;

тихи мутации) и несинонимни (nsSNP, non-synonymous SNP) –водещи до замяна на разнотипни аминокиселини) (фигура 4).



Фигура 4: Видове SNPs, според тяхната локализация и функция

Несъмнено най – интересни за анализиране са кодиращите SNPs, водещи до замяна на разнотипни аминокиселини (замяна на основна с киселинна аминокиселина), тъй като този тип замени водят до структурни и функционални промени на съответния генен продукт. Тези полиморфизми обаче са най-рядко срещаните (~5%) и най-малко хетерозиготни в сравнение с останалите SNPs, което е нормално като се вземе предвид действието на естествения отбор. Близо 60% от всички кодиращи SNPs, водещи до аминокиселинна замяна, имат честота на редкия алел <5% [124]. Поради тези причини, при традиционния анализ на индивидуални маркери се включват и полиморфизми локализирани в некодиращите райони на гена и дори в извънгенните области, тъй като те могат да са в неравновесна скаченост с все още неизвестен функционален полиморфизъм, който създава предразположение за развитие на дадено заболяване. Въпреки това обаче "истинската" асоциация може да бъде пропусната поради това, че не са избрани точно тези варианти, които са в неравновесна скаченост с тях. При асоциативни изследвания на отделни SNPs в даден ген, получените негативни резултати не отхвърлят категорично гена като кандидат ген. От друга страна, позитивните резултати не означават, че е открит точния отговорен SNP, а просто SNP тясно скачен с него, който понякога може да се намира на доста голямо разстояние (дори няколко гена) [125]. Затова в последните няколко години при асоциативните изследвания, анализирането на единични, случайно избрани SNPs се комбинира с анализиране на хаплотипи.

При дизайна и интерпретацията на асоциативните изследвания е много важно да се разбере хаплотипната стуктура на човешкия геном. Хаплотипът представлява специфична комбинация от алели, наблюдавана в дадена популация. Когато възникне нова мутация, тя засяга специфичен хаплотип. Асоциацията между един мутантен алел и хаплотипа, от който той произлиза (ancestral haplotype), може да бъде нарушена само при възникване на мутация или при протичане на рекомбинация в следващите поколения [121].

При липса на неравновесна скаченост между SNPs, техните алели формират привидно случайни комбинации, в следствие на което се наблюдават голям брой различни хаплотипи (2^n за n SNPs). От друга страна, в райони със силна неравновесна скаченост между съседни SNPs се наблюдават малък брой хаплотипи, представящи много стари (в исторически аспект) хаплотипи, при които не е протекла рекомбинация [126].

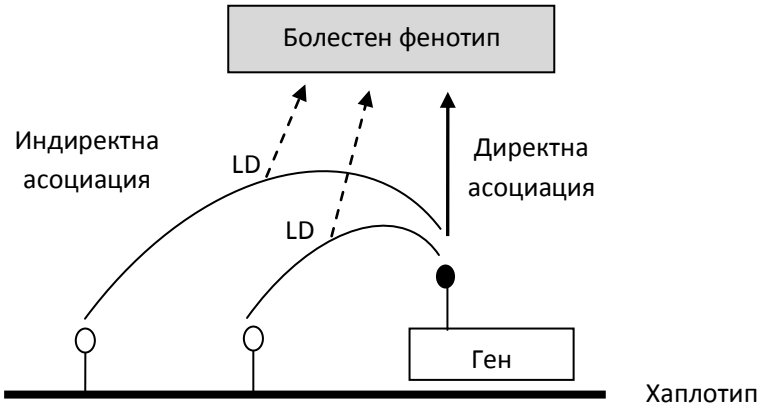
Редица изследвания показват, че човешкият геном е 'разделен' на региони, наречени хаплоблокове (хаплотипни блокове), които се характеризират с висока неравновесна скаченост и ниско хаплотипно разнообразие (няколко често срещани хаплотипа), поради намалената честота на рекомбинация в тях [125, 127, 128]. При анализиране на сегмент с дължина 216 kb, от района на главния комплекс на тъканна съвместимост (MHC) върху хромозома 6, Jeffreys и колеги (2001) установяват, че 'горещите точки' на рекомбинация съвпадат с границите на хаплотипните блокове. Разликите в честотата на рекомбинация, до известна степен обясняват значителната разлика по отношение на степента на неравновесна скаченост между SNPs в генома [121, 125, 128].

Най – голямата атрактивност на хаплотипните методи е идеята, че често срещаните хаплотипи обхващат повече от генетичните варианти в един хаплоблок и могат да бъдат тествани като се използват малък брой SNPs, т. нар. 'представителни' SNPs (htSNPs - haplotype tag SNPs) [121, 125, 127, 129, 130]. Установено е, че генотипирането на 200 000 до 1 000 000 'представителни' SNPs в целя геном може да даде информация за по – голямата част от често срещаните генетични варианти в дадена популация. Изборът на такива 'представителни' SNPs обаче, изисква много точно познаване на модела на LD [131]. Тези открития са основа за изграждането на хаплотипна карта (Haplotype Map, HapMap) на човешкия геном. Международният HapMap проект (The International HapMap Project), който стартира през октомври 2002

г. има за цел да състави карта на ДНК вариантите в човешкия геном, сравнявайки ДНК проби от индивиди от четири популационни групи с произход от Африка (YRI – етническа група Юруба, Нигерия), Азия (CHB – китайци от Пекин, JPT – японци от Токио) и Европа (CEPH – заселници в Юта с произход от северозападна Европа). Съставената карта, съдържа информация за вида, разположението, алелните, генотипните честоти и хаплотипните групи на широко разпространените генетични варианти в човешкия геном в различните популации. Получената информация е публично достъпна и може да бъде използвана за идентифицирането на гени, отговорни за развитието на различни заболявания (http://www.hapmap.org/).

Дизайн на асоциативните проучвания

Основната цел на асоциативните изследвания е да се открият специфични алели в дадени генетични маркери, които се срещат с по – голяма честота сред болни индивиди в сравнение със здравите. За постигането на тази цел се използват два основни подхода: директна и индиректна асоциация. При директната асоциация самият маркер съдържа функционален полиморфизъм, който директно повлиява фенотипа, като кодира протеин с различна структура или причинява разлики в експресията на гена. При индиректната асоциация алелът не причинява болестта, но е много близко разположен до болестия алел и се намира в неравновесна скаченост (LD) с него, т. е. алелът на даден генетичен маркер и болестният алел се предават заедно от поколение на поколение, защото са толкова близко разположени, че между тях много рядко настъпва рекомбинация при мейозата (Фигура 5).



Фигура 5: Директно и индиректно тестване за асоциация

За провеждане на асоциативно изследване могат да се използват два типа извадки: тип ‘случаи – контроли’ и семейства с болен пробанд и неговите родители

(триоси). При първият тип извадки се съпоставят големи групи от болни с точно поставена диагноза за дадено заболяване (случаи) и групи от здрави индивиди (контроли), внимателно подбрани по пол, етническа принадлежност и възраст. Едно от предимствата на този метод е, че при изследване на достатъчно голям брой индивиди, могат да се открият много малки различия. Въпреки това, при този тип изследвания често се получават фалшиви асоциации, които са резултат от скрита (неразпозната) популационна стратификация. Това означава, че в даден район съществуват субпопулации от хора поради миграционни процеси в миналото и различен темп на възпроизводство, като тези субпопулации са имали тенденцията да сключват бракове помежду си. Фалшиво позитивни резултати могат да се получат, ако случаите и контролите са подбрани от две или повече такива субпопулации, при които има разлика в честотите на даден алел и разпространението на заболяването [114, 117, 132].

За установяване на популационна стратификация се препоръчва тестване на 15 - 20 произволни, несвързани микросателитни маркери в групи от неродствени случаи и контроли. При биалелните маркери, каквито са SNPs, за постигане на поне 90% точност при определяне на популациона стратификация, са необходими най – малко 60 – 100 несвързани SNPs [133, 134].

Използването на семейства при асоциативните проучвания се оказва добър алтернативен подход, с който може да се избегне опасността от скрита популационна стратификация [135]. Най – общо казано, при този подход се анализират т. нар. триоси от двама родители и засегнато дете, като статуса на родителите няма значение. В този случай, ‘контролната’ група са непредадените родителски алели. Всеки родител предава само един от двата си алела в даден генетичен локус (една от двете хромозоми) на болното дете, като така се създава една изкуствена популация от братя и сестри на болните, които биха унаследили непредадените на болните деца алели. И пробандите и контролите в този случай произлизат от една и съща етническа група и социална среда.

Статистическата оценка се прави с метода на Falk и Rubinstein [136] за изчисляване на относителния хаплотипен риск (genotype-based haplotype relative risk, GHRR), като се сравняват генотипите на пациентите и тези на изкуствено конструираните “контроли” или метода на Terwilliger и Ott [137], при който се сравняват алелните честоти на засегантите деца с честотата на непредадените от родителите алели (haplotype-based haplotype relative risk (HHRR).

Вариант на този метод е тестът за неравновесно предаване на алели от хетерозиготни родители - TDT (Transmission Disequilibrium Test) [138]. Тестът разглежда само родители, хетерозиготни по определен алел, като хомозиготните родители са неинформативни. Проследява се дали този алел се предава по-често на засегнатото дете от очакваното при случайно събитие. Ако алелът няма връзка със заболяването, то се очаква той да се предава в 50% от случаите.

1.7.4. Асоциативни проучвания на кандидат гени при биполарното разстройство

В последните години, асоциативните проучвания на кандидат гени се оказват един много подходящ метод за идентифициране на гените свързани с комплексните заболявания. Изборът на такива гени става въз основа на 1) тяхната биологична роля в патофизиологията на заболяването и 2) тяхната локализация в райони, показали скаченост със заболяването в предишни изследвания [93].

Най – общо гените изследвани за асоциация с биполарното разстройство могат да бъдат разделени в няколко групи, показани в таблица 4. Подробна информация за всеки един от тях и проведените асоциативни проучвания може да бъде намерена в сайта на полигенните сигнални пътища (Polygenic Signaling Pathways) на адрес: http://www.polygenicpathways.co.uk/.

Таблица 4: Гени изследвани за асоциация с биполарното разстройство.

Растежни фактори: гени, чиито продукти са свързани с фосфатидил – инозитоловия метаболизъм и PI3K/AKT1 сигналния път и тирозин – киназния път	ANK3, AKT1, BDNF, BMP6, CABIN1, EGFR, FYN, GSK3B, IMPA2, NRG1, PIK3C3, PIK4CA, PIP5K2A, PDLIM5, RGS4, TCF4, WDFY2
Гени, кодиращи протеини, свързани с адхезията и клетъчните контакти	CNTNAP2, JAM3, NCAM1, NRXN1
NMDA и глутамат свързани гени	CIT, DAO, DAOA, DTNBP1, GRIA1, GRID1, GRIN1, GRIN2A, GRIN2B, GRIK4, GRM3, GRM4, GRM7, NOS1, NOSIAP, SNAP25, SYN3, SYNJ1
Гени от допамин и серотонинергична системи	COMT, DRD2, DRD3, HTR2A, HTR5A, HTR6, SLC6A3, SLC6A4, SLC18A1, SLC18A2, MAOA, TDO2, TH
GABA – свързани гени	GABRA1, GABRB2, GAD1
Циркадни гени	CLOCK, NPAS2, NR1D1, TIMELESS, PER3
Гени за цитокини	CSF2RB, IL1B, IL1RN, IL6, IL10, TNFA

Гени, кодиращи протеини участващи в защитата на клетката от оксидативен стрес	ND4, NDUFV2, MTHFR, MTHFD, MTR, NOS3
Гени, кодиращи протеини свързани с отговора на ендоплазмения ретикулум при стрес	XBP1
Други	ACE, ABCB1, ABCA13, AGT, APOE, BRD1, C10orf120, CACNA1C, CDKN2A, CHRNA7, DISC1, DPYSL2, FABP7, FBXO38. GLT8D1, GNL3, GPR50, GPR78, hCAP-D3, INTS6, ITIH3, MC5R, MCHR1, MCHR2, MLC1, MMP9, MRCL3, MRLC2, NEK4, NPAS3, PB1, PDE4B, PFN4, PPARD, PPP3CC, PSKH1, RELN, S100B, SEMG2, SLIT3, SP4, SST, SYNGR1, TAAR6, TMEM108, TP53I3, TSNAX, TSPAN8, TUBA8, YWHAH, ZNF804A

Последно обновяване – 25.04.2010

При изследванията на функционални кандидат гени решаваща роля има изборът на кандидатите, който зависи от познанията за патофизиологията на заболяването. При биполарното разстройство повечето изследвания са фокусирани върху невротрансмитерните системи, които са основна мишена за действие на лекарствата използвани при лечение на заболяването, а именно допамин, серотонин и норадренергичните системи [139]. Сред т. нар. 'традиционни' кандидати, получили най – голямо внимание са гените кодиращи моноамино оксидаза А (*MAOA*), тирозин хидроксилазата (*TH*), катехол –*O* – метилтрансферазата (*COMT*), и серотониновия транспортер (*5HTT*). Въпреки положителните резултати за всеки един от тези гени, заедно с може би още по – големия брой отрицателни репликативни изследвания, мета – анализите на функционални полиморфизми в три от гените *MAOA, COMT* и *5HTT* показват статистически значима асоциация със заболяването ($P<0.05$), но умерен генен ефект [140-143].

Гени, свързани със серотониновата невротрансмисия

Серотонинът (5-хидрокситриптамин (5HT)) е моноаминен невротрансмитер, който се синтезира в серотонергичните неврони на централната нервна система, а също така и в ентерохромафинните клетки на стомашно-чревния тракт. В ЦНС, той играе изключително важна роля при регулиране процесите на дишане, терморегулация, циркадни ритми, сън, апетит, агресия, настроение, сексуално поведение, болка и учене [144]. Смята се, че дисфункция на серотонергичната система е причина за редица прихиатрични заболявания включително, афективни разстройства, генерализирано

тревожно разстройство, паническо разстройство, обсесивно – компулсивно разстройство, социална фобия, шизофрения, анорексия нервоза, болест на Алцхаймер [144]. Ролята на серотонергичната невротрансмисия в етиологията на биполарното разстройство е предположена на базата на фармакологични наблюдения относно действието на някои от атипичните лекарства. Повечето антидепресанти имат различни посоки на действие, включително и блокиране на обратното всмукване на серотонин от синаптичната цепка, в резултат на което могат да предизвикат мания в предразположени индивиди [145]. Действието на група лекарства, т. нар. "селективни инхибитори на обратното всмукване на серотонина" (SSRIs-Serotonin Selective Reuptake Inhibitors) се осъществява чрез селективно блокиране на серотониновия транспортер (5-HTT, SLC6A4, SERT), който нормално се свързва със серотонина и го връща обратно в пресинаптичното нервно окончание. В резултат на това се увеличава серотонергичното действие, тъй като в синаптичната цепнатина се натрупва повече серотонин [146]. Тези наблюдения дават основание да се смята, че гените, свързани със серотониновата невротрансмисия са силни функционални кандидат гени с предполагаемо участие в етиологията на биполарното разстройство.

Един от най – широко изследваните гени при биполарното разстрйство е генът за серотониновия транспортер - *SLC6A4*, картиран в 17q11.1–q12 хромозомен район, който е показал и скаченост със заболяването в две проучвания. Продуктът на гена е локализиран в пресинаптичната мембрана на неврона и представлява Na+ и Cl- зависим транспортер, с 12 трансмембранни домена, което е характерна особеност на всички Na+-зависими медиаторни преносители. Структурата на SERT протеина е аналогична с тази на DAT1. Двата белтъка принадлежат към едно семейство транспортни белтъци. Положителни резултати за асоциация на гена със заболяването са били получени за 44bp инсерция/делеция (insertion/deletion) полиморфизъм (SERTPR) в промоторния регион и в последствие потвърдени в четири последователни мета – анализа. Изследване на 17bp VNTR полиморфизъм във втори интрон на гена също разкрива положителна асоциация, но само в един мета – анализ [142, 143, 147, 148].

Друг ген асоцииран със заболяването е *TPH2* (neuronal tryptophan hydroxylase), кодиращ ензим, който участва в биосинтезата на серотонина в централна нервна система. [149]. Единични нуклеотидни полиморфизми в гена са били асоциирани с биполарното заболяване в пет независими изследвания [150-154], докато само две проучвания не установяват асоциация [155, 156].

Други кандидат гени, изследвани в повече от едно проучване са някои от гените за серотониновите рецептори, като *HTR1A* (serotonin receptor 1A), *HTR2A* (serotonin receptor 2A), *HTR2C* (serotonin receptor 2C) и *HTR7* (serotonin 7 receptor). След първите негативни резултати, две проучвания свързват *HTR1A* с биполарното разстройство при анализиране на динуклеотидни тандемни повтори (CAn/GTn) и единичен нуклеотиден полиморфизъм (G>A) в екзон 1 на гена. Подобни резултати са получени и за *HTR2A,* локализиран в 13q14–q21 хромозомен район, показал скаченост със заболяването. Асоциация е била установена за 516C>T, 1438G>A и 62428C>T (rs6313) полиморфизми, докато негативни резултати са получени за +74C >A, 102T/C, 1354C/T (с изключение на едно изследване на Ranade и колеги, 2003 [157]) и His452Tyr полиморфизми. По отношение на *HTR2C*, в две изследвания асоциация с cys23-ser23 полиморфизъм в екзон 4 не е наблюдавана, докато друго изследване установява положителна асоциация. Други варианти в 5’ регулаторния регион на гена не дават позитивни резултати, но асоциация с +12C>G полиморфизъм в екзон 3 е наблюдавана в едно изследване. От проведените общо три изследвания на *HTR7*, две не установяват асоциация между заболяването и варианти в гена [106].

Гени, свързани с допаминергичната невротрансмисия

Допаминът е катехоламин от групата на биогенните амини с функции на невротрансмитер и хормон, произвеждан от невроните в субстанция нигра. Първоначално смятан за регулатор на моторните функции, главно поради моторните дефицити, свързани с болестта на Паркинсон, днес вече се предполага, че допаминът играе важна роля и при някои психични процеси и заболявания. Той осъществява своите функции, активирайки специфични метаботропни рецептори (G протеин – свързани рецептори) със седем мембранопроходни сегмента, разделени в пет класа: D1-D5. Допаминовите рецептори участват в редица неврологични процеси, като мотивация, удоволствие, познавателна способност, памет, учене, модулация на невроендокринната сигнализация. Дисфункция на допаминергичната невротрансмисия в централна нервна система е свързана с редица невропсихиатрични заболявания сред които, социалната фобия [158], синдрома на Турет (Tourette's syndrome) [159], болестта на Паркинсон [160], шизофренията [159], невролептичния малигнен синдром (Neuroleptic malignant syndrome) [161], синдрома на дефицит на вниманието и хиперактивността (Attention-Deficit Hyperactivity Disorder, ADHD) [162], наркотичната и алкохолната зависимост [159, 163]. В последните години, въз основа на допаминовата

хипотеза за биполарното разстройство, според която понижената допаминова активност предразполага към биполарна депресия, а повишаването на активността води до мания, допаминергичната система е изследвана и при биполарното разстройство.

Генът *DRD4* (dopamine receptor D4), картиран в район показал скаченост с биполарното разстройство (11p15.5), кодира D4 субтип на допаминовия рецептор, който е G протеин – свързан рецептор, инхибиращ аденилил циклазата и основна мишена за действието на лекарства използвани при лечението на шизофренията и болестта на Паркинсон. За асоциация с биполарно разстройство е изследван функционален VNTR полиморфизъм в екзон 3 на гена**,** който се състои от 2 – 10 тандемни повтора с дължина 48 bp. Muglia и колеги (2002) [164] анализират полиморфизма в 145 семейства с биполарни пробанди и техните биологични родители за асоциация със заболяването. Резултатите от TDT теста за предаването на индивидуалните алели на полиморфизма, показват по – рядко предаване на алела с две копия от мотива (2-repeat allele) (12 предадени срещу 28 непредадени алела, $\chi^2 = 6.40$; df = 1; P = 0.0114) и значително по – честото предаване в засегнатото поколение на алела с 4 копия (77 предадени алела срещу 52 непредадени, $\chi^2 = 4.845$ df = 1; P = 0.0278), като предаването и на двата алела става от страна на майките. Подобна асоциация е наблюдавана и в един мета – анализ [165].

Друг обещаващ ген е генът за допаминовия рецептор D1 (*DRD1*), също картиран в скачен със заболяването район (5q35.1). Ni и колеги (2002) [166] генотипират 286 триоса за 3 полиморфизма в гена (-800T/C, -48A/G, и 1403T/C). За тестване на неравновесна скаченост между гена и заболяването, генотипните данни са анализирани с TDT теста. Въпреки че индивидуалното генотипиране на полиморфизмите не дава положителни резултати, значителна асоциация на *DRD1* със заболяването е установена при хаплотипния анализ ($\chi^2 = 16.068$, df = 3, p =.0011). Severino и колеги (2005) [167] анализират един от полиморфизмите в гена (-48A/G) в 107 пациенти с биполарно разстройство тип I и 129 контролни индивида, предимно от сардински произход и установяват статистически значима разлика в генотипните ($chi^2 = 6.29$, df = 2, P = 0.042) и алелни честоти ($chi^2 = 5.46$, df=1, P = 0.019; OR = 1.53, 95% CI = 1.08-2.16) на полиморфизма между двете групи, предполагаща асоциация на гена със заболяването в изследваната популация. Същият полиморфизъм е изследван в друга гупа от случаи (407 пациенти с шизофрения и 380 с биполарно афективно разстройство) и 399 контроли от полски произход. Въпреки че, асоциация с шизофрения не е установена,

тенденция за асоциация е наблюдавана при биполарното разстройство (P=0.059 за генотипни, P=0.073 за алелни честоти), като генотип G/G и алел G на полиморфизма са значително по – често срещани сред пациенти с биполарно разстройство тип II (P=0.016 за генотипни, P=0.008 за алелни честоти) [168].

Допамин транспортерния ген (*DAT1, dopamine transporter 1, SLC6A3*) е картиран в 5p15.3 хромозомен локус и също е изследван за асоциация с биполарното разстройство. Неговият продукт принадлежи към семейството на мембранните транспортни белтъци (представлява Na^+ и Cl^- зависим транспортер) и играе централна роля в регулацията на нивата на допамин в синапса и в допаминовата невротрансмисия. Той опосредства активното поемане (re-uptake) на синаптичния допамин обратно в неврона. Въпреки че съществуват 5 различни допаминови рецептора за свързване с допамин в синапса, допаминовият транспортер е единствената молекула, която осъществява неговото обратното поемане, поради което функцията му е критична за поддържане нивата на допамин. Допаминовият транспортер е главна мишена за действието на амфетамини, L-DOPA и кокаин. Тези психостимуланти блокират неговата транспортна активност, в резултат на което се блокира обратното поемане на допамин и нивото му в синапса се увеличава.

Vandenbergh и колеги (1992) [169] публикуват данни за наличието на полиморфизъм, състоящ се от тандемно повторен елемент от 40bp (40bp-VNTR), разположен в 3'-непревеждащия се район на гена (3'-UTR). Броят на копията на повторения елемент варира от 3 до 11. Вариации в броя на повторите са свързани с идиопатичната епилепсия, синдрома на дефицит на вниманието и хиперактивността, кокаиновата и алкохолната зависимост, предразположеност към болестта на Паркинсон, предпазване от никотинова зависимост. Този полиморфизъм е анализиран в пет асоциативни проучвания в европейска популация, но нито едно от тях не открива асоциация с биполарното разстройство [170-174]. Позитивни резултати са получени при анализирне на други полиморфизми в гена. Keikhaee и колеги (2005) [175] сравняват алелните и генотипните честоти на промоторен полиморфизъм -67A/T в 136 пациенти и 163 контроли. Наблюдаваните генотипни честоти в групата на пациентите са както следва: хомозиготи по алел A (AA) - 30.9%, хетерозиготи (AT) – 55.1% и хомозиготи по алел T (TT) – 14%, в сравнение с контролната група, където AA – 49%, AT – 41.8% и TT – 9.2% (chi^2 = 10.3, df = 2, OR = 2.15 (95% CI 1.34-3.47), $P \leq 0.006$), като T алелът на полиморфизма е приблизително 1.4 пъти по – често срещан при пациенти в сравнение с

контролите ($P \leq 0.003$). Ohadi и колеги (2007) [176] установяват, че хомозиготността по Т алела е предразполагащ към заболяването фактор при мъжете, но не и при жените ($chi^2=8.825$, df=1, P=0.003).

Greenwood и колеги (2001) [177] анализират 14 варианта в гена в 50 триоса и установяват асоциация със заболяването за хаплотип от 5 SNPs, обхващащ района между екзон 9 и 15. Тези положителни резултати са потвърдени във втора независима извадка от семейства. 22 SNPs (8 нови варианта в гена и 14 полиморфизма анализирани в първото проучване) са анализирани в две независими извадки, едната от 50, другата от 70 семейства чрез TDT теста. Асоциация със заболяването е установена за два от осемте нови варианта, в интрон 8 и в интрон 13 на гена. Хаплотипният анализ на всичките 22 SNPs показва асоциация с регион в близост до 7ми и 8ми интрон на гена и в двете извадки [178].

Други допаминергични гени, за които са получени позитивни резултати в поне едно проучване са *DRD3* (dopamine receptor D3), *DDC* (dopa decarboxylase), чиито продукт е включен в синтезата на допамин и серотонин; *TH* (tyrosine hydroxylase), локализиран в 11p15.5 локус и участващ в превръщането на фенилаланин в допамин. [106].

GABA свързани гени

Аминокиселината GABA (гама - аминомаслена киселина, gamma-aminobutyric-acid), която е основен инхибиторен невротрансмитер в ЦНС при бозайници, осъществява своето действие там посредством GABA-A рецептори – трансмембранни йонни канали. Тези рецептори са основна мишена за действието на редица важни фармакологични агенти, като барбитурати и бензодиазепини [179]. Функционалните GABA-A рецептори са изградени от 5 хомоложни, но вариабилни субединици (обикновено 2α, 2β и 1γ), които формират канал, чрез който хлоридните йони преминават през клетъчната мембрана. Всяка субединица се състои от дълга, вариабилна извънклетъчна част, 4 трансмембранни домена и вариабилен цитоплазмен регион, между третия и четвъртия трансмембранни домени. В зависимост от хомоложността в аминокиселинната си последователност, субединиците са разделени в класове, с 70% - 80% идентичност в клас и 30% - 50% идентичност между класовете [180].

Две изследвания, в европейска и азиатска популации, анализиращи различни полиморфизми установяват асоциация на биполарното разстройство с гена *GABRA5* (γ-Aminobutyric acid A receptor, α-5), картиран в 15q11.2–q12 локус. През 1998 Papadimitriou и колеги [181], генотипират 48 пациенти с биполарно разстройство, 40 пациенти с униполарно разстройство и 50 здрави индивида, всички от гръцки произход, за динуклеотиден повтор (CA) в *GABRA5*. PCR реакцията установява наличието на девет алела с дължина между 272 и 290 базови двойки (bp). Установена е и значителна разлика по отношение на алелните честоти между пациенти с биполарно разстройство и контроли, като най – силна асоциация със заболяването е разкрита за алел с дължина 282 bp. Присъствието или липсата на този алел при пациенти с биполарно разстройство е свързано с превес на манийни епизоди над депресивните. Години по – късно, Otani и колеги (2005) [182] анализират 5 полиморфизма -754C>T, в промоторния участък, IVS1-21G>A, IVS2-26T>A, (*)302C>T, в екзон 5 и същия CA повтор в 3' фланкиращия регион на гена, в японска извадка от случаи и контроли. Анализът показва значителна разлика в алелните и генотипни честоти за IVS1-21G>A полиморфизъм между пациенти с биполарно разстройство тип I и контроли. Проведеният впоследствие хаплотипен анализ, разкрива асоциацията на хаплотип IVS1-21G>A/IVS2-26A>T с биполарното разстройство тип I и протективния ефект на IVS1-21A/IVS2-26T хаплотип (odds ratio: 0.57, 95% доверителен интервал: 0.44-0.73).

Единичен нуклеотиден полиморфизъм (156T>C) в гена *GABRA1* (γ-aminobutyric acid A receptor, α-1) е асоцииран с биполарното разстройство в едно проучване използващо двата типа извадки: тип случаи и контроли и семейства. Въпреки това, анализирането на други 12 полиморфизма в гена не дава положителни резултати.

Предимно негативни резултати са получени за *GABRA3* (γ-aminobutyric acid A receptor, α-3), въпреки че генът е разположен в интересен за биполрното разстройство локус - Xq28, показал скаченост със заболяването [106].

Гени, свързани с глутаматергичната система

Като основен ексцитаторен невротрансмитер в централната нервна система при бозайници, глутаматът упражнява своето физиологично действие посредством активирането на лиганд – зависими йонни канали и G протеин – свързани мембранни рецептори. Въпреки че, глутаматергичната система не е много добре проучена при биполарното разстройство, няколко гена от нея са изследвани за асоциация със

заболяването. Генът *DAOA* (D-amino acid oxidase activator) е картиран в 13q33.2 хромозомен локус, показал скаченост със заболяването, а неговия продукт играе роля при активирането на N-метил-D-аспартатните рецептори (N-methyl-D-aspartate receptors), членове на суперфамилията на глутамат – зависимите йонни канали, които са широко застъпени и при шизофрения и при биполарно разстройство [183, 184]. NMDA (N-метил-D-аспартанова киселина, N-methyl-D-aspartic acid) е селективен агонист, който се свързва само с тези рецептори, но не и с другите типове глутаматни рецептори (AMPA рецепторите и каинатните рецептори) известни още като несвързани с NMDA. Активирането на NMDA рецепторите води до отварянето на йонните канали. Отличително свойство на тези рецептори е тяхната волтаж – зависима активация в резултат на блокиране на йонните канали от извънклетъчни Mg^{2+} йони, което позволява навлизането на Na^{+} и малки количества Ca^{2+} йони в клетката и отвеждането на K^{+} йони извън нея. Предполага се, че преминаването на Ca^{2+} йони през NMDA рецепторите играе съществена роля в синаптичната пластичност, която е в основата на процесите учене и памет.

Позитивни резултати за полиморфизми в *DAOA* са получени от шест независими изследвания в европейска популация. Hattori и колеги (2003) [185] изследват две независими американски фамилни извадки (едната включваща 83 индивида от 22 семейства, а другата състояща се от 474 индивида от 152 семейства). Индивидуалното генотипиране на 16 SNPs в региона показва положителна асоциация със заболяването за пет от тях в едната серия, а хаплотипния анализ на седем от маркерите, намиращи се в неравновесна скаченост, разкрива статистически значима асоциация и в двете изследвани извадки (P = .0004 и P = .008, респективно). Подобни резултати са били наблюдавани и в други изследвания [184, 186-188]. Въпреки получените обнадеждаващи резултати, патологично асоцииран вариант все още не е идентифициран [139].

Друг ген свързан с глутаматергичната система и изследван за асоциация с биполарното разстройство е *GRIK4* (glutamate receptor, ionotropic, kainate 4), картиран в 11q22.3 хромозомен район. Генът е член на едно от двете генни семейства за каинат рецептори, а неговият продукт участва във формирането на функционалните каинат йонни канали, заедно със субединиците кодирани от другите членове на двете семейства (*GRIK5*, *GRIK1*, *GRIK2* и *GRIK3*) [189].

Изследвайки пациенти с биполарно разстройство и контроли, Pickard и колеги [190] установяват протективния ефект на 14 bp инсерция/делеция (insertion/deletion) полиморфизъм в 3' нетранслируемия участък (3' UTR) на *GRIK4* и потвърждават своите резултати във втора извадка от случаи и контроли [191].

Друг ген представляващ интерес при биполарното разстройство е *DTNBP1* (дистробревин – свързващ протеин 1; dystrobrevin-binding protein 1, dysbindin-1), експресиран в невроните на хипокампуса. Протеинът се открива в пресинаптичните мембрани на аксоните на глутаматергичните неврони. Значително намаляване на dysbindin-1 в хипокампуса е наблюдавано при пациенти с шизофрения [192]. Три изследвания в европейска популация и две в корейска, асоциират SNPs в гена с биполарното разстройство [193-196].

Гени, свързани със сигналната трансдукция

Генът *IMPA2* (inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2) е предположен като силен кандидат ген за биполарното разстройство от Yoshikawa и колеги още през 1997 г.[197], въз основа на локализацията му в район, показал скаченост със заболяването (18p11.21) и неговата евентуална функция. Инозитол фосфатазите играят ключова роля във фосфатидилинозитоловия сигнален път, който се повлиява от действието на литий (един от най – често използваните медикаменти при лечение на биполарно разстройство). Sjoholt и колеги (2004) [198], анализират 75 семейства (общо 92 засегнати индивида) от арабски произход и установяват силна асоциация за два полиморфизма (-461C >T и -207T >C) в промоторния участък на гена с преференциално предаване на -461C и -207T алелите в засегнатото потомство (P=0.006 и 0.002, респективно). Тези полиморфизми са в LD (D'=0.97) и в повечето семейства -461C и -207T вариантите се предават заедно. Два други, близко разположени полиморфизма (-241_-237dup и -185A>G), също демонстрират подобна тенденция за асоциация със заболяването. Последвалият хаплотипен анализ установява, че четирите промоторни полиморфизма (-461C>T, -241_-237dup, -207T>C и -185A>G) формират девет от 16 възможни хаплотипа, най – честия от които (-461C; -241_-237dup-negative; -207T; -185A) се предава в засегнатото поколение значително по – често от очакваното. Ohnishi и колеги (2007) [199] установяват асоциация за същите два промоторни полиморфизма (-461C >T и -207T >C) и три – маркерен хаплотип (-461C, -207T, -185A) в японска извадка от 496 случая с биполарно разстройство и 543 контроли. Тези положителни резултати, обаче не са потвърдени в европейска популация [200].

Генът *SYBL1* (Synaptobrevin-like 1) е картиран в псевдоавтозомен регион Xq28. Синаптобревинът е мембранен протеин за който се предполага, че играе роля в молекулните събития, свързани с освобождаването на невротрансмитерите. Генът е подложен на Х инактивация и е неактивен в У хромозомата, като по този начин се запазва еднакво количество генен продукт в двата пола. Единичен нуклеотиден полиморфизъм в интрон 5 на гена се счита за асоцииран със заболяването в две независими изследвания [201, 202].

Гени, свързани с клетъчния растеж

Продуктът на гена *BDNF* е член на фамилията невротрофини, които се синтезират в невроните и чиято синтеза и секреция зависят от невроналната активност. BDNF подпомага оцеляването на съществуващите неврони и съдейства за растежа и развитието на нови неврони и синапси. В напълно развитата нервна система, BDNF е включен в активност – зависимата невроналната пластичност, силно застъпена в хипотезата за синаптична пластичност при афективните заболявания, която разглежда функционалните и структурни промени на синаптично ниво, предизвикани от стрес и антидепресанти. Генът е картиран в 11p13 хромозомен район и кодира прекурсорен пептид (proBDNF), който се срязва протеолитично, за да се формира зрелия протеин [203]. Районът е показал скаченост със заболяването в няколко проучвания чрез анализ за скаченост, но не и в мета – анализи.

Поради силната еволюционна консервативност на кодиращата последователност на гена сред различните видове, в човешкия *BDNF* ген е установен само един чест, неконсервативен полиморфизъм, който представлява единична нуклеотидна замяна при 196^{ти} нуклеотид в 5’ proBDNF последователността, водеща до замяна на аминокиселината валин (Val) с метионин (Met) в кодон 66 (Val66Met).

Няколко фамилно базирани асоциативни изследвания разкриват асоциация на полиморфизма с биполарното разстройство с преференциално предаване в засегнатото поколение на алела Val [204-206]. Доказателство за алелна или генотипна асоциация на полиморфизма със заболяването, обаче не е получено при някои асоциативни изследвания на случаи и контроли от европейски, китайски и японски произход [207-210].

Друг кандидат ген за биполарно разстройство, първоначално асоцииран с шизофренията [211] е *NRG1* (neuregulin 1), картиран в 8p22–p11 район. Генът е

експресиран предимно по време на ранната ембриогенеза, а неговия продукт съдейства за пролиферацията и оцеляването на олигодендроцитите и миелинизиращите клетки в централна нервна система [211-213]. Известен брой полиморфизми в гена са асоциирани с биполарното разстройство в отделни изследвания [214-217].

Генът *NCAM1* (Cell adhesion molecule, neural, 1), картиран в 11q23.1 хромозомен локус, е смятан за обещаващ кандидат ген при биполарното разстройство, поради функцията на неговия продукт. NCAM1 играе основна роля в клетъчната миграция, невроналния растеж и синаптичната пластичност, процеси за които се смята, че са нарушени при афективните разстройства. Въз основа на тези предположения, Arai и колеги (2004) [218] анализират 11 варианта в гена в японска извадка от случаи и контроли (151 индивида с биполарно разстройство, 78 - с униполарно заболяване и 357 контроли) и установяват значителна асоциация със заболяването на три единични нуклеотидни полиморфизма, IVS6+32T>C, IVS7+11G>C и IVS12+21C>A (алелна асоциация, P=.04, P =.02, и P =.004, респективно) и три – маркерен хаплотип. Положителни резултати, относно асоциацията на гена със заболяването са получени и при друго изследване в европейска популация [219].

Гени, свързани с циркадните ритми

Друг клас кандидат гени особено интересни за биполарното разстройство са гените, чиито продукти са необходими за генериране и регулиране на циркадните ритми (circadian rhythms). Предполага се, че аномалии в тези ритми могат да бъдат свързани със заболяването [220, 221]. Също така от дълги години е известно, че лишаването от сън е доста ефикасен метод за облекчаване на симптомите на депресия и регулиране на настроението при пациенти с биполарно разстройство [222-224].

Няколко изследвания в последните години, установяват известна асоциация между биполарното разстройство и полиморфизми в гените *CLOCK, ARNTL, hTIM* (TIMELESS) и *PER3* (PERIOD3), контролиращи циркадните ритми при човека. [225-230].

1.8. Широко мащабни асоциативни изследвания (Genome Wide Association study, GWAS), избор на генетични варианти и платформи за генотипиране

Изборът на кандидат гени при асоциативните проучвания доста често е ограничен, тъй като се основава на хипотетичното участие на генния продукт в етиологията на дадено заболяване, която в повечето случаи не е добре позната. Поради

тази причина, широко мащабните асоциативни проучвания (цялостен геномен скан, Genome Wide Association Studies, GWAS) са изключително подходящи при изследване на често срещащите се комплексни заболявания, при които физиологичните механизми и генетичните фактори, отговорни за заболяването, не са добре проучени.

Завършването на човешкия геномен проект (The Human Genome project) и Hap-Map проекта (The HapMap project) и наличието на високо – ефективни технологии, позволяващи едновременното тестване на стотици хиляди SNPs в целия геном, в голям брой проби, направи технически възможно и финансово изгодно провеждането на широко мащабните асоциативни проучвания.

Дизайн на GWAS

Широко мащабните асоциативни проучвания могат да използват и двата типа извадки, характерни за асоциативните изследвания. На практика по – предпочитани са извадките тип случаи – контроли, тъй като събирането на големи групи от болни индивиди и здрави контроли, които да придадат достатъчна мощност на извадката за детекция на гени с малък ефект е много по- лесно и не толкова скъпо. От друга страна, една голяма контролна група (от здрави индивиди) може да се използва като ‘обща’ (common-control design) при изследването на няколко различни заболявания, което определено е много по – икономично в сравнение с фамилно – базираните GWAS проучвания, при които контролната група индивиди е уникална за даденото изследване [231, 232].

Избор на маркери и платформи за генотипиране

Несъмнено, едно от най – важните предимства на SNPs, което ги прави предпочитани маркери за провеждане на широко мащабни асоциативни проучвания, е факта, че те се унаследяват заедно (скачено) в хаплотипни блокове поради наличието на неравновесна скаченост между тях. Ето защо, в зависимост от размера на блока и степента на LD в него само един или няколко SNPs в този блок са достатъчни, за да се получи пълна информация за целия район. Имайки пред вид това, броят на вариантите, които трябва да се изследват, за да се покрие максимално целия геном в едно широко мащабно изследване е значително редуциран [233].

Понастоящем се използват три подхода при избора на маркери за провеждане на цялостен геномен скрининг: 1) случайна селекция, 2) селекция въз основа на неравновесна скаченост (LD) и 3) избор на функционални SNPs (кодиращи, cSNPs).

При селекцията на маркери въз основа на LD се избират минимален брой представителни SNPs (tagSNPs), които обхващат максималния брой варианти, наблюдавани в дадената популация. При случайната селекция LD не се взима под внимание. При третият подход се анализират само кодиращи SNPs, водещи до разнотипна аминокиселинна замяна или всички варианти, разположени в гени, като се предполага, че те са свързани с изследваното заболяване.

Използвайки данни за трите популации анализирани в международния HapMap проект, Steemers и Gunderson [234] обобщават, че приблизително 550 000 tagSNPs са необходими за обхващане на около 90% от вариантите (r^2>0.7), представени в европейска и азиатска популации и около 650 000 SNPs обхващат около 75% от вариантите при представителите на Юруба (Нигерия). От казаното до тук става ясно, че представителните SNPs (tagSNPs) могат да се използват за редуциране броя на генотипираните локуси, тъй като дават същия обем информация (достатъчно имформативни са), която се получава при генотипирането на голям брой случайно избрани локуси. Освен това, използването на сравнително малък брой варианти за генотипиране в големи групи от индивиди, значително намалява времето необходимо за статистическа обработка на данните и интерпретация на резултатите.

От технологична гледна точка, платформата която се използва за генотипиране при цялостното геномно асоциативно проучване трябва да отговаря на следните условия: 1) възможност за икономично, бързо и точно генотипиране на стотици хиляди локуси в големи групи индивиди (добре фенотипизирани случаи и контроли, уеднаквени по пол, етнос и възраст), 2) наличие на достатъчно добра техника за лесна и ефикасна обработка на пробите, 3) максимално автоматизиране на процеса с цел намаляване на възможността за грешки и 4) възможност за селектиране на неограничен, но достатъчен брой маркери за максимално покритие на целия геном [234].

Понастоящем, за цялостен геном скан се използват два типа платформи. При единият тип платформи, предлагани от Affymetrix (Affymetrix GeneChip), селекцията на SNPs е случайна (random panels of SNPs) без оглед на неравновесната скаченост между тях. Въпреки, че това не е най – ефикасния начин за цялостно покритие на генома, предимството на тези чипове е, че те предлагат голямо изобилие от маркери. Тъй като LD не е взета под внимание при селекцията, то се предполага, че поне част от генотипираните SNPs са взаимно свързани и маркерите, които не са анализирани могат да бъдат в неравновесна скаченост с един или повече от тях. Следователно, ако

генотипирането на даден маркер е неуспешно (той е неинформативен), има възможност информацията да се получи от друг SNP.

Установено е, че 500 К чипа на Affymetrix (могат да се анализират до 500 000 SNPs) обхваща 66% от вариантите в генома при азиатска популация (HapMap) и 41% при Юруба, в сравнение с 65% покритие при европейска популация [235].

Другият тип платформи (генотипиращи чипове) за генотипиране, предлагани от Illumina, се базират на неравновесната скаченост между SNPs и включват само тези от тях, които са в силна неравновесна скаченост с по – голямата част от останалите SNPs, т.е. само tagSNPs. Тези панели предлагат цялостно покритие на генома, поради което са много ефикасни. Така например, 300 К BeadChip на Illumina (чип за цялостен геномен скрининг, позволяващ анализирането на над 300 000 tagSNPs), обхваща 75% от всички чести варианти (честота на редкия алел (MAF) >=0.05, r^2=0.8), докато 550 К (чип позволяващ анализирането на над 550 000 tagSNPs) – 90% при същите условия в европейска популация [235]. Неудобството при използването на тези панели от представителни SNPs (tagging panels) идва от факта, че неуспешното анализиране дори и на един SNP, прави неинформативни всички останали варианти, които са в неравновесна скаченост с него. В допълнение, ефикасността на тези панели зависи силно от изследваната популация. Така например, 300 К чипа обхваща само 28% от честите варианти в генома при Юруба, в сравнение с 75% при европейци. При 550 К чипа, степента на покритие намалява от 90% при европейска популация до 57% при Юруба. С цел повишаване степента на покритие на генома и по – доброто изследване на африканска и афро – американска популации, Illumina предлага в допълнение към своя 550 К чип още 100 000 tagSNPs, които са специфични за Юруба.

1.9. Преглед на проведените широко мащабни асоциативни проучвания при биполарно разстройство

Широко мащабните асоциативни проучвания се прилагат успешно при голям брой комплексни заболявания. Към днешна дата, за заболявания като диабет тип 1 и 2, ракът на простатата, ракът на гърдата, болестта на Parkinson, хроничната лимфоцитна левкемия (CLL) и много други са идентифицирани и потвърдени голям брой локуси, които предразполагат към развитието им. Подробен каталог на проведените цялостни геномни скрининги до септември 2008г. може да бъде намерен на страницата на Националния институт за изследване на човешкия геном (National Human Genome

Research Institute) към националните институти по здравеопазване (NIH; National Institutes of Health) на адрес: www.genome.gov/26525384 [236].

До 2008г. проведените широко мащабни асоциативни проучвания при биполарно разстройство са четири (таблица 5). Три от тези изследвания [231, 237, 238] използват Affymetrix, а едно Illumina [239] като генотипиращи платформи.

Анализирайки ДНК пулове (комбиниране на много индивидуални ДНК проби) от 1233 случая и 1439 контроли, Baum и колеги (2008) установяват асоциация между биполарното разстройство и SNP (rs1012053, P = 1.5 X 10^{-8}) в гена за диацилглицерол киназа (*DGKH*). Генът е картиран в хромозома 13q14.11 и представлява интерес, тъй като неговият продукт е включен във фосфатидил инозитоловия път, чрез който литият упражнява някои от своите стабилизиращи настроението ефекти.

В друг геномен скан (WTCCC, 2007), при индивидуално генотипиране на 1868 случая и 2938 контроли е идентифициран локус в район с висока неравновесна скаченост в късото рамо на хромозома 16 (16p12) включващ няколко гена - *PALB2,* чиито продукт е необходим за стабилността на ключови ядрени структури, включително на хроматина; *NDUFAB1*, който кодира един от компонентите в митохондриалната дихателна верига и *DCTN5*, който взаимодейства с *DISC1* (ген асоцииран с шизофрения и биполарно разстройство [240-242].

Sklar и колеги (2008) провеждат широко мащабно асоциативно изследване върху 1461 случая и 2008 контролни индивида и получават статистически значими резултати за два варианта - rs4939921 (*P* = 1.7 X 10^{-7}) в гена за миозин (*MYO5B*) и rs1705236 (*P* = 6.1 X 10^{-7}) в гена за тетраспанин – 8 (TSPAN8). Проведеният хаплотипен анализ също показва асоциация. Въпреки това, допълнителното генотипиране на тези и други значими SNPs в две нови извадки (409 триоса; 365 случая и 351 контроли) не потвърждава първоначалната находка.

Използвайки генотипираща платформа, като тези на Sklar et al и The WTCCC, Ferreira и колеги (2008), анализират 1098 биполарни пациенти и 1267 контроли, като установяват асоциация за SNP (rs7221510, P = 1.4 X 10^{-6}) в гена *SKAP1*. Проведеният в последствие мета – анализ, включващ гореспоменатата извадка и данни от WTCCC (2007), Sklar et al (2008) (общо 4387 случая и 6209 контроли) установява силна асоциация на два варианта: rs10994336 (*P* = 9.1 X 10^{-9}) в гена за анкирин – G (*ANK3*) и rs1006737 (P = 7.0 X 10^{-8}) в *CACNA1C* гена.

Мета – анализът на данните от цялостните геномни сканове, проведени от Baum et al (2008) и The WTCCC (2007), идентифицира още два допълнителни гена *JAM3* и *SLC39A3* като евентуално асоциирани с биполарното разстройство [243].

Таблица 5: Широко мащабни асоциативни изследвания и мета –анализи при биполарно разстройство проведени до 2008г.

Година	Първи автор	Произход на извадката	Диагностични критерии*	Генотипираща платформа	Случаи	Контроли	Топ SNP	Ген (Хромозома)	*P* стойност
2007	WTCCC	Англия	ИДК, BPD I, BPD II, ШАР, биполарен тип, мания	Affymetrix 500K	1868	2938	rs420259	PALB2 (16)	$6.3X10^{-8}$
2008	Baum	САЩ/ Германия	DSM-IV (BPD I)	Illumina 550 (ДНК пулове)	1233	1439	rs1012053	DGKH (13)	$1.5X10^{-8}$
2008	Sklar	САЩ/ Англия	DSM-IV/ICD-10 BPD I	Affymetrix 500K или 5.0	1461	2008	rs4939921	MYO5B (18)	$1.7X10^{-7}$
2008	Ferreira	САЩ/ Англия/ Ирландия	BPD I, BPD II	Affymetrix 5.0 или 6.0	1098	1267	rs7221510	SKAP1 (17)	$1.4X10^{-6}$
2008	Baum	Мета – анализ (WTCCC+ Baum), индивидуално генотипиране			3101	4377	rs10791345	JAM3 (11)	$1X10^{-6}$
2008	Ferreira	Мета – анализ (WTCCC+ Sklar+ Ferreira)			4387	6209	rs10994336 rs1006737	ANK3 (10) CACNA1C (12)	$9.1X10^{-9}$ $7.0X10^{-8}$

* Изследователски диагностични критерии (Research Diagnostic Criteria); BPD I – биполарно разстройство тип I; BPD II - биполарно разстройство тип II; ШАР – шизоафективно разстройство, биполарен тип (schizoaffective bipolar type)

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел

Да се проучат генетични варианти в известни кандидат гени за асоциираност с биполарното разстройство и да се идентифицират нови полиморфизми, предразполагащи към развитие на заболяването в българска популация.

Задачи

1. Да се направи подбор и да се анализират полиморфизми в:
    A. гени, доказали асоциация със заболяването в други популации;
    B. кандидат гени, неизследвани до момента за асоциация в българска популация;
    C. гени, неизследвани за асоциация със заболяването, но с предполагаемо участие в неговата патогенеза, поради нарушена експресия в мозъка при пациенти с биполарно разстройство.
2. Да се определи алелната и генотипната честота на анализираните полиморфизми в български пациенти и контроли и да се изследва тяхната асоциация с биполарното афективно разстройство.
3. Да се верифицират резултатите за всички полиморфизми, показали положителна асоциация, посредством анализирането им в допълнителна група от случаи и контроли.
4. Да се проведе широко мащабно асоциативно проучване за идентифициране на нови полиморфизми, чрез цялостно сканиране на генома и анализиране на повече от 550 000 SNPs при български пациенти с биполарно разстройство и контроли.
5. Да се валидизират и реплицират резултатите от цялостния геномен скрининг, посредством повторно генотипиране на най – силно асоциираните SNPs в допълнителна група от случаи и контроли.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. Клиничен материал

Извадката от пациенти (случаи) включва общо 310 неродствени индивида от български произход, от които: 232 (74.8%) с диагноза биполарно разстройство тип I, 9 пациента (2.9%) с диагноза биполарно разстройство тип II и 69 индивида (22.3%) с диагноза биполарно разстройство (неуточнен тип). Пациентите са набрани от регионални психиатрични болници и диспансери в градовете София, Пловдив, Русе, Благоевград, Раднево в България. Диагнозата е поставена от лекуващите лекари въз основа на цялата налична клинична документация (епикризи от предишни хоспитализации, здравни картони), подробни анамнестични данни и полуструктурирани интервюта (съкратената версия на СКАН (SCAN; Schedule of Clinical Assesment in Neuropsychiatry) [2], съгласно изискванията на DSM-IV критериите. При несъответствие по отношение на диагнозата, с пациента е проведено допълнително детайлно интервю от двама независими лекари-специалисти, с цел постигане на консенсусна диагноза.

Контролната група се състои от 704 неродствени, психически здрави индивида, подбрани от същите региони на България и съответстващи на болните по пол, възраст и етнически произход. Контролите са набрани сред пациенти на общо практикуващи лекари сред медицински персонал и сред кандидати за придобиване на свидетелство за управление на МПС. Някои демографски характеристики за двете изследвани групи са представени в таблица 6.

Таблица 6: Демографски данни за случаи и контроли

Показател	**Контроли**		**Случаи**	
Брой индивиди	704		310	
Пол	*мъже*	*жени*	*мъже*	*жени*
	350 (49.7%)	354 (50.3%)	119 (38.4%)	191 (61.6%)
Средна възраст (стандартно отклонение)*	47 (±16)	50 (±15.2)	39 (±15.3)	37 (±17.2)

* липсват данни за възрастта на 27 пациента (11 мъже и 16 жени)

На всички пациенти и контроли е дадена пълна информация за изследването и те са подписали информирано съгласие за участие. Одобрение за провеждане на

изследването е получено от всички местни етични комисии, където са събирани пробите, както и от етичната комисия в института в Йокохама (Yokohama), RIKEN (The Institutes of Physical and Chemical Research), Япония.

3.2. Биологичен материал

Значителна част от ДНК пробите (220 пациенти) и всички контроли са набрани в рамките на съвместен проект между Катедрата по медицинска генетика, при Медицинския университет София и Катедрата по невропсихиатрична генетика, при Медицински университет, Кардиф, Великобритания, в периода 2000 – 2006 г., с финансовата подкрепа на Janssen Research Foundation. Останалата част от пробите (90 пациента) са набрани допълнително от Катедра медицинска генетика, при Медицински университет София през 2007 г.

За генетичен анализ е използвана високомолекулна ДНК изолирана от ядрени кръвни клетки. Използвани са 10 ml венозна кръв, взета стерилно в пластмасови епруветки (вакутейнери), съдържащи K_3EDTA като антикоагулант. Кръвта е транспортирана на 4ºC до 24-48h в молекулярно-генетичната лаборатория в Катедрата по медицинска генетика, където веднага е подложена на обработка за изолиране на високомолекулна ДНК.

Принцип: В настоящата работа е използван метод за изолиране на ДНК чрез фенол-хлороформна екстракция.

Методът включва следните етапи:

- Разрушаване на кръвните клетки с хипотоничен солеви разтвор;
- Утаяване на ядрата след центофугуране;
- Лизиране на ядрата с подходящ за целта буфер и протеиназа К в присъствието на SDS (детергент, който дисоциира протеините от ДНК и създава условия за действието на ензима);
- Очистване на белтъците и протеиназата от ДНК чрез последователно третиране с фенол, фенол : хлороформ : изоамилов алкохол (25:24:1) и хлороформ : изоамилов алкохол (24:1);
- Утаяване на ДНК с 96% етанол;
- Разтваряне на ДНК в 500-1000µl стерилен ТЕ буфер и съхраняване на –20ºC.

Използвани разтвори и реактиви:

1. Еритроцит лизиращ буфер: 155 mM NH4Cl; 10 mM KHCO3; 0,1 mM EDTA pH 7.4 (NaOH).
2. Нуклеолизиращ буфер: 75 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8.00 (NaOH).
3. Натриев додецил сулфат (SDS – Gibco BRL) 10% разтвор с бидестилирана вода.
4. Протеиназа К, 20 U/mg (Promega) концентрация 20 mg/ml.
5. Фенол, еквилибриран с Tris pH 8.0 (Merck 00206).
6. Хлороформ (Merck 02444).
7. Изоамилов алкохол (Merck 00979).
8. Етилов алкохол – абсолютен (Merck 00983).
9. ТЕ – буфер: 10 mM Tris; 0,1 mM EDTA pH 7.4.

Апаратура:

1. Центрофуга Rotina 46.
2. Устройство за разбъркване – Vortex - Genie 2.
3. Термостат.

След изолирането, високомолекулната геномна ДНК е съхранявана в ТЕ буфер при -20ºС в ДНК-банката на Катедрата по медицинска генетика. От всяка проба е взето равно количество (200 µl); пробите са транспортирани върху сух лед до Institute of Medical Science, Laboratory of Pharmacogenetics, RIKEN, Йокохама, Япония, където са проведени анализите.

Концентрацията и чистотата на всяка ДНК проба са определени със спектрофотометър NanoDrop® ND-1000, V3.3 (NanoDrop Technologies, Inc.), като за целта е използвана 1 µl проба. За определяне чистотата на ДНК е взето съотношението от абсорбцията на ДНК при 260nm и 280nm дължина на вълната. При съотношение A260:A280=~1.8, ДНК се приема за ‘чиста’ (свободна от примеси).

За количествено оценяване на наличието и степента на деградация на ДНК е проведена електрофореза в 1% агарозен гел, с 1 µl проба. Регистрирането на smear и липсата на ясно ограничена ивица е показател за ДНК-деградация. Концентрациите на двадесет и пет проби, показали ниска стойност на съотношението A260:A280 и наличие

на smear са оценени допълнително в институт RIKEN, Yokohama, SNP research center, с PicoGreen®, dsDNA Quantification Kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) съгласно протокола на производителя [244].

След измерване на концентрацията, пробите са разредени с Tris EDTA буфер (pH 8.0) до 50ng/µl за цялостния геномен скрининг и до 5ng/µl за асоциативно проучване на кандидат гени.

3.3 Дизайн на експерименталната работа

Експерименталната работа при настоящия научно – изследователски труд обхваща най – общо два етапа. През първият етап, с помощта на базата данни PubMed на NCBI (National Center for Biotechnology Information, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) са проучени максимален брой литературни източници, описващи молекулярно-генетични изследвания при биполарно разстройство и е изготвен списък от 199 кандидат маркера (единични нуклеотидни полиморфизми) от 65 гена. След направения подбор, за всеки вариант е избран метод за генотипиране, а именно: за 47 полиморфизма е използван метод TaqMan, а останалите 152 маркера са анализирани чрез Invader метод, комбиниран с мултиплексна полимеразна верижна реакция (MPCR, multiplex PCR) с проби и праймери по собствен дизайн.

Всички маркери, независимо от избрания за генотипиране метод, първоначално са анализирани в серия от 94 случая и 184 контроли. След прилагане на точен тест на Фишер, полиморфизмите показали статистически значими разлики в алелните и генотипните честоти сред случаи и контроли са генотипирани в нова серия от 78 случая и 372 контролни индивида. В последствие, тест на Фишер е проведен отделно върху данните от второто генотипиране, както и върху обобщените данни от двете генотипирания и е извършена корекция за множествени сравнителни процедури.

Вторият етап на научната разработка е посветен на цялостното геномно асоциативно проучване. С помощта на Illumina Bead Array 550K генотипиращ чип първоначално са анализирани 554 496 единични нуклеотидни полиморфизма в 188 български пациенти и 376 здрави индивида (Група 1). След филтриране на получените данни по определени критерии, за по-нататъшен анализ са подбрани общо 497 732 полиморфизма. За валидизиране на резултатите от цялостното геномно сканиране, първите 100 маркера, показали най – значима асоциация със заболяването са генотипирани чрез Inavder метод, комбиниран с мултиплексна полимеразна верижна

реакция в същата извадка от 188 случая и 376 контроли (Група 1). С цел потвърждаване на резултатите, стоте маркера са анализирани и в допълнителна серия от 122 случая и 328 контроли (Група 2) със същия метод. Така, общият брой изследвани проби с цел валидизиране и потвърждаване на резултатите от цялостното геномно асоциативно проучване е 310 случая и 704 контроли (Група 1 + Група 2). За статистическа оценка на резултатите от генотипирането в Група 2 е използван точния тест на Фишер, а върху обобщените данни от анализирането на всички проби (Група 1 + Група 2) е приложен тестът на Cochran-Mantel-Haenszel (CMH test). Извършена е и корекция за множествени сравнителни процедури по метода на Бонферони.

3.4. Методи за генотипиране на генетични варианти

За изследване на генетичните варианти в настоящата работа са използвани следните методи: TaqMan метод за генотипиране на SNPs и Invader метод, комбиниран с мултиплексна полимеразна верижна реакция (MPCR – Invader assay).

3.4.1 Метод за генотипиране на полиморфизми чрез алел – специфична хибридизация (TaqMan метод)

Поради своята висока производителност, специфичност, чувствителност, бързина, точност и финансова рентабилност, TaqMan е предпочитан метод за генотипиране при анализ на сравнително малък брой полиморфизми в голяма извадка. Методът е описан за първи път през 1991 г. от Holland и колеги [245], а впоследствие Roche Molecular Diagnostics и Applied Biosystems разработват технологията за диагностични и изследователски цели.

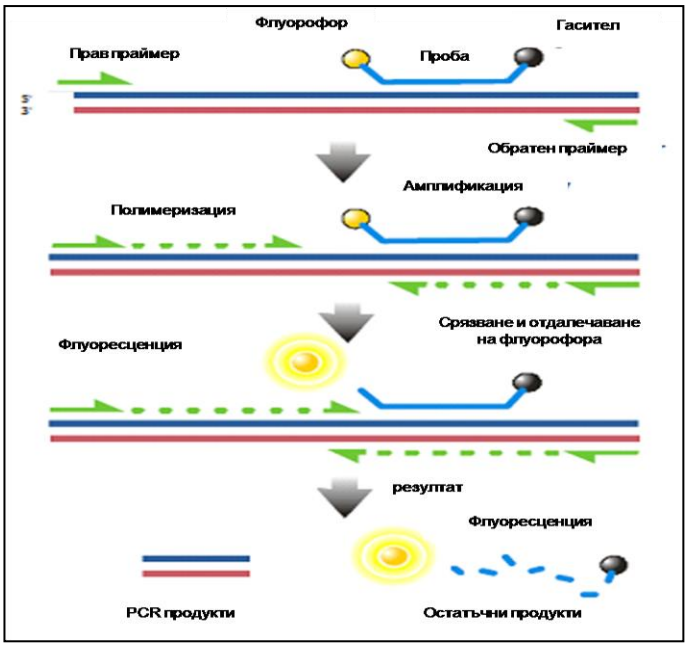
Понастоящем, компанията Applied Biosystems поддържа и предлага една от най-големите в света колекции на предварително конструирани (pre-designed), валидизирани и налични проби (установена е минималната алелна честота на полиморфизмите в 2 до 4 популационни групи) за генотипиране на SNPs чрез TaqMan (inventoried probes), както и такива, които се произвеждат и преминават процес на валидизация, само ако бъдат поръчани (made to order probes). При липса на проба за даден полиморфизъм, съществува възможност за създаването й по избор на клиента (custom made probes).

TaqMan пробите използвани за генотипиране на полиморфизми в настоящата научна разработка са предварително конструирани и предоставени от Applied

Biosystems, заедно с универсалния TaqMan микс.

3.4.2 Принцип на метода

TaqMan методът комбинира полимеразна верижна реакция и детекция на мутацията в една стъпка, като се използва 5’→3’екзонуклеазната активност на ензима Taq ДНК полимераза. За провеждането на PCR са необходими двойка специфични праймери (прав и обратен) за амплифициране на даден ДНК фрагмент в който се намира нуклеотидната замяна и двойка алел – специфични проби, комплементарни на всеки един от двата алела на изследвания SNP. Всяка проба е двойно белязана, като в 5’ края си носи флуорофор (FAM и VIC), а в 3’ края си – ‘заглушител’ на флуоресценцията (minor groove binder, MGB). Когато пробата е интактна, близостта на ‘заглушителя’ до флуорофора, подтиска неговата флуоресценция, индуцирана от светлинен източник, посредством флуоресцентен резонансен енергиен трансфер (FRET). Процес, при който енергията от възбудена флуорофорна молекула се пренася върху акцепторна молекула -“заглушител” на флуоресцирането. Пробите хибридизират с определена последователност от амплифициращия се ДНК фрагмент, в мястото на нуклеотидната замяна. По време на фазата на удължаване на праймера и синтез на новата верига от Taq ДНК полимеразата, 5’екзонуклеазната активност на ензима разгражда разположената отпред проба, хибридизирала с ДНК матрицата. По този начин флуорофора се отдалечава от ‘заглушителя’, което води до увеличаване интензитета на флуоресценция. При несъответствие между пробата и таргетната ДНК, поради намалената хибридизация, не се генерира флуоресцентен сигнал [246] (фигура 6).



Фигура 6: Принцип на TaqMan метода

PCR реакцията протича в краен обем от 5 µl при следните условия:

Начална денатурация	95°C	10 min	
Денатурация	95°C	15 sec	40 цикъла
Хибридизация	58°C	1 min	
Синтез	72°C	15 sec	
Прекъсване на реакцията	4°C	∞	

Необходими реактиви и разтвори:

1. Геномна ДНК 5ng/µl
2. Готов TaqMan универсален микс 2X
3. Готов микс от праймери и проби 80X
4. DW (дестилирана вода)

Апаратура:

1. Центрофуга за PCR плаки
2. GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA)
3. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System

Техника:

1. В епруветка, на лед се приготвя реакционната смес, както следва:

	1 проба/1 SNP
TaqMan Universal Master Mixture	2.5 µl
80X Primer-probe mixture	0.06 µl
DW (дестилирана вода)	1.4 µl
Общ обем	**4 µl**

Количествата на необходимите реактиви се преизчисляват в зависимост от броя анализирани индивиди.

2. За всяка TaqMan реакция са използвани 384 – ямкови плаки, като в една такава плака могат да се анализират ДНК проби от четири 96 – ямкови плаки. На всяка плака се обозначава изследваната група (случаи, контроли) и rs на SNP за който тя е генотипирана.
3. Така подготвената плака се поставя на лед и с помощта на мултиканална пипета от приготвената вече реакционна смес се разпределят по 4 µl в кладенче.

4. Центрофугира се за няколко секунди на 60-70 оборота при 4°C без да се покрива.
5. Отново на лед, в съответните кладенчета с реакционната смес се добавя 1 µl геномна ДНК, 5ng/µl.
6. Плаката се покрива със специална лепенка, центрофугира се за кратко и се фиксира върху PCR апарата като се задават по – горе описаните условия на амплификация.
7. След приключване на PCR, плаката се центрофугира за секунди на 4°C, и се анализира с помощта на Applied BiosystemsTM 7900HT Real-Time PCR system - ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System.

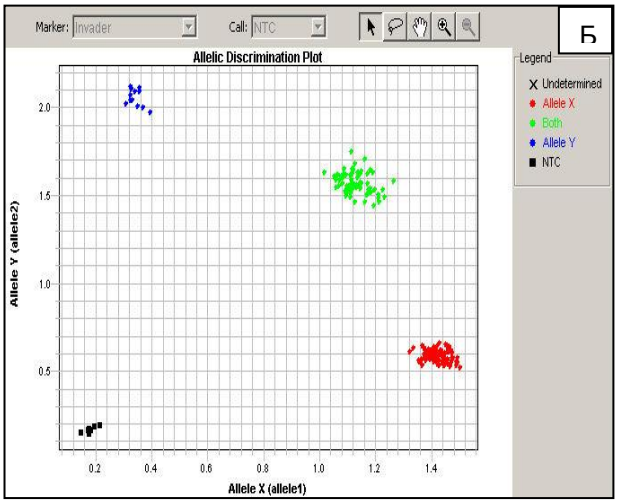
Разчитане и анализ на данните

Applied BiosystemsTM 7900HT Real-Time PCR system - ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System разполага с удобен за работа софтуер чрез който, предварително се създава т. нар. матрица, която описва точния вид на анализираната 384 – ямкова плака. Обозначават се заетите кладенчета, както и местата на т. нар. негативни контроли (NTC), кладенчета в които няма ДНК проба и не би трябвало да се отчете флуоресцентен сигнал. Веднъж създадена тази матрица служи за анализ на всички плаки от същия вид. При използването на друг вид плака (с различно разположение на заетите кладенчета и NTC) се създава нова матрица. След създаването на матрицата, плаката се поставя в апарата и софтуерът осигурява автоматично измерване и едновременно нормализиране на флуоресцентните сигнали от всяко кладенче. Резултатите се представят в табличен (фигура 7А) и в графичен вид, под формата на алел – дискриминационна диаграма (Allelic Discrimination Plot) (фигура 7Б). На получената графика, активна в момента на анализа, визуално могат да се проследят групите проби, от които е регистриран флуоресцентен сигнал, като нормализираният сигнал от всяка проба е представен с отделна точка. С други думи, хомозиготните по алел 1 проби се регистрират като червени точки по оста X (VIC® флуоресценция), хомозиготните по алел 2 – като сини точки по оста Y (FAM™ флуоресценция), а хетерозиготите – като зелени точки между двата хомозиготни клъстера (VIC®/FAM™ флуоресценция).

А

SDS 2.1	AD Results	1							
Filename	rs769390_contr3_4_070419.sds								
PlateID									
Assay Type	Allelic Discrimination								
Run DateTime	4/19/07 9:36:50 PM								
Operator									
Sample Information									
Well	Sample Name	Marker Name	Allele X Rn	Allele Y Rn	Call	Quality Value	Call Type	Task	Passive Ref
1	A1	Invader	1.3147726	0.6241252	allele1	98.05	Automatic	Unknown	4130.9727
3	A3	Invader	1.3285569	0.64935464	allele1	98.54	Automatic	Unknown	3985.282
5	A5	Invader	1.3665934	0.64574194	allele1	99.53	Automatic	Unknown	3714.2368
7	A7	Invader	1.3578508	0.6600665	allele1	99.31	Automatic	Unknown	4285.7827
9	A9	Invader	1.0099176	1.6465379	Both	98.41	Automatic	Unknown	4091.5178
11	A11	Invader	1.366319	0.6515007	allele1	99.51	Automatic	Unknown	3728.6235
13	A13	Invader	1.3703698	0.6170044	allele1	99.64	Automatic	Unknown	3660.3577
15	A15	Invader	1.3807167	0.6137354	allele1	99.8	Automatic	Unknown	3670.7498
17	A17	Invader	0.36149138	2.020392	allele2	99.64	Automatic	Unknown	3597.5767
19	A19	Invader	1.3868935	0.6074777	allele1	99.87	Automatic	Unknown	3694.1467
21	A21	Invader	1.1037374	1.5651331	Both	99.88	Automatic	Unknown	3900.2
23	A23	Invader	1.3567379	0.5871612	allele1	99.31	Automatic	Unknown	3811.5845
25	B1	Invader	1.3921455	0.63533354	allele1	99.89	Automatic	Unknown	4578.6816
27	B3	Invader	1.3999639	0.658315	allele1	99.83	Automatic	Unknown	4649.808
29	B5	Invader	1.3693678	0.63664496	allele1	99.6	Automatic	Unknown	4449.906
31	B7	Invader	1.3947507	0.6205466	allele1	99.93	Automatic	Unknown	4602.5913
33	B9	Invader	1.0579206	1.6307327	Both	99.46	Automatic	Unknown	4666.8643
35	B11	Invader	1.396811	0.64956754	allele1	99.86	Automatic	Unknown	4703.7207

Б



Фигура 7: Таблично (А) и графично (Б) представяне на резултатите от TaqMan за SNP rs769390 (*GAD1*) след разчитане на плаката. Полиморфизмът е генотипиран в 184 контролни индивида. Групата червени сигнали по оста X, отразява индивидите хомозиготи по алел 1 (VIC® флуоресценция), групата от сини сигнали по оста Y – индивидите, хомозиготи по алел 2 (FAM™ флуоресценция), а зелените сигнали съответстват на хетерозиготите (VIC®/FAM™ флуоресценция). Черните квадратчета в долния ляв ъгъл отразяват негативните контроли (в случая, липсва контаминация в съседни кладенчета).

В случаите, когато автоматичното детерминиране на сигналите е затруднено, при възможност, данните се коригират мануално, по субективна оценка. При успешно протекла реакция и ясно разграничаване на трите клъстера, резултатите се записват на външен носител под формата на текстов файл и се обработват в Microsoft® Excel. Статистическата обработка на резултатите става чрез точнен тест на Фишер, като се пресмятат алелните и генотипни честоти и се проследява наличието или липсата на статистически значими разлики в двете изследвани групи (случаи и контроли).

3.4.3 Генотипиране на полиморфизми чрез Invader метод, комбиниран с мултиплексна полимеразна верижна реакция.

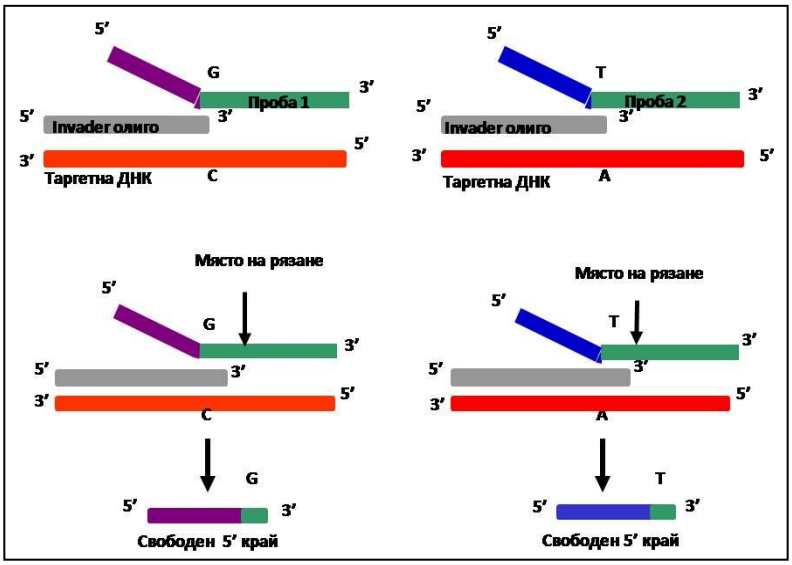
3.4.3.1 Принцип на Invader метода

Invader технологията, разработена от Third Wave Technologies (http://www.twt.com) комбинира структурно – специфични ендонуклеазни ензими за рязане и флуоресцентен резонансен енергиен трансфер. Методът протича в две едновременни, циклични, изотермални реакции и разчита на идеалното съвпадение на ензима с неговия субстрат. В първата реакция много прецизно се детектира мястото на нуклеотидната замяна, а втората се използва за амплификация на сигнала и отчитане на резултатите.

Всяка Invader реакция включва две таргетни, SNP специфични сигнални проби

(съответстващи на ‘дивия’ и на ‘мутантния’ тип алели на изследвания полиморфизъм), Invader олигонуклеотид (проба), две универсални FRET проби (universal fluorescence resonance energy transfer cassettes), белязани с два различни флуорофора (VIC и FAM) и ензим – клеваза (Cleavase enzyme; термостабилна Flap ендонуклеаза (FEN), изолирана от едноклетъчни микроорганизми) [247, 248], която разпознава и реже образуваната при реакцията тройна структура.

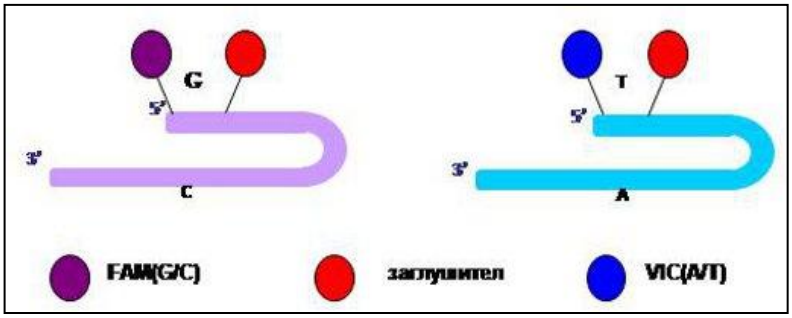
В първичната реакция, два олигонуклеотида (проби) хибридизират с едноверижната таргетна ДНК (съдържаща SNP), като образувт специфична тройна стуктура в мястото на SNP. Invader пробата е комплементарна на таргетната ДНК с изключение на мястото на SNP (в 3’ края си има база, която не съвпада с базата в SNP). Алел –специфичната проба има база, комплементарна на тази в SNP, но в 5’ края си завършва с няколко допълнителни некомплементарни нуклеотида. Когато се образува специфичната тройна структура (сандвич), тя се разпознава от ензима – клеваза и бива срязана от него, като се освобождава къс ДНК фрагмент, наричан още 5’ рамо (flap) (фигура 8). За един час всяка таргетна ДНК, съдържаща SNP може да индуцира освобождаването на няколко хиляди такива фрагмента [248], които в последствие се включват във вторичната реакция.



Фигура 8: Първична реакция при Invader

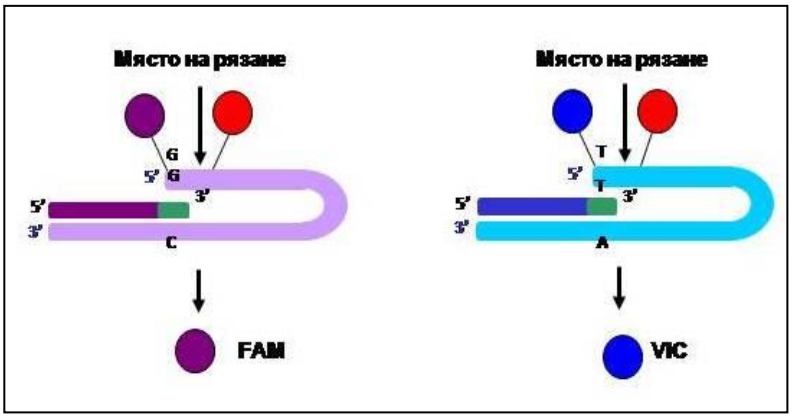
Във вторичната реакция се включват и двете универсални FRET проби, чиято структура е изобразена на фигура 9. На 5’ края си всяка FRET проба носи флуорофор (донорна молекула, VIC и FAM), съответстващ на всеки един от двата алела на анализирания SNP (в случая, FAM за G/C и VIC за A/T). Флуоресценцията на

флуорофора първоначално е заглушена от близко разположената до него акцепторна молекула (заглушител). Итук в резултат на FRET, енергията от възбудената донорна молекула се предава на акцепторната молекула, а полученият в резултат на отдалечаването на донора от акцептора флуоресцентен сигнал може да бъде уловен от различни системи за детекция на флуоресценцията [248, 249].



Фигура 9: Структура на универсалните FRET проби.

Освободените при първичната реакция 5’ рамена, участват във вторичната реакция като Invader олиго. Те отново хибридизират с FRET пробите, като образуват специфичната тройна структура. В случая, 5’ рамото носещо G алела на SNP ще хибридизира с FRET пробата белязана с FAM. Клевазата отново разпознава образуваната тройна структура и срязва съответната FRET проба. В резултат на това, флуорофора се освобождава от ‘заглушителя’ и се генерира флуоресцентен сигнал (Фигура 10). Интензитета на сигнала се определя от съотношението на FAM или VIC към ROX (internal reference). Тъй като последователността на всяко 5’ рамо е специфична за една FRET проба се генерира различен флуоресцентен сигнал [249].

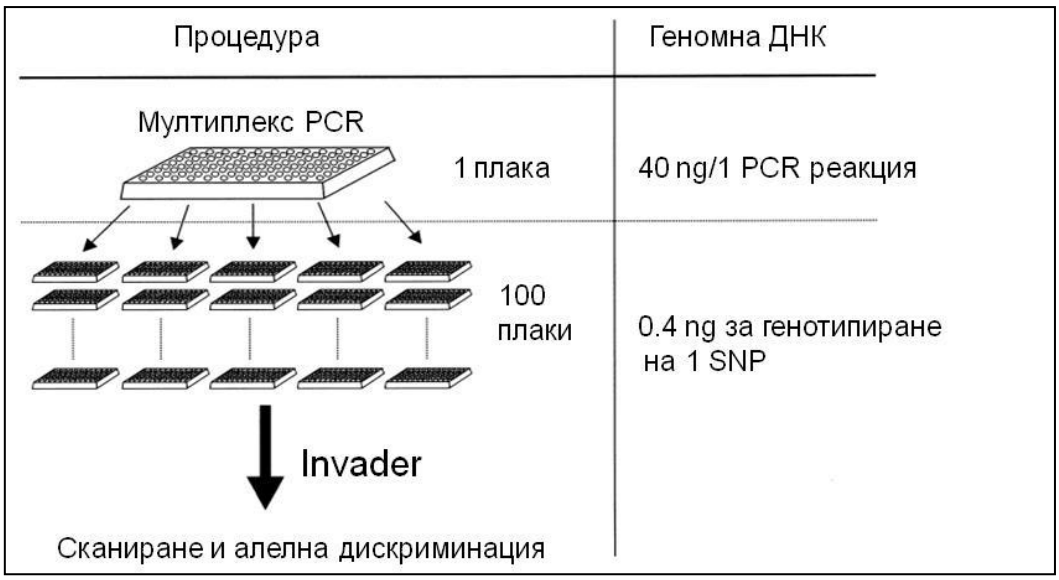


Фигура 10: Вторична реакция при Invader

Invader методът има няколко предимства. На първо място, той е високо чувствителен. Hall и колеги [250] установяват, че повече от 10^7 репортерни молекули

(флуорофори) се генерират за една таргетна ДНК при 4 часова реакция, което не налага предварителното намножаване на ДНК. При Invader се генерира и детектира амплифициран флуоресцентен сигнал, а не таргетната ДНК. Рамената, които се добавят в 5’ края на двете SNP специфични проби са универсални и могат да се използват при синтеза на проби за всеки един SNP. FRET пробите, които също са универсални, се синтезират в големи количества и могат да бъдат използвани при генотипирането на всеки един полиморфизъм. Това намалява цената за синтез на проби и прави метода значително по – икономичен, от финансова гледна точка [249].

Въпреки това, в този си формат, Invader изисква голямо количество геномна ДНК (20 – 100 ng) и дълъг инкубационен период (3 – 4 h), което налага наличието на голямо количество материал, за изследването на един пациент или предварително намножаване на таргетния район. На второ място, генотипирането само на един SNP в една реакция силно намалява ефикасността на метода. За преодоляване на тези недостатъци, Invader метода се комбинира с мултиплексен PCR, който позволява едновременното амплифициране на голям брой различни таргетни ДНК райони в една реакция и генотипирането на повече на брой полиморфизми в големи групи от индивиди. За първи път Ohnishi и колеги [251] комбинират Invader метода с мултиплексен PCR в който амплифицират таргетните райони за 100 SNPs в една реакция, като използват 40 ng геномна ДНК или 0.4 ng ДНК за един SNP (фигура 11). Те успешно генотипират 98 от тези 100 SNPs в 10 индивида и потвърждават точността на метода чрез директно секвениране.



Фигура 11: Мултиплексен PCR (Ohnishi et al, 2001)

Мултиплексната полимеразна верижна реакция (MPCR) е била приложена за първи път през 1988 г. от Chamberlain и колеги [252] за детекция на делеции в гена за дистрофин при мускулна дистрофия тип Duchenne (Duchenne muscular dystrophy; DMD). Днес методът е широко използван за анализ както на делеции, така и на мутации и полиморфизми [253, 254].

3.4.3.2 Дизайн на праймери за провеждане на мултиплексен PCR

За дизайн на праймери при генотипиране на SNPs е необходимо да се знае последователността около полиморфизма. Всички праймери използвани за провеждане на мултиплексната полимеразна верижна реакция са конструирани по собствен дизайн, като са използвани ДНК последователности с размер около 1 kb, за всеки полиморфизъм от базата данни BioMart (Ontario Institute for Cancer Research (OICR) и European Bioinformatics Institute (EBI; http://www.biomart.org/index.html). Получените ДНК последователности са експортирани във вид на текстов файл с който може да се работи в програмата Sequencher (Gene Codes Corporation, http://genecodes.com/). Непосредствено преди дизайна на праймерите всяка таргетна ДНК последователност е проверена за наличие на повторени ДНК елементи посредством опцията Repeat Masker на интернет страницата на Institute for Systems Biology (http://www.repeatmasker.org/).

За дизайн на праймерите е използван олигокалкулатора на SIGMA Genosys (http://www.genosys.jp/adt/SGJ_NN_3rd.html) – фирмата производител, при следните условия:

1. Размер на таргетната последователност между 300 и 500 bp
2. Дължина на праймера между 18 и 25 bp
3. 3’ краят на правия и 5’ краят на обратния праймер да отстоят на разстояние минимум 100 bp от SNP
4. 3’ и 5’ краищата на правия и обратния праймер да съдържат като първа база C или G
5. Температурата на топене (Tm, melting temperature) на праймерите да бъде между 58ºC и 62ºC, възможно най – близка за праймерите от една двойка
6. Праймерът не трябва да включва райони в които дадена база се повтаря повече от 3 пъти (пр. AGCGGGGGATGGGG)

7. Да липсва склонност, от страна на праймерите да формират Hairpin структури и димери

Доставените разтвори на прави и обратни праймери се съхраняват на 4ºC до започване на работа с тях.

3.4.3.3 Валидизиране на праймерите

Преди провеждане на MPCR, за всяка двойка праймери задължително се проверяват условията на работа и способността им да инициират амплификация, посредством Test – PCR.

PCR реакцията протича в краен обем от 20 µl, при следните условия:

Начална денатурация	94°C	5 min	}
Денатурация	94°C	30 sec	}
Хибридизация	60°C	30 sec	37 цикъла
Синтез	72°C	1 min	
Краен синтез	72°C	5 min	
Прекъсване на реакцията	4°C	∞	

Използвани реактиви и разтвори:

1. Разтвор на прав и обратен праймер — 50 pmol/uL всеки
2. PCR буфер с $Mg2^{+}$ — 10X
3. dNTPs (A, T, C, G) — 25 mM
4. Ензим ExTaq DNA polymerase — 5U/uL
5. ДНК матрица — 5 ng/uL
6. Диметил сулфоксид (DMSO)
7. Дестилирана вода (DW)

Апаратура:

1. Устройство за разбъркване – Vortex
2. Центрофуга
3. 96 – ямков PCR апарат (Applied BiosystemsTM 96-Well GeneAmp® PCR System 9700)

Техника:

1. За всяка двойка тествани праймери, в отделна епендорф епруветка се смесват по 1 µl от правия и обратния праймери и се добавят 18 µl дестилирана вода до

краен обем 20 µl.

2. Така получената смес (**Primer mix**) се разбърква добре на вортекс, след което се центрофугира за няколко секунди. Може да се съхранява на 4ºC до започване на работа.

3. В две отделни епендорф епруветки, на лед се приготвят двата работни разтвора (**Master mix**), единия с DMSO (+), а другия без DMSO (-) по следния начин:

Master Mix		***1 проба***
DW	7.4 µl	9.4 µl
DMSO	2.0 µl	-
10X buffer (plus $Mg2^{+}$)	3.2 µl	3.2 µl
25 mM dNTP	1.2 µl	1.2 µl
5U/uL ExTaq DNA polymerase	0.2 µl	0.2 µl
Общ обем	**14 µl**	**14 µl**

Количеството на необходимите реактиви се преизчислява в зависимост от броя на двойките праймери, които се тестват.

4. След приготвянето на двата микса, в PCR плака, на лед се изготвя и амплификационния разтвор за PCR реакцията по следната рецептура:

Master Mix (DMSO +/DMSO-)	14 µl
2.5 pmol/uL PrimerMix	4 µl
5 ng/uL Template DNA	2 µl
Общ обем	**20 µl**

Така, всяка двойка праймери, се тества и при двата вида условия: в среда с DMSO и в среда без DMSO.

5. След накапването на разтвора, плаката се залепва с лепенка, центрофугира се за кратко и на лед се пренася до PCR апарата. Фиксира се върху него и се задават по – горе описаните условия на амплификация.

6. След приключване на PCR реакцията, наличието на амплификация се установява в 1.5% агарозен гел, чрез хоризонтална електрофореза.

Изборът на условията на работа (DMSO+ или DMSO-) за всяка двойка тествани праймери става въз основа на интензитета на получените след електрофорезата

бендове. За последващи анализи се избира тази среда, в която амплификацията е протекла по – ефективно (наблюдава се по – интензивен бенд). По – голяма част от използваните в настоящата работа двойки праймери работят в среда без DMSO.

При липса на амплификация и при двата вида условия, двойката праймери се тества посредством Touch – down PCR.

Използваните реактиви, разтвори, апаратура и техниката на изготвяне на работните разтвори (Primer mix, Master mix, амплификационна смес) за провеждане на Touch – down PCR са същите както при test – PCR, като единствената разлика е в условията на амплификация.

PCR реакцията протича отново в краен обем от 20 µl, но при следните условия:

Начална денатурация	94°C	5 min	
Денатурация	94°C	30 sec	10 цикъла
Хибридизация	60°C	30 sec	
Синтез	72°C	2 min	
Денатурация	94°C	30 sec	30 цикъла
Хибридизация	65°/60°C*	30 sec	
Синтез	72°C	2 min	
Краен синтез	72°C	5 min	
Прекъсване на реакцията	4°C	∞	

*) - 0.3°C/цикъл

При повторен неуспех, след проведения Touch – down PCR, директно се преминава към конструиране на нова двойка праймери, като обикновено се цели синтез на ампликон с по – малка дължина, от около 300 нуклеотида. Ако и с новите праймери не се детектира амплификация на таргетната ДНК последователност при двата вида условия (с DMSO и без DMSO), последователно се провеждат Test – PCR и Touch – down PCR, като се използват 4 комбинации от праймери, в една реакция. Първите две включват първия прав и първия обратен праймер и втория прав и втория обратен праймер, а новите комбинации са от първи прав и втори обратен праймер, както и втори прав и първи обратен праймер.

Всички двойки праймери използвани за провеждане на мултиплексен PCR при асоциативното проучване на кандидат гени в настоящата научна разработка, са валидизирани чрез Test – PCR (или Touch – down PCR, при необходимост), а техните

нуклеотидни последователности, дължината им, температурата на топене и големината на таргетната ДНК последователност са посочени в Приложение 1, таблица 7.

3.4.3.4 Провеждане на мултиплекс PCR

След успешно валидизиране на всички двойки праймери се преминава към провеждане на мултиплексен PCR.

MPCR реакцията протича в краен обем 20 µl при следните условия:

Начална денатурация	95℃	5 min	
Денатурация	95℃	15 sec	40 цикъла
Хибридизация	60℃	45 sec	
Синтез	72℃	3 min	
Прекъсване на реакцията	4℃	∞	

Използвани реактиви и разтвори:

1. Геномна ДНК 5ng/µl
2. DW
3. DMSO
4. 10*Vogelstein buffer с $MgCl_2$ 78 mM
5. dNTPs (A, T, C, G) 25 mM
6. Прав праймер 50 pmol/µl
7. Обратен праймер 50 pmol/µl
8. ExTaq HS (hot start) DNA polymerase (Takara) 2.5 U/µL

Апаратура:

1. Вортекс
2. Центрофуга
3. GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) за 96 ямкови плаки

Техника:

1. В две отделни епендорф епруветки се приготвят два микса от прави и обратни праймери, които предварително са подбрани в зависимост от условията им на работа (DMSO+ или DMSO-).
2. Работи се на лед. В епруветка се приготвя реакционната смес, както следва:

20 SNPs/1 ДНК проба

DW	9.6 µl	7.6 µl
DMSO	-	2.0 µl
10*Vogelstein buffer с $MgCl_2$	3.2 µl	3.2 µl
dNTPs	1.2 µl	1.2 µl
Прав праймер	1 µl (0.05 µl X брой SNPs)	
Обратен праймер	1 µl (0.05 µl X брой SNPs)	
ExTaq HS DNA polymerase	2 µl	2 µl
Общ обем	**18 µl**	**18 µl**

Пресметнати са необходимите реактиви за 20 SNPs, за 1 ДНК проба. При промяна на броя на анализираните полиморфизми, количеството на всеки праймер се преизчислява по формулата изразена в скоби, като корекцията на общия обем на работния разтвор до 18 µl става за сметка на водата. Количествата се преизчисляват и в зависимост от броя на анализираните в една реакция ДНК проби.

3. С помощта на мултиканална пипета, в 96 ямкови плаки се разпределят по 18 µl от готовия микс
4. Добавят се по 2 µl геномна ДНК и плаките се покриват с лепенка.
5. След центрофугиране, те се фиксират върху PCR апарата и се задават условията на амплификация, описани по – горе.
6. След приключване на реакцията, PCR продуктите се подлагат на хоризонтална нисковолтова гел електрофореза в 1.5% агарозен гел. PCR реакцията се смята за успешно протекла при наличие на един или няколко широки бенда (до около 500 бази). Готовите PCR продукти се разреждат с дестилирана вода до краен обем 200 µl, покриват се с лепенка и се съхраняват на 4ºC до следващия етап от анализа.

3.4.3.5 Провеждане на Singleplex PCR (SPCR)

При необходимост от амплифициране само на една или две таргетни ДНК последователности беше провеждан т.нар. Singleplex PCR (SPCR), който също в зависимост от наличието или липсата на DMSO се означава като SPCR (+) и SPCR (-).

Използвани реактиви и разтвори:

1. Геномна ДНК 5ng/µl
2. dNTPs 25mM
3. Прав праймер 50pmol/ul

4. Обратен праймер 50pmol/ul
5. Ензим ExTaq DNA polymerase 5U/ul
6. 10X buffer (Mg^{2+})
7. DMSO
8. DW

Апаратура:

1. Вортекс
2. Центрофуга
3. GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) за 96 ямкови плаки

Техника:

1. В епруветка, на лед се приготвя работната смес както следва:

	1 ДНК проба	
DW	11 µl	13 µl
DMSO	2 µl	-
10X buffer (Mg^{2+})	3.2 µl	3.2 µl
dNTPs	1.2 µl	1.2 µl
Прав паймер	0.2 µl	0.2 µl
Обратен праймер	0.2 µl	0.2 µl
ExTaq DNA polymerase	0.2 µl	0.2 µl
Общ обем	**18 µl**	**18 µl**

Количеството на необходимите реактиви се преизчислява в зависимост от броя изследвани проби.

2. След вортексиране, от така приготвения микс, с помощта на мултиканална пипета се разпределят по 18 µl във всяко кладенче на 96 ямкова плака.
3. Прибавят се по 2 µl геномна ДНК.
4. Плаката се центрофугира за секунди, покрива се с лепенка и на лед се пренася до PCR апарата. Фиксира се върху него и се задават следните условия на амплификация:

Начална денатурация	94°C	5 min	
Денатураця	94°C	30 sec	37 цикъла
Хибридизация	60°C	30 sec	

Синтез	72°C	1 min
Краен синтез	72°C	5 min
Прекъсване на реакцията	4°C	∞

5. След приключване на реакцията, PCR продуктът отново се подлага на хоризонтална гел електорфореза за детекция на амплификация, разрежда се с дестилирана вода до 200 µl и се съхранява на 4ºC до използването му.

3.5. Хоризонтална гел електрофореза

Хоризонталната нисковолтова агарозна гел електрофореза дава възможност за разделяне на ДНК фрагменти в зависимост от техния заряд, обем и молекулна маса. За това тази техника се използва за качествено и количествено определяне на амплифицираните продукти. Идентификацията се осъществява с помощта на подходящ маркер, а разтвореният в агарозния гел етидиев бромид позволява визуализирането на ДНК под действието на UV светлина.

В настоящият научен труд, хоризонталната гел електрофореза е използвана с цел определяне наличието, количеството и дължината на фрагментите на всички PCR продукти, както и за оценка за наличие на деградация сред използваните ДНК проби.

Използвани разтвори и реактиви:

1. Агароза (WAKO)
2. 1X TBE електрофоретичен буфер (90 mM Tris-HCl, 90 mM борна киселина, 1mM Na2EDTA pH 8.0)
3. Етидиев бромид (10mg/ml)
4. Разтвор за нанасяне на пробите (30% глицерол, 0,25% бром-фенолово синьо, 2mM EDTA)
5. ДНК маркер

Необходима апаратура:

1. Микровълнова фурна
2. Апарат за хоризонтална електрофореза
3. Пластмасова вана за изливане на агарозния гел
4. Стартови гребени
5. UV – трансилюминатор с дължина на вълната 312 nm
6. Фотодокументационна система.

Приготвяне на агарозен гел:

1. Пластмасовата ваничка се облепя с лабораторна лепенка
2. В зависимост от желаната процентна концентрация се приготвя агарозен гел по следната рецептура:

	1.5% агарозен гел	***1% агарозен гел***
Агароза	3g	2g
1X TBE буфер	200 ml	200 ml

3. Сместа се вари в микровълнова фурна до пълното стапяне на агарозата. Охлажда се под течаща вода до около 50ºC и се прибавят 10µl етидиев бромид.
4. Гелът се излива във ваничката и се слага стартовият гребен. Изчаква се до пълното желиране на гела (около 20 мин) и гребена се отстранява внимателно. Ако няма да се използва веднага, гелът може да бъде съхраняван добре опакован на 4ºC до 1 месец.
5. Електрофоретичната камера се напълва с 1X TBE буфер, така че да се покрие изцяло гела

Тестване на PCR продуктите

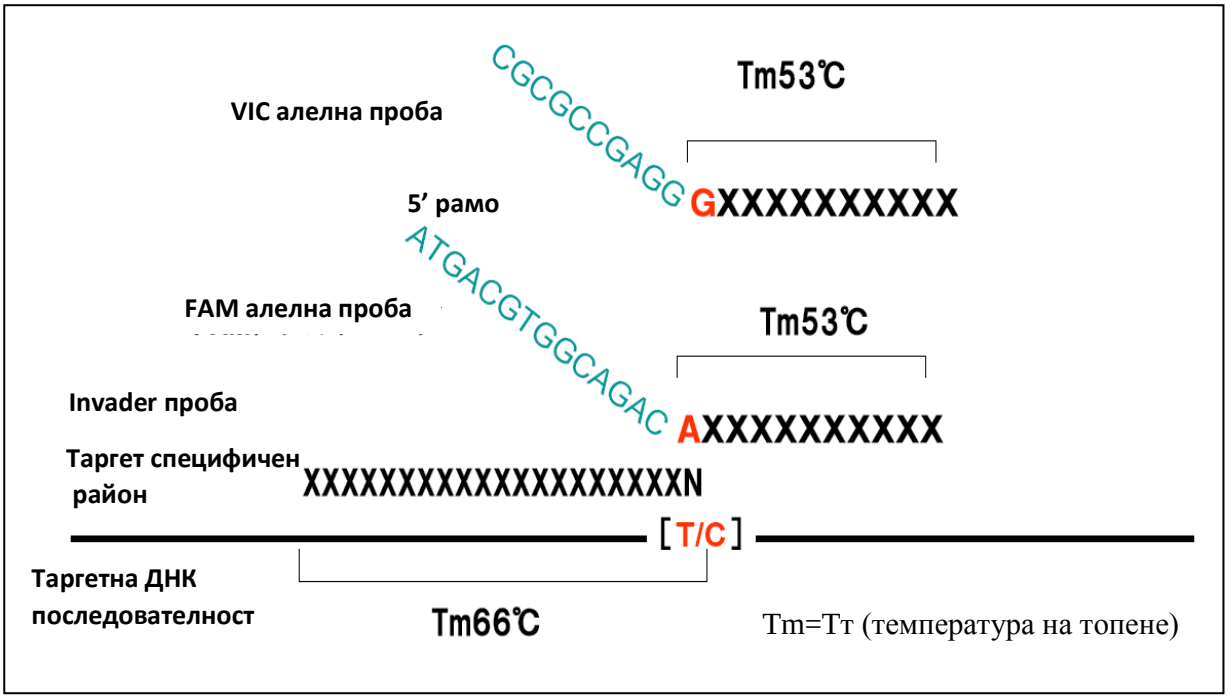
1. Към 3 µl разтвор за нанасяне на пробите се прибавят 3 µl PCR продукт и получената смес се накапва в стартовите ямки на агарозния гел. В една от ямките се накапват 5 µl маркер
2. Електрофорезата тече 20/30 мин при подавано напрежение 200/150 волта (в зависимост от големината на разделяните фрагменти)
3. PCR продуктите се визуализират с UV при 312 nm.
4. Резултатите се документират чрез заснемане с дигитална камера

3.6 Дизайн на алел специфични и Invader проби за провеждане на Inavder

За дизайн на проби при Invader е необходимо да се знаят 40 – 50 бази от последователността, непосредствено около SNP. При дизайна на пробите е използвана отново програмата Sequencher® 4.14, и същите последователности върху които са конструирани праймерите за мултиплексния PCR. След идентифициране на мястото на SNP, за дизайн на проби се използва горната верига на ДНК последователността.

За синтез на алел специфичните проби се използва тази част от последователността в 3’ посока спрямо SNP (след него). Всяка алел специфична проба се състои от 5’ рамо и таргет – специфичен район. Базата в 5’ края на таргет – специфичния район на пробата се определя от базата в SNP и трябва да е различна за двете проби, като съответства на алтернативните алели на полиморфизма. Избраната последователност трябва да има температура на топене Tm (на двуверижния участък) 53ºC (в диапазона 50 - 56ºC), като за предпочитане е Tm на двете проби да се различава с около 3ºC. След избор на подходяща последователност тя се копира в таблица на Exel и към 5’ края й се добавя секвенция (5’ рамо) от 10 и съответно 14 нуклеотида (за всяка една от двете проби), която е некомплементарна на таргетната ДНК и не се свързва с нея. Изборът, коя секвенция към коя последователност да се добави е случаен, но след това, тази информация е от изключително важно значение при разчитането и анализа на резултатите. Тъй като тези 5’ рамена са универсални, те могат да се използват при генотипирането на всеки SNP (Фигура 12).

Дизайнът на Invader олигото започва от 3’ терминалния нуклеотид на пробата, като се използва ДНК последователността в посока 5’ спрямо SNP (преди него). Този нуклеотид съвпада с таргет – специфичния район на алелната проба в мястото на SNP, но е некомплементарен на базата в SNP в долната верига на ДНК. Поради тази характерна особеност в дизайна й, Invader пробата може да се използва с всяка една от двете алелни проби. Температурата на топене на избрания фрагмент тук трябва да е около 66ºC (64 – 68ºC), което определя и по – голямата му дължина в сравнение с алел специфичните проби. За предпочитане е разликата в температурите на топене между алел специфичните проби и Invader олигото да е в диапазона 11 – 17ºC. С изключение на 3’ терминалния си нуклеотид, Invader пробата е комплементарна на таргетната ДНК последователност (Фигура 12).



Фигура 12: Дизайн на SNP специфични проби и Invader проба.

За определяне температурата на топене (Tm) при синтез на пробите е използван специално създаден за целта онлайн адрес на институт RIKEN (http://www.riken.go.jp/lab-ww/help2/members/kagawa/tmnumber.html). Всички проби за провеждане на Invader са изработени и доставени от Sigma Genosys® Japan.

Пробите с дължина над 60 нуклеотида се доставени в лиофилизирано състояние и са разтварени в ТЕ-буфер преди работа. Тъй като необходимата за провеждане на реакцията концентрация е 50 pmol/µl, за разреждане е използвана следната формула:

Xµl ТЕ-буфер = nmol:0.05

Количеството вещество (nmol) на всяка проба е обозначено на съответното флаконче. Полученият обем ТЕ-буфер се добавя към сухото вещество и се разбърква добре.

В Приложение 2, таблица 8 са посочени нуклеотидните последователности, температурата на топене и дължината на пробите, използвани при генотипирането на всеки SNP в асоциативното проучване на кандидат гени.

3.6.1 Провеждане на Invader

Използвани реактиви и разтвори:

1. DW
2. Invader буфер
3. FRET проби
4. Ензим Cleavase VIII
5. ROX 0.125 nM
6. Invader проба 50pmol/µl
7. VIC/FAM алелни проби 50pmol/µl

Апаратура:

1. 384 – канален роботизиран автоматичен пипетор Beckman Multimek за прехвърляне на PCR продукта от 96 ямкови в 384 ямкови плаки
2. Вортекс
3. Центрофуга
4. GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) за 384 ямкови плаки
5. ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System

Техника:

1. След електрофорезата MPCR продуктът се разрежда с DW до краен обем 200 µl
2. С помощта на роботизирания автоматичен пипетор Beckman Multimek, 2µl от разредения MPCR продукт се разпределят в 384 ямкови плаки. В една 384 ямкова плака може да се разпредели разтвор от четири 96 ямкови плаки. Приготвят се толкова плаки, колкото е броят на полиморфизмите, които ще се анализират и броят на изследваните ДНК проби. В нашия случай, броят на изследваните проби (94 случая и 184 контроли), позволява разполагането им в една 384 – ямкова плака. За анализ на 20 полиморфизма се приготвят 20 384 – ямкови плаки плюс 1 или 2 допълнително (в случай на грешка).
3. Плаките се оставят да изсъхнат на стайна температура за една нощ. На другия ден се опаковат и съхраняват на 4ºC до провеждане на Invader реакцията.
4. Предварително се приготвя микса от Invader и алелни проби за всеки SNP:

Invader проба	3.5 µl
VIC алелна проба	35 µl
FAM алелна проба	35 µl
DW	426.5 µl

Общ обем	**500 µl**

5. На лед в 50 ml епруветка, покрита с фолио се приготвя реакционния микс, както следва:

	1 ДНК проба	*1 SNP(400 ДНК проби)*
DW	2.125 µl	850 µl
Invader буфер	0.125 µl	50 µl
FRET	0.125 µl	50 µl
Cleavase VIII	0.125 µl	50 µl
ROX	0.25 µl	100 µl
Invader микс	0.25 µl	100 µl
Общ обем	**3µl**	**1200 µl**

Количеството на необходимите реактиви се преизчислява в зависимост от броя изследвани полиморфизми. При анализ на повече от един SNP, сместа от реактивите, без Invader микса, се разпределя в епендорф епруветки, чийто брой съответства на броя на анализираните полиморфизми и едва тогава, към всяка епендорф се добавя и Invader микса за съответния SNP.

6. С помощта на мултиканална пипета, към 384 – ямковата плака, съдържаща изсъхналия вече PCR продукт се добавят по 3 µl реакционен микс.

7. Плаките се центрофугират, проверява се дали във всяко кладенче има разтвор, покриват се с лепенка и се фиксират върху PCR апарата, като се задават следните условия за инкубация на реакцията:

   95ºC 5 мин
   63ºC 5 мин
   15°C ∞

8. След приключване на реакцията, плаките се центрофугират и се подлагат веднага на анализ. При незадоволителен резултат инкубацията се продължава по следния протокол за всеки следващ неуспешен резултат:

   63ºC 5 мин
   63ºC 20 мин
   63ºC 30 мин
   63ºC 60 мин

9. След приключване плаките могат да се опаковат във фолио и да се

съхраняват на 4ºC, на тъмно, в случай на необходимост.

Отчитане и анализ на резултатите от Invader

Разчитането на резултатите след Invader става по същият начин, както и след провеждане на TaqMan анализ. Използва се същата апаратура и същият софтуер. Единствената разлика тук е, че поради големият брой плаки (големия брой полиморфизми), които се анализират едновременно, се използва опцията за роботизирано автоматично поставяне на плаките в гнездото на четящата апаратура. Разграничаването на данните от отделните плаки става посредством идентификационен баркод, обозначен на всяка една от тях. След разчитането на флуоресцентните сигнали от всички плаки, анализът на получените резултати се проверява по същия начин, както и при TaqMan анализ. Плаките, при които се наблюдава достатъчно добро разграничаване на сигналите (съди се визуално по получения графичен плот), не се подлагат на по-нататъшни анализи. Тези, при които разделянето на сигналите не е настъпило или не е достатъчно добро, се подлагат на по-нататъшна инкубация, като се следва горепосочения протокол.

В случай, че и след инкубация при 63°C за 60 минути липсва ясно разграничаване на групите сигнали, се провежда нова Invader реакция с остатъка от разредения MPCR продукт. При повторен неуспех, се провеждат SPCR и нова Invader реакция със същите проби като се следват описаните по-горе процедури. При неуспех, се синтезират нови алел специфични и Invader проби, като за матрица се използва другата верига на ДНК.

При успешно разграничаване на сигналите, данните се прехвърлят в Excel и се пристъпва към статистическата им обработка с помощта на точния тест на Фишер (Fisher’s exact test). Ако за даден полиморфизъм се установи статистически значима разлика в разпределението на алелните и генотипните честоти сред случаите и контролите той бива анализиран в допълнителни проби.

3.7. Цялостно геномно асоциативно проучване

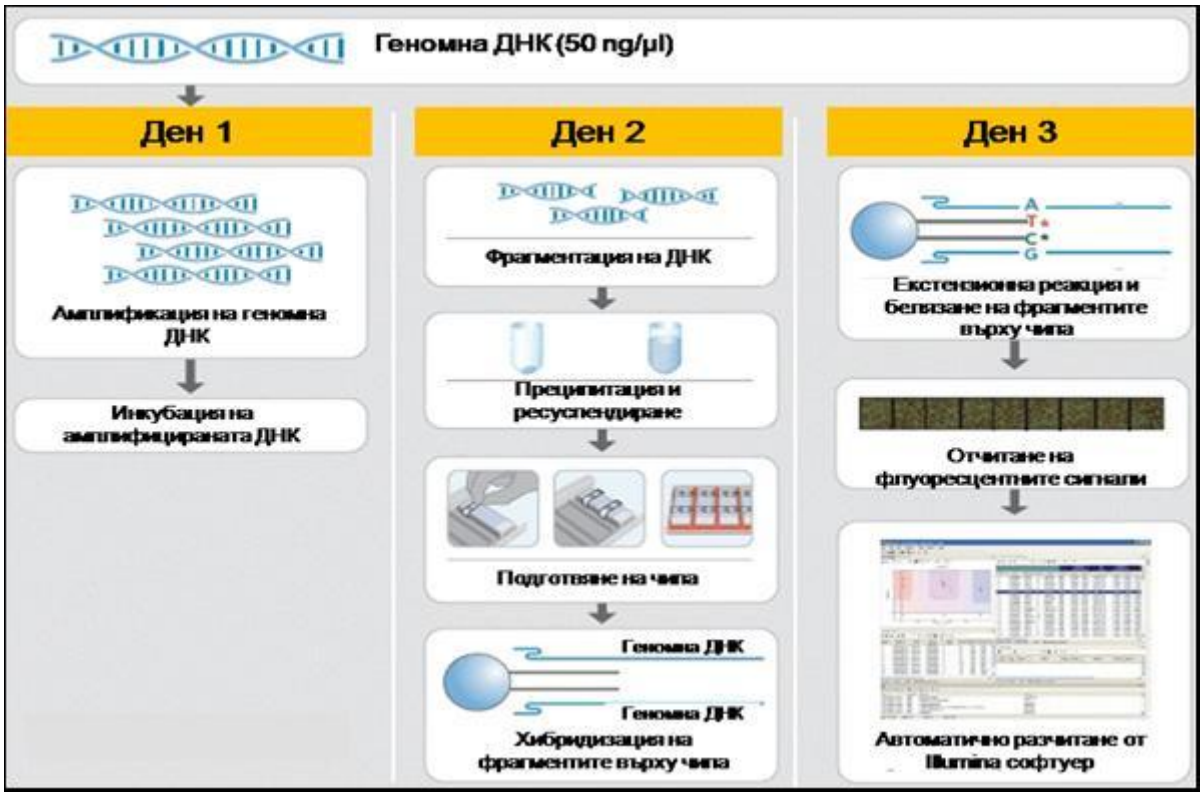
Цялостният геномен скрининг беше проведен в лабораторията за развитие на методите за генотипиране (Laboratory for Genotyping Development) към RIKEN институт в Йокохама Япония, върху 550K генотипиращия чип на Illumina (Illumina HumanHap550v3 Genotyping BeadChip), съгласно протокола на производителя за

технологията Infinium II.

Генотипиращите чипове, които Illumina предлага за цялостно геномно сканиране са уникални от гледна точка на това, че за тяхното конструиране е използвана технологията BeadArray. За разлика от конвенционалните микрочипове, върху които пробите се нанасят чрез точкуване или *in situ* синтез, BeadArray технологията разчита на случайното разпределение на многобройни силиконови мъниста върху твърд, силиконов носител. Всяко мънисто, с размер 3μm е натоварено със стотици хиляди копия на дадена локус – специфична олигонуклеотидна последователност (проба), с дължина 50 нуклеотида. Групите мъниста се разпределят случайно в кладенчетата на чипа. Флуоресцентно белязани 30 –мерни олигонуклеотиди, хибридизират с част от последователността на пробата известна като „адресна" последователност, като така позволяват да се определи много точно местоположението на всяко мънисто (кое мънисто в коя ямка е попаднало). С помощта на алгоритъм след това се проследява, кои олигонуклеотиди са хибридизирали успешно със своята таргетна „адресна" последователност. Платформата е високо флексибилна и може да бъде адаптирана за различни цели.

Методът Infinium II за цялостно геномно генотипиране, разработен от Illumina и комбиниран с технологията BeadArray, позволява едновременното сканиране на стотици хиляди полиморфизми в рамките на един геном. Най – общо, методът обхваща четири етапа. Първият етап включва изотермална амплификация на геномната ДНК и последващо ензим контролирано фрагментиране, което след това не изисква провеждане на гел електрофореза за разделяне на специфични по размер фрагменти. След алкохолна преципитация и ресуспендиране, пробата се нанася върху чипа, което осигурява хибридизация на амплифицираните фрагменти с локус – специфичните 50 – мерни олигонуклеотиди, ковалентно свързани към едно от мънистата (едно мънисто съдържа проби за всеки един от двата алела на даден SNP). Следва ензим-медиирано алел специфично удължаване на олигонуклеотидите върху мънистото (base extension) и флуоресцентно белязане на пробите. Флуоресцентните сигнали се детектират от специален четец (Illumina BeadArray Reader), а обработката на получените данни – идентификация на SNP и неговите алели, се извършва от специално разработен софтуер на Illumina (GenomeStudio Data Analysis Software) (Фигура 13). Статистическата оценка на данните от цялостния геномен скан е извършена с помощта на точния тест на

Фишер.



Фигура 13: Принцип на метода Infinium II, комбиниран с BeadArray технологията на Illumina. Методът обхваща четири основни стъпки: 1.цялостно геномно амплифициране и фрагментиране на ДНК; 2.Хибридизация на амплифицираните фрагменти върху чипа; 3.Алел – специфична екстензионна реакция; 4. Белязане на продуктите с флуорохроми (адаптирано от Infinium® II Assay Workflow протокол; © 2006 Illumina, Inc)

Цялостното геномно асоциативно проучване беше проведено върху 550K генотипиращия чип на Illumina (Illumina HumanHap 550K chip), като успешно бяха генотипирани 554 496 единични нуклеотидни полиморфизма в серия от 188 случая с биполарно разстройство и 376 контролни индивида, всички от български произход. След изключване на полиморфизмите локализирани в половите хромозоми и на вариантите в митохондриалната ДНК, получените данни бяха подложени на качествен контрол съгласно следните критерии:

1. Качество на флуоресцентния сигнал за всеки SNP (SNP call rate) ≥ 0.99, сред случаи и контроли;

2. Отклонение от уравнението на Харди-Вайнберг сред контролните индивиди при ниво на значимост P = $1.0X10^{-6}$;

3. Честота на редкия алел за всеки SNP (Minor Allele Frequency) > 0, сред

случаи и контроли

Филтрирането беше извършено въз основа на изчислените от софтуера на Illumina данни чрез филтърната функция на Microsoft Excel.

3.8. Валидизиране и реплициране на резултатите от цялостното геномно асоциативно проучване

След филтриране на данните общо 497 732 варианта от всички успешно генотипирани полиморфизми отговориха на гореспоментатите критерии и бяха включени в последващия анализ. Тези полиморфизми бяха подредени по нарастване на най-ниската от трите стойности на p (въз основа на един от трите модела на теста на Фишер) за всеки SNP, като първите 100 маркера, показали най – силна асоциация със заболяването бяха използвани за индивидуално генотипиране.

С цел валидизиране и реплициране на резултатите от цялостния геномен скан, индивидуалното генотипиране на избраните 100 полиморфизма беше проведено в два етапа. През първия етап стоте кандидат маркера бяха генотипирани в същата серия от случаи и контроли, използвана при цялостното геномно асоциативно проучване. През втори етап, който обхваща реплицирането на резултатите, маркерите бяха анализирани в допълнителна серия от случаи и контроли. И в двата етапа на индивидуалното генотипиране за генотипираща платформа беше използван Invader метод, комбиниран с мултиплексна полимеразна верижна реакция. Дизайнът на праймерите и Invader пробите, използваните програми, реактиви, апаратура и условията на работа са описани в т.3.4.3.2 до т.3.6.1, а подробности относно нуклеотидните последователности, температурата на топене, дължината на ампликона и на използваните праймери и проби за генотипирането на всеки SNP при провеждане на Invader, след цялостното геномно сканиране са посочени в Приложения 3 и 4, таблици 9 и 10.

За установяване на статистически значими разлики в разпределението на алелните и генотипните честоти сред двете изследвани групи след реплицирането на резултатите е използван двустранния точен тест на Фишер, а върху обобщените данни от двете генотипрания (валидизиране и реплициране на резултатите) е приложен тестът на Cochran-Mantel-Haenszel (CMH test).

3.9 Статистически методи

3.9.1 Анализ на равновесието по закона на Харди-Вайнберг (Hardy-Weinberg equilibrium)

Съгласно Закона на Харди-Вайнберг, в идеална популация, което означава достатъчно голяма популация, без действие на отбор спрямо разглеждания ген, без възникване на нови алели на гена в резултат на мутации и без асортативно кръстосване по този ген, съотношението между алелните и генотипните честоти в даден локус остава непроменено с течение на поколенията. В един локус с два алела, доминантен **A** и рецесивен **a** и генотипове **AA** (хомозиготи по домонантния алел), **Aa** (хетерозиготи) и **aa** (хомозиготи по рецесивния алел), сумата от алелните и генотипните честоти е единица, или

$$(p+q)^2=p^2+2pq+q^2=1,$$

където p и q са алелните честоти, съответно на доминантния и рецесивния алели.

Равновесните генотипни честоти на хомозиготите по двата алела се изразяват чрез квадрата на съответния алел, а генотипната честота на хетерозиготите – чрез произведението на алелните честоти умножени по две.

Проверка за наличие на равновесие по закона на Харди-Вайнберг е извършена при изследването на полиморфизми в областта на кандидат гени сред двете изследвани групи с помощта на програмата HaploView 4.0 (Broad Institute of MIT & Harvard), като за ниво на значимост е прието $P < 0.001$. Маркерите, показали значително отклонение от принципа на Харди-Вайнберг са изключени от анализ.

3.9.2 Точен тест на Фишер (Fisher's exact test)

Точният тест на Фишер принадлежи към групата на непараметричните статистически методи и се прилага при анализ на две независими извадки, независимо от техните характеристики (размер, пропорционалност). Тестът на Фишер е изключително подходящ в случаите, когато използваната извадка е с малък размер, т.е., когато е възможно очакваната честота да е под 10 при една степен на свобода. Наименованието на теста – 'точен', показва възможността значимостта на отклонението от нулевата хипотеза да се изчисли точно, а не на базата на приближения спрямо теоретична извадка.

При използване на точния тест на Фишер може да се установи статистически значима асоциация между две номинални променливи, когато анализираните обекти се

класифицират по два различни показателя. По този начин се формира двумерна таблица с размерност 2X2 (2X2 кростаблица) (Таблица 11).

Таблица 11: 2X2 кростаблица при точен тест на Фишер

	Случаи	**Контроли**	**Общо**
Алел 1	a	b	**r1**
Алел 2	c	d	**r2**
Общо	**c1**	**c2**	**t**

r1 – общ брой индивиди в първи ред, носители на алел 1 (a+b); r2 – общ брой индивиди във втори ред, носители на алел 2 (c+d); c1 – общ брой индивиди в първа колона, случаи (a+c); c2– общ брой индивиди във втора колона, контроли (b+d); t – общ брой анализирани индивиди (a+b+c+d). Адаптирано от http://statpages.org/ctab2x2.html

В клетките на таблицата се попълват получените при генотипирането данни (колко от случаите и колко от контролите са носители на алел 1 и алел 2 на даден SNP) и под нулевата хипотеза се изчислява хипергеометричното разпределение на стойностите в отделните клетки, въз основа на което, при фиксирани маргинални стойности в таблицата, се определя стойността на величината P (P – value = α).

Съгласно нулевата хипотеза (H_0) между две групи не съществува статистически значима асоциация, а за проверка достоверността на хипотезата е прието ниво на значимост P = 0.05. Според алтернативната хипотеза (H_A), между двете изследвани групи в извадката съществува статистически значима, неслучайна разлика. Тази хипотеза може да бъде левостранна, когато между променливите се очаква да има негативна асоциация, дясностранна – очаква се позитивна асоциация или двустранна – алтернативата не е предварително известна.

Тестът на Фишер бива едностранен (one – tailed) или двустранен (two – tailed). При едностранния тест предварително се знае посоката на разликата между параметъра и оценката, а вероятността (P) се изчислява като сума от стойността на P във всички възможни случаи на хипергеометрично разпределение, при които разпределението на данните в клетките със същата насока на разликата е същото като емпирично полученото или още по-крайно. При двустранният тест, вероятността (P) е сума от стойността на P във всички възможни случаи на същото или по-крайно разпределение на данните, но и в двете посоки на стохастично разпределение, независимо от посоката

на връзката. Стойност на $P \leq 0.05$ показва, че вероятността полученото разпределение да е случайно е по-малка или равна на 5%

В настоящата научна разработка е приложен двустранния точен тест на Фишер съгласно три модела: на алелните честоти (allele – frequency mode), на доминантно унаследяване (dominant – inheritance mode) и на рецесивно унаследяване (recessive – inheritance mode), като по този начин за всеки изследван полиморфизъм са получени три възможни зависимости, както по отношение на алелните честоти, така и по отношение на генотипните честоти на хомозиготите по единия или другия алтернативен алел. Тестът на Фишер и използван за установяване на статистически значима асоциация както при асоциативното проучване на кандидат гени, така и след цялостното геномно асоциативно проучване, а също и при валидизирането и реплицирането на резултатите след цялостния геномен скан. Изчисленията са направени с помощта на Microsoft Excel и програма Perl в DOS.

3.9.3 Корекция при множествени изследвания

Множественият сравнителен анализ (корекция при множествени изследвания; Correction for multiple testing) е процедура, с помощта на която се коригира стойността на величината P (Pvalue), получена при провеждане на голям брой аналогични статистически тествания. Прилагането на тази процедура има за цел да намали вероятността от възникване на грешка от I род (α грешка, получаване на фалшиво позитивен резултат), изразяваща се в погрешно отхвърляне на нулевата хипотеза. Прието ниво на значимост от 0.05 означава, че вероятността за възникване на грешка от I род е 5%, т.е. вероятността да сме получили статистически значим резултат случайно е 5%.

Една от най – често прилаганите процедури за множествено сравняване, но и много консервативна е корекцията на Бонферони (Bonferroni correction), която има за цел да намали риска за възникване на грешки от I род при многократно използване на даден статистически анализ. Съгласно тази корекция, при проведени n на брой независими изследвания, корекцията на нивото на значимост за целия обем на експеримента (p_{total}), се изчислява като всяко отделно изследване се разгледа при ниво на значимост равно на $1/n^{та}$ от нивото, което трябва да се приеме при едно проведено изследване и се изразява по следния начин:

$$p_{total}=p/n,$$

където p е нивото на значимост в едно изследване, прието за 0.05, а n е броят на проведените изследвания. Така получената стойност представлява коригираното ниво на значимост, съгласно броя направени изследвания, като всички тествания при които p продължава да има стойност по – ниска от зададената се интерпретират като данни за наличие на истинска асоциация между даден вариант и заболяването.

Въпреки че прилагането на корекцията на Бонферони намалява риска за грешка от I род, поради своята консервативност, тя увеличава риска за възникване на грешка от II род (β грешка, получаване на фалшиво отрицателен резултат), изразяваща се в нарастване на вероятността за отхвърляне на истински асоциации.

В настоящия научен труд, корекцията на Бонферони е приложена както при асоциативното изследване на кандидат гени, така и след получаване на данните от цялостното геномно асоциативно проучване и филтрирането на резултатите.

3.9.4 Други статистически методи

Неравновесната скаченост между изследваните маркери (D'/r^2) е изчислена с помощта на програмата HaploView 4.0 (Broad Institute of MIT & Harvard), а LD – блоковите структури са конструирани по метода "solid spine of LD" (в програмата HaploView), съгласно който първият и последният маркер в хаплотипния блок трябва да са в силна неравновесна скаченост с междинните SNPs, като те самите не е необходимо да са в неравновесна скаченост. Хаплотипният анализ беше извършен с помощта на програмата SNPALyze версия 3.1 (Dynacom, Chiba, Japan, http://www2.dynacom.co.jp), а също така и с програмата HaploView 4.0.

За оценяване размера на ефекта (effect size, сила на връзката между две променливи при статистически анализ) е анализирано съотношението на шансовете (Odds Ratio, OR). OR е относителна мярка за риска или вероятността дадено събитие да се случи сред дадена група обекти, когато е налице даден фактор, в сравнение с група обекти, при които факторът липсва. Оценка на 95% доверителен интервал (95%CI) и съотношението на шансовете е направена на базата на заключенията за рисков алел за всеки полиморфизъм поотделно.

Статистическите изчисления след цялостното геномно асоциативно проучване са извършени с помощта на програмата R в лабораторията по статистически анализи

към институт RIKEN (Laboratory of Statistical Analysis, RIKEN Center for Genomic Medicine, Tokyo, Japan) от Проф. Н. Каматани и А. Такахаши, съвместно с Д-р М. Кубо от лабораторията по развитие на методите за генотипиране в същия институт (Laboratory for Genotyping Development, RIKEN Center for Genomic Medicine, Yokohama, Japan). Програмата R е използвана и за построяване на квантилна вероятностна диаграма (Q – Q plot), с цел установяване наличието на популационна стратификация сред изследваните групи. За оценка на статистически значимите разлики от цялостния геномен скан е построена диаграма тип Manhattan (Manhattan plot). За целта е използвана програмата HaploView 4.0 и данните за хромозомната локализация и трансформираната в отрицателен десетичен логаритъм стойност на p за всеки изследван SNP.

За установяване на асоциация след индивидуалното генотипиране на стоте кандидат маркера, върху обобщените данни (валидизиране и реплициране на резултатите) от цялостния геномен скан е приложен тестът на Cochran-Mantel-Haenszel (CMH test statistics), който отчита евентуалното наличие на популационна стратификация сред използваната извадка. Тестът е приложен със съдействието на Д-р Й. Каматани от лабораторията по молекулярна медицна към института по медицински науки в Токио (Laboratory of Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Japan).

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Резултати от асоциативното проучване на кандидат гени

В първият етап от нашето проучване, включващ подбор на канидат гени и полиморфизми, бяха подробно проучени литературните източници, съобщаващи за молекулярно генетични изследвания при биполарно разстройство. За целта беше използвана базата данни на NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) (ключови думи: bipolar affective disorder, manic - depressive illness, single nucleotide polymorphism, association study, linkage, в различни комбинации) и беше анализирана информацията от няколко стотин източници, публикувани до средата на 2007 година. При избора на кандидат гени бяха съблюдавани следните условия: 1. гени с установена положителна асоциация със заболяването в минимум едно проучване; 2. гени, неизследвани до момента за асоциация със заболяването в българска популация; 3. гени, неизследвани за асоциация със заболяването, но за които съществуват данни за нарушена експресия в мозъка при пациенти с биполарно разстройство. Като краен резултат, за анализа бяха избрани 65 гена.

Кандидат полиморфизмите бяха подбрани от публично достъпните бази данни на NCBI и HapMap (www.ncbi.nlm.nih.gov; www. hapmap.org/index.html.en) въз основа на съществуващи данни за асоциация със заболяването. Общо 199 маркера бяха селектирани за генотипиране в този първи етап на проучването, като повечето от тях са ‘представителни’ SNPs (tagSNPs) във фаза II на HapMap проекта с r^2>0.8 и честота на редкия алел 0.1 (MAF≥0.1) в европейска популация (CEU population), с изключение на тези, асоциирани със заболяването в други популации.

След изготвянето на списъка с избраните кандидат полиморфизми, за всеки един от тях беше определен метода за генотипиране. За 47 маркера беше избран методът TaqMan с предварително конструирани, преминали процес на валидизация и поддържани в наличност проби от Applied Biosystems, а останалите 152 полиморфизма бяха анализирани чрез Invader метод, комбиниран с мултиплексна полимеразна верижна реакция, с проби и праймери, конструирани по собствен дизайн.

Маркерите, за които беше избран методът TaqMan, бяха генотипирани успешно, като един от тях, rs1058573 (*5HTR2A*) се оказа мономорфен за нашата популация и беше изключен от изследването. От останалите 152 маркера, генотипирани чрез метода Invader, резултат беше получен за 144 от тях. За 8 полиморфизма генотипирането се

оказа неуспешно и разграничаване на отделните клъстери от флуоресцентни сигнали не беше постигнато, дори и след използването на два отделни набора от Invader проби. От 144 успешно генотипирани SNPs, след анализ на разпределението на алелните и генотипни честоти, 9 показаха отклонение от принципа на Hardy–Weinberg за равновесието в контролната група индивиди, поради което бяха изключени от анализ (Таблица 12).

Таблица 12: Полиморфизми, показали отклонение от закона на Hardy–Weinberg поради сходен брой хомо- и хетерозиготни индивиди или поради твърде голям брой хетерозиготи в контролната група индивиди.

Ген (NCBI)	SNP (NCBI)	Честота, случаи			Честота, контроли			HWE P
		11	12	22	11	12	22	
MTHFR	rs1801131	0.45	0.55	0.00	0.45	0.55	0.00	$4.91X10^{-9}$
NRG1	rs3757930	0.50	0.50	0.00	0.46	0.54	0.00	$1.49X10^{-8}$
ARNTL	rs2279287	0.07	0.06	0.86	0.08	0.05	0.87	$1.07X10^{-13}$
DGKH	rs1170195	0.43	0.28	0.28	0.39	0.36	0.25	$7.00X10^{-4}$
GNAL	rs8091359	0.11	0.18	0.71	0.10	0.18	0.72	$7.25X10^{-7}$
MPPE1	rs643652	0.43	0.36	0.21	0.41	0.34	0.25	$7.06X10^{-5}$
PER3	rs11576985	0.47	0.53	0.00	0.38	0.62	0.00	$6.54X10^{-12}$
GRP78	rs3216733	0.39	0.61	0.00	0.40	0.60	0.00	$4.60X10^{-11}$
SYN3	rs11089599	0.01	0.93	0.06	0.00	0.95	0.05	$1.53X10^{-40}$

11 – хомозиготи по алел 1; 12 – хетерозиготи; 22 – хомозиготи по алел 2; HWE P - оценка за равновесието по закона на Hardy–Weinberg, изразена като p – value (програма HaploView 4.0)

Два SNPs, rs872123 (*GAD1*) и rs16927997 (*GRP78*/*MIF2*) се оказаха мономорфни за изследваната извадка и също не бяха включени в последващия анализ.

Всички маркери бяха генотипирани в серия от 94 случая и 184 контроли, като валиден резултат беше получен за 179 полиморфизма от 65 гена. За установяване на асоциация с биполарното разстройство, върху получените данни от успешно генотипираните маркери, беше приложен двустранния точен тест на Фишер. Информацията за всички кандидат гени и полиморфизми, тяхната локализация, ефекта на SNP, честотата на редкия алел за всеки полиморфизъм сред случаи и контроли,

оценката на равновесието по закона на Hardy–Weinberg, сред двете изследвани групи, изразена като P-value, оценката за значимостта на асоциацията със заболяването изразена като P-value (минимално), след двустранен точен тест на Фишер, както и използвания литературен източник е посочена в таблица 13.

Таблица 13: Кандидат гени и полиморфизми генотипирани успешно в първия етап от асоциативното проучване в 94 случая и 184 контроли.

Хромозомен локус	Ген	SNP (NCBI)*	алел 1	алел 2	ефект	MAF**		HWE (P-стойност)***		*P*-стойност±	Литературен източник
						случаи	контроли	случаи	контроли		
1p36.3	*MTHFR*	rs1801133	G	A	Ala222Val	0.30	0.33	0.32	0.51	0.15	Zintzaras, 2006; Kempisty et al, 2006
1p36.23	*PER3*	rs228729	T	C	intron 2	0.38	0.43	0.59	0.49	0.14	Nievergelt et al, 2006
		rs228642	C	T	intron 8	0.38	0.37	1.00	0.08	0.52	
		rs228666	C	T	intron 9	0.38	0.32	0.64	1.00	0.18	
		rs228697	C	G	Pro856Ala	0.15	0.14	0.75	0.02	0.46	
		rs2859388	A	G	intron 17	0.32	0.30	1.00	0.01	0.31	
1q42.1	*DISC1*	rs1538977	A	G	intron 4	0.24	0.29	1.00	0.81	0.27	Hodgkinson et al, 2004;
		rs2492367	C	T	Ile469Ile	0.10	0.13	1.00	0.34	0.23	Thomson et al, 2005
		rs2812393	C	G	intron 6	0.40	0.39	0.89	0.81	0.78	
		rs1322784	A	G	intron 6	0.28	0.26	0.34	0.53	0.45	
1q43	*MTR*	rs1805087	A	G	Asp919Gly	0.18	0.21	0.74	0.46	0.44	Kempisty et al, 2007
2q31	*GAD1*	rs3749034	A	G	5' UTR	0.26	0.24	0.79	0.31	0.37	Lundorf et al, 2004
		rs1978340	A	G	promoter	0.27	0.28	0.47	1.00	0.62	
		rs11542313	C	T	His37His	0.40	0.46	0.38	0.20	0.20	
		rs769390	A	C	intron 6	0.29	0.25	0.57	0.88	0.21	
3p26.1-p25.1	*GRM7*	rs1485171	C	A	intron 8	0.15	0.17	1.00	0.41	0.51	The WTCCC, 2007
3q28	*SST*	rs6797699	C	T	3' near gene	0.29	0.33	1.00	0.51	0.31	Nakatani et al, 2006
		rs1365111	G	A	intron	0.05	0.06	1.00	0.95	0.55	
4p16.1	*GPR78*	rs17844778	A	C	Arg201Ser	0.32	0.36	0.42	0.31	0.39	Underwood et al, 2006
		rs11736084	C	T	intron	0.34	0.29	0.99	0.69	0.29	
		rs1282	C	T	intron	0.18	0.24	0.56	0.71	0.12	
		rs9685931	A	G	Arg342His	0.14	0.10	0.26	0.33	0.094	
		rs9799720	G	C	3' UTR	0.16	0.10	1.00	0.30	0.030	
4p16.1	*SORCS2*	rs4411993	C	T	intron 2	0.13	0.13	0.91	1.00	1.00	Baum et al,2007
		rs7683874	A	G	intron 2	0.05	0.07	1.00	0.09	0.55	
		rs10937823	C	T	intron 2	0.05	0.06	1.00	0.29	0.55	
4q12	*CLOCK*	rs1801260	A	G	3' UTR	0.27	0.28	0.50	0.85	0.47	Benedetti et al, 2007; Benedetti et al, 2003
4q22	*LIM*	rs2438146	C	T	intron 2	0.41	0.43	0.25	0.16	0.22	Kato et al, 2005
		rs10008257	A	G	intron	0.46	0.48	0.60	0.24	0.073	
4q35	*FAT*	rs1298865	A	G	Ser4367Ser	0.37	0.34	1.00	0.45	0.51	Blair et al, 2006;
		rs2306990	C	T	intron 23	0.35	0.32	0.90	0.72	0.41	Jamra et al, 2007

		rs2637777	A	C	Ser3554Ala	0.37	0.34	1.00	0.60	0.43	
		rs2304865	C	G	intron 18	0.33	0.30	0.69	0.75	0.38	
5q31-q33	*HTR4*	rs2278392	C	T	intron 4	0.08	0.10	1.00	0.18	0.30	Ohtsuki et al, 2002
5q33.1	*CAMK2A**	rs13360565	G	T	intron 2	0.48	0.48	0.49	0.45	0.48	Xing et al, 2002
		rs2304042	A	G	intron 2	0.32	0.30	0.55	0.68	0.37	
		rs2288799	A	G	intron 8	0.48	0.49	0.56	1.00	0.65	
		rs17712679	A	T	intron 17	0.41	0.45	0.88	0.78	0.34	
6p21.3	*GRM4*	rs3798529	A	C	intron 15	0.26	0.16	0.41	0.97	0.0035	Fallin et al, 2005
		rs3778068	C	G	intron 3	0.31	0.34	0.28	0.93	0.28	
		rs1565366	A	G	intron 2	0.24	0.16	1.00	0.54	0.029	
		rs2499724	A	C	intron 1	0.38	0.37	1.00	0.72	0.85	
		rs733457	G	T	intron 1	0.37	0.35	0.64	1.00	0.61	
6p21.3	*TNFA*	rs1800629	A	G	5' near gene	0.12	0.13	1.00	0.75	0.79	Pae et al, 2004
6p22.3	*DTNBP1*	rs760761	G	A	intron 3	0.15	0.20	0.66	0.93	0.14	Breen et al, 2006
6p23	*KIF13A*	rs3734234	A	G	Leu1070Leu	0.41	0.36	1.00	0.04	0.12	Fallin et al, 2005
		rs942376	A	G	Ser1209Ser	0.19	0.26	0.67	0.80	0.056	
		rs2296197	C	T	Pro1633Pro	0.22	0.28	1.00	0.95	0.15	
		rs1044654	C	A	3' UTR	0.22	0.28	1.00	0.85	0.15	
7q21.1-q21.2	*GRM3*	rs1024516	A	C	intron 1	0.33	0.31	1.00	0.72	0.66	Fallin et al, 2005
		rs2299213	C	T	intron 1	0.32	0.31	1.00	0.55	0.77	
		rs1405874	C	T	intron 1	0.31	0.30	1.00	0.70	0.82	
		rs2189813	C	T	intron 1	0.34	0.30	1.00	1.00	0.39	
		rs2237554	A	C	intron 1	0.34	0.30	1.00	1.00	0.39	
		rs2237555	A	G	intron 1	0.34	0.30	1.00	1.00	0.39	
		rs982339	A	G	intron 2	0.22	0.25	0.92	0.59	0.46	
		rs17126	A	G	intron4	0.29	0.27	0.10	0.91	0.31	
7q36.1	*HTR5A*	rs1800883	C	G	5' UTR	0.28	0.41	0.93	0.01	0.0050	Birkett et al, 2000; Arias et al, 2001; Shimron-Abarbanell et al,1997
8p12	*NRG1*	rs2919390	A	C	intron 5	0.37	0.32	0.79	1.00	0.24	Thomson et al, 2007
		rs6988339	A	G	intron 5	0.44	0.44	0.90	0.01	0.23	
8p21.3	*VMAT1*	rs988713	C	T	5' near gene	0.29	0.26	1.00	0.91	0.42	Lohoff et al, 2006
		rs1390938	A	G	Ile136Thr	0.29	0.26	1.00	0.83	0.38	
		rs2279709	G	T	intron 3	0.50	0.45	0.72	0.51	0.16	
8p22-p21	*DPYSL2*	rs920697	A	G	intron 1	0.20	0.23	1.00	0.31	0.25	Fallin et al, 2005;
		rs327232	A	G	intron 3	0.19	0.22	0.05	0.12	0.090	Nakata et al, 2002;

		rs11863	C	T	3' UTR	0.46	0.40	0.60	0.57	0.0028	Nakata et al, 2003;
		rs17666	C	T	3' UTR	0.27	0.41	1.00	0.42	0.0019	Hong et al, 2005
9q33-q34.1	*GRP78*	rs391957	T	C	5' near gene	0.36	0.36	0.45	0.23	0.90	Kakiuchi et al, 2005
	MIF2	rs17840761	G	A	5' near gene	0.50	0.42	0.23	0.47	0.068	
		rs1140763	G	A	3' UTR	0.50	0.42	0.37	0.40	0.084	
		rs12009	G	A	3' UTR	0.50	0.42	0.28	0.46	0.090	
9q34.3	*GRIN1*	rs11146020	G	C	5' near gene	0.05	0.10	0.39	0.91	0.049	Mundo et al, 2003
		rs2301363	T	C	intron 1	0.10	0.13	0.38	1.00	0.17	
		rs1126442	G	A	Val285Val	0.35	0.32	0.98	0.26	0.28	
10p12.2	*PIP5K2A*	rs10828317	C	T	Asn251Ser	0.27	0.25	1.00	0.52	0.42	Jamra et al, 2006
		rs1053454	C	A	3' UTR	0.34	0.30	1.00	0.58	0.38	
11p13	*BDNF*	rs2049045	C	G	intron 1	0.14	0.24	0.81	0.90	0.011	Sklar et al, 2002; Strauss et al, 2005;
		rs4923463	A	G	intron	0.18	0.27	0.29	0.51	0.015	Webster et al, 2002; Webster et al, 2006
		rs6265	C	T	Val66Met	0.14	0.24	0.81	0.67	0.0079	
11p15	*ARNTL*	rs1982350	G	A	intron 2	0.37	0.40	0.08	0.51	0.12	Nievergelt et al, 2006
		rs3789327	G	A	intron 2	0.43	0.43	0.15	0.12	0.15	
		rs2278749	T	C	intron 15	0.14	0.13	0.81	0.15	0.43	
11q22.3	*GRIK4*	rs1944522	C	T	intron	0.50	0.48	0.64	0.07	0.26	Pickard et al, 2006
		rs2282586	A	G	intron	0.42	0.36	0.85	0.70	0.27	
11q23.1	*HTR3B*	rs1176744	A	C	Tyr129Ser	0.28	0.28	0.74	0.36	0.50	Frank et al, 2004
		rs17116138	A	G	Val183Ile	0.02	0.02	1.00	1.00	1.00	
11q23.1	*NCAM1*	rs686050	C	G	intron 8	0.35	0.35	0.33	0.16	0.92	Arai et al, 2004
		rs646558	A	C	intron 14	0.15	0.15	1.00	1.00	1.00	
12p12	*GRIN2B*	rs7301328	G	C	Pro122Pro	0.38	0.39	0.92	0.32	0.73	Martucci et al, 2006
		rs1806201	A	G	Thr888Thr	0.30	0.33	1.00	0.90	0.44	
		rs1805502	A	G	3' UTR	0.16	0.21	0.54	0.22	0.066	
		rs1805246	A	G	Phe1406Phe	0.06	0.03	1.00	1.00	0.23	
12p13	*GNB3*	rs5443	C	T	Ser275Ser	0.37	0.34	0.19	0.12	0.048	Zill et al, 2000; Serretti et al, 2003
12q21.1	*TPH2*	rs4131348	C	T	5' UTR	0.13	0.18	1.00	0.57	0.14	Harvey et al, 2007;
		rs1386494	T	C	intron 5	0.19	0.14	0.20	1.00	0.051	De Luca et al, 2004;
		rs7305115	A	G	Pro312Pro	0.42	0.43	0.88	0.11	0.49	Lopez et al, 2006
		rs1007023	G	T	intron 8	0.20	0.14	0.43	1.00	0.039	
		rs9325202	A	G	intron 8	0.45	0.40	0.49	0.68	0.13	
		rs4290270	A	T	Ala375Ala	0.40	0.39	1.00	0.63	0.72	
12q22-q23	*DUSP6*	rs2279574	A	C	Val114Leu	0.44	0.43	0.17	0.78	0.0035	Lee et al, 2006

12q24	*CIT*	rs4766951	C	T	intron 5	0.50	0.45	1.00	0.02	0.13	Lyons-Warren et al, 2005
		rs435136	A	G	intron 9	0.36	0.36	0.23	0.48	0.26	
		rs203368	C	T	intron13	0.48	0.50	0.89	0.11	0.47	
		rs2074052	C	G	intron 20	0.48	0.48	0.97	0.45	0.88	
		rs278109	C	T	Arg1066Arg	0.14	0.15	0.81	0.39	0.43	
		rs2285595	A	G	intron 30	0.41	0.42	0.43	0.55	0.69	
12q24	*RFX4*	rs10778502	C	T	Thr279Thr	0.40	0.38	0.52	0.53	0.28	Glaser et al, 2005
12q24	*P2RX7*	rs2230912	A	G	Gln460rg	0.15	0.19	0.08	1.00	0.17	McQuillin et al, 2007;
		rs1718119	A	G	Ala348Thr	0.36	0.40	0.30	1.00	0.24	Barden et al, 2006
12q24.11-q24.12	*CUX2*	rs3847953	C	T	intron 18	0.34	0.32	0.31	0.84	0.31	Glaser et al, 2005
		rs933305	A	G	intron 8	0.22	0.20	0.22	1.00	0.24	
12q24.2-q24.31	*NOS1*	rs2682826	A	G	3' UTR	0.25	0.29	0.27	1.00	0.20	Fallin et al, 2005
		rs816363	C	G	intron 26	0.36	0.38	0.48	0.37	0.78	
		rs2293051	C	G	intron 7	0.48	0.42	1.00	0.90	0.21	
		rs532967	A	G	intron 3	0.11	0.17	0.62	0.16	0.035	
		rs3782206	C	T	intron 3	0.13	0.11	0.33	0.61	0.12	
		rs561712	T	C	intron 2	0.48	0.44	0.39	0.87	0.21	
		rs3782219	C	T	intron 1	0.17	0.20	1.00	1.00	0.42	
		rs3782221	A	G	intron 1	0.19	0.22	0.58	0.83	0.23	
13q14.11	*DGKH*	rs1012053	A	C	intron 1	0.16	0.17	0.35	0.77	0.74	Baum et al,2007
		rs1170191	A	G	intron 1	0.19	0.19	0.79	0.64	0.91	
		rs9525570	C	T	intron 1	0.17	0.21	0.19	0.26	0.28	
		rs9315897	C	T	intron 7	0.17	0.21	0.16	0.72	0.22	
13q14-q21	*5HTR2A*	rs6313	A	G	Ser34Ser	0.38	0.46	1.00	0.52	0.071	Ranade et al, 2003; Chee et al, 2001
13q31.2-q32.3	*STK24**	rs9517312	A	G	3' UTR	0.19	0.22	1.00	0.27	0.25	Christian et al, 2002
		rs9517313	C	G	intron 10	0.39	0.32	0.37	0.81	0.091	
		rs3783006	C	G	intron 9	0.42	0.45	0.20	0.63	0.35	
		rs9805187	A	C	intron 2	0.11	0.10	0.65	0.15	0.30	
		rs9517328	A	T	intron 2	0.17	0.17	0.47	1.00	0.44	
		rs9556964	C	T	intron 2	0.33	0.35	1.00	1.00	0.64	
		rs7324994	C	T	intron 1	0.30	0.31	0.69	0.86	0.82	
14q24	*MTHFD1*	rs2236225	A	G	Arg653Gln	0.42	0.42	0.66	0.90	0.87	Kempisty et al, 2007
15q11.2-q12	*GABRA5*	rs140681	A	G	intron 1	0.08	0.14	1.00	1.00	0.048	Papadimitriou et al, 1998; Otani et al, 2005
16p12.1	*PALB2*	rs420259	A	G	intron 9	0.32	0.30	0.08	0.32	0.052	The WTCCC, 2007
16p13.3	*SSTR5*	rs169068	C	T	Pro335Leu	0.43	0.49	0.80	0.74	0.15	Nyegaard et al, 2002

		rs4988483	A	C	Leu48Met	0.04	0.04	1.00	1.00	1.00	
17p13.1	*ALOX12*	rs1126667	A	G	Gln261Arg	0.42	0.40	1.00	0.57	0.69	Fridman et al, 2003
18p11.22	*NAPG*	rs2290279	A	G	intron 1	0.27	0.29	0.05	1.00	0.29	Andrew et al, 2006
		rs495484	A	T	intron5	0.37	0.34	0.33	0.81	0.25	
		rs510110	C	A	intron 8	0.37	0.34	0.36	0.58	0.25	
18p11.31-p11.2	*NDUFV2*	rs906807	A	G	Val29Ala	0.15	0.17	0.57	1.00	0.48	Washizuka et al, 2004; Washizuka et al, 2003
18p11.22-p11.21	*GNAL**	rs1895689	A	C	intron 2	0.30	0.25	0.46	0.47	0.31	Corradi et al, 2005;
		rs1786568	C	G	intron 4	0.35	0.29	0.36	0.70	0.15	Vuoristo et al, 2000
		rs1786569	A	G	intron 5	0.29	0.25	0.92	1.00	0.35	
		rs602201	A	T	3' near gene	0.40	0.38	0.46	0.58	0.24	
18p11.21	*CHMP1B**	rs1786581	C	T	3' UTR	0.09	0.14	1.00	0.99	0.10	Vuoristo et al, 2001
18p11.21	*MPPE1**	rs662515	C	G	Ala268Pro	0.34	0.26	0.97	1.00	0.060	Vuoristo et al, 2001
		rs3974590	A	G	intron 4	0.39	0.25	0.98	0.41	0.00059	
		rs673735	C	T	intron 4	0.36	0.45	0.51	1.00	0.06	
		rs8097892	C	T	intron 2	0.48	0.50	0.01	0.85	0.12	
18q11.2	*LAMA3*	rs12608087	C	T	intron 11	0.05	0.07	1.00	1.00	0.70	Baum et al, 2007
21q22.3	*S100B*	rs2839350	A	G	3' near gene	0.12	0.15	0.21	0.11	0.11	Roche et al, 2007
		rs3788266	A	G	5' UTR	0.47	0.49	0.29	0.97	0.48	
22q11.1	*TUBA8*	rs362043	G	T	intron 1	0.36	0.30	0.13	0.37	0.10	Fallin et al, 2005
22q11.2	*DGCR8*	rs2073778	C	T	intron 2	0.17	0.10	1.00	0.42	0.014	Fallin et al, 2005
22q11.23	*BCR*	rs3761418	A	G	5' near gene	0.27	0.28	0.85	0.29	0.38	Hashimoto et al, 2005
		rs2267012	A	G	intron 1	0.12	0.08	1.00	1.00	0.12	
		rs2267013	A	G	intron 1	0.15	0.15	1.00	0.44	0.72	
		rs2267015	A	T	intron 1	0.48	0.47	0.89	0.66	0.89	
		rs2156921	A	G	intron 1	0.48	0.47	0.97	1.00	0.88	
		rs2213172	C	G	intron 1	0.50	0.49	0.96	0.98	0.77	
		rs2267020	G	T	intron 1	0.45	0.47	0.81	0.04	0.29	
		rs140504	G	A	Asn796Ser	0.13	0.14	1.00	0.51	0.90	
		rs131690	A	G	intron 15	0.46	0.44	0.91	0.87	0.58	
		rs131702	G	T	intron 15	0.16	0.15	0.13	0.01	0.89	
22q13.1	*SYNGR1*	rs909685	A	T	intron 1	0.36	0.29	0.10	0.90	0.024	Verma et al, 2005
		rs715505	G	C	intron 1	0.25	0.21	0.15	0.44	0.046	
22q13.1	*IL2RB*	rs228942	T	G	Asp391Glu	0.15	0.18	0.29	0.17	0.48	Fallin et al, 2005
		rs84459	C	T	intron 9	0.31	0.30	1.00	0.20	0.61	
		rs84460	G	A	intron 9	0.30	0.30	0.96	0.25	0.80	

22q13.2	*ADSL*	rs909669	C	T	5' near gene	0.18	0.20	1.00	0.85	0.65	Severinsen et al, 2006
22q13.2	*GPR24*	rs133068	C	G	5' near gene	0.36	0.40	0.85	0.93	0.46	Severinsen et al, 2006
		rs133069	A	C	5' near gene	0.36	0.40	1.00	0.84	0.40	
		rs133070	A	G	5' near gene	0.38	0.41	0.71	1.00	0.51	
		rs133073	C	T	Asn82Asn	0.38	0.41	0.71	1.00	0.43	
22q13.33	*BRD1*	rs138880	A	C	5' near gene	0.23	0.20	0.85	0.21	0.38	Severinsen et al, 2006
22q13.33	*MLC1*	rs11568190	A	G	Ala351aAla	0.16	0.15	0.52	0.17	0.28	Verma et al, 2005
		rs11568171	G	A	intron 1	0.11	0.10	0.65	1.00	0.52	
		rs2076127	C	T	intron 10	0.19	0.21	1.00	0.52	0.51	

*Single Nucleotide Polymorphism (SNP), единичен нуклеотиден полиморфизъм

**Minor Allele Frequency (MAF), честота на редкия алел

***Hardy–Weinberg Equilibrium P-value (HWE P-value), P-стойност според закона за равновесие на Харди–Вайнберг

± минимална P стойност след двустранен точен тест на Фишер

В този първи етап на изследването, при ниво на статистическа значимост, P=0.05, общо 17 SNPs показаха предполагаема асоциация със заболяването (P стойности по – малки от 0.05), поради което бяха подложени на допълнителен анализ в допълнителна извадка от 78 случая и 372 контроли. Генотипирането на тези полиморфизми във втората група от случаи и контроли беше извършено с пробите в наличност и със същия метод с който е бил анализиран съответния маркер в първия етап на изследването. Статистическият анализ беше проведен с точен тест на Фишер отделно върху резултатите от първи и втори скрининг, а също и върху обобщените данни от генотипирането на всички проби. Подробна информация относно генотипирането на избраните 17 полиморфизма е посочена в таблица 14.

Таблица 14: Обобщени резултати от генотипирането на 17 SNPs в 172 случая с биполарно разстройство и 556 контроли

Локус	Ген	db SNP		Случаи (*n*=172)			Контроли (*n*=556)			Честота, случаи			Честота, контроли			Рисков алел	P-стойност		
				11	12	22	11	12	22	11	12	22	11	12	22		1vs2	vs11	vs22
4p16.1	*GPR78*	rs9799720	1ви	2	26	66	0	36	148	0.02	0.28	0.70	0.00	0.20	0.80	1	0.038	0.11	0.070
			2ри	1	15	62	2	66	300	0.01	0.19	0.79	0.01	0.18	0.82	1	0.66	1.00	0.75
			Общо	3	41	128	2	102	448	0.02	0.24	0.74	0.00	0.19	0.81	1	**0.035**	0.090	0.065
6p21.3	*GRM4*	rs1565366	1ви	5	35	54	3	53	128	0.05	0.37	0.57	0.02	0.29	0.70	1	0.029	0.12	0.047
			2ри	5	14	59	10	105	254	0.06	0.18	0.76	0.03	0.28	0.69	2	0.72	0.16	0.28
			Общо	10	49	113	13	158	382	0.06	0.28	0.66	0.02	0.29	0.69	1	0.17	**0.029**	0.45
6p21.3	*GRM4*	rs3798529	1ви	50	40	4	131	48	5	0.53	0.43	0.04	0.71	0.26	0.03	2	0.0063	0.0035	0.72
			2ри	56	19	3	255	104	12	0.72	0.24	0.04	0.69	0.28	0.03	1	0.73	0.69	1.00
			Общо	106	59	7	386	152	17	0.62	0.34	0.04	0.70	0.27	0.03	2	0.064	0.062	0.62
7q36.1	*HTR5A*	rs1800883	1ви	8	37	49	39	69	73	0.09	0.39	0.52	0.22	0.38	0.40	2	0.0050	0.0066	0.073
			2ри	8	21	48	60	152	160	0.10	0.27	0.62	0.16	0.41	0.43	2	**0.0038**	0.23	**0.0025**
			Общо	16	58	97	99	221	233	0.09	0.34	0.57	0.18	0.40	0.42	2	**0.000097**	**0.0081**	**0.00085**
8p22-p21	*DPYSL2*	rs11863	1ви	21	44	28	68	84	32	0.23	0.47	0.30	0.37	0.46	0.17	2	0.0028	0.020	0.020
			2ри	19	42	17	103	181	88	0.24	0.54	0.22	0.28	0.49	0.24	2	0.93	0.58	0.77
			Общо	40	86	45	171	265	120	0.23	0.50	0.26	0.31	0.48	0.22	2	0.055	0.068	0.21
8p22-p21	*DPYSL2*	rs17666	1ви	7	36	49	34	83	67	0.08	0.39	0.53	0.18	0.45	0.36	2	0.0019	0.019	0.0096
			2ри	11	28	39	56	160	156	0.14	0.36	0.50	0.15	0.43	0.42	2	0.31	0.86	0.21
			Общо	18	64	88	90	243	223	0.11	0.38	0.52	0.16	0.44	0.40	2	**0.0045**	0.084	**0.0079**
9q34.3	*GRIN1*	rs11146020	1ви	79	7	1	146	34	1	0.91	0.08	0.01	0.81	0.19	0.01	1	0.068	0.049	1.00
			2ри	65	13	0	301	62	5	0.83	0.17	0.00	0.82	0.17	0.01	1	0.65	0.87	0.59
			общо	144	20	1	447	96	6	0.87	0.12	0.01	0.81	0.17	0.01	1	0.082	0.10	0.70
11p13	*BDNF*	rs6265	1ви	68	25	1	107	64	12	0.72	0.27	0.01	0.58	0.35	0.07	1	0.0079	0.026	0.067
			2ри	52	25	1	221	131	19	0.67	0.32	0.01	0.60	0.35	0.05	1	0.14	0.25	0.22
			Общо	120	50	2	328	195	31	0.70	0.29	0.01	0.59	0.35	0.06	1	**0.0033**	**0.015**	**0.019**
12p13	*GNB3*	rs5443	1ви	41	37	16	74	93	16	0.44	0.39	0.17	0.40	0.51	0.09	2	0.57	0.70	0.048
			2ри	31	32	15	180	159	30	0.40	0.41	0.19	0.49	0.43	0.08	2	**0.017**	0.17	**0.0050**
			общо	72	69	31	254	252	46	0.42	0.40	0.18	0.46	0.46	0.08	2	**0.018**	0.38	**0.00051**
12q21.1	*TPH2*	rs1007023	1ви	2	34	58	4	44	136	0.02	0.36	0.62	0.02	0.24	0.74	1	0.069	1.00	0.039

			2ри	1	20	57	7	89	275	0.01	0.26	0.73	0.02	0.24	0.74	1	1.00	1.00	0.89
			Общо	3	54	115	11	133	411	0.02	0.31	0.67	0.02	0.24	0.74	1	0.12	1.00	0.079
12q22-q23	*DUSP6*	rs2279574	1ви	14	54	26	57	93	33	0.15	0.57	0.28	0.31	0.51	0.18	2	0.0041	0.0035	0.088
			2ри	14	41	23	84	186	98	0.18	0.53	0.29	0.23	0.51	0.27	2	0.43	0.37	0.67
			Общо	28	95	49	141	279	131	0.16	0.55	0.28	0.26	0.51	0.24	2	**0.026**	**0.013**	0.23
12q24.2-q24.31	*NOS1*	rs532967	1ви	2	17	75	2	57	123	0.02	0.18	0.80	0.01	0.31	0.68	2	0.10	0.61	0.035
			2ри	6	32	40	6	111	255	0.08	0.41	0.51	0.02	0.30	0.69	1	**0.00084**	**0.0087**	**0.0041**
			Общо	8	49	115	8	168	378	0.05	0.28	0.67	0.01	0.30	0.68	1	0.33	**0.019**	0.78
15q11.2-q12	*GABRA5*	rs140681	1ви	0	14	77	3	44	136	0.00	0.15	0.85	0.02	0.24	0.74	2	0.048	0.55	0.064
			2ри	1	18	58	1	74	297	0.01	0.23	0.75	0.00	0.20	0.80	1	0.32	0.31	0.44
			Общо	1	32	135	4	118	433	0.01	0.19	0.80	0.01	0.21	0.78	2	0.55	1.00	0.52
18p11.21	*MPPE1*	rs3974590	1ви	35	44	15	106	64	14	0.37	0.47	0.16	0.58	0.35	0.08	2	0.00059	0.0015	0.038
			2ри	37	37	4	178	149	45	0.47	0.47	0.05	0.48	0.40	0.12	1	0.45	1.00	0.11
			Общо	72	81	19	284	213	59	0.42	0.47	0.11	0.51	0.38	0.11	2	0.10	**0.036**	0.89
22q11.2	*DGCR8*	rs2073778	1ви	65	27	2	152	29	3	0.69	0.29	0.02	0.83	0.16	0.02	2	0.019	0.014	1.00
			2ри	62	15	1	278	81	8	0.79	0.19	0.01	0.76	0.22	0.02	1	0.51	0.56	0.71
			Общо	127	42	3	430	110	11	0.74	0.24	0.02	0.78	0.20	0.02	2	0.35	0.25	1.00
22q13.1	*SYNGR1*	rs909685	1ви	16	35	43	14	77	93	0.17	0.37	0.46	0.08	0.42	0.51	1	0.10	0.024	0.53
			2ри	8	30	39	55	155	159	0.10	0.39	0.51	0.15	0.42	0.43	2	0.16	0.37	0.26
			Общо	24	65	82	69	232	252	0.14	0.38	0.48	0.12	0.42	0.46	2	0.90	0.60	0.60
22q13.1	*SYNGR1*	rs715505	1ви	55	29	9	110	66	6	0.59	0.31	0.10	0.60	0.36	0.03	2	0.33	0.90	0.046
			2ри	46	25	6	207	135	27	0.60	0.32	0.08	0.56	0.37	0.07	1	0.69	0.61	1.00
			Общо	101	54	15	317	201	33	0.59	0.32	0.09	0.58	0.36	0.06	2	0.89	0.72	0.22

$1^{ви}$ - първи етап на изследването, използвани 94 случая и 184 контроли; $2^{ри}$ –втори етап, използвани 78 случая и 372 контроли; Общо–комбиниран анализ на 172 случая и 556 контроли.

В обобщение, в първия етап на асоциативното проучване успешно бяха генотипирани 179 полиморфизма от 65 кандидат гена в 94 случая и 184 контролни индивида. Статистическата обработка на данните с двустранен точен тест на Фишер разкри възможната асоциация на 17 маркера с биполарното разстройство. Във втория етап на изследването тези полиморфизми бяха подложени на допълнителен молекулярно – генетичен анализ в 78 случая и 372 контроли. Статистическият анализ на данните само от втория скрининг показа възможна асоциация на заболяването с три полиморфизма, а именно: rs1800883 (*HTR5A*) с $P=2.5X10^{-3}$, rs5443 (*GNB3*) с $P=5.00X10^{-3}$ и rs532967 (*NOS1*) с $P=8.40X10^{-4}$.

Комбинираният анализ на данните от генотипирането във всички проби (172 случая и 556 контроли), установи възможна асоциация на биполарното разстройство с общо девет маркера: rs9799720 (*GPR78*) с $P=3.50X10^{-2}$, rs1565366 (*GRM4*) с $P=2.90X10^{-2}$, rs1800883 (*HTR5A*) с $P=9.70X10^{-5}$, rs17666 (*DPYSL2*) с $P=4.50X10^{-3}$, rs6265 (*BDNF*) с $P=3.30X10^{-3}$, rs5443 (*GNB3*) с $P=5.10X^{-4}$, rs2279574 (*DUSP6*) с $P=1.30X10^{-2}$, rs532967 (*NOS1*) с $P=1.90X10^{-2}$, rs3974590 (*MPPE1*) с $P=3.60X10^{-2}$.

Най – силна статистически значима асоциация показа вариант rs1800883 (C→G замяна), разположен в промоторния участък на гена, кодиращ рецептора за серотонин (*HTR5A*, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A). Генотипиранто на този полиморфизъм се оказа неуспешно за 1 индивид от групата на случаите (0.6%) и за трима от контролната група (0.5%), което е индикация, че установената асоциация не е резултат от грешка при генотипирането. Рисковият генотип (GG) беше наблюдаван с много по – голяма честота сред пациентите - 56.7%, в сравнение с 42.1% от индивидите в контролната група (P=0.00085, odds ratio (OR)=1.80; 95% CI, 1.27–2.54). Рисковият алел (G) беше наблюдаван много по – често в групата на случаите с алелна честота от 73.7%, в сравнение с 62.1% честота при контролите (P=0.000097).

Слаба асоциация беше наблюдавана и за SNP rs6265, водещ до амино – киселинна замяна (Val66Met), разположен в екзон 2 на гена кодиращ невротрофния фактор в мозъка (*BDNF*, brain-derived neurotrophic factor). Рисковият алел (C) беше наблюдаван с по – голяма честота в групата на случаите, в сравнение с контролната група индивиди (P=0.0033).

Слаба асоциация показа и вариант rs5443, локализиран в екзон 10 на гена кодиращ β субединицата на гуанин нуклеотид – свързващия протеин (*GNB3,* guanine

nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3). 18% от случаите са хомозиготни носители на рисковия генотип (TT), в сравнение с 8% при контролите (P=0.00051).

Поради вероятността от грешки тип I (фалшиво позитивни резултати), беше приложена корекцията на Бонферони за множествени сравнения [255]. Тъй като размерът на използваната извадка в първи скрининг е сравнително малък и нито един от изследваните маркери не би запазил нивото си на значимост след прилагане на корекцията на Бонферони в този етап, тя беше приложена след комбинирането на резултатите от двата скрининга. В този случай,

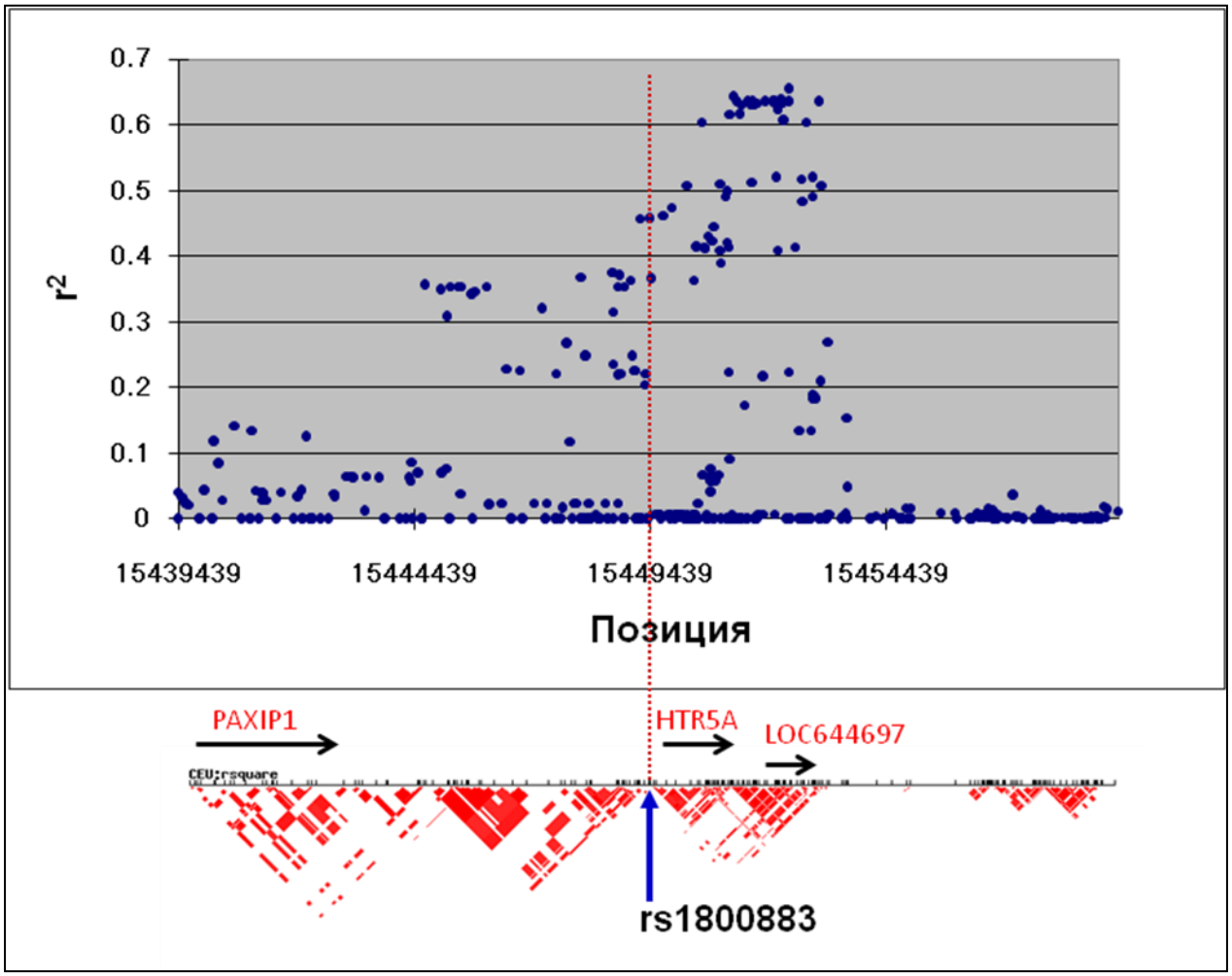
$$P=0,05/179=2.79X10^{-4}$$

След тази корекция, само вариант rs1800883 в *HTR5A* гена остана статистически значимо асоцииран с биполарното разстройство, с коригирана *P* стойност от 0.017. Отчитайки вероятността за възникване на грешка от II род (получаване на фалшиво отрицателен резултат) при прилагане на корекцията на Бонферони, евентуалната асоциация на останалите полиморфизми със заболяването не може да бъде напълно изключена.

4.2. Резултати от анализа на връзката между варианти в *HTR5A* и биполарното разстройство. Фино картиране и хаплотипен анализ

За да разберем дали rs1800883 не е маркер за друг, все още неанализиран вариант, който се намира в неравновесна скаченост с него и е включен в етиологията на биполарното разстройство, предприехме фино картиране на региона около маркерния SNP.

Използвайки базата данни на HapMap за европейска популация (CEU), проучихме LD – блоковата стуктура в района на гена *HTR5A* и оценихме стойностите на r^2 (като мярка за LD) между rs1800883 и други представителни SNPs (tSNPs).в района на и около гена. Както се вижда от фигура 14, маркерният полиморфизъм (rs1800883) е локализиран между два LD блока и показва по – силна неравновесна скаченост спрямо маркерите в десния LD блок ($r^2 \geq 0.5$), в сравнение с тези в левия.



Фигура 14: Диаграма на LD – блоковата структура на *HTR5A*, съгласно базата данни на HapMap за европейска популация (долната част на фигурата) и разпределение на стойностите на r^2 (по ординатата) между rs1800883 и други представителни полиморфизми в района на *HTR5A*, според позицията им. Всяка точка от диаграмата е отделен полиморфизъм.(база данни HapMap, 2007)

С помощта на базата данни на HapMap и програмата HaploView, от двата LD – блока за анализ бяха подбрани общо 12 представителни полиморфизма. Генотипирането на маркерите беше извършено посредством метода Invader, комбиниран с мултиплексна полимеразна верижна реакция, първоначално в 94 слуая и 184 контроли, с праймери и проби по собствен дизайн. Данни относно генотипирането на тези 12 маркера и проведения статистически анализ чрез точен тест на Фишер са представени в таблица 15.

Таблица 15: Данни от генотипирането на 12 представителни полиморфизма в района на *HTR5A* ген, в 94 случая и 184 контрлни индивида.

Ген	SNP	Случаи, генотип (*n*=94)			Контроли, генотип (*n*=184)			Случаи, честота			Контроли, честота			Рисков алел	P – стойност*			OR	95% CI
		11	12	22	11	12	22	11	12	22	11	12	22		pa	p11	p22		
LOC644697	rs4960681	47	38	9	65	91	28	0.50	0.40	0.10	0.35	0.49	0.15	1	**$2.0X10^{-2}$**	**$2.0X10^{-2}$**	$2.0X10^{-1}$	1.83	(1.11-3.03)
HTR5A	rs2581841	10	31	53	25	84	75	0.11	0.33	0.56	0.14	0.46	0.41	2	**$2.9X10^{-2}$**	$5.7X10^{-1}$	**$1.6X10^{-2}$**	1.88	(1.14-3.10)
интергенен	rs2698515	64	28	2	120	53	11	0.68	0.30	0.02	0.65	0.29	0.06		$3.6X10^{-1}$	$6.9X10^{-1}$	$2.3X10^{-1}$		
HTR5A	rs1730215	13	45	36	40	87	57	0.14	0.48	0.38	0.22	0.47	0.31		$1.0X10^{-1}$	$1.5X10^{-1}$	$2.3X10^{-1}$		
HTR5A	rs6320	60	29	5	108	60	16	0.64	0.31	0.05	0.59	0.33	0.09		$2.9X10^{-1}$	$4.4X10^{-1}$	$3.5X10^{-1}$		
LOC644697	rs7807281	31	45	18	90	77	17	0.33	0.48	0.19	0.49	0.42	0.09	2	**$2.6X10^{-3}$**	**$1.5X10^{-2}$**	**$2.2X10^{-2}$**	1.95	(1.16-3.26)
LOC644697	rs10254608	25	49	20	82	79	23	0.27	0.52	0.21	0.45	0.43	0.13	2	**$2.4X10^{-3}$**	**$4.1X10^{-3}$**	$7.8X10^{-2}$	2.22	(1.29-3.80)
HTR5A	rs2581845	14	46	34	32	91	60	0.15	0.49	0.36	0.17	0.50	0.33		$5.2X10^{-1}$	$6.1X10^{-1}$	$5.9X10^{-1}$		
HTR5A	rs7457899	41	42	11	75	81	27	0.44	0.45	0.12	0.41	0.44	0.15		$5.1X10^{-1}$	$7.0X10^{-1}$	$5.8X10^{-1}$		
HTR5A	rs2873379	62	30	2	110	61	12	0.66	0.32	0.02	0.60	0.33	0.07		$1.9X10^{-1}$	$3.6X10^{-1}$	$1.5X10^{-1}$		
HTR5A	rs1561600	11	34	49	26	79	78	0.12	0.36	0.52	0.14	0.43	0.43		$1.8X10^{-1}$	$5.8X10^{-1}$	$1.6X10^{-1}$		
HTR5A	rs2698497	0	19	75	5	44	135	0.00	0.20	0.80	0.03	0.24	0.73		$1.5X10^{-1}$	$1.7X10^{-1}$	$3.0X10^{-1}$		

*Двустранен точен тест на Фишер; pa-модел на алелните честоти; p11/p22-модел на доминантно/рецесивно унаследяване; OR (Odds Ratio)-съотношение на шансовете; 95%CI (95% confidential interval)-95% доверителен интервал

Статистическата обработка на данните след това първо генотипиране, разкри статистически значима разлика за четири полиморфизма, а именно: rs4960681 (*LOC644697*) с минимално $P=2.0X10^{-2}$ (OR=1.83 и 95% CI от 1.11-3.03), rs2581841 (*HTR5A*) с минимално $P=1.6X10^{-2}$ (OR=1.88 и 95% CI от 1.14-3.10), rs7807281 (*LOC644697*) с минимално $P=2.6X10^{-3}$ (OR=1.95 и 95% CI от 1.16-3.26), rs10254608 (*LOC644697*), с минимално $P=2.4X10^{-3}$ (OR=2.22 и 95% CI от 1.29-3.80).

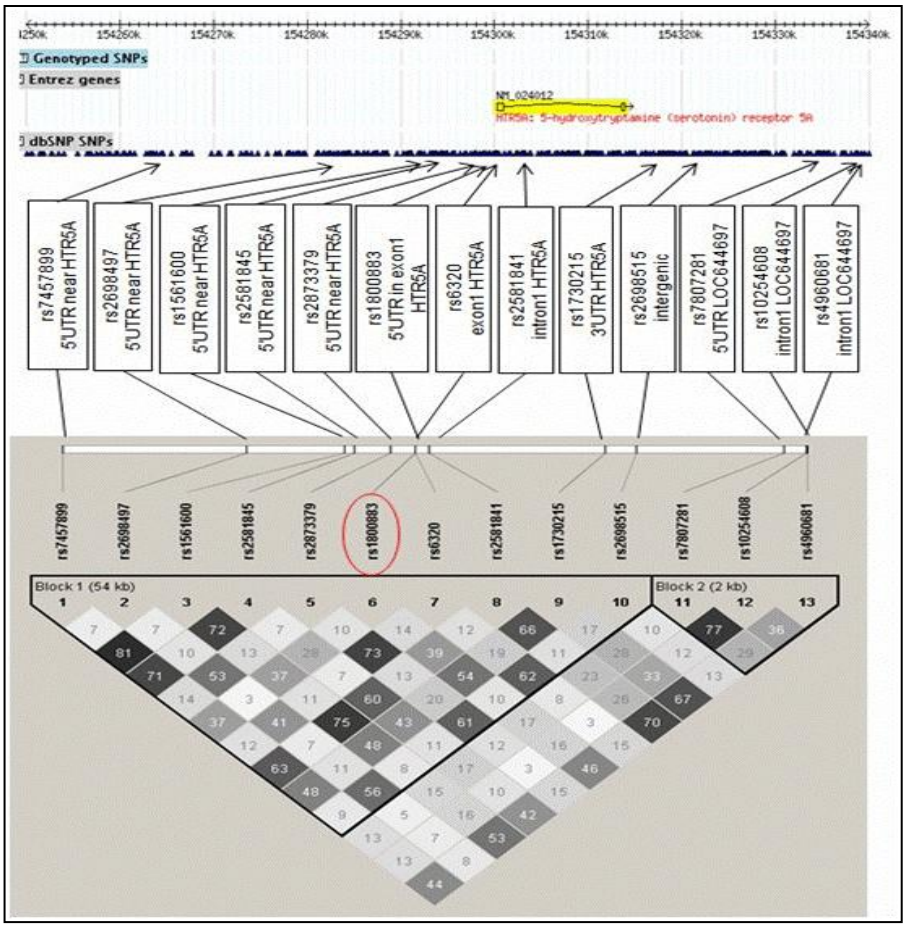
Тези четири полиморфизма бяха подложени на допълнителен анализ в останалите случаи и контроли. Двустранен точен тест на Фишер беше приложен, както върху данните от второто генотипиране, така и върху обобщените данни от двете генотипирания. Като резултат, два от четирите полиморфизма показаха статистически значима разлика, с P стойност близка до тази на rs1800883. Нито един от тези два полиморфизма обаче, не достигна статистическтата значимост на маркерния SNP. В таблица 16 са посочени данни относно генотипирането на двата полиморфизма във всички проби, статистическата им значимост след Фишер тест, както и данни относно генотипирането на rs1800883 във всички налични проби.

Таблица 16: Обобщени данни от генотипирането на два представителни полиморфизма, в района на *HTR5A*, показали стойност на P близка до тази на маркерния SNP. Посочени са и данните от анализирането на rs1800883 във всички проби.

Ген	SNP	Случаи, генотип (*n*=172)			Контроли, генотип (*n*=556)			Случаи, честота			Контроли, честота			Рисков алел	P – стойност			OR	95% CI
		11	12	22	11	12	22	11	12	22	11	12	22		pa	p11	p22		
HTR5A	**rs1800883**	**16**	**58**	**97**	**99**	**221**	**233**	**0.09**	**0.34**	**0.57**	**0.18**	**0.40**	**0.42**	**2**	**$9.70X10^{-5}$**	**$8.10X10^{-3}$**	**$8.50X10^{-4}$**	**1.80**	**(1.27-2.54)**
HTR5A	rs2581841	17	56	99	59	259	237	0.10	0.33	0.58	0.11	0.47	0.43	2	$8.10X10^{-3}$	$8.90X10^{-1}$	$6.50X10^{-4}$	1.82	(1.29-2.57)
LOC644697	rs10254608	44	88	40	211	257	86	0.26	0.51	0.23	0.38	0.46	0.16	2	$9.00X10^{-4}$	$3.40X10^{-3}$	$2.20X10^{-2}$	1.79	(1.22-2.62)

Означенията са както в предната таблица

За да установим степента на неравновесна скаченост между изследваните маркери за нашата популация, използвахме данните от генотипирането на 12те представителни полиморфизма, заедно с маркерния SNP и с помощта на програма HaploView, проследихме структурата на LD в района на гена *HTR5A*. Както се вижда на фигура 15, анализираните 13 маркера принадлежат на два LD блока (блок 1 с големина 54 kb и блок 2 с големина 2 kb), в които първият и последният маркер се намират в силна неравновесна скаченост с междинните полиморфизми, като те самите не е необходимо да са в неравновесна скаченост по между си (т.нар.'solid spine of LD' approach в програмата HaploView). Степента на неравновесна скаченост е представена чрез стойностите на r^2. Черните фигури отразяват $r^2=1$ (цифрите не се изписват във фигурата), т.е. между съответните маркери съществува пълна неравновесна скаченост, сивите - $0< r^2<1$, като стойността е означена в съответната фигура, а белите отразяват $r^2=0$, т.е. липса на неравновесна скаченост между съответните маркери (случайно рекомбиниране на маркерите).



Фигура 15: Диаграма на LD структурата в района на гена *HTR5A* и локализация на анализираните представителни полиморфизми, според базата данни на NCBI (горната част на фигурата). За построяване на LD блоковите структури (очертаните с черен контур триъгълни фигури) е използван подходът 'solid spine of LD approach' в програмата HaploView 4.0.

Хаплотипният анализ беше проведен с трите маркера показали статистически значима асоциация (rs1800883, rs2581841 и rs10254608) с програмата SNPALyze 3.1. Таблица 17 демонстрира честотите на установените осем хаплотипа при случаите и контролите.

Таблица 17: Хаплотипен анализ с 3 маркера в *HTR5A* гена при 172 случая и 556 контроли

N	Хаплотип 123*	Честота		P стойност*
		Случаи	Контроли	Odds Ratio (95% доверителен интервал)
X1	G-T-A	0.46	0.36	0.00045; 1.6 (1.22 - 1.99)
X2	C-C-C	0.19	0.28	0.00041; 0.6 (0.43 - 0.78)
X3	G-T-C	0.21	0.22	незначим
X4	C-T-C	0.05	0.06	незначим
X5	G-C-C	0.06	0.05	незначим
X6	C-T-A	0.01	0.03	незначим
X7	C-C-A	0.01	0.01	незначим
X8	G-C-A	0.00	0.00	незначим

1 - rs1800883; 2 - rs2581841; 3 - rs10254608;
* P стойностите са базирани на точен тест на Фишер.

Най – често срещаният хаплотип в нашата популация (X1) е установен при 46% от пациентите в сравнение с 36% при контролната група и включва рисковите алели на трите маркера. Въпреки това, този хаплотип показа по – слаба асоциация със заболяването в сравнение с асоциацията на индивидуалния маркер, rs1800883.

4.3 Резултати от широко мащабното асоциативно проучване

Цялостния геномен скрининг върху биполарното разстройство беше проведен в два етапа. В първият етап на изследването с помощта на 550K генотипиращия чип на Illumina успешно бяха анализирани повече от 500 000 полиморфизма за 188 пациенти със заболяването и 376 контролни индивида. Във втория етап с цел валидизиране на резултатите от цялостния геномен скан, 100 маркера бяха генотипирани в същата серия от случаи и контроли, а реплицирането беше проведено в допълнителна серия от проби (122 случая и 328 контроли)

За провеждане на цялостния геномен скрининг, ДНК пробите, предварително доведени до крайна концентрация 50ng/µl, бяха транспортирани до лабораторията за развитие на генотипиращите методи в института RIKEN в Йокохама, Япония (Laboratory for Genotyping Development, RIKEN Center for Genomic Medicine, Yokohama, Japan), където генотипирането беше извършено съгласно протокола на фирмата производител (Illumina, Inc. San Diego, California, USA). Получените след скрининга данни бяха подложени на статистически анализ в лабораторията за статистически анализ към същия институт (Laboratory for Statistical Analysis, RIKEN Center for Genomic Medicine, Yokohama, Japan), като за всеки анализиран маркер бяха установени: броя успешно генотипирани индивиди, алелните и генотипни честоти, неговата значимост, изразена чрез стойността P с двустранен точен тест на Фишер за трите модела на унаследяване, рисковия алел, качеството на получения сигнал върху чипа сред случаи, контроли и общо, честотата на по – рядко срещания алел (MAF) за случаи, контроли и общо, стойността на P по отношение на закона на Hardy–Weinberg за равновесието, общо и поотделно (за случаи и контроли), съотношението на шансовете (OR). Разпределението на стойността на P за всичките 554 496 анализирани полиморфизма, след тази първа обработка на данните, е посочено в таблица 18

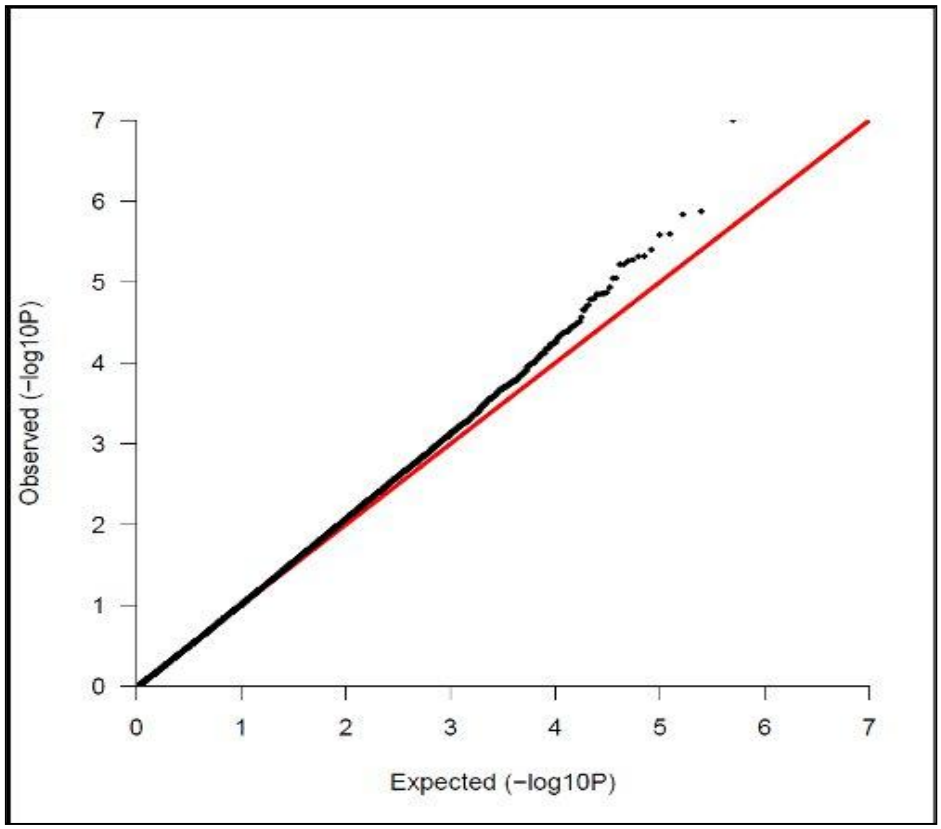
Таблица 18: Разпределение на стойностите на P след цялостния геномен скан и провеждане на двустранен точен тест на Фишер, съгласно трите модела на унаследяване

P value	Брой полиморфизми		
	vs11	vs22	1vs2
≥0.01	550 020	549 746	548 604
<0.01	4031	4276	5232
<0.001	393	409	577
<0.0001	49	56	69
<0.00001	3	8	13
<0.000001	0	1	1
Общо	**554 496**	**554 496**	**554 496**

Получените данни бяха подложени на филтриране по определени критерии (вж Материали и методи), приети и използвани от лабораторията за развитие на генотипиращите методи в института RIKEN в Япония. В резултат на проведения качествен контрол, общо 497 732 маркера, които показаха качество на получения флуоресцентен сигнал (SNP call rate) ≥0.99, сред случаи и контроли, честота на редкия

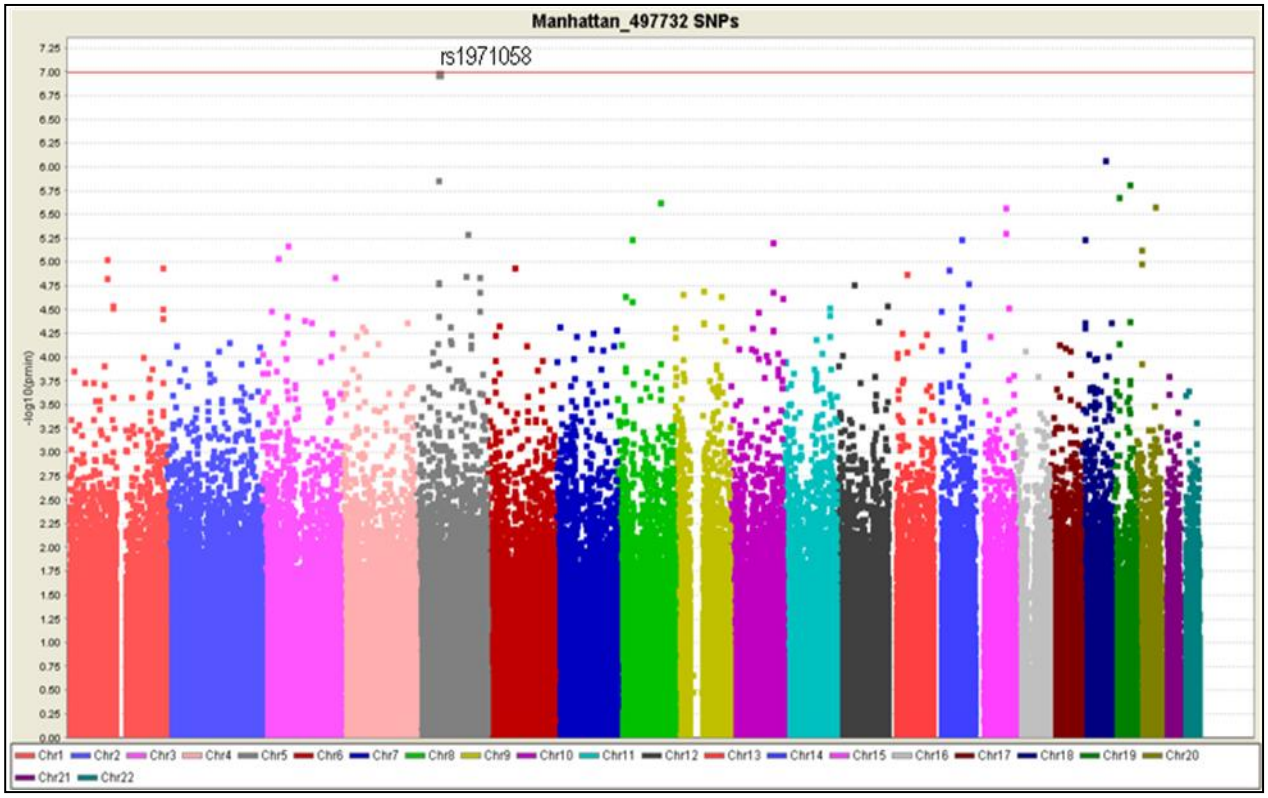
алел (MAF) > 0 и за двете изследвани групи и стойност на P по отношение на принципа на Hardy-Weinberg за равновесието ≥0.000001, в контролната група, бяха подложени на последващ анализ, с цел установяване на асоциация с биполарното разстройство.

Данните за стойностите на P за 497 732 полиморфизма, изчислени по модела на алелните честоти (pa) с тест на Фишер, бяха използвани за построяване на нормална квантилна диаграма (Q – Q plot), изобразена на фигура 16. Както е видно от представената диаграма, при сравняване разпределенията на -log10 от наблюдаваните стойности на P (ординатa) и очакваните стойности на P (абсциса) при вярна нулева хипотеза, не беше установено значително отклонение от нормалното разпределение и наличие на популационна стратификация сред използваната извадка. Квантилната диаграма е построена с помощта на статистическа програма R, свободно достъпна в Internet.



Фигура 16: Нормална квантилна диаграма изобразяваща разпределението на отрицателните десетични логаритми на стойностите на P за 497 732 SNPs, успешно преминали качествения контрол. Y (observed (-log10P)) – отрицателен десетичен логаритъм от наблюдаваните стойности на P; X (expected (-log10P)) – отрицателен десетичен логаритъм от очакваните стойности на P при вярна нулева хипотеза (червената диагонална линия).

Данните от минималната получена стойност на P за всеки полиморфизъм (най – ниската стойност на P за всеки маркер, получена след изчисляване на стойностите на P според трите модела с точен тест на Фишер) за 497 732 маркера преминали успешно качествения контрол, бяха използвани за построяване на диаграма тип Manhattan (Manhattan plot). По оста X на получената диаграма (Фигура 17) се вижда разпределението на 497 732 полиморфизма генотипирани в цялостното геномно асоциативно изследване, според локализацията им в 22-те двойки автозоми, като всяка хромозома е изобразена в различен цвят, а всяка точка е полиморфизъм. По оста Y са изобразени стойностите на отрицателния десетичен логаритъм от P_{min}. След прилагане на корекцията на Бонферони за множествени тествания, коригираното ниво на статистическа значимост от $1X10^{-7}$ (0.05/497 732) беше преминато само от един маркер, rs1971058 (интергенен, между *LOC728103* и *LOC100130514*) с минимална стойност на $P=9.86X10^{-8}$.



Фигура 17: Диаграма тип Manhattan, отразяваща отрицателен десетичен логаритъм от разпределението на минималните P стойности за 497 732 SNPs в цялостния геномен скрининг. Всяка хромозома е изобразена в различен цвят. Червената линия изобразява коригираното ниво на статистическа значимост ($-\log10(1X10^{-7})=7$), базирано на корекцията на Бонферони за множествени тествания.

Преминалите успешно качествен контрол 497 732 маркера бяха подредени в нарастващ ред в зависимост от тяхната минимална стойност на P (след точен тест на

Фишер), като първите 100 маркера показали най – ниска стойност бяха избрани за генотипиране във всички проби с цел потвърждаване и реплициране на резултатите от цялостния геномен скан. За валидизиране на резултатите, 100те маркера бяха генотипирани в същата серия от случаи и контроли (188 случая и 376 контроли – група 1), използвана при цялостното геномно сканиране, а реплицирането беше проведено в допълнителна, независима серия от 122 случая и 328 контроли (група 2). И при двете проведени генотипирания, като генотипираща платформа беше използван Invader метод, комбиниран с мултиплексна полимеразна верижна реакция, с проби и праймери по собствен дизайн (вж Материали и методи, Таблици 9 и 10).

Данните относно генотипирането на стоте маркера са представени в таблица 19. Маркерите са подредени по нарастване на най – ниската получена стойност за P (според Фишер тест) след цялостното геномно проучване. За всеки полиморфизъм е показано отклонението (или липсата на такова) от равновесието според принципа на Hardy-Weinberg, изразено като P стойност, честотата на по – рядко срещания алел, както и генът или най – близкия такъв, към който принадлежи съответния маркер.

Таблица 19: Данни от генотипирането на 100те полиморфизма, показали най - силна асоциация със заболяването след цялостното геномно асоциативно проучване. Показани са и данните от реплицирането на резултатите

SNP ID (NCBI)	Х3	Позиция (бд)	ЦГАП					Репликационно проучване					Близкостоящ ген
			P_{min}	HWE P		MAF		P_{min}	HWE P		MAF		
				Случаи[a]	Контроли[b]	Случаи[a]	Контроли[b]		Случаи[c]	Контроли[d]	Случаи[c]	Контроли[d]	
rs1971058	5	57457363	9.86E-08	0.88	0.080	0.44	0.39	0.18	0.87	0.25	0.46	0.50	*LOC728103/LOC100130514*
rs1506223	18	60534163	8.15E-07	0.17	0.38	0.20	0.10	0.89	0.93	0.36	0.12	0.11	-
rs6859725	5	57391288	1.33E-06	1.00	0.35	0.49	0.34	0.05	0.31	0.85	0.38	0.44	*LOC728103*
rs8099939	19	47212948	1.46E-06	0.88	0.32	0.45	0.39	0.10	0.90	1.00	0.48	0.45	*GRIK5*
rs8109263	19	20589484	1.99E-06	0.085	0.67	0.05	0.15	0.23	0.11	0.10	0.09	0.12	*ZNF626*
rs1975804	8	109360409	2.28E-06	0.048	0.0007	0.25	0.18	0.28	0.63	0.91	0.20	0.23	*EIF3S6*
rs6122972	20	48808649	2.54E-06	1.00	0.60	0.08	0.18	0.08	1.00	0.26	0.12	0.17	*PARD6B*
rs2289700	15	77011738	2.60E-06	0.78	1.00	0.16	0.07	0.17	1.00	0.23	0.12	0.09	*CTSH*
rs16970287	15	77015312	4.77E-06	1.00	1.00	0.15	0.06	0.26	0.88	0.14	0.11	0.09	*CTSH*
rs10491291	5	132944258	4.82E-06	0.82	1.00	0.20	0.10	0.47	0.83	0.89	0.16	0.14	*FSTL4*
rs1813100	18	9502985	5.48E-06	0.027	0.67	0.44	0.41	0.11	0.088	0.22	0.41	0.43	*RALBP1*
rs1135990	8	38828710	5.50E-06	0.010	0.59	0.28	0.18	0.93	1.00	0.92	0.20	0.20	*TACC1*
rs2283380	14	71979491	5.57E-06	0.023	0.21	0.41	0.29	0.62	1.00	0.23	0.37	0.36	*RGS6*
rs11192617	10	107572237	6.04E-06	1.00	0.33	0.23	0.12	0.48	0.59	0.79	0.17	0.15	-
rs951030	10	107579349	6.04E-06	1.00	0.33	0.23	0.12	0.48	0.59	0.83	0.17	0.15	-
rs6795228	3	65938767	6.37E-06	1.00	0.34	0.07	0.17	0.50	1.00	0.034	0.12	0.11	*MAGI1*

rs4814074	20	12175793	7.16E-06	0.58	0.69	0.16	0.07	0.13	0.98	0.34	0.07	0.11	-
rs11129950	3	42289591	8.83E-06	0.30	0.46	0.08	0.17	0.10	0.51	0.69	0.10	0.15	*CCK*
rs10875032	1	96970919	8.99E-06	0.07	0.68	0.39	0.47	0.030	0.022	0.81	0.42	0.46	*PTBP2*
rs12479608	20	12176787	1.00E-05	0.58	0.70	0.16	0.07	0.13	0.98	0.41	0.07	0.11	-
rs4660080	1	239609416	1.11E-05	0.10	0.33	0.45	0.42	0.25	0.86	0.071	0.47	0.45	*RGS7*
rs2029516	6	69134708	1.11E-05	0.000066	0.66	0.50	0.40	0.37	0.16	0.85	0.41	0.42	-
rs2249395	14	37790476	1.16E-05	0.77	0.64	0.47	0.34	0.33	0.69	0.54	0.40	0.42	*CLEC14A*
rs9534415	13	45986879	1.27E-05	0.033	0.73	0.16	0.08	0.13	0.17	1.00	0.10	0.08	*COX17P*
rs11951994	5	128046772	1.34E-05	0.59	0.52	0.28	0.42	0.07	0.67	0.39	0.38	0.32	-
rs7621975	3	185241200	1.39E-05	0.005	0.46	0.09	0.17	0.61	1.00	0.36	0.17	0.15	*HTR3D*
rs10476364	5	161116904	1.39E-05	0.23	0.30	0.42	0.28	0.63	0.24	0.28	0.37	0.38	*GABRA6*
rs6673531	1	96887637	1.41E-05	0.089	0.68	0.39	0.47	0.040	0.023	0.91	0.43	0.46	*PTBP2*
rs11958003	5	57428887	1.59E-05	0.30	0.071	0.23	0.36	0.0047	0.86	0.0000010	0.26	0.19	*LOC728103*
rs1959718	14	87250611	1.60E-05	0.32	0.33	0.05	0.12	0.60	0.94	0.12	0.08	0.09	*LOC730121*
rs733250	5	57466810	1.61E-05	0.72	0.23	0.12	0.23	0.54	1.00	0.85	0.15	0.16	*LOC728103/LOC100130514*
rs1862019	12	44277267	1.64E-05	0.65	0.38	0.43	0.30	0.012	0.49	0.23	0.30	0.39	-
rs10746876	9	73255767	1.92E-05	0.74	0.61	0.13	0.05	0.61	0.78	1.00	0.09	0.10	*TRPM3*
rs11951528	5	161150054	1.99E-05	0.23	0.45	0.42	0.29	0.53	0.24	0.31	0.37	0.38	*GABRA1*
rs1903905	10	109261677	2.00E-05	0.0048	1.00	0.38	0.49	0.16	0.39	1.00	0.39	0.44	*SORCS1*
rs10965002	9	21445814	2.08E-05	0.22	0.44	0.10	0.04	0.86	0.58	0.48	0.05	0.06	*IFNWP19*

rs10095297	8	20542323	2.20E-05	0.52	0.53	0.35	0.48	0.71	1.00	0.84	0.45	0.43	-
rs875069	9	117396947	2.20E-05	0.40	0.060	0.23	0.13	0.032	0.50	0.027	0.14	0.19	-
rs3123209	10	133079181	2.29E-05	0.14	0.073	0.42	0.46	0.10	0.57	0.60	0.43	0.49	*TCERG1L*
rs13252226	8	38725763	2.49E-05	0.040	0.83	0.24	0.14	0.27	1.00	0.79	0.15	0.18	*TACC1*
rs708345	12	129052556	2.72E-05	0.41	0.68	0.34	0.47	0.29	0.85	0.93	0.39	0.43	-
rs325921	1	111465866	2.74E-05	0.041	0.012	0.21	0.15	0.19	0.065	0.85	0.19	0.18	*TMEM77*
rs4903024	14	71990360	2.84E-05	0.017	0.094	0.31	0.22	0.07	0.066	1.00	0.28	0.24	*RGS6*
rs11216747	11	117475536	2.87E-05	1.00	1.00	0.03	0.0027	0.68	1.00	1.00	0.00	0.01	*TMPRSS4*
rs325894	1	111454071	2.87E-05	0.044	0.012	0.21	0.15	0.30	0.10	1.00	0.18	0.17	*TMEM77*
rs2290272	15	83248435	2.93E-05	0.034	0.80	0.41	0.29	0.24	0.66	0.97	0.30	0.33	*SLC28A1*
rs1557078	1	239616973	2.95E-05	0.14	0.20	0.44	0.44	0.41	0.73	0.14	0.48	0.47	*RGS7*
rs4317369	5	161160952	3.09E-05	0.23	0.53	0.42	0.30	0.63	0.24	0.15	0.37	0.38	*GABRA1*
rs7619223	3	23183012	3.11E-05	0.013	0.014	0.30	0.24	0.09	0.0000009	0.000000043	0.12	0.08	*UBE2E2*
rs2775220	14	19582612	3.16E-05	1.00	0.21	0.11	0.22	0.26	0.32	0.18	0.16	0.18	*OR4U1P*
rs2763342	10	71238584	3.23E-05	0.18	0.064	0.32	0.22	0.24	0.96	0.42	0.28	0.25	*COL13A1*
rs4387777	2	61483139	3.40E-05	0.0049	0.008	0.23	0.13	0.0035	0.0098	0.0000014	0.09	0.16	*USP34*
rs1624780	11	117639995	3.46E-05	0.66	0.31	0.50	0.37	0.82	0.84	1.00	0.43	0.42	*EVA1*
rs1472034	5	57414225	3.55E-05	0.54	0.0028	0.23	0.35	0.037	0.40	0.88	0.33	0.27	*LOC728103*
rs12489378	3	63273648	3.57E-05	0.40	0.49	0.23	0.13	0.92	0.68	0.23	0.16	0.16	-
rs1376481	3	63284090	3.57E-05	0.40	0.49	0.23	0.13	0.58	1.00	0.23	0.15	0.16	-

rs1341446	1	239608511	3.71E-05	0.18	0.59	0.45	0.42	0.35	1.00	0.21	0.49	0.46	*RGS7*
rs2190937	14	72024406	3.78E-05	0.056	0.10	0.48	0.39	0.36	0.80	0.75	0.46	0.43	*RGS6*
rs9867153	3	107895401	3.90E-05	0.77	0.071	0.44	0.44	0.33	0.58	0.94	0.47	0.49	-
rs11880124	19	47375631	3.99E-05	1.00	0.50	0.17	0.08	0.91	1.00	0.57	0.13	0.13	*DEDD2*
rs2077857	12	106942437	4.08E-05	0.049	0.0038	0.34	0.43	0.09	0.19	0.0034	0.40	0.39	-
rs2945118	3	126326179	4.09E-05	0.011	0.62	0.20	0.12	0.54	1.00	0.27	0.15	0.16	*SLC12A8*
rs2981514	3	126327612	4.09E-05	0.011	0.62	0.20	0.12	0.58	1.00	0.24	0.15	0.16	*SLC12A8*
rs11132322	4	169713165	4.09E-05	0.18	0.22	0.42	0.31	0.07	1.00	0.20	0.29	0.35	*PALLD*
rs2309979	9	73357222	4.12E-05	0.52	0.055	0.22	0.13	0.54	0.20	0.80	0.13	0.14	-
rs7042172	9	73348461	4.12E-05	0.52	0.055	0.22	0.13	0.74	1.00	0.46	0.19	0.18	-
rs1064059	18	75994674	4.17E-05	0.74	0.47	0.13	0.23	0.14	0.54	0.19	0.25	0.20	*ZNF508*
rs9304062	18	75989699	4.17E-05	0.74	0.47	0.13	0.23	0.14	0.54	0.17	0.25	0.20	*ZNF508*
rs1979368	18	9444478	4.19E-05	0.089	0.013	0.38	0.30	0.11	0.72	0.14	0.29	0.33	*RALBP1*
rs10869019	9	73232173	4.24E-05	0.37	1.00	0.14	0.06	0.60	0.94	1.00	0.08	0.09	*TRPM3*
rs1266071	6	31777475	4.47E-05	0.010	0.23	0.17	0.10	0.63	0.57	0.70	0.14	0.13	*BAT5*
rs6977358	7	14364611	4.56E-05	1.00	0.36	0.28	0.17	0.43	0.50	0.89	0.21	0.20	*DGKB*
rs2702340	4	56602951	4.56E-05	0.00044	0.0025	0.15	0.15	0.13	0.67	0.53	0.16	0.21	*CEP135*
rs1477268	5	86463622	4.59E-05	1.00	0.006	0.29	0.19	0.58	0.53	0.90	0.20	0.20	-
rs10982853	9	117444994	4.63E-05	0.16	0.26	0.19	0.10	0.08	0.57	0.044	0.14	0.16	-
rs702192	9	1636654	4.66E-05	0.011	0.30	0.26	0.35	0.42	0.90	1.00	0.30	0.33	-

rs12894020	14	65413950	4.68E-05	0.60	0.67	0.30	0.42	0.34	0.20	0.67	0.36	0.37	*NCOA4P*
rs1561674	10	55618720	4.69E-05	0.10	0.25	0.24	0.34	0.17	1.00	0.57	0.29	0.34	*PCDH15*
rs7078920	10	55621179	4.69E-05	0.10	0.25	0.24	0.34	0.19	0.034	0.0000010	0.21	0.26	*PCDH15*
rs329017	18	9482196	4.73E-05	0.27	1.00	0.21	0.33	0.74	1.00	0.49	0.32	0.32	*RALBP1*
rs11773068	7	157442913	4.95E-05	0.77	1.00	0.14	0.25	0.11	0.83	0.25	0.24	0.21	*PTPRN2*
rs17291402	10	109273146	4.97E-05	0.007	0.75	0.38	0.49	0.26	0.40	1.00	0.40	0.43	-
rs11591564	10	109275918	5.08E-05	0.008	0.83	0.38	0.49	0.20	0.49	1.00	0.39	0.43	-
rs1563797	4	62798804	5.13E-05	0.078	0.86	0.29	0.19	0.22	0.80	1.00	0.23	0.19	-
rs12671685	7	96644065	5.37E-05	0.17	0.60	0.20	0.11	0.37	1.00	1.00	0.11	0.14	*ACN9*
rs7653056	3	177272697	5.37E-05	0.17	0.60	0.20	0.12	0.22	0.80	1.00	0.11	0.14	-
rs6767034	3	63251876	5.38E-05	0.40	0.49	0.23	0.13	0.91	0.72	0.27	0.16	0.17	*SYNPR*
rs10507408	13	32986583	5.39E-05	1.00	0.56	0.03	0.10	0.10	1.00	1.00	0.05	0.08	-
rs7993213	13	94886853	5.53E-05	0.14	0.13	0.47	0.43	0.27	0.48	0.13	0.48	0.49	*CLDN10*
rs10946415	6	20989365	5.59E-05	0.77	0.68	0.15	0.25	0.33	0.36	1.00	0.20	0.23	*CDKAL1*
rs11745848	5	138545384	5.62E-05	0.064	0.17	0.39	0.49	0.09	0.12	0.65	0.39	0.44	*SIL1*
rs4924268	15	36508542	5.70E-05	0.24	0.13	0.46	0.42	0.46	0.38	0.54	0.50	0.48	*FAM98B*
rs3759001	11	117640955	5.78E-05	0.076	0.48	0.46	0.33	0.14	1.00	0.17	0.39	0.44	*EVA1*
rs961013	18	66931385	5.80E-05	0.0005	0.00000048	0.04	0.11	0.19	0.0038	0.00000049	0.06	0.08	-
rs5019857	7	54503844	5.82E-05	1.00	1.00	0.08	0.02	0.65	1.00	1.00	0.03	0.03	-
rs4447895	4	40092010	5.83E-05	1.00	1.00	0.04	0.12	0.28	1.00	0.22	0.07	0.09	*CHRNA9*

rs1537966	9	1615303	5.95E-05	0.018	0.12	0.28	0.38	0.75	0.66	0.83	0.36	0.36	-
rs7121214	11	83700584	6.23E-05	0.24	0.42	0.47	0.34	0.08	0.67	0.005	0.35	0.38	*DLG2*
rs829179	9	127356466	6.37E-05	0.65	0.32	0.09	0.03	0.76	1.00	0.45	0.08	0.07	*MAPKAP1*
rs2032794	5	86468373	6.38E-05	1.00	0.010	0.29	0.19	0.58	0.53	0.96	0.20	0.20	*LOC645261*

ХЗ, хромозома; бд, базови двойки; Pmin, най - ниската получена стойност за P след тест на Фишер съгласно трите модела на унаследяване; GWAS (Genome Wide Association Study), Цялостно геномно асоциативно проучване (ЦГАП); HWE P, стойност на P според принципа на Харди-Вайнберг; MAF (Minor Allele Frequency), Честота на по - рядко срещания алел;
a Случаи: n=188
b Контроли: n=376
c Случаи: n=122
d Контроли: n=328

Статистическият анализ на данните от второто генотипиране (реплициране на резултатите) разкри статистически значима разлика с P стойност < 0.05 за следните осем полиморфизма: rs6859725 (*LOC728103*) с P_{min}=0.05, rs10875032 (*PTBP2*) с P_{min}=0.03, rs6673531 (*PTBP2*) с P_{min}=0.04, rs11958003 (*LOC728103*) с P_{min}=0.0047, rs1862019 с P_{min}=0.012, rs875069 с P_{min}= 0.032, rs4387777 (*USP34*) с P_{min}=0.0035 и rs1472034 (*LOC728103*) с P_{min}=0.037. След изключване на 16 маркера, показали пълна неравновесна скаченост с останалите (r^2>0.8), и прилагане на корекцията на Бонферони за множествени тествания, нито един от тези осем маркера не достигна зададеното коригирано ниво на статистическа значимост в репликационното проучване, P<0.0006 (0.05/84) (Таблица 19).

Най – силна асоциация от цялостния геномен скрининг показа вариант rs1971058 (минимална P стойност 9.86 X 10^{-8}), локализиран в 5q11.2 хромозомен локус. Съгласно базата данни на NCBI (версия 36.3), в този район са картирани два гена, *LOC728103* (18 kb от SNP) и *LOC100130514* (35 kb от SNP), който е подобен на гена за фосфоглицерат мутаза 1 (*PGAM1*), експресиран в много тъкани, включително и в мозъка. Въпреки това, силната асоциация на този SNP не беше потвърдена при генотипирането му в допълнителната извадка от случаи и контроли (група 2) (P=0.18, MAF=0.50).

За установяване на крайна асоциация от цялостния геномен скан и репликационното проучване, върху данните от двете колекции беше приложен тестът на Cochran-Mantel-Haenszel. Въпреки че, повторното генотипиране на 100те полиморфизма не разкри силна статистически значима асоциация на някой от тези варианти със заболяването, комбинираният анализ на резултатите в 310 случая и 704 контроли, установи тенденция към асоциация за 10 варианта с P стойност <10 x 10^{-5}, след теста на Cochran-Mantel-Haenszel. Тези варианти, с изключение на един, който е междугенен, са локализирани в некодиращите участъци на осем гена и са представени в таблица 20. Маркерите са подредени в зависимост от тяхната P стойност след теста на Mantel-Haenszel. За всеки маркер са посочени неговата позиция в базови двойки (според базата данни на NCBI), съответната хромозома, алелите му, най – близкия ген (до 100 бд), разпределението сред случаи и контроли, най – ниската стойност на P съгласно теста на Фишер след цялостния геномен скан и репликационното проучване, както и крайната асоциация (в P стойност) след прилагане теста на Cochran-Mantel-Haenszel.

Таблица 20: Генотипни характеристики и данни за 10 SNPs, показали тенденция за асоциация с биполарното разстройство в пълната извадка от случаи и контроли.

SNP ID (NCBI)	Х3	Позиция (бд)	Алели[a]	Функция	Близкостоящ ген	Група	Случаи[b]		Контроли[c]		P_{min} ЦГАП	P_{min} Реплициране	Mantel-Haenszel P
							11/12/22[d]	MAF	11/12/22[d]	MAF	OR (95%CI)	OR (95%CI)	OR (95%CI)
rs8099939	19	47212948	G>T	Интронен	*GRIK5*	ЦГАП	55/94/37	0.45	129/184/52	0.39	$1.46X10^{-6}$	0.097	$2.12X10^{-6}$
						РП	33/59/29	0.48	96/159/66	0.45	2.53 (1.65-3.88)	1.45 (0.90-2.34)	1.95 (1.43-2.67)
rs6122972	20	48808649	A>G	3' UTR	*PARD6B*	ЦГАП	158/27/1	0.08	245/106/14	0.18	$2.54X10^{-6}$	0.078	$3.11X10^{-6}$
						РП	92/25/2	0.12	225/86/13	0.17	2.76 (1.75-4.35)	1.50 (0.92-2.44)	2.02 (1.46-2.80)
rs2289700	15	77011738	G>A	Интронен	*CTSH*	ЦГАП	133/48/5	0.16	318/46/1	0.07	$2.60X10^{-6}$	0.171	$9.14X10^{-6}$
						РП	94/26/2	0.12	266/49/5	0.09	2.70 (1.74-4.19)	1.47 (0.88-2.45)	2.13 (1.53-2.95)
rs11129950	3	42357775	A>G	5' UTR	*CCK*	ЦГАП	159/25/2	0.08	248/109/8	0.17	$8.83X10^{-6}$	0.098	$2.18X10^{-5}$
						РП	97/25/0	0.10	235/77/8	0.15	2.78 (1.75-4.40)	1.40 (0.85-2.32)	1.99 (1.42-2.79)
rs16970287	15	77015312	A>G	Интронен	*CTSH*	ЦГАП	136/46/4	0.15	322/42/1	0.06	$4.77X10^{-6}$	0.257	$2.70X10^{-5}$
						РП	97/23/2	0.11	270/45/5	0.09	2.75 (1.75-4.33)	1.39 (0.82-2.36)	2.14 (1.52-3.00)
rs8109263	19	20632051	G>T	3' UTR	*ZNF626*	ЦГАП	168/16/2	0.05	265/94/6	0.15	$1.99X10^{-6}$	0.229	$4.08X10^{-5}$
						РП	102/16/3	0.09	253/59/8	0.12	3.52 (2.07-6.00)	1.42 (0.82-2.47)	2.35 (1.60-3.44)
rs10507408	13	32986583	A>G	Интергенен	-	ЦГАП	175/11/0	0.03	297/66/2	0.10	$5.39X10^{-5}$	0.102	$4.88X10^{-5}$
						РП	111/11/0	0.05	276/46/2	0.08	3.64 (1.89-7.00)	1.76 (0.89-3.46)	2.58 (1.61-4.15)
rs3123209	10	133079181	G>A	5' UTR	*TCERG1L*	ЦГАП	57/101/28	0.42	116/164/85	0.46	$2.29X10^{-5}$	0.101	$7.56X10^{-5}$
						РП	34/58/18	0.43	80/168/76	0.49	2.63 (1.67-4.15)	1.57 (0.89-2.75)	2.06 (1.45-2.94)

rs10491291	5	132944258	C>T	Интронен	*FSTL4*	ЦГАП	120/58/8	0.20	296/66/3	0.10	$4.82X10^{-6}$	0.471	$9.53X10^{-5}$
						РП	86/34/2	0.16	236/77/5	0.14	2.36 (1.59-3.51)	1.21 (0.76-1.91)	1.72 (1.28-2.31)
rs10875032	1	96970919	G>T	Интронен	*PTBP2*	ЦГАП	63/101/22	0.39	104/178/83	0.47	$8.99X10^{-6}$	0.030	$9.67X10^{-5}$
						РП	34/73/15	0.42	95/155/68	0.46	2.97 (1.81-4.88)	1.94 (1.07-3.52)	2.76 (1.88-4.05)

ХЗ, хромозома; бд, базови двойки; ЦГАП, Цялостно Геномно Асоциативно Проучване; РП, Репликационно проучване; MAF, Честота на по-рядко срещания алел; P_{min} ЦГАП, минимална стойност на P след тест на Фишер в цялостния геномен скан; P_{min} Реплициране, минимална стойност на P след тест на Фишер при реплициране на резултатите; Mantel-Haenszel P, стойност на P след прилагане на теста на Mantel-Haenszel върху данните от двете генотипирания (310 случая и 704 контроли); OR (95%CI), Съотношение на шансовете (95% доверителен интервал)

a: По-често срещан (Major, главен) алел > по-рядко срещан (Minor) алел

b: Цялостно геномно асоциативно проучване, *n*=188; Реплициране на резултатите, *n*=122

c: Цялостно геномно асоциативно проучване, *n*=376; Реплициране на резултатите, *n*=328

d: По-често срещаният алел сред случаите и контролите е дефиниран като алел 1

Статистическата обработка на данните от двете генотипирания (във всички налични проби) с тест на Cochran-Mantel-Haenszel, разкри аналогична стойност на P за следните пет полиморфизма в сравнение с цялостното геномно асоциативно проучване:

rs8099939 (P_{MH}=2.12X10^{-6}) от гена *GRIK5*

rs6122972 (P_{MH}=3.11X10^{-6}) от гена *PARD6B*

rs2289700 (P_{MH}=9.14X10^{-6}) от гена *CTSH*

rs10507408 (P_{MH}=4.88X10^{-5}) – интергенен

rs3123209 (P_{MH}=7.56X10^{-5}) от гена *TCERG1L*

Освен rs2289700, за още един вариант от гена *CTSH* (cathepsin H), rs16970287 беше наблюдавана слаба асоциация със стойност на P от 2.70X10^{-5} (OR=2.14, 95%CI=1.52-3.00) след теста на Cochran-Mantel-Haenszel. С помощта на програмата Haploview (v 4.2) и въз основа на нашите генотипни данни за тези два полиморфизма установихме, че те се намират в неравновесна скаченост (r^2=0.9). Въпреки това, нито един маркер не показа стойност на P по – ниска от установената в цялостния геномен скан (Таблица 20).

Използвайки базата данни за генетична асоциация на Националните институти по здравеопазване (NIH) [256], проверихме дали някой от нашите предполагаеми гени, определени от топ 100 SNPs, не е бил вече включен в етиологията на биполарното разстройство или друго психиатрично заболяване при предишни асоциативни проучвания. Нашето търсене установи пет гена, изследвани за подобна асоциация. Това са генът за холецистокинин (*CCK*), картиран в късото рамо на хромозома 3p22-p21.3, гените за GABA-A рецепторите, alpha 1 и 6 (*GABRA1* и *GABRA6*), картирани в район 5q34-q35, генът за ацетилхолиновият рецептор, субединица alpha 9 (*CHRNA9*), локализиран в 4p14 района и генът за глутаматния рецептор 5 (*GRIK5*), картиран в 19q13.2 района. Общо 6 полиморфизма локализирани близо до или в тези гени бяха сред топ 100 вариантите след цялостното геномно асоциативно проучване. Информация относно тяхното генотипиране в българската популация е представена в таблица 21. По литературни данни, само два от гореспоментатите 6 полиморфизма са били изследвани в две предишни независими проучвания. Подробна информация относно генотипирането на rs11129950 от гена *CCK* не беше открита в статията на Cratacos и колеги (2009) [257] Вторият полиморфизъм, rs8099939 (*GRIK5*) е анализиран от Shibata

и колеги (2006) [258] за асоциация с шизофрения в японска група от случаи и контроли, но позитивни резултати не са установени.

Таблица 21: Генотипни характеристики в българска популация за 6 полиморфизма (от топ100 SNPs) локализирани в гени, които вече са били изследвани за асоциация с биполарното разстройство или подобно психично състояние според базата данни за генетична асоциация на NIH (http://geneticassociationdb.nih.gov/)

SNP ID (NCBI)	Х3	Позиция	Ген	Изследвана група	Случаи[a]		Контроли[b]		ЦГАП Pmin	Реплициране Pmin	Mantel-Haenszel Pmin
					11/12/22[c]	MAF	11/12/22[c]	MAF	OR (95%CI)	OR (95%CI)	OR (95%CI)
rs11129950	3	42357775	*CCK*	ЦГАП	159/25/2	0.08	248/109/8	0.17	8.83E-06	0.098	2.18E-05
				РП	97/25/0	0.10	235/77/8	0.15	2.78 (1.75-4.40)	1.40 (0.85-2.32)	1.99 (1.42-2.79)
rs4317369	5	161160952	*GABRA1*	ЦГАП	58/99/29	0.42	178/158/29	0.30	3.09E-05	0.629	3.99E-03
				РП	45/64/13	0.37	116/165/40	0.38	2.10 (1.45-3.04)	1.19 (0.62-2.30)	1.51 (1.14-2.00)
rs11951528	5	161150054	*GABRA1*	ЦГАП	59/99/28	0.42	182/156/27	0.29	1.99E-05	0.527	2.83E-03
				РП	45/64/13	0.37	120/163/42	0.38	2.14 (1.48-3.10)	1.24 (0.65-2.39)	1.50 (1.13-1.98)
rs10476364	5	161116904	*GABRA6*	ЦГАП	59/99/28	0.42	182/158/25	0.28	1.39E-05	0.628	1.84E-03
				РП	45/64/13	0.37	121/163/41	0.38	2.14 (1.48-3.10)	1.21 (0.63-2.32)	1.55 (1.17-2.05)
rs8099939	19	47212948	*GRIK5*	ЦГАП	55/94/37	0.45	129/184/52	0.39	1.46E-06	0.097	2.12E-06
				РП	33/59/29	0.48	96/159/66	0.45	2.53 (1.65-3.88)	1.45 (0.90-2.34)	1.95 (1.43-2.67)
rs4447895	4	40092010	*CHRNA9*	ЦГАП	170/16/0	0.04	285/75/5	0.12	5.83E-05	0.278	1.68E-04
				РП	105/16/0	0.07	270/49/5	0.09	2.98 (1.70-5.24)	1.31 (0.72-2.38)	2.13 (1.41-3.20)

ЦГАП, цялостно геномно асоциативно проучване; РП, реплициране на резултатите; CI, доверителен интервал, (confidence interval); Х3, хромозома; MAF, честота на редкия алел (minor allele frequency); OR, съотношение на шансовете (odds ratio); SNP, единична нуклеотидна замяна (single nucleotide polymorphism)

a: ЦГАП, n=188; Реплицираненa резултатите, n=122

b: ЦГАП, n=376; Реплициране на резултатите, n=328

c: По - често срещаните алели (major alleles) на SNPs при случаи и контроли са дефинирани като алел 1

Допълнителна проверка в базата данни на NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) установи, че всички тези гени са разположени близо до или в райони, показали положителна асоциация с биполарното разстройство и шизофренията при предишни проучвания чрез анализ за скаченост [259-262]. Генът *CCK*, чиито продукт, холецистокинин е повсеместно разпространен в ЦНС е широко изследван за редица невропсихиатрични състояния, като паническо разстройство, шизофрения, униполарна депресия, биполарно разстройство [263-268] въпреки че, не всички проведени изследвания съобщават позитивни резултати. Интензивното изследване на този ген е продиктувано от многобройните функции, които той изпълнява, а именно регулиране на количеството храна, процеса на обучение, безпокойство/паника и други неврологични състояния [269]. Най – близкият вариант до този ген, rs11129950 показа слаба асоциация след теста на Mantel-Haenszel със стойност на P от 2.18 x 10^{-5}, OR=2.18. За възможна асоциация на гена *GABRA1* (кодиращ ГАМК рецептора, α1) с биполарното разстройство съобщават Horiuchi и колеги през 2004 [270], изследвайки японска група от случаи/контроли и потвърждават своите резултати в друга независима извадка от европейски произход. В допълнение, една година по – късно, Petryshen и колеги [271] получават положителни данни за асоциация на GABA A генния клъстер (включващ гените *GABRA1* и *GABRA6*) с шизофрения. Shi и колеги, 2007 [272] изследват за асоциация с биполарното разстройство гена *CHRNA9*, като използват две отделни групи – 474 индивида от 152 семейства от Националния институт по психично здраве (National Institute of Mental Health, NIMH) и 83 индивида от 22 фамилии от Clinical Neurogenetics (CNG) pedigrees, но не получават позитивни резултати. Генът *GRIK5* е изследван за асоциация с шизофрения от Shibata и колеги [258] въз основа на хипотезата за нарушена функция на глутаматергичната система в етиологията на заболяването. Въпреки че в Японска популация варианти асоциирани със заболяването не са идентифицирани, генът е един от обещаващите кандидат гени с възможна роля в етиологията на биполарното разстройство, тъй като глутаматните рецептори са важни за структурната и функционалната пластичност на синапса, включително процесите на обучение и запаметяване [273]. Въпреки че след теста на Mantel-Haenszel гореспоменатите гени показаха слаба асоциация с биполарното разстройство в нашето проучване, тяхната локализация близо до, или в райони показали скаченост със заболяването в предишни проучвания ги прави добри кандидати, с възможна роля в етиологията на биполарното разстройство.

В допълнение, сравнихме резултатите от цялостното геномно асоциативно проучване със списък от полиморфизми и кандидат гени, за които в литературата съществуват положителни данни за асоциация с биполарното разстройство [231, 237-239, 274]. Тъй като няколко скорошни цялостни геномни асоциативни проучвания и мета – анализи върху биполарно разстроство [243, 275, 276] асоциират със заболяването полиморфизми и гени в 3p22-p21.3 хромозомен район, решихме да проследим генотипния статус на тези варианти в нашата популация. Както се вижда от таблица 22 нито един от тези варианти, локализирани в 3p22-p21.3 хромозомен район и застъпени в използваната от нас генотипираща платформа не показа асоциация със заболяването в нашата извадка.

Таблица 22: Резултати от цялостното геномно асоциативно проучване в българска популация за полиморфизми, асоциирани с биполарното разстройство в предишни проучвания

SNP_ID (NCBI)	Х3	Позиция	Ген	Случаи, *n*=188		Контроли, *n*=376		ЦГАП P_{min}*	Източник
				11/12/22	MAF	11/12/22	MAF	OR (95%CI)	
rs1042779	3	52796051	*ITIH1*	62/96/28	0.41	115/177/73	0.44	0.164 1.41 (0.88-2.27)	Scott et al., 2009
rs2289247	3	52702297	*GNL3*	38/93/55	0.45	87/179/99	0.48	0.372 1.22 (0.79-1.87)	Scott et al., 2009
rs11177	3	52696345	*GNL3*	31/95/60	0.42	81/182/102	0.47	0.125 1.43 (0.90-2.25)	Scott et al., 2009
rs3617	3	52808845	*ITIH3*	52/92/42	0.47	103/181/80	0.47	0.898 1.04 (0.68-1.58)	Scott et al., 2009
rs2251219	3	52559827	*PBRM1*	56/96/33	0.44	102/178/82	0.47	0.223 1.35 (0.86-2.11)	McMahon et al., 2010
rs1010554	3	52517959	*STAB1*	63/89/34	0.42	132/174/59	0.40	0.517 1.16 (0.73-1.84)	Baum et al., 2008
rs7620081	3	51475631	*VPRBP*	160/26/0	0.07	318/44/3	0.07	0.328 inf	Baum et al., 2008
rs9833750	3	51171463	*DOCK3*	159/27/0	0.07	319/43/3	0.07	0.328 inf	Baum et al., 2008
rs9869826	3	50973856	*DOCK3*	159/27/0	0.07	320/42/3	0.07	0.328 inf	Baum et al., 2008
rs6265	11	27636492	*BDNF*	2/54/130	0.156	21/123/221	0.226	0.007 5.62 (1.44-21.79)	Muller DJ et al., 2006; Okada T et al., 2006; Kremeyer B et al., 2006; Sklar P et al., 2002; Geller B et al., 2004;
rs1012053	13	41551437	*DGKH*	128/45/13	0.191	247/106/11	0.176	0.045 2.38 (1.07-5.33)	Baum et al., 2008
rs9315897	13	41636982	*DGKH*	134/44/8	0.16	227/123/15	0.21	0.023 1.57 (1.07-2.30)	Baum et al., 2008
rs420259	16	23541527	*PALB2*	104/60/22	0.28	176/159/30	0.30	0.105 1.36 (0.96-1.94)	WTCCC, 2007
rs4939921	18	45716326	*MYO5B*	157/26/3	0.086	292/68/4	0.10	0.246 1.34 (0.83-2.14)	Sklar, 2008

ЦГАП, цялостно геномно асоциативно проучване; CI, доверителен интервал,(confidence interval); Х3,хромозома; MAF, честота на редкия алел, (Minor Allele Frequency); OR,

съотношение на шансовете, (odds ratio; SNP, единична нуклеотидна замяна, (single nucleotide polymorphism); inf, безкрайност, (infinity)
* Двустранен точен тест на Фишер. Представени са минималните стойности на P

В допълнение, малко вероятно е вариантът rs11129950 (*CCK*), който ние идентифицирахме в нашето проучване да се намира в неравновесна скачесност (LD) с някой от по – рано идентифицираните полиморфизми в хромозомен район 3p22-p21.3, тъй като най – близкия до нашия маркер SNP, rs9869826 от гена *DOCK3* (експресиран изключително в ЦНС, а неговият продукт е известен като модификатор на клетъчната адхезия или пресинилин – свързващ протеин) е разположен на 8.68Mbp разстояние от нашия маркер (съгласно базите данни на NCBI и HapMap). Тенденция към асоциация беше установена за гена *DGKH* (diacylglycerol kinase, eta). Генът е картиран в дългото рамо на хромозома 13q14, в район показал скаченост с биполарното разстройство и шизофренията, а неговият продукт играе важна роля в литий – чувствителния фосфатидил инозитолов сигнален път. [277]. Най – силно асоциирания вариант от този ген, rs1012053 идентифициран през 2008 г. от Baum и колеги [239] в тяхното проучване, показа слаба асоциация в нашата извадка с минимална стойност на P от 4.50×10^{-2} след цялостното геномно асоциативно проучване, но въпреки това предразполагащият алел, установен от Baum et al е A, а в нашето проучване – G. Според базата данни на HapMap за европейска популация, rs1012053 не е в LD ($r^2 = 0.03$) с друг вариант от същия ген, rs9315897, с минимално $P=2.30 \times 10^{-2}$ (в нашата извадка), също идентифициран от Baum и колеги. Полиморфизъм rs420259, локализиран в гена *PALB2* (partner and localizer of *BRCA2* gene) идентифициран от WTCCC като асоцииран с болестта, не показа никаква асоциация в нашата извадка. Полиморфизъм rs1485171, локализиран в гена за глутаматния рецептор, подтип 7, също споменат от WTCCC в тяхното изследване не беше включен в използваната от нас генотипираща платформа. Вариантът rs4939921 в гена за миозин (*MYO5B*) асоцииран със заболяването в изследването на Sklar и колеги, през 2008 не показа никаква асоциация в изследваната от нас група. Не на последно място, асоциацията с гена *BDNF* също би трябвало да бъде спомената. Полиморфизмът rs6265 от този ген, за когото данни за асоциация със заболяването съществуват от предишни проучвания в други популации, показа слаба асоциация в нашата извадка след цялостното геномно асоциативно изследване (минимална стойност на $P = 6.92 \times 10^{-3}$). Въпреки това, rs6265 загуби значимостта си след прилагане на корекцията за множествени тествания.

5 ОБСЪЖДАНЕ

5.1. Обсъждане на резултатите от асоциативното проучване на кандидат гени

Често срещащите се социално – значими болести, към които спадат сърдечносъдовите заболявания, ракът, затлъстяването, диабетът, редица психиатрични заболявания, са резултат от комбинативното действие на множество гени и фактори на околната среда. Идентифицирането на рисковите генетични фактори, отговорни за дадено заболяване, би обогатило знанията ни относно тяхната патогенеза, би улеснило поставянето на диагнозата и би подобрило лечението им.

Анализът за скаченост и асоциативните проучвания са двата основни подхода, използвани за детекция на гени, предразполагащи към или отговорни за дадено заболяване. Докато анализът за скаченост бележи успех при картирането на гени за редица моногенни заболявания, при често срещащите се, социално – значими болести, към които се причислява и биполарното афективно разстройство, този подход не дава толкова добри резултати. Поради тази причина, при идентифицирането на гени за комплексните заболявания, предпочитана и широко използвана стратегия са асоциативните проучвания на кандидат гени, чието основно преимущество пред анализа за скаченост е възможността за детекция на гени с малък ефект. Тези проучвания са съсредоточени основно върху гени, за които се предполага, че са включени в патофизиологията на изследваното заболяване, поради функцията на генния продукт (функционални кандидат гени), или са локализирани в кандидат район, идентифициран като такъв, чрез анализа за скаченост (позиционни кандидат гени). Така, благодарение на проведените през годините асоциативни проучвания са идентифицирани двата функционални кандидат гена - *ADH-2* (алкохол дехидрогеназа) и *ALDH-2* (алдехид дехидрогеназа), като гени, предпазполагащи към алкохолизъм, с алели ADH-2*2 и ALDH-2*2, по – рядко срещани при азиатска популация. Също така, благодарение на асоциативния подход е разкрита и потвърдена връзката между ApoE4 и късната форма на болестта на Alzheimer при европейска популация, след като генът *ApoE* (аполипопретеин Е) е бил идентифициран като позиционен кандидат ген в анализ за скаченост [204]. В същото време при други заболявания асоциативния подход дава разнообразни и трудни за интерпретиране резултати, като голяма част от получените позитивни асоциации не са успешно потвърдени (реплицирани) при други популации.

Най – общо казано, успехът на едно асоциативно проучване зависи от подбора

на подходящи кандидат гени и полиморфизми в тях, използването на високо ефективна технология за генотипиране на тези полиморфизми и не на последно място, биологичен материал от добре охарактеризирани за изследваното заболяване индивиди.

Асоциативното проучване на кандидат гени и полиморфизми в тях беше проведено в първия етап от нашето проучване, за да бъдат идентифицирани генетични варианти, асоциирани с биполарното афективно разстройство в българска популация. За целта, подробно бяха проучени няколко стотин източници, съобщаващи за молекулярно генетични изследвания при заболяването. При избора на кандидат гени, вниманието ни основно беше насочено към тези от тях, за които положителна асоциация беше установена в минимум едно проучване; гени, неизследвани до момента за асоциация със заболяването в българска популация; гени, неизследвани за асоциация със заболяването, но за които съществуват данни за нарушена експресия в мозъка при пациенти с биполарно разстройство. Като краен резултат, за анализ бяха избрани общо 65 гена.

Поради своето изобилие и гъстота в човешкия геном, а също и поради биалелната си природа и ниски мутационни нива (в сравнение с микросателитните маркери), единичните нуклеотидни полиморфизми (SNPs) се превърнаха в предпочитани полиморфни маркери за анализ при идентифициране на гените отговорни за комплексните заболявания, а също и в редица фармакогенетични проучвания. По литературни данни, към 2009 г. в базата данни на NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/) са валидирани и депозирани около 10 млн. единични нуклеотидни полиморфизми, а генотипни данни за около 4 млн. различни SNPs за трите основни континентални групи могат да бъдат намерени на страницата на HapMap проекта (www.hapmap.org/index.html.en). Именно с помощта на базите данни на NCBI и HapMap и въз основа на съществуващи данни за асоциация със заболяването, за генотипиране в първият етап на нашето проучване бяха избрани общо 199 маркера, повечето от които 'представителни' SNPs (tagSNPs) във фаза II на HapMap проекта с r^2>0.8 и честота на редкия алел 0.1 (MAF≥0.1) в европейска популация (CEU population), с изключение на тези, асоциирани със заболяването в други популации.

За генотипиране на избраните полиморфизми в този първи етап от проучването бяха използвани 2 метода. 47 полиморфизма от общо 199те избрани, бяха успешно генотипирани чрез метода TaqMan с проби на Applied Biosystems, а за останалите 152

маркера беше използвана Invader технологията, комбинирана с мултиплексна полимеразна верижна реакция, с проби и праймери по собствен дизайн. Понастоящем, съществуват немалко методи за генотипиране на SNPs, позволяващи тестването на малък брой полиморфизми в сравнително голям брой проби в една реакция, при които разграничаването на алелите на даден маркер може да се постигне най – общо посредством следните механизми: алел – специфична хибридизация (allele-specific hybridization), алел – специфично нуклеотидно инкорпориране (allele-specific nucleotide incorporation; primer extension), алел – специфично олигонуклеотидно лигиране (allele-specific oligonucleotide ligation) и алел – специфично, ензим медиирано инвазивно рязане на проба (allele-specific invasive cleavage of a probe). Методът TaqMan, при който алелната дискриминация се постига посредством хибридизация предлага сравнително бърз и лесен начин за установяване на мутационния статус на ДНК в една стъпка (Вж. Материали и Методи). Тъй като при разграничаването на алелите тук не се включват ензими, ключова роля има дизайнът на пробата [246]. Всички проби, използвани за генотипиране на SNPs чрез метода TaqMan, са предоставени от компанията Applied Biosystems, която понястоящем предлага една от най-големите в света колекции на валидизирани, предварително конструирани (pre-designed), налични проби за генотипиране на SNPs, които използват универсални PCR условия и не изискват допълнителна оптимизация на протокола. Въпреки че се отличава с изключителна специфичност, чувствителност, бързина и точност, TaqMan изисква алел – специфични, флуоресцентно белязани олигонуклеотиди (проби) за всеки анализиран маркер, което увеличава цената за един анализ, изисква сравнително голямо количество геномна ДНК (при анализиране на голям брой полиморфизми) и не на последно място, позволява едновременното анализиране на един полиморфизъм в една реакция, което значително намалява производителността на метода. Поради тези причини, като алтернативен метод за останалите 152 маркера беше избрана Invader технологията, кобминирана с мултиплексна полимеразна верижна реакция, а пробите и праймерите бяха конструирани по собствен дизайн (Вж. Материали и Методи). За разлика от TaqMan, Invader не изисква синтезата на алел – специфични флуоресцентно белязани олигонуклеотиди за веки анализиран маркер. Още при конструирането си, всяка SNP специфична първична проба са удължава с една от двете flap последователности – VIC и FAM, които участват във вторичната реакция и хибридизират с универсалните FRET проби (Вж. Материали и Методи). Тези FRET проби се синтезират в големи количества

и могат да бъдат използвани във всяка Inavder реакция, независимо от анализирания полиморфизъм, което значително намалява цената за синтеза на SNP специфичните олигонуклеотиди. В допълнение, комбинирането на Invader технологията с мултиплексен PCR, позволяващ едновременното амплифициране на таргетните райони за голям брой полиморфизми (до 100 SNPs) в една реакция [251], значително намалява количеството на използваната геномна ДНК за анализ на един SNP, спестява време и увеличава производителността на метода, давайки възможност за анализиране на сравнително голям брой полиморфизми за кратко време в голям брой проби. Не на последно място, форматът в който се изпълнява Invader, т.е. използването на 384 – ямкови плаки значително редуцира обема на реакцията, намалявайки цената за генотипиране на 1 SNP [249, 251, 278].

Независимо от избрания метод за генотипиране, всички полиморфизми първоначално бяха анализирани в група от 94 случая и 184 контроли. Генотипирането се оказа успешно за 179 маркера от 65 гена, от които 17 показаха предполагаема асоциация със заболяването с P стойност по – малка от 0.05. За потвърждаване истинността на получените резултати, сигнификантните маркери бяха генотипирни в допълнителна, независима извадка от 78 случая и 372 контролни индивида. Статистическият анализ на данните само от второто генотипиране, показа възможна асоциация на заболяването с три полиморфизма, а комбинирания анализ на резултатите от двете генотипирания разкри предполагаема асоциация на биполарното разстройство с общо девет маркера. След коригиране на стойността на P посредством корекцията на Бонферони за множествени сравнения, само един полиморфизъм, rs1800883 от гена *HTR5A* остана статистически значимо асоцииран с биполарното разстройство (P=0.000097, коригирана стойност P=0.017).

Според базите данни на NCBI и HapMap (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/; www.hapmap.org/index.html.en) rs1800883 (-19G/C) е локализиран в промоторния участък на гена кодиращ серотониновия рецептор подтип 5A (*HTR5A, 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 5A*). По литературни данни към момента, полиморфизмът е изследван за асоциация с биполарното разстройство в няколко проучвания. Анализирайки 112 биполарни пациенти, 75 униполарни пациенти и 187 контролни индивида от британски произход, Birkett и колеги, 2000 [279] установяват асоциация между G алела на SNP и биполарното разстройство с P стойност 0.025 и OR (Odds Ratio) 0.56, индикиращо евентуалният протективен ефект на този алел в

изследваната популация. Година по – късно, Arias и колеги [280] анализират същия този вариант при 88 биполарни пациента и 164 контроли от испански произход, но не откриват асоциация между SNP и заболяването. Въпреки че в настоящата работа е установена статистически значима асоциация между rs1800883 и биполарното разстройство, G алелът на този SNP, определен от Birkett и колеги (2000) като протективен, се оказва рисков за нашата популация. Когато изследваният вариант е асоцииран директно със заболяването, един и същи алел на маркера би трябвало да покаже асоциация при проучвания в други популации. При положение, че изследваният полиморфизъм се намира в неравновесна скаченост с варианта причинител, то тогава може да се очаква различните алели на този маркер да покажат асоциация със заболяването при различни популации, дори когато каузалния вариант е представен. В допълнение, в нашата контролна група индивиди, честотата на G алела (0.62) е сходна с тази при германски (0.63) и испански контроли (0.62) [280, 281], докато при британски контроли тя е доста по – висока (0.71) [279]. Имайки предвид произхода на изследваните проби и факта, че полиморфизмът е изследван само в европейска популация, разлики по отношение на алелната честота между британските контроли и българските, испанските и германските контроли не би трябвало да се очакват и е много вероятно да се дължат на наличие на популационна стратификация в британската контролна извадка.

Получените от нас резултати осигуряват допълнителни доказателства за значението на гена *HTR5A* за предразположеността към биполарно афективно разстройство, но не могат да обяснят връзката между идентифицирания SNP и болестта. Добре известно е, че двете фази на заболяването (мания и депресия) се отличават с различен серотонинов профил (излишък и недостиг на серотонин, респективно), като тази трансформация е силно повлияна от фактори на околната среда. Тъй като районът около SNP е богат на CpG повтори, той би могъл да бъде добър кандидат за епигенетичнен контрол чрез метилиране, въпреки че до момента по литературни данни, функционални проучвания, касаещи тази полиморфизъм не са провеждани.

За разлика от гризачите, които притежават два функционални 5-HT_5 рецептора (5-HT_{5A} и 5-HT_{5B}), в човешкия мозък е експресиран само един от тези два подтипа рецептори - 5-HT_{5A}, поради наличието на стоп кодони в гена кодиращ 5B подтипа. [282]. Въпреки че функцията на този подтип рецептори все още не е напълно изяснена,

въз основа на тяхната локализация в мозъка се предполага, че те могат да имат отношение към двигателния контрол, храненето, безпокойството, депресията, познанието, паметта, приспособяването и мозъчното развитие [283]. В допълнение, тъй като 5-HT_{5A} рецепторите вероятно участват и в неврон медииран път за регулация на астроцитната активност, свързана с глиозата се предполага, че нарушения в този път могат да бъдат причина за развитие на някои болести на ЦНС между които, болест на Алцхаймер, синдром на Даун [284].

Човешкият *5-HT_{5A}* рецепторен ген се състои от два екзона, разделени от дълъг интронен участък. Целият кодиращ район на гена е подробно проучен при здрави индивиди за наличие на генетични варианти, като първоначално са установени 2 полиморфизма в 5' нетраслируемия участък на гена (еднинията от които rs1800883) и други два в кодиращия регион [281]. Генът е експресиран основно в мозъчната кора (по – специално слоеве II-III и V-VI на неокортекса), хипокампуса (gyrus dentatus и клетъчно пирамидалния слой на зони CA1 и CA3) и малкия мозък, което разпространение най – вероятно е индикатор за това, че продукта на този ген е включен във висши мозъчни и лимбични функции. Поради тази причина, *HTR5A* е смятан за един от добрите кандидат гени с евентуална роля в етиологията на психиатричните заболявания [279]. Той кодира протеин от 357 аминокиселини и е картиран в дългото рамо на хромозома 7q36.1, в район показал предполагаема скаченост с биполарното афективно разстройство (с ранно начало) в няколко проучвания [285, 286]. Анализирайки 70 европейски семейства с пробанд, засегнат с биполарно разстройство тип I с ранно начало, Etain и колеги, 2006 получават положителни резултати за скаченост в район 7q36 с непараметрична LOD стойност 2.43 и P=0.007 [287]. Подобни резултати получават Cassidy и колеги една година по – късно [288] изследвайки 60 семейства от ирландски произход със засегнат от биполарно разстройство тип I пробанд и брат/сестра страдащи от биполарно разстройство тип I, тип II, депресивно разстройство или шизоафективно заболяване. Получените стойности на непараметричен LOD=2.11 и P=0.018, както и резултатите от проведените през годините проучвания определят 7q36, като район скачен с болестта и подсказват за наличието на ген/и включен в етиологията на заболяването.

Изолиран първоначално в серум от Rapport и колеги през 1948 [289] и наречен *серотонин,* поради силните си съдосвиващи ефекти, а в последствие детектиран и в мозъка [290] 'хормонът на щастието' (както още е известен) има филогенетично древна

роля в нервната трансмисия [291]. Серотонинергичната система е широко застъпена в ЦНС повлиявайки почти всяка сфера от физиологията на бозайниците: от сърдечносъдовата регулация, дишането, храносмилателната система, усещането за болка и терморегулация до по – централно контролирани функции, които включват, поддържане на циркадни ритми, апетит, агресия, сензоримоторна активност, сексуално поведение, настроение, познавателни способности, учение и памет. Предположението, че нарушения в серотонергичната система са свързани с етиологията на депресивните разстройства, датира от 1955 г., когато Pletscher и колеги [292] установяват, че резерпинът (антихипертензивно лекарство, което подтиска депресията) намалява серотонина в мозъка. През 1958 г. установяването на антидепресивните свойства на имипрамина (imipramine) и ипрониазида (iproniazid), впоследствие свързано с действието им съответно като инхибитор на обратното захващане на серотонина и инхибитор на моноаминооксидазата, допълнително потвърждава ролята на серотонина в патофизиологията на депресивните разстройства. Тези открития допринасят за формулирането на т.нар. индоламинна хипотеза за депресията. Според нея склонността към депресия е свързана с ниска серотонергична активност, която може да се обясни с: 1.намалено освобождаване на серотонин; 2. по – малко серотонинови рецептори или 3. нарушена серотонин рецепторно – медиирана сигнална трансдукция [293]. През 1974 г. Prange и колеги [294] разширяват индоламинната хипотеза, като включват и биполарното афективно разстройство, изказвайки предположението, че двете фази на заболяването – манийна и депресивна се характеризират с дефицит в серотонергичната невротрансмисия. По отношение на афективните разстройства, серотониновата система привлича голям интерес поради факта, че антидепресантите, които инхибират обратното захващане на серотонина или активират неговите рецептори, са ефикасни при лечението на болестта. Някои проучвания установяват и биохимични нарушения в серотониновата система, изказвайки предположението, че повторното изпадане в депресия може да се дължи на изчерпването на аминокиселината триптофан, прекурсор на серотонина. Нещо повече, намаленото ниво на синтез на серотонин при жените в сравнение с мъжете и регулирането на рецепторната експресия посредством половите хормони може да обясни различията в разпространението на депресията сред двата пола.

С цел изясняване ролята на серотонина за манията и депресията, през годините са проведени огромен брой изследвания, а именно: проучвания върху серотониновото

захващане, върху 5 – хидроксииндол – оцетната киселина (5-hydroxyindole-acetic acid, 5-HIAA), която е основен метаболит на серотонина в цереброспиналната течност, невроендокринни тестове, които или предизвикват освобождаване на серотонин или активират серотониновите рецептори или блокират обратното захващане на серотонина, postmortem проучвания на серотонина и неговите метаболити, изследвания за гъстотата на серотониновите рецептори и сигналната трансдукция в мозъка. В последните години, широко приложение за изучаване на серотониновата система намират молекулярно генетичните изследвания и in vivo образните проучвания на невррецепторите. Серотонинът упражнява своите многобройни функции посредством голям брой рецептори. Тези рецептори, локализирани на пост – или пресинаптичната мембрана, свързват освободения серотонин и предават сигнала до постсинаптичния неврон или регулират серотониновата продукция в самия неврон посредством негативна обратна връзка. За първи път Gaddum и Picarelli [295] през 1957 година установяват съществуването на голям брой подтипове на серотониновите рецептори, които наричат 5-HT-M и 5-HT-D, по имената на техните антагонисти, съответно морфин (**M**orphine) и дибензилин (**D**ibenzyline). Години по – късно, през 1986 Bradley и колеги [296] установяват, че М рецепторите, преименувани на 5-HT_3 рецептори са единствения подтип познати йонотропни рецептори. Към днешна дата, при бозайници са идентифицирани общо 7 класа серотонинови рецептори, комбинирани в групи от 1 до 7 (HTR1-7), които обхващат (по литературни данни до момента) най - малко 20 функционално и фармакологично различни рецепторни подтипа. С изключение на HTR3, който, както вече беше споменато, е единствения йонотропен подтип (ligand gated ion channel receptor), всички останали членове на фамилията са G – протеин свързани рецептори (guanine nucleotide binding protein (G-protein) coupled receptors). Само за няколко от известните подтипове, които са широко експресирани в лимбичната система и имат висок афинитет към антипсихотици е установено, че са свързани с контрола на настроението. Проучвания върху knockout или трансгенни мишки показват, че дисрегулация на настроението е резултат от нарушената функция на някои подтипове на серотониновите рецептори. Така например е установено, че *HTR1B* knockout мишки показват повече агресивност и по – малко безпокойство и обратно, *HTR1A* knockout животни показват повече разтревоженост и вероятно по – малко агресивно поведение. Освен това, при мишки с мутации в *HTR2C* или *HTR5A* гените се наблюдава, респективно, тенденция към затлъстяване или намалена локомоторна

активност. В подкрепа на тези силни доказателства от проучвания на животни, предишни изследвания установяват увеличена експресия на *HTR2A* в тромбоцитите при суицидни пациенти и значително намалени мозъчни нива на 5 – хидроксииндол – оцетната киселина при биполарни пациенти. Нещо повече, установено е, че третирането с *HTR1A* агонисти може да повлияе невротрансмитерното освобождаване и да доведе до поведенчески промени. Въз основа на тези резултати се предполага, че серотониновите рецептори, свързани с регулацията на настроението, са изключително добри кандидати с евентуална роля в патогенезата на биполарното афективно разстройство [297].

Към днешна дата, почти всички гени кодиращи различните подтипове серотонинови рецептори са анализирани в голям брой асоциативни проучвания [142]. В настоящата научна разработка освен *HTR5A* гена, са изследвани полиморфизми в още три гена, кодиращи серотонинови рецептори подтип 2A (*HTR2A*), 3B (*HTR3B*) и 4 (*HTR4*). За разлика от 5-HT_5, който има инхибиторен ефект (намалява вътреклетъчната концентрация на цАМФ) и трите изследвани класа - 5-HT_2, 5-HT_3 и 5-HT_4 притежават екситаторен ефект, като 5-HT_2 и 5-HT_4 увеличават вътреклетъчната концентрация съответно на инозитол трифосфата (IP3) и диацилглицерола (DAG) и на цАМФ (cAMP), а механизма на действие на 5-HT_3 е свързан с деполяризация на клетъчната мембрана. 5-HT_{2A} рецепторите са експресирани в множество централни и периферни тъкани, а в ЦНС са представени основно в базалните ганглии. Активирането на рецептора води до стимулиране секрецията на кортикостерон, окситоцин, ренин и пролактин, а неговото инхибиране повлиява поведението.

От молекулярно генетична гледна точка, сред многобройните ‘серотонергични кандидат гени’, серотониновия 2A рецепторен ген, локализиран в дългото рамо на хромозома 13q14-q21, е най – широко изследвания, вероятно поради факта, че подпомага благоприятния терапефтичен ефект на инхибиторите на обратното захващане на серотонина. Към момента по литературни данни, пет *HTR2A* полиморфизма са тествани в асоциативни проучвания, но положителни резултати са получени само за два от тях - rs1058573 (-1438A/G;), локализиран в промоторния участък на гена и rs6313 (102T/C; Ser34Ser), в екзон 1. Vincent и колеги, 1999 [298] анализират rs6313 в европейска популация и установяват, че C алелът на полиморфизма е по – често срещан при случаи в сравнение с контролната група индивиди (OR 1.79). Неотдавна, положителни данни за асоциация са получени и за rs1058573, при

генотипирането му във френска извадка (OR за алел A-1438: 1.59) [299]. Асоциация между биполарното разстройство и този полиморфизъм, но с неговия G алел е установена и в корейска извадка [300]. И двата полиморфизма бяха включени в асоциативното проучване на кандидат гени и бяха изследвани за асоциация със заболяването в българската извадка. Единият, rs1058573 се оказа мономорфен за нашата популация поради което беше изключен от анализ, а rs6313 не показа статистически значима асоциация със заболяването (P_{min}=0.071).

5-HT_3 рецепторите са изградени от 5 субединици, образуващи йонен канал през който преминават натриеви, калиеви и калциеви йони. Този клас рецептори се открива в централни и периферни неврони, а също така е представен и в пресинаптичните краища, където се предполага, че подпомага или модулира освобождаването на серотонин. За пълното активиране на рецептора е необходимо едновременното действие на неговите два подтипа - 5-HT_{3A} и 5-HT_{3B} [301]. Антагонисти на 5-HT_3 (ondasetron, granisetron, tropisetron и др) са ефикасни при лечение на гадене и повръщане, предизвикани от химио- и лъчетерапия, а също така, съществуват и индикации за добър ефект при лечение на мигрена. Преклинични изследвания предполагат, че антагонисти на рецептора могат да подобрят паметта и да благоприятстват лечението на мъчително безспокойство, депресия, болка и деменция. Терапефтичния ефект на агонистите на 5-HT_3 рецептора все още не е напълно изяснен, но се предполага, че част от тях притежават анксиолитичен ефект [302]. Два полиморфизма от гена, водещи до аминокиселинна замяна - rs1176744 (A/C Tyr129Ser) в екзон 5 и rs17116138 (G/A Val 183Ile) в екзон 6 бяха подложени на анализ за асоциация с биполарното разстройство в нашата извадка, но нито един от тях не показа статистически значима стойност на P (P_{min}= 0.50 и 1.00, респективно).

Въпреки че, към момента са идентифицирани общо 7 варианта на 5-HT_4 рецепторите (5-HT_{4A-H}), различаващи се по С – терминалната последователност, всички те имат сходен фармакологичен ефект и са свързани с активирането на аденилил циклазата. Този подтип серотонинови рецептори проявяват също и конституитивна (лиганд независима) активност, която повлиява функцията на рецептора, макар и в малка степен. Именно тази активност обяснява различията между очакваните и наблюдавани ефекти на агонистите и антагонистите на рецептора. 5-HT_4 е експресиран в голям брой тъкани между които, мозък (амигдала, хипокампус, фронтална кора, стриатум, субстанция нигра), хранопровод, илеум, дебело черво, пикочен мехур и

сърце. В ЦНС, 5-HT_4 рецепторите модулират освобождаването на ацетилхолин, допамин, серотонин и ГАМК (гама – аминомалсена киселина, GABA) и подобряват синаптичната трансмисия, като по този начин най – вероятно повлияват паметта [303]. Генът *HTR4,* кодиращ този подтип рецептори е локализиран в дългото рамо на хромозома 5q32, в район показал скаченост с биполарното заболяване в две проучвания [304, 305]. Въз основа на неговата функция и локализация и с цел откриване на мутации в гена и изясняване ролята му в етиологията на психиатричните заболявания, Ohtsuki и колеги (2002) подлагат *HTR4* на директно секвениране в 48 пациенти от японски произход с биполарно заболяване и 48 пациенти със шизофрения, като установяват осем полиморфизма и четири редки варианта, само два от които, IVS3+6G/A и IVS3−63C/T депозирани в базата данни на NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/), като rs2278392 и rs1432919, респективно [306]. Установените маркери впоследствие са генотипирани в 53 пациента с биполарно разстройство, 58 индивида с депресивно заболяване, 96 пациента със шизофрения и 187 контролни индивида, а резултатите са потвърдени в семейства с биполарно заболяване (NIMH Initiative Genetics Bipolar Pedigrees) и шизофрения (RIKEN Japanese Schizophrenia Families) чрез TDT тест. Поради установената силна неравновесна скаченост между тях, само единият от гореспоменатите два полиморфизма, rs2278392 беше подложен на анализ за установяване на асоциация с биполарното афективно разстройство в българската извадка, но статистически значима разлика в разпределението на алелните и генотипни честоти между случаи и контроли не беше установена (P_{min}= 0.30).

Въпреки че след прилагане на стриктната корекция на Бонферони, само вариант rs1800883 от гена *HTR5A* остана статистически значимо асоцииран със заболяването, вероятната асоциация на още няколко полиморфизма не може да бъде изцяло изключена и те би трябвало да бъдат споменати.

Мозъчният невроторфен фактор, BDNF (Brain-derived Neurotrophic Factor), който принадлежи към суперфамилията на невротрофните растежни фактори е смятан за изключително добър кандидат за патогенезата на афективните заболявания въз основа на своята функция. Невротрофините се синтезират в невроните в неактивна форма, като тяхната синтеза и секреция зависят от невроналната активност. BDNF има изключително важна роля за растежа, развитието и оцеляването на невроналните популации, а в напълно развитата нервна система, протеинът е включен в активност – зависимата невронална пластичност. Това са процеси, широко застъпени в хипотезата

за синаптичната пластичност при афективните заболявания, която разглежда функционалните и структурни промени на синаптично ниво, индуцирани от стрес и антидепресанти.

Генът кодиращ мозъчния невротрофен фактор при човека е локализиран в късото рамо на хромозома 11p13, в район показал скаченост със заболяването в няколко проучвания [307], което прави *BDNF* не само функционален, но и добър позиционен кандидат локус за афективните заболявания. Поради силната еволюционна консервативност на кодиращата последователност на гена при различните видове, в човешкия *BDNF* ген е идентифициран само един чест неконсервативен полиморфизъм. Това е единична нуклеотидна замяна на 196то място (196G-A) в 5' края на гена, която води до замяна на аминокиселината валин (Val) с метионин (Met) в кодон 66 (Val66Met). Данни за асоциация на rs6265 с биполарното разстройство са получени от две независими фамилно – базирани проучвания. Neves-Pereira и колеги (2002) изследват 283 триоса, повечето от които от европейски произход и установяват значителна асоциация за G алела (Val66) на SNP със заболяването (P = .00064), а проведеният впоследствие хаплотипен анализ установява значително предаване от родители на биполарни пробанди на хаплотипа включващ този SNP (P = .000394) [205]. Подобни резултати през същата година получават и Sklar и колеги, анализирайки 76 кандидат гена (между които и *BDNF* с rs6265) в извадка от 470 триоса [204]. Тези първоначални резултати са потвърдени в три последващи фамилно – базирани проучвания върху биполарно разстройство с ранно начало [206, 308, 309]. Положителни данни за асоциация на rs6265 с биполарното разстройство са получени и при две асоциативни проучвания. При едното проучване, Green и колеги (2006) установяват статистически значима асоциация между Val алела на rs6265 и биполарното разстройство тип I (P=0.028), генотипирайки 621 случая и 998 контролни индивида от европейски произход [310]. Lohoff и колеги (2005) наблюдават същата тази асоциация (P=0.004), но в група пациенти (*n*=131) с бърза смяна на афективните епизоди (rapid cycling bipolar disorder) [311].

Разлика в разпределението на алелните и генотипни честоти между случаи и контроли за вариант rs6265 беше установена и в българската извадка. Рисковият за нашата популация алел C, беше наблюдаван по – често при случаи в сравнение с контролната група индивиди (P=0.0033). Заедно с rs6265, още два полиморфизма от гена - rs2049045 и rs4923463 бяха включени в асоциативното проучване на кандидат

гени, но нито един от двата варианта не запази статистическата си значимост след обработката на резултатите от двете генотипирания.

Тенденция към асоциация, след генотипирането му в 172 случая и 556 контроли, показа и вариант rs17666 от гена *DPYSL2* (*DRP-2*)с минимална стойност на P 0.0045. Генът е член на фамилията дихидропиримидиназа – свързани протеини, за които се смята, че участват в аксоналния растеж и осъществяването на нови невронални връзки. Тъй като продуктът на гена медиира вътреклетъчния отговор към колапсин (инхибиторен протеин на аксоналния растеж), се предполага, че нарушения във функцията му могат да доведат до аномалии в аксоналния растеж по време на развитието на нервната система. Това от своя страна предполага, ролята му в развитието на някои невропсихиатрични състояния, между които и биполарното разстройство. В подкрепа на това твърдение, съществуват и някои експериментални данни. В свое проучване. Johnston-Wilson и колеги (2000) [312] наблюдават значително намалена експресия на DRP-2 в мозъка при пациенти с биполарно разстройство и шизофрения. Генът е локализиран в късото рамо на хромозома 8p22-p21, в район показал скаченост с шизофрения в няколко проучвания чрез анализ за скаченост и няколко мета – анализа [313-318]. Въз основа на своята функция и локализация, *DPYSL2* е добър кандидат ген, включен в редица асоциативни проучвания първоначално при шизофрения, а впоследствие и при биполарно разстройство. Nakata и колеги (2003a) [319] анализират връзката между 5 полиморфизма в гена и шизофрения в японска извадка от случаи и контроли, като установяват значителна асоциация за един полиморфизъм (rs17666, разположен в 3’ нетранслируемия участък на гена), изразяваща се в протективния ефект на неговия C алел. Въз основа на получените резултати и на данни от предишни проучвания, според които, шизофренията и биполарното разстройство поделят, поне частично, общи локуси за предразположеност, Nakata и колеги анализират асоциацията между същите тези полиморфизми и биполарното разстройство отново в японска извадка от случаи и контроли, но данни за положителна асоциация не са установени [320]. Няколко години по – късно, Hong и колеги (2005) [321] сравняват честотата на rs17666 при пациенти с шизофрения (с негативни и позитивни симптоми) и здрави индивиди от Европейски и Афро – Американски произход. И при двете изследвани групи е установена значително по – висока честота на C алела на SNP при пациенти в сравнение с контролната група индивиди, но статистически значима стойност на P е достигната само в европейска

популация (честота на С алел: Европейци: 42% при случаи срещу 25% при контроли, P=0.014; Афро – Американци: 52.6% при случаи и 50.0% при контроли, P=0.93). В допълнение, в европейската извадка честотата на алела е била значително по – висока както при пациенти с негативни симптоми (алелна честота: 53.3%, P=0.009), така и при пациенти с позитивни симптоми (39.2%, P=0.050) в сравнение с контролните индивиди (алелна честота 25%). Въз основа на получените резултати, авторите заключават, че С алела на този вариант може да е маркер (да е в неравновесна скачесност) за друг полиморфизъм в гена или в близкостоящ ген, който да оказва влияние върху предразположеността към шизофрения. Положителни данни за асоциация на гена *DPYSL2* както с шизофренията, така и с биполарното заболяване получават и Fallin и колеги (2005), анализирайки 440 единични нуклеотидни полиморфизма от 64 кандидат гена, използвайки триоси от еврейски произход (Ашкенази евреи) [322].

Общо четири полиморфизма от гена бяха включени в проведеното от нас асоциативно проучване на кандидат гени и бяха анализирани в първия етап на изследването в 94 случая и 184 контроли. Два от четирите полиморфизма, rs11863 и rs17666 показаха стойност на P по – ниска от 0.05 (P_{min}=0.0028 и 0.0019, респективно) и бяха генотипирани във втория етап на проучването в нова извадка от случаи и контроли. След комбинирането на резултатите от първия и втория скрининг, само rs17666 показа асоциация със заболяването, като рисковият за нашата популация алел Т беше установен в 70.3% от случаите срещу 62% при контролните индивиди (P=0.0045).

Слаба асоциация беше наблюдавана и за вариант rs5443, от гена *GNB3* (guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3) локализиран в 12p13 хромозомен район. Данни от все повече клинични и фармакологични проучвания, както и от изследвания върху животни показват, че нарушения в молекулярните механизми на сигналната трансдукция могат да бъдат включени в патофизиологията на биполарното заболяване и депресивното разстройство. Добре известно е, че G – протеините са основни регулаторни компоненти при свързването на мембранните рецептори с вътреклетъчни сигнални трансдуктори (аденилилциклаза), което води до увеличаване на вътреклетъчната концентрация на Ca^{2+} (като ранно събитие в сигналната каскада), а също и до активирането на няколко протеин кинази и регулация на транскрипционни фактори. G – протеините, които свързват около 80% от познатите мембранни рецептори с редица вътреклетъчни посредници са изградени от три субединици и при активирането на рецептора се дисоциират на Gα субединица и Gβγ

димер. Освободената фосфорилирана α субединица, впоследствие активира следващите участници в каскадата, но днес се предполага, че β и γ субединиците също подпомагат взаимодействието на G – протеините с рецепторите и вътреклетъчните посредници.

По – голяма част от проучванията върху биполарно разстройство, проведени до момента, засягат α субединицата на G – протеините, поради което завишени нива на стимулираната Gα субединица ($G\alpha_s$) са установени в периферна кръв (тромбоцити и левкоцити), както и посмъртно в мозъчна тъкан на пациенти с биполарно разстройство. Един от най – често наблюдаваните резултати при изследване на биполарни пациенти и потвърждение за завишената функция на G – протеина е увеличената концентрация на Ca^{2+} в периферна кръв при пациенти в остра фаза на мания, която достига нормални равнища след успешно лечение.

Понастоящем, не съществуват доказателства, че нарушените нива и функция на $G\alpha_s$ са резултат от мутации в гена кодиращ тази субединица (*GNAS*). Тъй като голям брой транскрипционни и посттранскрипционни механизми регулират нивата на Gα субединиците, то завишените нива на $G\alpha_s$ могат да бъдат резултат от нарушения в някои от тези биохимични пътища или най- вероятно мутации в гените кодиращи β и γ субединиците на G – протеина са отговорни за наблюдаваните промени. В тази връзка, Siffert и колеги (1998) [323] изследвайки друго често срещано, мултифакторно заболяване – хипертонията, идентифицират единична нуклеотидна замяна (C825T), rs5443 в екзон 10 на гена кодиращ β3 субединицата на хетеротримерните G – протеини (*GNB3*) и установяват, че T алелът на SNP е асоцииран с появата на сплайс вариант (Gβ3s), което води до делецията на 41 аминокиселини. Впоследствие, няколко проучвания асоциират този сплайс вариант както с хипертонията и затлъстяването, така и с усилената сигнална трансдукция и йонен транспорт [324-327]. Въз основа на твърдението, че при депресивни пациенти са наблюдавани нарушени равнища и активност на Gα субединиците, както и асоциацията на rs5443 с усилената сигнална трансдукция и йонен транспорт, Zill и колеги (2000) анализират връзката между rs5443, афективните заболявания и отговорът към антидепресанти при 88 депресивни пациенти (10 с биполарно разстройство и 78 с униполарно заболяване), 68 пациента с шизофрения и 111 контролни индивида. Резултатите от проведеното изследване недвусмислено показват значително по – висока честота за T алела на SNP при депресивни пациенти в сравнение с контролната група индивиди (P = 0.008; alleles: P = 0.004, OR = 1.87, 95% CI 1.23-2.84) и в сравнение с шизофренните пациенти (P = 0.018;

alleles: P = 0.009, OR = 1.94, 95% CI 1.99-3.14). Също така е установена статистически значима асоциация между отговорът след четириседмично лечение с антидепресанти и генотип TT (p = 0.01) [328]. Подобни резултати получават и Serretti и колеги (2003) [329]. Анализирайки голяма група от биполарни и униполарни италиански пациенти те установяват, че rs5443 повлиява активността на селективните инхибитори на обратното всмукване на серотонина (SSRI), като хомозиготите по T алела на SNP отговарят по – добре на лечението с SSRI (P=0.009). Въз основа на предположението, че мозъчно-съдова болест би могла да бъде важен фактор, допринасящ за развитието на депресия, Bondy колеги (2002) предприемат комбиниран анализ на варианти от гена за ангиотензин – I конвертиращия ензим (*ACE*) и rs5443 от *GNB3*. (двата гена са били нееднократно асоциирани със сърдечносъдовото заболяване и афективните разстройства) в група от 201 депресивни пациенти и 161 контролни индивида. Установена е значително по – висока честота на T алела на rs5443 сред пациентите в сравнение с контролната група индивиди (P=0.0035, OR=1.61, 95% CI 1.17–2.2). В допълнение, резултатите от комбинирания анализ на двата гена установяват, че за индивиди с генотип TT (rs5443) и присъствие на D алела на *ACE* гена (ID и DD) рискът за развитие на униполарна депресия е пет пъти по – висок (P = 0.0002, OR = 5.83, 95% CI 1.99–17.08) [330].

Въз основа на положителните резултати получени от предходни изследвания, генът *GNB3* беше определен като подходящ кандидат с възможна роля в етиологията на биполарното разстройство и беше включен в асоциативното проучване на кандидат гени. Избраният полиморфизъм, rs5443 беше генотипиран успешно първоначално в група от 94 случая и 184 контролни индивида чрез метода TaqMan. Въпреки че след статистическата обработка на данните от първия скрининг полиморфизмът показа гранична стойост на P=0.048 (при зададено ниво на значимост P=0.05), той беше проследен във втори скрининг в допълнителна, независима извадка от 78 случая и 372 контроли. Рисковият алел T беше наблюдаван по – често в групата на случаите (39.7%) в сравнение с контролната група индивиди (29.7%) със стойност на P (съгласно модела на алелните честоти) от 0.017. Полиморфизмът запази статистически значима асоциация при същия рисков алел (T) и след комбиниране на данните от двата скрининга (172 случая и 556 контроли), като рисковият генотип (TT) беше установен при 18% от случаите в сравнение с 8% при контролните индивиди (P=0.00051). Въпреки установената асоциация, след прилагане на корекцията на Бонферони за

множествени тествания, rs5443 загуби статистическата си значимост.

В заключение, получените от нас резултати след асоциативното проучване на кандидат гени дават основание да се предположи, че генът *HTR5A* има важна, но най – вероятно не самостоятелна роля в етиологията на биполарното разстройство в българската популация. Въпреки че, асоциацията на гени като *BDNF, HTR3B, 5HTR2A, HTR4, TPH2* не беше потвърдена, известна тенденция бе наблюдавана за някои от тях, поради което тяхната евентуална роля в патогенезата на болестта не може да бъде отхвърлена напълно. Най – вероятно, малкият размер на използваната извадка или наличието на фалшиво позитивни резултати в предходни проучвания са причина за липсата на асоциация при тях. Поради тази причина, допълнителни проучвания, използващи по – голям брой проби както в нашата, така и в други популации заслужават внимание.

Резултатите от проведеното изследване биха могли да бъдат от полза при планиране на бъдещи анализи на кандидат гени, а също така биха били добър източник на информация при провеждане на мета-анализи върху отделни кандидат гени и варианти в тях.

5.2 Обсъждане на резултатите от цялостното геномно асоциативно проучване

С цел идентифициране на нови гени с евентуална роля в етиологията на биполарното разстройство в българска популация, втория етап на настоящата научна разработка е посветен на цялостното геномно асоциативно проучване.

Проведените от 2005 г. до момента цялостни геномни асоциативни проучвания дават убедителни доказателства за това, че отделни, често срещани ДНК варианти (SNPs) в човешкия геном влияят върху генетичната предразположеност на хората към повече от 40 различни често срещани заболявания. Голяма част от тези находки включват по-рано неподозирани кандидат гени и нови патофизиологични хипотези. Широкомащабните асоциативни проучвания (както още са известни) днес са възможни и изключително популярни благодарение на каталогизирането на милиони ДНК варианти в човешкия геном, проведено от международния HapMap проект и последвалото бързо развитие на нови високоефективни генотипиращи технологии, даващи възможност за изключително бързо и точно анализиране на повече от 1 млн. полиморфизми в голям брой проби. Въпреки възможностите, които имат цената на тези технологии остава висока. Поради тази причина, с цел намаляване на разходите и

същевременно запазване на статистическата мощност на проучването много често при провеждане на цялостен геномен скан се предприема двуетапен подход. При този подход всички налични проби (случаи и контроли) се разделят на ‘тестова’ група (test sample) която се използва за геномното сканиране и ‘репликативна’ група (replication sample), в която биват генотипирани определен брой полиморфизми, показали възможна асоциация с изследваното заболяване с цел потвърждаване на находката. Този подход беше предприет и в нашето проучване, като с помощта на HumanHap550K генотипиращият чип на Illumina в съчетание с технологията Infinium II, общо 554 496 представителни единични нуклеотидни полиморфизма бяха успешно анализирани в група от 188 случая с биполарно разстройство и 376 контролни индивида. След прилагане на определени критерии за контрол на качеството, общо 497 732 полиморфизма бяха подбрани за по – нататъшен анализ. За валидизиране на резултатите от цялостното геномно сканиране, първите 100 полиморфизма, показали най – значима асоциация със заболяването бяха генотипирани чрез Inavder метод, комбиниран с мултиплексна полимеразна верижна реакция в същата извадка от случаи и контроли. Във втория етап на цялостното геномно асоциативно проучване, с цел потвърждаане на резултатите, стоте маркера бяха анализирани в допълнителна серия от 122 случая и 328 контроли. И при двете генотипирания, като генотипираща платформа отново беще използван методът Invader, комбиниран с мултиплексна полимеразна верижна реакция, с проби и праймери по собствен дизайн.

Въпреки че, проведеното от нас цялостно геномно асоциативно проучване не разкри убедителен кандидат ген и нито един от топ100 полиморфизмите не достигна коригираното ниво на значимост след прилагане корекцията на Бонферони ($P < 0.00060$), има няколко варианта, чиято възможна роля в етиологията на заболяването не може да бъде напълно изключена и те заслужават внимание.

Както вече беше споменато, генът кодиращ глутаматния рецептор, подтип 5 (*GRIK5*) първоначално е изследван за асоциация с шизофрения, но генетични варианти асоциирани със заболяването не са установени за японска популация. Генът е картиран в дългото рамо на хромозома 19, включва 19 екзона и има дължина 67.48 kb. Широко експресиран е в имунната, нервната, репродуктивната и дихателната системи. Генът кодира протеин, който принадлежи към фамилията на глутамат – зависимите йонни канали. Глутаматът действа като основен екситаторен невротрансмитер в централна нервна система посредством активирането на лиганд – зависими йонни канали и G –

протеин свързани мембранни рецептори. Заедно със субединици, кодирани от други гени във фамилията, продуктът на този ген формира функционални хетеромерни каинат – свързващи йонни канали. В допълнение, *GRIK5* е един от 306те кандидат гена, анализирани от Gratacos и колеги (2009) в техния опит да идентифицират нови гени за няколко психиатрични заболявания, сред които и биполарното разстройство в Европейска популация [257]. Силна асоциация с биполарно разстройство е наблюдавана за друг полиморфизъм, rs10414815, локализиран приблизително на 66kbp от нашия маркер (база данни на HapMap). Този вариант не беше включен в нашата генотипираща платформа и не е в LD (r^2=0.09) с rs8099939, според базата данни на HapMap.

Вторият вариант, rs6122972, показал тенденция към асоциация със заболяването в нашата извадка със стойност на P от $3.11X10^{-6}$ и съотношение на шансовете, OR=2.02, след теста на Mantel-Haenszel е локализиран близо до гена *PARD6B* (par-6 partitioning defective 6 homolog beta), който е картиран в дългото рамо на хромозома 20, в регион показал скаченост с шизофрения в предходни проучвания [331]. Генът съдържа 3 екзона, има дължина 22.20 kb, а неговият продукт участва в процесите на асиметрично клетъчно делене и клетъчна поляризация и има предполагаема роля в аксоногенезата и регулацията на клетъчната миграция [332, 333].

Интронен вариант rs2289700 в гена за катепсин (*CTSH*) също показа тенденция за асоциация със заболяването след комбинирането на резултатите от цялостния геномен скан и репликативното проучване с P стойност от $9.14X10^{-6}$ и съотношение на шансовете, OR=2.13, след теста на Mantel-Haenszel. Генът е картиран върху дългото рамо на хромозома 15 в район показал предполагаема скаченост, както с биполарното заболяване така и с други психиатрични заболявания [334], съдържа 14 екзона и има дължина 23.33 kb. Протеинът кодиран от този ген е лизозомна цистеин протеиназа, която участва в разграждането на лизозомните протеини. Увеличена експресия на гена се свързва с малигнената прогресия на простатни тумори. До момента, по литературни данни генът не е изследван за асоциация с биполарното заболяване.

Полиморфизмът rs6265 ($P=6.92X10^{-3}$) от гена *BDNF* (мозъчен невротрофен фактор) също би трябвало да бъде коментиран, въпреки че наблюдаваната след цялостния геномен скан асоциация не запази значимост след прилагане на корекцията на Бонферони. Генът е картиран върху късото рамо на хромозома 11p13, в район

показал предполагаема скаченост с биполарното заболяване в предходни проучвания [112, 335]. Тъй като и генът и полиморфизмът бяха обстойно разгледани и дискутирани в т 5.1 (Обсъждане на резултатите от асоциативното проучване на кандидат гени), тук ще бъдат дискутирани изключително резултатите от цялостния геномен скан. Полиморфизмът rs6265 (G/A, Val66Met) е бил обект на множество асоциативни проучвания през годините, като по – голяма част от тях установяват асоциация с биполарното заболяване за Val алела на SNP (същата асоциация беше установена и при асоциативното проучване на кандидат гени, проведено в първия етап на нашето изследване). Въпреки че, след цялостния геномен скан, Val алела на полиморфизма беше наблюдаван отново по – често в групата на случаите в сравнение с групата на контролните индивиди със стойност на P от 0.007, rs6265 загуби статистическата си значимост след прилагане на корекцията за множествени тествания. Въпреки този резултат, имайки предвид функцията и локализацията на гена *BDNF*, както и големия брой проучвания проведени през годините, по – голяма част от които съобщават позитивни данни за асоциация със заболяването, генът за мозъчния невротрофен фактор остава добър кандидат ген с възможна роля в етиологията на биполарното разстройство.

В резултат на проведените до момента цялостни геномни асоциативни проучвания и последващи мета – анализи на редица често срещани заболявания, днес са идентифицирани и потвърдени голям брой чести полиморфизми, имащи отношение към етиологията на тези състояния, като едновременно с това става ясно, че всеки един от идентифицираните варианти има малък принос за повишаване риска от дадено заболяване (средно OR=1.36) [336]. Тези изследвания също така ясно показват, че групи съдържащи няколко хиляди пациента трябва да бъдат анализирани с цел идентифициране на полиморфизми с малък ефект (какъвто най – вероятно е случая и с психиатричните заболявания). В този контекст, основен недостатък на проведеното от нас цялостно геномно сканиране е малкия размер на използваната извадка (188 случая и 376 контроли), което налага проследяването на получените от нас резултати в други проучвания.

Проведените до момента асоциативни проучвания на кандидат гени и цялостни геномни сканове върху биполарно разстройство идентифицират голям брой гени и полиморфизми в тях като асоциирани със заболяването. Въпреки че нашето цялостно геномно асоциативно проучване не установи силен кандидат ген и не успяхме

убедително да потвърдим ролята в етиологията на заболяването за Българска популация на полиморфизми, асоциирани с биполарното разстройство в предишни цялостни геномни проучвания, слаба асоциация беше наблюдавана за гена *DGKH*. Трудно е да бъдат направени финални заключения за други известни кандидат гени, като *PALB2, GRM7* и *MYO5B*, тъй като анализираните от тях полиморфизми не показаха асоциация с биполарното заболяване в нашата извадка, което не ги отхвърля като възможни кандидати.

6. ИЗВОДИ

1. Установено е, че 65 гена от известните голям брой кандидат гени, включени в базата данни на NCBI и HapMap проекта са подходящи за асоциативно проучване на биполарната психоза в пациенти от българска популация чрез методите TaqMan и Invader.

2. В първия етап на изследването успешно са определени алелните и генотипни честоти на 179 полиморфизма от 65 гена и е доказано, че 17 от тях са асоциирани със заболяването ($P < 0.05$). Три от тях останаха позитивни при репликативното генотипиране.

3. Установена е статистически значима асоциация на девет SNPs с биполарното разстройство при комбинирания анализ на резултатите от двата етапа на асоциативното проучване (172 случая и 556 контроли).

4. Вариантът rs1800883 в гена за серотониновия рецептор (*HTR5A*) показа най – силна статистически значима асоциация ($P =0.000097$) и остана асоцииран със заболяването и след прилагане на корекцията на Бонферони за множествени тествания ($P = 0.017$).

5. В резултат на финното картиране в рамките на LD-региона на rs1800883 (*HTR5A*) бяха определени алелните и генотипните честоти на 12 представителни полиморфизма (tSNPs) и беше установена статистически значима асоциация между 2 от тях и биполарното разстройство. Нито един от тези варианти не достигна значимостта на rs1800883.

6. Доказано е с хаплотипен анализ, че трите най – значими маркера в района на *HTR5A* гена са положително асоциирани със заболяването ($P=0.00045$), но асоциацията не е по – силна от тази на индивидуалния маркер rs1800883.

7. След първия етап на цялостния геномен скан най – значима асоциация с биполарното разстройство с P стойност от $9.86X10^{-8}$ е установена за rs1971058 (*LOC728103*/*LOC100130514*) от общо успешно генотипирани 594 496 SNPs с 550K чип на Illumina. Тази асоциация не е запазена при потвърждаването на резултатите в допълнителни проби

8. Повторното генотипиране на топ 100 SNPs, в отделна извадка от случаи/контроли не потвърждава силната асоциация на нито един от тези варианти с

биполарното разстройство.

9. При комбинираният анализ на резултатите от двете извадки, десет маркера (rs8099939, rs6122972, rs2289700, rs11129950, rs16970287, rs8109263, rs10507408, rs3123209, rs10491291, rs10875032) показаха тенденция за асоциация със заболяването ($P < 10 \times 10^{-5}$).

7. ПРИНОСИ

1. За първи път сред група от български пациенти с биполарно афективно разстройство и незасегнати контроли е проведено асоциативно проучване върху голям брой полиморфизми от кандидат гени, при които е установена асоциация със заболяването в други популации.

2. Получени са допълнителни доказателства за значението на варианти в серотониновите гени за развитието на биполарното разстройство, подкрепящи серотониновата хипотеза за етиологията на болестта.

3. Данните от проведеното асоциативно проучване на кандидат гени послужиха за провеждането на мета-анализ върху варианти в гена *MTHFR*.

4. Разширена е ДНК банката на Катедрата по медицинска генетика, Медицински университет София, с 90 проби от пациенти с биполарно заболяване, както и със съпътстваща клинична информация.

5. За първи път в българска популация е проведено цялостно геномно асоциативно проучване върху биполарното разстройство в резултат, на което е създадена база данни с алелните и генотипните честоти на повече от 500,000 SNPs на индивиди с български произход.

6. Получени са допълнителни данни в подкрепа на асоциацията с биполарно разстройство в българска популация за гени, асоциирани със заболяването в предходни проучвания.

7. Идентифицирани са и нови хромозомни региони и гени, които могат да съдържат варианти с възможна роля в етиологията на заболяването.

8. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Таблица 7: Използвани праймери при провеждане на мултиплексен PCR при асоциативно проучване на кандидат гени

db SNP	Нуклеотидна последователност	Дължина (bp)	Тт (ºC)	Дължина на ампликона
rs1126442F	ATGCTGCCACTGTATACCG	19	61.15	500
rs1126442R	CTAGTCCTGAGAGCTGCTCC	20	60.87	
rs11146020F	CCAGAGGGATGGGTAAGG	18	61.89	437
rs11146020R	AAGAGTCGTCACCCACAG	18	58.70	
rs131702F	CAAGATGGTACTGCTCATTCAC	22	61.12	329
rs131702R	TCCCATGGTTCAGAATCAG	19	61.08	
rs140504F	CTCTTGGGCTCTTGACAG	18	58.55	358
rs140504R	CCTAGTTGTGCCCAGATG	18	59.18	
rs872123F	CAGTAATCTGGATGGAGTGG	20	59.51	476
rs872123R	CCACTTCCTCCTTTGACC	18	59.60	
rs11542313F	TAATGAAGAGCTCTGGCAAAG	21	61.05	564
rs11542313R	TTTCTACGCGACCTTTGG	18	61.37	
rs9799720F	TAAGAAGCCCTGTGGAAAG	19	59.39	420
rs9799720R	GGAACAATGCTAATAACCAGG	21	59.84	
rs11736084F	GGAAACTGAGGTGCAGAG	18	58.38	371
rs11736084R	TGTCACTCTGCACAGCAC	18	59.70	
rs1282F	TCAGCCTCTGCACTTCATC	19	61.80	367
rs1282R	CTACCTACATCTGGTCTTAGCCAC	24	61.76	
rs17844778F	GTGGCTTGGCTACAGCAG	18	62.26	410
rs17844778R	GTGTCTGCACCAATGAACC	19	61.67	
rs9685931F	GCTGTCACTGTGGCTGAG	18	60.85	470
rs9685931R	CTTAGCTCAAAGTCAAGCCAC	21	60.58	
rs3216733F	GGTCAATCTGTCTGTGCTG	19	59.36	354
rs3216733R	GACTTGTGCGGTTACCAG	18	59.23	

rs16927997F	CCTGAGTAAAGATGTGGATTAAC	23	58.16	363
rs16927997R	CATGTGCATCTGGTGTAGG	19	60.14	
rs1140763F	CCCTAGAGAATTAACCTTTCAGC	23	60.93	381
rs1140763R	GTATGATCAATAAAGGACAGGC	22	58.95	
rs391957F	GGTAGATAACATCCGCCC	18	59.30	361
rs391957R	GACCTGTGAGCAACGAAC	18	59.34	
rs17840761F	TGATTCATTGGCTGCTATTC	20	60.19	335
rs17840761R	CATCTAAGCTGCGACTGG	18	59.67	
rs12009F	TGCAGAATTATAATTGGTAAACAAC	25	59.72	359
rs12009R	TGAAAGGTTAATTCTCTAGGGC	22	60.10	
rs11568190F	CCACAGGCTTCTCACCTC	18	61.04	518
rs11568190R	ACGAGGGAGCTTTGGTC	17	60.37	
rs11568171F	ATCAGCACAGAGAAGACCC	19	59.35	444
rs11568171R	AGTGTAGAATCTCACCCTGAAC	22	58.70	
rs2076127F	CTCAGAAGTCGTGTTGGAG	19	58.46	439
rs2076127R	GTTTAAGGATTACCCGCC	18	58.40	
rs909685F	GGCTCTGAATTCATTTATCTGTG	23	61.36	382
rs909685R	ATTCCACAGCAGGGAGAC	18	60.22	
rs715505F	TGTTCATTCCACAAGTCCC	19	60.97	468
rs715505R	GCTGACCCTGTCCTAGACC	19	61.28	
rs7301328F	CCTATCCACGCTGTCAATG	19	61.72	448
rs7301328R	ATTGCTGTCATCCTCGTG	18	59.77	
rs2438146F	GGTAATCACCAAAGTAACATGC	22	59.77	571
rs2438146R	ACTACCACGGAAGCCAAG	18	60.27	
rs10008257F	CCTAAATTCCTATAGCAATCAAAC	24	58.67	606
rs10008257R	TATTCCATCAGTGCCACC	18	59.41	
rs2279574F	GGAAGCGAGTGGATTCTG	18	60.96	480
rs2279574R	GCTATACGAGTCGTCGCAC	19	61.03	
rs1801131F	TCTTTGCCTCCCTAAGCC	18	61.85	450
rs1801131R	AGAATTTACAGGAATGGCCTC	21	60.84	
rs17116138F	AGGCAAGCTCCATCATTC	18	60.34	485

rs17116138R	ATGCAATAGAGCAGAAATTCC	21	59.70	
rs760761F	ATGGCACATTAGTAAGCACAG	21	59.25	833
rs760761R	AAATTGATTCTGGATTTGAGTC	22	58.53	
rs9325202F	TCCAATAACTTCTCTTCTTGCAG	23	61.26	445
rs9325202R	GCAAAGCTGTTGGAAAGG	18	60.96	
rs1386494F	GTTTCTCGCAGGTTGTTG	18	59.37	390
rs1386494R	AATTGAATGTGCCTGCTG	18	59.79	
rs4290270F	ACATTCAACCTAGGGAGAGAATAC	24	60.26	415
rs4290270R	AGGTGCCAAATCCTCTATG	19	59.07	
rs7305115F	CCTCAAGTCTTGCTGGG	17	59.44	412
rs7305115R	AAGCTAGAGCATCGAGCC	18	59.81	
rs2285595F	CGCCTAGAGGACCAAACTAAG	21	61.66	366
rs2285595R	TTCCTCTGCAGTACAATGAGC	21	61.95	
rs278109F	CAGATACCAGTCATAGCCACAG	22	61.13	438
rs278109R	CTGACCCGACCAAAGTAATC	20	60.92	
rs2074052F	AACTTCCTTCCATAGGGTCTAAC	23	60.25	448
rs2074052R	GAACTGTCTGAAGCCAATAAAC	22	59.26	
rs203368F	GAAATGAACAAGGAATTGAATC	22	58.90	370
rs203368R	GGTGGGAGAGAGTGAAATG	19	59.61	
rs435136F	TTCCAAACTCTCAGTCATGAAC	22	60.70	528
rs435136R	GAGCCCTGAGGAATTTCAC	19	61.19	
rs4766951F	CAACATAACTGAATTGTGGCTC	22	60.95	301
rs4766951R	CTGCCCATCAGAATGAGG	18	61.87	
rs1801260F	TGGCATCACTGTAAGCAAAC	20	61.30	439
rs1801260R	GTTCAACCACAGTAGCACAC	20	58.13	
rs3847953F	AGGTCCTTACCAACATGGG	19	61.20	337
rs3847953R	GGACTACAGGTGTGACGC	18	59.20	
rs933305F	CCCAGGCTGATCTCAAAC	18	60.81	397
rs933305R	AGCCATGCTCATTCACTTAC	20	59.29	
rs1012053F	CCAGGCTGGTCTTGAACTAC	20	61.27	371
rs1012053R	AAATGAGACAACGGAGGC	18	60.22	

rs1170191F	CGCATATGTTGATGTTATTTCC	22	60.60	413
rs1170191R	TTCAAGCCACCCATGAC	17	60.68	
rs1170195F	ATCTAACAATTGATCAACTCTGATG	25	59.92	498
rs1170195R	GGAATCTGTCAATTTGCACTC	21	61.07	
rs9525570F	GAGAATCTACTGCTGAAATTATTGG	25	60.82	398
rs9525570R	GGATAAAGGCAGAGATTAGTGG	22	60.47	
rs9315897F	TCTACTGAAAGCACATTTACTGG	23	59.83	397
rs9315897R	TAGTTAATGAATAACTGTTGAAGGC	25	59.18	
rs2304865F	CACCTTTGTCTATGGCACTG	20	60.74	421
rs2304865R	GCCATCAAGAGGAAGGAG	18	59.88	
rs2637777F	TGAACTTCCCATCTGTTACG	20	60.12	448
rs2637777R	GTTTCTTGTGTGGAGAAATGAG	22	60.16	
rs2306990F	ACTGTATTCATCTGCTTGATAATTC	25	59.11	514
rs2306990R	TTTGTTTGCCAGTGTAGAGG	20	60.30	
rs1298865F	ACATTCATGCAAGTATGTATGG	22	58.82	384
rs1298865R	GTTGGGTAATGCATGGTG	18	59.76	
rs140681F	ATGAAGGGACTGAGGCAC	18	60.22	456
rs140681R	CTGGTTCAGTCTGGAGCC	18	61.04	
rs1024516F	GACCCTCTACATGCTTATGC	20	58.72	450
rs1024516R	TTGTTCATTCTACCTACTCCCTAC	24	59.11	
rs2299213F	TAATCCACTTGGCACCTTG	19	61.09	473
rs2299213R	CTTATTTGGCTAGGTGGGC	19	61.00	
rs1405874F	AATGAGTCATTAAGAGGTAACCC	23	58.92	475
rs1405874R	AGATTGTAGGCTCTCATTTCAC	22	58.84	
rs2189813F	ATCTCCTCTTGAGTTCTACATCC	23	59.24	486
rs2189813R	AACACCATCATGTTCCCTC	19	59.76	
rs2237554F*	CTGTGAGAAGGATGCTTGG	19	61.00	525
rs2237554R	CTGTTGAGAATTGTGTCCTAATG	23	60.05	
rs2237555F*	CTGTGAGAAGGATGCTTGG	19	61.00	525
rs2237555R	CTGTTGAGAATTGTGTCCTAATG	23	60.05	
rs982339F	TTCTAGCACTATCCACATCCC	21	60.50	500

rs982339R	AATAGTGCCAAGGTTGCTC	19	59.28	
rs17126F	CCCAAATTCCCATACTCAAC	20	60.58	516
rs17126R	GGAAAGATCATGATGTTACCC	21	59.64	
rs2278392F	TTGATTGCTGACATCTATTGC	21	60.25	463
rs2278392R	CAAATTATTTCATTGTATCTCTTGC	25	59.46	
rs646558F	GTCATCCTTCCCATATTATAACAG	24	59.16	436
rs646558R	TAATAATGTGTTGGTGCCTTC	21	58.93	
rs686050F	GTGCATGCCATCATTTAAAC	20	60.36	464
rs686050R	ATCTAACTTGAGCATGCCC	19	59.23	
rs3789327F	CCACAGAAAGCCAGGTCTAC	20	61.27	496
rs3789327R	CTGAACCGACAACACAGG	18	60.31	
rs2278749F	TCATTCAGGCACTAGCTCAC	20	60.59	480
rs2278749R	CATTCAACTTGGCCAAGG	18	61.68	
rs2279287F	GCTGTCCTTCTATTCAGGG	19	58.79	506
rs2279287R	GGCTCCATCTAGGAAACC	18	58.56	
rs1982350F	GGTATGGGTTTGGGAGAAG	19	60.73	489
rs1982350R	GGCTGCATCTAATAAGTGATAGAAG	25	60.95	
rs228729F	GCAAGATGCTGTTGTCTTC	19	58.47	471
rs228729R	AATGTGCTTATGCTAAACTCTACTC	25	58.65	
rs228642F	GCCACCTGTGTTGTGTATC	19	58.92	457
rs228642R	CTGAGATTACAGGCGTGC	18	59.51	
rs228666F	GGTTGCAGAACTGTCTTAATTAG	23	58.49	464
rs228666R	ATCCTCATTTAGTGGGCTC	19	58.06	
rs2859388F	CAGTAGGTAATCCGCGTG	18	59.24	516
rs2859388R	GCTAAATAAACCTGAGAATGGC	22	60.47	
rs228697F	CCCTTACCTCGTCCCAG	17	60.64	424
rs228697R	TCTGGGCATCTCTTCCTG	18	61.58	
rs11576985F	AAACTTATGAACTGTTTATTTCTGG	25	58.30	501
rs11576985R	TCCACTACCTGATGCTGC	18	59.94	
rs1053454F	GTCAGAAATAGCTAGAACGATGC	23	60.78	395
rs1053454R	TGCTTGCTGTATATTCAGTTGC	22	61.72	

rs10828317F	AGAGGGCTGCTAAACTGG	18	59.54	483
rs10828317R	TGGTATTCAAGCCTTCTCC	19	59.20	
rs10778502F	GCATTGTAGACTGGGTTGG	19	60.55	461
rs10778502R	TTAAGCCACACAAATGGTTC	20	59.98	
rs4411993F	GGAATGCCACACTAACTAGC	20	58.78	511
rs4411993R	CAAAGGTCAGGACACCAC	18	58.99	
rs7683874F	CCATGGAACCTTCTAGCAG	19	59.81	376
rs7683874R	GAATGCACTGGAAGGAGG	18	60.81	
rs10937823F	CTGTAATTCAGCTATTCACTGTCC	24	60.56	500
rs10937823R	TAGGTGACACAAAGCTATCAGG	23	60.71	
rs4988483F	GGTTCAGGGACTCACCAC	18	60.56	453
rs4988483R	ACACTGGTGAACTGGTTGAC	20	60.06	
rs169068F	CCCTTCTTCACCGTCAAC	18	60.69	467
rs169068R	CCTACTGCCCTGTGTCTACC	20	61.15	
rs920697F	GTTCGTCCTATTCTTTCCATC	21	59.02	473
rs920697R	AAATCTGCTTTCCATCCTC	19	58.19	
rs327232F	TTCATGGAGCTGGGAGAC	18	61.44	436
rs327232R	GAGATGGAGAGGAGGAGC	18	58.92	
rs11863F	CTCCCAGGTCTACCATTTC	19	58.47	438
rs11863R	TCCCATGTGTTCTAGAATCTC	21	58.12	
rs17666F	CTTGCAGCTCTAGTATTCACTTG	23	59.74	518
rs17666R	CCTCCCGAACATCTCAATAC	20	60.89	
rs909669F	CGCTCTAACACTGAATCCG	19	60.99	530
rs909669R	AGAGGTGAGCGGTAGCTG	18	60.76	
rs133068F*	ATCACCCTGCACACTTCC	18	61.19	456
rs133068R	GCAGATCCCTACATGTGTCC	20	61.98	
rs133069F*	ATCACCCTGCACACTTCC	18	61.19	456
rs133069R	GCAGATCCCTACATGTGTCC	20	61.98	
rs133070F	ACACATGTAGGGATCTGCC	19	59.94	444
rs133070R	CTGACGGCTTCCAACTATC	19	59.81	
rs3798529F	GCTAGTGAGTTGCAGTCCC	19	60.01	392

rs3798529R	CACTCTCCTTGTCCTGGG	18	60.86	
rs3778068F	GTGGATTTCCAGAAATGACC	20	60.73	462
rs3778068R	AATGGTTGTCTCAGGCAG	18	58.70	
rs733457F	TCAGAGTGTCCTAGGCTGC	19	60.75	433
rs733457R	GGTCTCACGACTGCAATTC	19	60.87	
rs2499724F	TCCCTGAGTTCCCTATTACTG	21	59.57	467
rs2499724R	GGAATCTAGAGGGATGAATCAC	22	60.30	
rs2682826F	CAATCTAAGATCGACACACTTG	22	58.82	480
rs2682826R	TGCTGAACCTTTCCTCTG	18	59.01	
rs816363F	TCCAACTCCTGACCTCAAG	19	60.40	414
rs816363R	ATAAGGTCTTCCTGGTCCC	19	59.34	
rs2293051F	TGCTTGTAGCCAGCGTAG	18	60.32	403
rs2293051R	AACTCTTTGGAAGACTGGC	19	58.39	
rs532967F	GAGGAGCGAGATAACAGGAC	20	60.38	408
rs532967R	GAGTATGTAGCCACAGCCC	19	59.69	
rs3782206F	TTGCAAGTTGGCATTGTC	18	60.87	488
rs3782206R	GTATAAACTATTAACTGGGCCTGG	24	60.48	
rs561712F	GATGAATCAGAAGCCACAGTC	21	61.25	431
rs561712R	CAAGTACCCAGAATATTATAGAGGC	25	59.82	
rs2919390F	GGGATTGATAAGGGAGCTG	19	60.98	434
rs2919390R	AATGTCAGCGCACAACAG	18	61.12	
rs3757930F	GCCATCCTCTGAGCTAATTG	20	61.31	458
rs3757930R	ACAGGACCATGATGAGCC	18	61.15	
rs228942F	GACTCTTTCTTGCAAAGAAGG	21	59.62	430
rs228942R	TGAGATCTCGCCACTAGAAG	20	59.69	
rs84459F	GCTCTCCCTGATTATAGCCC	20	61.47	528
rs84459R	GCTCTGATGGGCACTTTC	18	60.98	
rs84460F	GAGAGGAAAGTGCCCATC	18	59.72	462
rs84460R	TGAAATAGATCCATGAGACCC	21	60.30	
rs1800883F	CCTCTGCTTCCTTAGCCTC	19	60.65	359
rs1800883R	TAAGCACTCCGAAGACCG	18	61.57	

rs1044654F	CCATCTGAACACTTCATTCAAC	22	60.96	349
rs1044654R	AAGACTGTCTCCGATGGG	18	60.21	
rs2296197F	CCTCTGACACTCCCATAAATTC	22	61.26	455
rs2296197R	CAGCAGTATTACCAGTGGC	19	58.26	
rs942376F	TGTGGCTGAAACCTAGGAG	19	60.41	559
rs942376R	CTCTATTTCAACTGCAGAATAAGG	24	59.82	
rs3734234F	AGGCAATGGATGGAAATG	18	60.88	413
rs3734234R	ACTCTTACACATTGTTTCTGGG	22	59.53	
rs12608087F	GCTTTCAGGGTGTCAGTG	18	59.34	416
rs12608087R	AGTTGAGCCCTGAGAACC	18	59.33	
rs2236225F	CCTGTGACTGGGACGTTAC	19	60.61	479
rs2236225R	CTGACAGTGGCAACAAGC	18	60.65	
rs2290279F	TATTTGGGCGGATTCTTG	18	60.98	423
rs2290279R	AGTAGAGAAGCCCTCGCC	18	61.09	
rs495484F	GCAGAAACAACCACAGATTTAAG	23	61.41	381
rs495484R	TTGTCTACAATGAGCATGTGTTC	23	61.53	
rs510110F	ACTAGCAGCTTTCGTGTTCC	20	61.00	460
rs510110R	CCCTTTCATGTTGCTGAG	18	59.31	
rs6797699F	TCACCCAGGCTAGAGTGC	18	61.65	468
rs6797699R	TGCAAGACATTTAGGTGTGG	20	61.14	
rs1365111F	TCTAGAGAGGTCAGGAAGTGG	21	60.00	461
rs1365111R	ATCTTCCTAGACCTTTAAATCACAC	25	59.49	
rs362043F	AGCCCATGCCAATGATAC	18	60.91	490
rs362043R	CATTCAACAGTGGCATTAACC	21	61.73	
rs2839350F	CTGAGCGAACTCCATGTG	18	60.60	442
rs2839350R	CAAGAATCCTAAAGTGACTAAGTCC	25	60.07	
rs420259F	ACTGCACCCTTGAACTCC	18	60.26	446
rs420259R	AGGTTTCAGAGAAAGTTGGG	20	59.71	
rs11089599F	GCAAAGGCTCAAATCCAC	18	60.79	456
rs11089599R	TAATTCGTATTTGAAACTGGAGG	23	60.70	
rs1485171F	CACTACAGAGAAGCAGGGAAG	21	60.59	420

rs1485171R	CATCCATCATCCACTGTCC	19	61.44	
rs906807F	CTGAAATAGAGATGGATAGGGTAG	24	58.71	396
rs906807R	TTCAACTGGAACCAACATC	19	58.41	
rs13360565F	AATCACTGGCTGTCCTCC	18	60.22	364
rs13360565R	GACCTGCCTGAGTTCTGG	18	61.04	
rs2304042F	GAGGAAGGAACCATTACCC	19	59.74	386
rs2304042R	GGAGGTAGAGTAAGTGTTTCAAGC	24	61.04	
rs2288799F	GGTCAGTCTTCATGCTCC	18	58.14	428
rs2288799R	GACTCCTGGATATCTCTCCC	20	59.03	
rs17712679F	GGTACAGAAGTGACGGTGG	19	60.61	452
rs17712679R	CACTTCCACAGATCTGGG	18	59.11	
rs1895689F	CGGCTAGTGGTGAGAGATG	19	61.03	387
rs1895689R	CAGATCAACACTCCAAGAATACC	23	61.30	
rs8091359F	GGTGTTTGTATCTTGAAAGGG	21	59.85	469
rs8091359R	CAGTAAGCCATGTCAGACC	19	58.16	
rs1786568F	TTACCCATGAGGAAGTTGAAG	21	60.5	442
rs1786568R	CTTCGCTGGATAAAGTACAGG	21	60.28	
rs1786569F	TGTCAGCTCTATATGGTCTTCAC	23	59.79	478
rs1786569R	AATTCTGCATTCCTCCATC	19	59.00	
rs602201F	ATGAATGGTAGCTGTAGAATTTAGG	25	60.28	486
rs602201R	GTTAGCCAGGATGGTCTTG	19	59.66	
rs1786581F	CCAAGTGGATATGCTGCTC	19	60.82	477
rs1786581R	TCATTCTGGGCAGGAAAC	18	61.23	
rs643652F	GCTCTTCATCTTGTCTTACGC	21	60.59	410
rs643652R	CACACTTGGGCCTTACTTG	19	60.72	
rs662515F	GAGATACTGTGAAAGCCAGG	20	58.85	468
rs662515R	ATGGCCTGACTTGTACCC	18	59.93	
rs3974590F	TACGGGCATGTGATGAAG	18	60.68	368
rs3974590R	TCACACTCTTATTGAACCATGAC	23	60.43	
rs673735F	CCCTTTCCCAAGAGGTTC	18	61.01	461
rs673735R	CACCTAGGAAAGAGACTGATGC	22	61.73	

rs8097892F	TTTGTCAGGAAAGAGGAAAC	20	58.29	403
rs8097892R	ATCTCTGCCTTTCCATCC	18	59.10	
rs9517312F	TTAGCAACTCAGTTCTATTTCCC	23	60.15	466
rs9517312R	TATGCTTGCTAGGCAGGC	18	61.67	
rs9517313F	AACTCCAGAGCATGTCACC	19	60.28	502
rs9517313R	CAGAAGCATTTCAGATAAGGG	21	60.22	
rs3783006F	CCTAAGTCTCAAAGAAGGAGC	21	58.71	443
rs3783006R	TAGGGAAAGTGCATGGAC	18	58.53	
rs9805187F	CCTGATGCGTCCAAACTC	18	61.91	479
rs9805187R	AATGTGTATTGGCCAGTGTG	20	60.88	
rs9517328F	GACCACCAACCAGTTAAATG	20	59.28	464
rs9517328R	TGTGTGAATGAGCAGCAG	18	59.66	
rs9556964F	CTAATACTCTCAGATTCCAGGC	22	58.46	453
rs9556964R	TGTTCTCCTTCTACAGAGGG	20	58.41	
rs7324994F	AGGGCAAGAAGACTAGGG	18	58.35	443
rs7324994R	AGGGAATTGGAAAGTTGTG	19	58.94	
rs9325202 F	TCCAATAACTTCTCTTCTTGCAG	23	61.26	445
rs9325202 R	GCAAAGCTGTTGGAAAGG	18	60.96	
rs1386494 F	GTTTCTCGCAGGTTGTTG	18	59.37	390
rs1386494R	AATTGAATGTGCCTGCTG	18	59.79	
rs4290270 F	ACATTCAACCTAGGGAGAGAATAC	24	60.26	415
rs4290270R	AGGTGCCAAATCCTCTATG	19	59.07	
rs7305115 F	CCTCAAGTCTTGCTGGG	17	59.44	412
rs7305115R	AAGCTAGAGCATCGAGCC	18	59.81	
rs4960681F	TTGTGTGACCCTGCTGTG	18	62.16	386
rs4960681R	GACAGAGTCTCAGGCGTTC	19	60.15	
rs2581841F	CGCTGATTCAGTACACTGG	19	59.41	403
rs2581841R	GCAGCTTTACTCATGTTCAGG	21	61.38	
rs2698515F	CAAGAATAACAGCCCAGCTC	20	61.34	560
rs2698515R	ATGAGAGCTCCTGTGTATTCTACC	24	61.40	

rs1730215F	CGATGGTAATGGGTTTGTG	19	61.22	361
rs1730215R	AGAATTGCTTGAACCTGGG	19	61.61	
rs6320F	GCTCACTAGCAGGAAATTGG	20	61.34	312
rs6320R	GAAAGCCCAGCAAGGTG	17	62.05	
rs7807281F	TTAACCCATTCAGAATCCAAAC	22	61.44	469
rs7807281R	CTTAAATACTCACATGCGGAC	21	58.69	
rs10254608F	TGACTGTGACTTGAGGAACC	20	60.31	375
rs10254608R	AAAGAAACAATTGGGAAATTAGTC	24	60.12	
rs2581845F	ACATTGATTGATGGTATCGC	20	59.78	435
rs2581845R	CCAATGACAGTGACCTCATAAG	22	60.97	
rs7457899F	ACCACATCCAGCCTACTTG	19	60.13	484
rs7457899R	CTGAGGTCAGGAGTTCGAG	19	60.13	
rs2873379F	AAGGAGAGACACAGTTTAACCC	22	60.04	349
rs2873379R	ACAAAGCCAAGGATGACTG	19	60.27	
rs1561600F	GGTTCTGGTTGTTGGGAC	18	60.38	495
rs1561600R	GGAGAGAGAAGTGCCAGC	18	60.25	
rs2698497F	TGTTCAAGGGAGAAGATGATAAG	23	60.98	381
rs2698497R	TCCCTTCAGATGACACATACTC	22	60.54	

dbSNP – база данни на NCBI;

*използвана е една двойка праймери; F – прав праймер (Forward primer); R – обратен праймер (Reverse primer).

Приложение 2

Таблица 8: Използвани проби (Invader, VIC и FAM) за провеждае на Inavder при асоциативното проучване на кандидат гени

db SNP	VIC:CGCGCCGAGG Проба FAM:ATGACGTGGCAGAC	Тт*	Дължина
rs1126442_inv	GGCCCACATCAGCGACGCCGT**T**	66	22
rs1126442_G_VIC	CGCGCCGAGG**G**GGCGTGGTGGC	53	22
rs1126442_A_FAM	ATGACGTGGCAGAC**A**GGCGTGGTGGCC	54	27
rs11146020_inv	ACCCTCCCTATTCCTCTTAGCCCGAGGA**T**	66.2	29
rs11146020_G_VIC	CGCGCCGAGG**G**GGGGGTCCCAAG	53.8	23
rs11146020_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**GGGGGTCCCAAG	53.8	27
rs131702_inv	GTGTTACATACCAGGACAGACTGTGTTCGGGTGACATTAA**A**	66.6	41
rs131702_G_VIC	CGCGCCGAGG**G**GACAAGCTCCTGCA	52.1	25
rs131702_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**GACAAGCTCCTGCAG	52.6	30
rs140504_inv	CTGGACGCTTTGAAGATCAAGATCTCCCAGATCAAGA**T**	65.9	38
rs140504_G_VIC	CGCGCCGAGG**G**TGACATCCAGAGAGAG	53.1	27
rs140504_A_FAM	ATGACGTGGCAGAC**A**TGACATCCAGAGAGAGAAG	54.25	34
rs872123_inv	GCTCCAAAAAATAAGTGCTTGGCACATAGTAGGGGATTAATAAATATTCGTTTAATCAATTACTGCTAATAT**A**	66.3	73
rs872123_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**CAATTAAACATTCTAAACAAGGAC	53.92	35
rs872123_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**CAATTAAACATTCTAAACAAGGAC	52.28	39
rs11542313_inv	ATACCTGGTGCGGCGTGGCCCA**A**	65.8	23
rs11542313_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**GGATGCACCAGAAAAC	53.1	27
rs11542313_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**GGATGCACCAGAAAACTG	53.9	33
rs9799720_inv	GGGACAGTGGCTTTTCCTCTCTGAACCTTAGCTT**A**	66.4	35
rs9799720_G_VIC	CGCGCCGAGG**G**CTCACCCTTGTTCTG	52.6	30
rs9799720_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**CTCACCCTTGTTCTG	52.6	31
rs11736084_inv	ATGCAGTCATTATACTCCAGGTTTTAATTATCCGCCTCCTCATC**A**	66.1	45
rs11736084_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**TGGTGTCCTCTTTGG	52.6	27
rs11736084_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**TGGTGTCCTCTTTGGG	53.1	31

rs1282_inv	AAGGCTTAGCAGAGCTTTGTCTTAGAGGAGTAGATGAAAAGGAAAGTA**A**	66.5	49
rs1282_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**AGAGAGGGCATTCAG	52.6	26
rs1282_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**AGAGAGGGCATTCAGG	53.1	31
rs17844778_inv	GTGCACCGGGTGGCACGCAG**T**	66.2	21
rs17844778_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**CACTGCCAGCGCAT	52.1	25
rs17844778_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**CACTGCCAGCGC	53.8	27
rs9685931_inv	CCGGCTGCTGAAGAGAACCCCGC**T**	67.3	24
rs9685931_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**CCCAGCATCCACCC	54.8	25
rs9685931_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**CCCAGCATCCACC	54.3	28
rs3216733_inv	GTCACTGCTCCGCCCCCCC**T**	66.5	20
rs3216733_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**GCTGATTCATTGGCTGC	53.5	28
rs3216733_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**AGCTGATTCATTGGCTG	53.5	32
rs16927997_inv	CACTTGGGCCCAGGAGGGTTAAAAAAAAAAAAAAAAATCCCTGGAAGCATTAAAT**T**	66.5	56
rs16927997_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**GAAGTGTTTCCTTATCCCAA	52.6	31
rs16927997_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**GAAGTGTTTCCTTATCCC	53.9	33
rs1140763_inv	GGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCC**T**	67	25
rs1140763_G_VIC	CGCGCCGAGG**G**GGTTCGAGTGATTCTC	53.09	27
rs1140763_A_FAM	ATGACGTGGCAGAC**A**GGTTCGAGTGATTCTCC	53.5	32
rs391957_inv	CCCCGGGGCTGTGGGATCTGAAACTTTT**A**	66.1	29
rs391957_T_VIC	CGCGCCGAGG**T**CTTCTCTACTGCTTGTTCT	52.2	30
rs391957_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**CTTCTCTACTGCTTGTT	51.2	32
rs17840761_inv	GGCCCTAGGGGGTCGGAGTAG**T**	66	22
rs17840761_G_VIC	CGCGCCGAGG**G**TCCAGCAGGAGTGA	52.06	25
rs17840761_A_FAM	ATGACGTGGCAGAC**A**TCCAGCAGGAGTGAC	52.6	30
rs12009_inv	CAGGGTACACAGCACTGTAGGTCATCTTTAATGGCT**T**	66.1	37
rs12009_G_VIC	CGCGCCGAGG**G**TATTGGGCTTGGCCT	52.6	26
rs12009_A_FAM	ATGACGTGGCAGAC**A**TATTGGGCTTGGCCTG	53.09	31
rs11568190_inv	CTGCAGGCCACTCACCTCCCC**T**	66	22
rs11568190_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**GCCAGGCGCTCC	53.8	23
rs11568190_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**GCCAGGCGCTC	53.3	26

rs11568171_inv	CCACGTGTCACCAGTTCTTTATCTGGAATAAAATTATCATCGGCTTTG**T**	66.4	49
rs11568171_G_VIC	CGCGCCGAGG**G**CCACTCTGAGGAAACT	53.09	27
rs11568171_A_FAM	ATGACGTGGCAGAC**A**CCACTCTGAGGAAACTTC	53.9	33
rs2076127_inv	TGGTGGCCCCAGATACAGGGCGGAAT**A**	66.5	27
rs2076127_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**GAGGCCCCGAG	53.3	30
rs2076127_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**GAGGCCCCGAGG	53.8	27
rs909685_inv	CCACTGGCTTTGTGAGGGGGC**G**	66	22
rs909685_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**TGTCTGCTTGGGTCATTTC	54.25	30
rs909685_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**TGTCTGCTTGGGTCATTTC	54.25	34
rs715505_inv	AGGGCAGTGGGAAGCTGGAGAGAGG**A**	66.8	26
rs715505_G_VIC	CGCGCCGAGG**G**TCAAGGGTATTTCGGAAG	53.9	29
rs715505_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**TCAAGGGTATTTCGGAAG	53.9	33
rs7301328_inv	GAGCCCCCGTGGATGCCCAGGAT**T**	67.3	24
rs7301328_G_VIC	CGCGCCGAGG**G**GGGGTGAGAGTCTG	54.7	25
rs7301328_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**GGGGTGAGAGTCTG	54.7	29
rs2438146_inv	AAGGCTTTCTTGGGAAACTTTGGTGTCATTCAGTGGATGATCATTAAAACATTTCATTTA**A**	66	61
rs2438146_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**ATCTTTTTTATTGTTGTTTTTGTTTTTGTTT	52.8	42
rs2438146_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**ATCTTTTTTATTGTTGTTTTTGTTTTTGTTTG	53.1	47
rs10008257_inv	GAATACACGTGTAAAACACCTAGCCTAGTGTATTGAACAGAGTAGGT**T**	66.6	48
rs10008257_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**TACAATGAAGAGGACCATTATTG	53.6	34
rs10008257_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**TACAATGAAGAGGACCATTATT	53.3	37
rs2279574_inv	TTGAGCTTCTTGAGCAGCAGCCCGAGCA**T**	66.1	29
rs2279574_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**CGACTCGCCGCC	53.8	23
rs2279574_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**CGACTCGCCGC	53.3	26
rs1801131_inv	GTTCTCCCGAGAGGTAAAGAACGAAGACTTCAAAGACACTT**A**	66.4	42
rs1801131_T_VIC	CGCGCCGAGG**T**CTTCACTGGTCAGCTC	53.09	27
rs1801131_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**CTTCACTGGTCAGCT	52.6	30
rs17116138_inv	TCTCTGGGAAAGTCAATTGTTTGTGTTGTTTGCAGTGGAAGAC**T**	66.2	44
rs17116138_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**TAGACCTGGCCTTTCTG	53.5	28
rs17116138_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**TAGACCTGGCCTTTCT	53.09	31

rs760761_inv	GTGTTCTCTGACACACAAAAGTATTTGATTTTGACCAAGTCCATTGTGTCTAATTTTTATCTTGTTT	66.1	67
rs760761_G_VIC	CGCGCCGAGGGTTTGTGCTTTTGATGTTATATCTAAAA	53.1	38
rs760761_A_FAM	ATGACGTGGCAGACATTTGTGCTTTTGATGTTATATCTAAAAAG	53.6	44
rs9325202_inv	TGAATGAGATGTTTGTGGTAGGAGTAAAAACAGGAGAGATTTATTATTATCATTAGTCTCTCTGTATCCCTATCT	67.8	75
rs9325202_A_VIC	CGCGCCGAGGATGCCTTTCTTGAGCAGAG	53.9	29
rs9325202_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTGCCTTTCTTGAGCAG	53.1	31
rs1386494_inv	CTGAGGCTTGAAAATCAATTGCCAGGGATGTGTCACTCA	66.9	39
rs1386494_T_VIC	CGCGCCGAGGTGGTTTTTACTAGTTGCTAGCT	52.9	32
rs1386494_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCGGTTTTTACTAGTTGCTAGC	54.5	35
rs4290270_inv	CAAGCAAGAAGGGCAACTGCGGGCC	67	25
rs4290270_A_VIC	CGCGCCGAGGATATGGAGCAGGACTCC	53.1	27
rs4290270_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTATGGAGCAGGACTCC	53.1	31
rs7305115_inv	CATGGCTCAGATCCCCTCTACACCCCT	66.5	27
rs7305115_A_VIC	CGCGCCGAGGAGAACCGTGAGTACCTAC	53.5	28
rs7305115_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGAACCGTGAGTACCTA	53.1	31
rs2285595_inv	GGATGTCTGGTCTGAAAGCGTATGGGCCATAAACT	66.4	35
rs2285595_A_VIC	CGCGCCGAGGAAAGACACTGAGCTAGTTAGT	52.6	31
rs2285595_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGAAGACACTGAGCTAGTTAG	54.2	34
rs278109_inv	CACCTGCTCTGTTTCTCGGTGTCCAGCATA	65.9	30
rs278109_C_VIC	CGCGCCGAGGCCTCTGCAGCTCTCG	54.7	25
rs278109_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTCTCTGCAGCTCTCGAA	53.09	31
rs2074052_inv	CTCTGTAATGTGATGGTAATTGAAGGCATTTAAGAAAACCCGACTA	65.08	46
rs2074052_C_VIC	CGCGCCGAGGCAAAAGTGGCAGAGTGAG	53.5	28
rs2074052_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGAAAAGTGGCAGAGTGAG	53.5	32
rs203368_inv	CCCAAGAAATAATTGGTGAGGAATATTTGAATATTTCTCCCAAGAAATAATCGAA	64.4	55
rs203368_C_VIC	CGCGCCGAGGCTGAGCAAGGATATTCTTTTAAC	53.3	33
rs203368_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTGAGCAAGGATATTCTTTTAACTG	53.92	39
rs435136_inv	GAATATAGTCCCAGATGTTTAATATAATTTTGAATCTTTGGCCAAATCATTTCCACT	64.2	57
rs435136_A_VIC	CGCGCCGAGGATTTGCTTGGTTGTGAAAGGTT	52.9	32
rs435136_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTTTGCTTGGTTGTGAAAG	51.7	33

rs4766951_inv	TCAAAACACCAGAATAAAAAAAAACAACTATTTCAAAGGCACAGAAAACTCAAAGAAC**A**	64.1	59
rs4766951_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**TCCCAAAGGCAACAATA	51.2	28
rs4766951_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**TCCCAAAGGCAACAATACA	52.2	34
rs1801260_inv	CATCAAAAAATATCCAGGCACCTAAAACACTGTCAGAACTGGCT**T**	66.08	45
rs1801260_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**TGCCCCTATGATCACC	53.09	27
rs1801260_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**TGCCCCTATGATCAC	52.6	30
rs3847953_inv	GTAGGATAGAGGTAAGCAGAGAAGATGGAGAATGGTG**A**	65.9	38
rs3847953_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**TCCTTGTGGAAGGAATG	53.5	28
rs3847953_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**TCCTTGTGGAAGGAATGG	53.9	33
rs933305_inv	CACCCCTTTTAAAAACAAAATGATAATATACTATGCATACCATTGTGAACCTTACTTTTCCCC**T**	66.4	64
rs933305_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**TCTATATCTTTGAGCTCCTTC	52.9	32
rs933305_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**TCTATATCTTTGAGCTCCTT	52.6	35
rs1012053_inv	CCAAGAGGCATATTCTTTAAAAATATATGTACAAAGTTATGGAGTATATGCACAAAGTTATTTGTATATTTTTAAAAAATATATAC**T**	64	87
rs1012053_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**AAGTTATGGGTATATGTACAAAG	52	34
rs1012053_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**AAGTTATGGGTATATGTACAA	51.1	36
rs1170191_inv	GCACCAAATGATACAGCATTAAGGCACATTGAGAACTAGGAATAAACC**T**	66.4	49
rs1170191_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**TTTGATTTGTTGAAAGCTGTGC	53.3	33
rs1170191_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**TTTGATTTGTTGAAAGCTGTG	52.9	36
rs1170195_inv	TGTCTTGGTATCTCTGTGGTAATGCTTTGTTTGAATGTTGATGTTTCACAAAG**T**	65.9	54
rs1170195_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**GTTTACATTTTATCTTCCTATTTCTCA	53.1	38
rs1170195_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**GTTTACATTTTATCTTCCTATTTCTC	54.4	41
rs9525570_inv	TATCTCCCTTCTAATCTCTTTTGCATACCATTGCTAGAGTTAATTTTCTTAAATCACTAAATCTTTTAATTAAA**A**	64.52	75
rs9525570_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**GCTTGAAACTCAAACTC	51.2	28
rs9525570_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**GCTTGAAACTCAAACTCTG	52.2	34
rs9315897_inv	GGGGGTACTTGTAACTTTAATAATAGGGAAATGTCATAAAAGAAATGTGAATAGAAAG**A**	64.8	59
rs9315897_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**TATGGGATTACTGCAGAA	51.7	29
rs9315897_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**TATGGGATTACTGCAGAAAAA	51.1	36
rs2304865_inv	AGCTCTGTCAATGACTATGACAGAATCAACAATGAGCTCCTT**A**	65.4	43
rs2304865_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**AAACACAGCGGGATAAAAA	52.2	30

rs2304865_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGAAACACAGCGGGATAAAAA	52.2	34
rs2637777_inv	CCAATGACGCCACCTGAGTATTCTTCTCCAGAAGT	66.4	35
rs2637777_A_VIC	CGCGCCGAGGAGGTGATGAAAATCTCCAG	51.7	29
rs2637777_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCGGTGATGAAAATCTCCA	51.2	32
rs2306990_inv	GACTAAGCTGACACCTGAAGAGTAAGGAGAAACAGACATAAACA	66.2	44
rs2306990_C_VIC	CGCGCCGAGGCTCATGATCCTATTGCAAATAAATA	52.28	35
rs2306990_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTCATGATCCTATTGCAAATAAATACA	52.9	41
rs1298865_inv	GCACGATTCGGACTGGAAGGAGCTCAGT	66.3	28
rs1298865_A_VIC	CGCGCCGAGGAGACTGCACTTCAGACAG	53.5	28
rs1298865_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGACTGCACTTCAGACA	53.09	31
rs140681_inv	CCCTGGTCCAACCACCCTATGCATTTTTTAGGTCATT	66.1	37
rs140681_A_VIC	CGCGCCGAGGAGAACCTTGACTTTTCAAACGT	52.9	32
rs140681_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGAACCTTGACTTTTCAAAC	52.2	34
rs1024516_inv	CCCCCAACACCCAAAATATATTTTTCACTACCTTCCTTGGTTCATAT	65.8	47
rs1024516_A_VIC	CGCGCCGAGGAAATTTTCCAAATTTTAAACTGAAGTATTTCA	52.8	42
rs1024516_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCAATTTTCCAAATTTTAAACTGAAGTATTT	52.3	44
rs2299213_inv	TTTCTGCTGAGGTCAAGCATATTTGGTCACCAAACCTGA	65.8	39
rs2299213_C_VIC	CGCGCCGAGGCGCAAGATATGTCACTGTG	53.9	29
rs2299213_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGCAAGATATGTCACTGTGC	54.25	34
rs1405874_inv	GAAACTGATATATAATAGTCTGAATTCCATTTTATTGACTTGCAATAAAAAATAACGATCTTAGAGACAGGAATAA	65	76
rs1405874_C_VIC	CGCGCCGAGGCCTAAATCTGCATAACTAGC	52.2	30
rs1405874_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTCTAAATCTGCATAACTAGCC	52.6	35
rs2189813_inv	CCAGAAAATTTTTTAAATGGGCCTGATACTCATTTCTTTCTCTGAGCTAAACTTAAAAAGAATTAAAA	64.9	68
rs2189813_C_VIC	CGCGCCGAGGCTGATGGTAAGAAAATGTTGATAAA	52.3	35
rs2189813_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTGATGGTAAGAAAATGTTGATAAAC	52.6	40
rs2237554_inv	GATGAGAAGGCTAATGGATGCCAGATGTGGAAACAAATTCATGTT	66	45
rs2237554_A_VIC	CGCGCCGAGGACAAAGGTCCCCTCTCT	53.1	27
rs2237554_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCCAAAGGTCCCCTCT	52.1	29
rs2237555_inv	CATTTCTAAGTGTCGTGACCTAGAAGAAAAGTTCTCCTGAAACTT	65.2	45
rs2237555_A_VIC	CGCGCCGAGGAAAATGAAGCATGTATAGACTTCAG	53.9	35

rs2237555_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGAAATGAAGCATGTATAGACTTC	53.3	37
rs982339_inv	ACTCCACAGTGCTCAAGGGGACCACCT	66.6	27
rs982339_A_VIC	CGCGCCGAGGACTGGTCAATTTGTATTAAGCATTG	53.9	35
rs982339_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCTGGTCAATTTGTATTAAGCAT	53.3	37
rs17126_inv	CAAGACTGAGATTTAAAATTTCCCAGAGGAAAATCGTGTGGTTCT	65.2	45
rs17126_A_VIC	CGCGCCGAGGAGACAGAATTAGCAGCAATAATTTA	52.3	35
rs17126_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGACAGAATTAGCAGCAATAAT	52.9	36
rs2278392_inv	GCATGGAGCTCCGCTATGCACATTGTTCTGTA	65.6	32
rs2278392_T_VIC	CGCGCCGAGGTCTTACCTATCCAGAGAAATG	52.6	31
rs2278392_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCCTTACCTATCCAGAGAAAT	52.2	34
rs646558_inv	CCAGTCCGTAAGTAAAGCCAGCTGCCCT	66.4	28
rs646558_A_VIC	CGCGCCGAGGACCTTTTCCCAGCCCA	52.6	26
rs646558_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCCCTTTTCCCAGCCC	54.8	29
rs686050_inv	CCGGAACATCAGCAGCGAAGAAAAGGTATCATGCTA	66.3	36
rs686050_C_VIC	CGCGCCGAGGCCCCAGGAGTTTCAG	52.1	25
rs686050_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCCCAGGAGTTTCAG	52.1	29
rs3789327_inv	GTACCAAGGCCTCTGTGTCTTTTATTAACCAGCACCT	66.1	37
rs3789327_G_VIC	CGCGCCGAGGGTCTTCCCAAGAGTGAC	53.1	27
rs3789327_A_FAM	ATGACGTGGCAGACATCTTCCCAAGAGTGACC	53.5	32
rs2278749_inv	CACCTATGGTAAGAGCTGTGTGAGGGGCA	66.2	29
rs2278749_T_VIC	CGCGCCGAGGTGGGGCTAGGTGCA	51.4	24
rs2278749_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCGGGGCTAGGTGC	53.8	27
rs2279287_inv	GCCGCGGGGCTGGTGTCTACA	66.3	21
rs2279287_T_VIC	CGCGCCGAGGTCTTCAGTAAGTGGTCAAAAC	52.6	31
rs2279287_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCCTTCAGTAAGTGGTCAAAA	52.2	34
rs1982350_inv	AGGCCCCGCAGAAAGAAAGGAACAGAATCCTTTCATAT	65.9	38
rs1982350_G_VIC	CGCGCCGAGGGGGAAGGCCCCAG	53.8	23
rs1982350_A_FAM	ATGACGTGGCAGACAGGAAGGCCCCAGAAT	52.6	30
rs228729_inv	GGAGAGAAATTTCATCCTACGAATGCACCAGGACTCAA	65.9	38
rs228729_T_VIC	CGCGCCGAGGTACAAGCAGCCAGAGGA	53	27

rs228729_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCACAAGCAGCCAGAG	52.1	29
rs228642_inv	CCTACTCCTTTATAGGAGGAAATATTTTTCTCTCATTGATTTGTTCTAATTTTTCTTTTCATCTCATTAGAG**A**	65.7	73
rs228642_C_VIC	CGCGCCGAGGCGCAACCTTTAACCAGAG	53.5	28
rs228642_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGCAACCTTTAACCAGAGAG	54.25	34
rs228666_inv	GGTTACTTGTCCCTGATTTCAGATTTGTACATATATAGCACTGAAACCA**A**	65.6	50
rs228666_C_VIC	CGCGCCGAGGCTACAGAAAGATGAGTGCTTTA	52.9	32
rs228666_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTACAGAAAGATGAGTGCTTTAG	53.3	37
rs2859388_inv	CTTTAAAATTCGTTACAGGTATTACGCTTAAGTGTTCATTGCCTATAACACGT**T**	65.2	54
rs2859388_A_VIC	CGCGCCGAGGATTTGTTTACTTACAACCGGG	52.6	31
rs2859388_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTTTGTTTACTTACAACCGG	52.2	34
rs228697_inv	GGATACTTTTATGACCGTTTTCCTGCCTGACCCC**A**	66.4	35
rs228697_C_VIC	CGCGCCGAGGCCTGTCTGTCCTCTGTT	53.1	27
rs228697_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCTGTCTGTCCTCTGTT	53.1	31
rs11576985_inv	CATCCTACTGCCAGCGCTCTGTCCAC**T**	66.5	27
rs11576985_A_VIC	CGCGCCGAGGAGGATCGCCTCCCAT	52.1	25
rs11576985_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGGATCGCCTCCC	53.8	27
rs1053454_inv	GTTTTCATTTTTCCTACACCGAAGCCACCTCTGTCC**T**	66.1	37
rs1053454_C_VIC	CGCGCCGAGGCTCCAATGTTCATGTCTGTC	54.25	30
rs1053454_A_FAM	ATGACGTGGCAGACATCCAATGTTCATGTCTGTCC	54.5	35
rs10828317_inv	GTTCTTACCTCAACATCCTTTTTTAGTTTTTCCAGGAAGACCTTCTTG**A**	65.6	49
rs10828317_C_VIC	CGCGCCGAGGCTGTTGTCATCAATATAAATCTTTTG	52.6	36
rs10828317_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTGTTGTCATCAATATAAATCTTTTGG	52.9	41
rs10778502_inv	CTCCGGGGTGCTGATGCCCAC**A**	66	22
rs10778502_C_VIC	CGCGCCGAGGCGTGCTGCAGGCATTA	52.6	26
rs10778502_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGTGCTGCAGGCATTAC	53.1	31
rs4411993_inv	GACCATTTCCATTGGGATCAATGACAAATAAAAAACAGAAAGCTCACC**A**	65.6	49
rs4411993_C_VIC	CGCGCCGAGGCTGAATTTCCTCCATAGTCC	54.25	30
rs4411993_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTGAATTTCCTCCATAGTCCA	52.6	35
rs7683874_inv	GCTGGGCGGTAGCAGGACTAGAAGG**T**	66.8	26
rs7683874_A_VIC	CGCGCCGAGGACCTTTTGGGAGGAACTG	53.5	28

rs7683874_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCCTTTTGGGAGGAACT	53.1	31
rs10937823_inv	CGGCTTCCTGAGTGTGGGTGCCA	65.8	23
rs10937823_C_VIC	CGCGCCGAGGCGATCAATATTTGACCAATGAATG	53.6	34
rs10937823_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGATCAATATTTGACCAATGAATGA	52.3	39
rs4988483_inv	GGTGCTGGTGCCCGTGCTGTACT	65.8	23
rs4988483_A_VIC	CGCGCCGAGGATGCTGGTGTGTGCG	52.1	25
rs4988483_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTGCTGGTGTGTGC	51.4	28
rs169068_inv	AGGACGCTGACGCCACGGAGCA	66	22
rs169068_C_VIC	CGCGCCGAGGCGCGTCCAGACAGG	54.4	24
rs169068_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGCGTCCAGACAGGAT	52.6	30
rs920697_inv	GCTGGATATAAGGACGCTCTTTGGTTCTGGTTTTCCA	66.1	37
rs920697_T_VIC	CGCGCCGAGGTTTTAGCCATGGGCACC	53.1	27
rs920697_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTTTAGCCATGGGCAC	52.6	30
rs327232_inv	CAGTTTTGCTCCTGACCGTTGAAGCTTTTTATATTGACCCT	65.6	41
rs327232_A_VIC	CGCGCCGAGGATGGCTACTGTGGTATTCG	53.9	29
rs327232_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTGGCTACTGTGGTATTC	53.5	32
rs11863_inv	GCCATGCCGTCTCACCCACAGTATCACAA	66.1	29
rs11863_C_VIC	CGCGCCGAGGCGTGGAACCGCAGAC	54.8	25
rs11863_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGTGGAACCGCAGACA	52.6	30
rs17666_inv	CTGAATAACTGCAGTGACTTGATGCTCTAAAACAGTGTAGGAA	65.4	43
rs17666_C_VIC	CGCGCCGAGGCTTAAGAATAGATGGTTTTTAATCC	52.3	35
rs17666_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTTAAGAATAGATGGTTTTTAATCCTG	52.9	41
rs909669_inv	CAGGCAGAAGCAGCGGAGATTCTCCGA	66.5	27
rs909669_C_VIC	CGCGCCGAGGCAGCCGGCAGCG	53.3	22
rs909669_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTAGCCGGCAGCGC	53.8	27
rs133068_inv	AATACCATGAATTGTCTTTTGAGGGGTTTTCTGTCTCCCCA	65.6	41
rs133068_VIC	CGCGCCGAGGCCAACTTGAATGCAATCTTC	52.2	30
rs133068_FAM	ATGACGTGGCAGACGCAACTTGAATGCAATCTTC	52.2	34
rs133069_inv	CTTTATCCCCCACCCCACCCCCT	65.8	23
rs133069_A_VIC	CGCGCCGAGGACTTTTTTTTCTTTTTTTTTTACTGCAAAAC	52.6	41

rs133069_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCCTTTTTTTTCTTTTTTTTTTACTGCAAAA	52.3	44
rs133070_inv	ATGATCTCTTTGGGGGATCATGCTCAGATATTTGTCTCAAAGAT	65.3	44
rs133070_A_VIC	CGCGCCGAGGATCCCAGGCCAAACCT	52.6	26
rs133070_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTCCCAGGCCAAACC	54.8	29
rs3798529_inv	CCCTGTTGTGCCCATCGCTCTCCACT	66.8	26
rs3798529_A_VIC	CGCGCCGAGGACAGCAATCCAAGGAGC	53.1	27
rs3798529_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCCAGCAATCCAAGGAG	52.6	30
rs3778068_inv	CCTGGAGTGAGGCACATAGCTGGGTGA	66.6	27
sr3778068_C_VIC	CGCGCCGAGGCGGTGTGGGAGCC	53.9	23
rs3778068_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGGTGTGGGAGCC	53.9	27
rs733457_inv	CTCTGCATGATCCCTGCCTTCATGGAGCA	66.2	29
rs733457_G_VIC	CGCGCCGAGGGGACATCCGAGTGG	51.4	24
rs733457_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGACATCCGAGTGGG	52.1	29
rs2499724_inv	CTGTCACACATCTTCAGTAAACATTTACCAAATGAATACAACTGTAT	63.2	47
rs2499724_A_VIC	CGCGCCGAGGAAAACTGGAACCAAACCCA	51.7	29
rs2499724_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCAAACTGGAACCAAACC	50.7	31
rs2682826_inv	GGCCATGTTCCAGTGGTTTCATGCACCCT	66.2	29
rs2682826_A_VIC	CGCGCCGAGGATGAGTTGCCCTTGTCG	53.1	27
rs2682826_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTGAGTTGCCCTTGTC	52.6	30
rs816363_inv	GAGGGTGAGGGGTTTCTGAGAGTAGGATGTA	65.8	31
rs816363_C_VIC	CGCGCCGAGGCCAAGTGTGCATGTGTG	53.1	27
rs816363_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCAAGTGTGCATGTGTG	53.1	31
rs2293051_inv	TGGTGATGGCAGACCTGTGGTGGAGAGAA	66.2	29
rs2293051_C_VIC	CGCGCCGAGGCGGGAACACCCGG	53.9	23
rs2293051_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGGGAACACCCGG	53.9	27
rs532967_inv	GCTTCTGGCAGGGCTGTTGTACTTGGCT	66.4	28
rs532967_A_VIC	CGCGCCGAGGACTTTGATGTTTTAATTAGCCAGC	53.6	34
rs532967_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCTTTGATGTTTTAATTAGCCAG	53.3	37
rs3782206_inv	GGTAAGCTAAATCAGTAAGGAAGGCTGGGTAACTTCCAAAA	65.6	41
rs3782206_C_VIC	CGCGCCGAGGCAGGACATTTAGTTGCATATTTAAAAA	52.9	37

rs3782206_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTAGGACATTTAGTTGCATATTTAAAAAG	53.2	42
rs561712_inv	CAGAGTGGCTCTTGATTACAGGCATTTCCCAAGTCAA**A**	65.9	38
rs561712_T_VIC	CGCGCCGAGGTGGCTACCTACATGATCG	53.5	28
rs561712_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCGGCTACCTACATGATC	53.1	31
rs2919390_inv	CCAAAAGAAGTAACCAAAAATTTCTATAGCTTAGTAAATTCCATGTTCTAGAACTTTT**T**	63.4	59
rs2919390_A_VIC	CGCGCCGAGGAATGTGGACCTCAGAAAAAG	52.2	30
rs2919390_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCATGTGGACCTCAGAAAAA	51.7	33
rs3757930_inv	CAGAACCTTGAGGGAAGAATTGGAGAGTATATTTTACATCCAAAATA**A**	64.05	48
rs3757930_C_VIC	CGCGCCGAGGCTTCAAACCTTTCTCGTTACAT	52.9	32
rs3757930_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTTCAAACCTTTCTCGTTACATG	53.3	37
rs228942_inv	CCCGGCCACACCCTCATCAGG**A**	66.02	22
rs228942_T_VIC	CGCGCCGAGGTTCTTCCTCTGAGTAGGG	53.5	28
rs228942_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTCTTCCTCTGAGTAGG	53.1	31
rs84459_inv	CCATGCCAAAGCAGAAGGGCACTGAGAG**A**	66.1	29
rs84459_C_VIC	CGCGCCGAGGCACAGCCTGTTCACC	52.1	25
rs84459_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTACAGCCTGTTCACCC	52.6	30
rs84460_inv	CTTCCTTGCTGTCACCCATCAGGTCACCA**T**	65.9	30
rs84460_G_VIC	CGCGCCGAGGGGGAGACATCAGGTAAG	53.1	27
rs84460_A_FAM	ATGACGTGGCAGACAGGAGACATCAGGTAAGC	53.5	32
rs1800883_inv	GAACACCCCTTCTGCAAGTACCCCAGG**A**	66.4	28
rs1800883_C_VIC	CGCGCCGAGGCCGGTCTCCTGACC	54.4	24
rs1800883_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCGGTCTCCTGACC	54.4	28
rs1044654_inv	GTGGGCTCATCTTTGCTGTCACAAACAACTGGATG**T**	66.3	36
rs1044654_C_VIC	CGCGCCGAGGCATCTTTCCTACCAAGTTGTT	52.6	31
rs1044654_A_FAM	ATGACGTGGCAGACAATCTTTCCTACCAAGTTGTTG	52.9	36
rs2296197_inv	CTCCCTTTGGCTAAGGCACTGTTTTCCTTGAG**A**	65.5	33
rs2296197_C_VIC	CGCGCCGAGGCGGCACCACAATTATCTTG	53.9	29
rs2296197_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGGCACCACAATTATCTTGT	52.2	34
rs942376_inv	CATCATCACTGTGCTTTATGATGGGCAGGTAGAAAAACTG**T**	65.6	41
rs942376_A_VIC	CGCGCCGAGGACTGCCATGCTCCTTG	52.6	26

rs942376_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCTGCCATGCTCCTT	52.06	29
rs3734234_inv	CTATTTTAAGTCTGCTTGTCTTACCTGGTAACTGTCCAT	63.7	39
rs3734234_A_VIC	CGCGCCGAGGACCCTCTTTGGAGTTTGG	53.5	28
rs3734234_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCCCTCTTTGGAGTTTG	53.1	31
rs12608087_inv	GCTCTGGAGAAGAGAGAAGCAGCCCTAAAGATA	65.5	33
rs12608087_C_VIC	CGCGCCGAGGCGAGGTCAGGGGAA	51.4	24
rs12608087_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGAGGTCAGGGGAAG	52.06	29
rs2236225_inv	GCACATGGCAATTCCTCCATCATTGCAGACCT	65.6	32
rs2236225_A_VIC	CGCGCCGAGGAGATCGCACTCAAGCTTG	53.5	28
rs2236225_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGATCGCACTCAAGCTT	53.1	31
rs2290279_inv	GAGAACCTTCCGGGGGCCTGTGTGTT	66.8	26
rs2290279_A_VIC	CGCGCCGAGGAGACGCCGGGTCC	53.8	23
rs2290279_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGACGCCGGGTC	53.3	26
rs495484_inv	GTCCTGCTGTGGTGAGACAGAACATACTACTTTATGAC	66	38
rs495484_A_VIC	CGCGCCGAGGAGCTGACTTTCAAAGTATGC	52.2	30
rs495484_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGCTGACTTTCAAAGTATGC	52.2	34
rs510110_inv	GGACGTAGGTATGTCTTTAAAAACTATTGCTGTGTGTTTAACTT	63.4	44
rs510110_C_VIC	CGCGCCGAGGCTACTTTGAATCCACATTTGG	52.6	31
rs510110_A_FAM	ATGACGTGGCAGACATACTTTGAATCCACATTTGGAA	51.5	37
rs6797699_inv	GATCTCTTGACCTCGTGATGCACCCACCTA	66	30
rs6797699_C_VIC	CGCGCCGAGGCAGCTTCCCAAGCCAA	52.6	26
rs6797699_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTAGCTTCCCAAGCCAATTATTT	52.9	36
rs1365111_inv	GAGAACCAAGTAAGACAATGTAAGTGAAAATGCTTAGCAGTCCT	65.3	44
rs1365111_G_VIC	CGCGCCGAGGGTAAAATGTCACAGGTTTTATTATTG	52.6	36
rs1365111_A_FAM	ATGACGTGGCAGACATAAAATGTCACAGGTTTTATTATTGC	52.9	41
rs362043_inv	GTAGACAGGCATGGCCAAGCTCTGTGGAA	66.2	29
rs362043_G_VIC	CGCGCCGAGGGTTGATAGGTGTATTCTGAC	52.2	30
rs362043_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTTGATAGGTGTATTCTGACC	52.6	35
rs2839350_inv	GATTGCCAGGAGAGGACGGTTGGCATTTACAT	65.7	32
rs2839350_A_VIC	CGCGCCGAGGACCTGGAACTAACGGCA	53.1	27

rs2839350_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCCTGGAACTAACGG	52.1	29
rs420259_inv	AGCCACTGTGCCCAGCAGAGGTATTTCTAACT	65.7	32
rs420259_A_VIC	CGCGCCGAGGATTTAAGGGACACACAGATTTC	53	32
rs420259_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTTTAAGGGACACACAGATTT	52.6	35
rs11089599_inv	CACAAGGCTGGGGATTAGGCAGATTGGGAA	65.9	30
rs11089599_G_VIC	CGCGCCGAGGGCAAGTTGACATGTGCAG	53.5	28
rs11089599_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTCAAGTTGACATGTGCAGTG	54.3	34
rs1485171_inv	GAGTAGAGGAGCTCTAGACCACAAGTGAAACTTGT	65.3	35
rs1485171_C_VIC	CGCGCCGAGGCAGAGCTCGTGGAACA	52.6	26
rs1485171_A_FAM	ATGACGTGGCAGACAAGAGCTCGTGGAACAG	53.1	31
rs906807_inv	GTAATTACTTACCACAAATAAAGCTCCTCCAGCTCCATTTTGCATAT	64.9	47
rs906807_A_VIC	CGCGCCGAGGACTGTCTTATGCAAATTCCTTAC	53.3	33
rs906807_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCTGTCTTATGCAAATTCCTTA	52.9	36
rs13360565_inv	GAGGCTGACTTCTGGGCAGAGGAAGGA	66.6	27
rs13360565_G_VIC	CGCGCCGAGGGATGCCCATCCAGAG	52.1	25
rs13360565_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTATGCCCATCCAGAGC	52.6	30
rs2304042_inv	GACTCAAGCACATCCCTCGCCCTCTCTT	66.4	28
rs2304042_A_VIC	CGCGCCGAGGAGCCTCCGTTTCCATGA	53.1	27
rs2304042_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGCCTCCGTTTCCAT	52.1	29
rs2288799_inv	CAGCAGGATGTACAGGATGACCCCTGGAT	66.2	29
rs2288799_A_VIC	CGCGCCGAGGAAGAGGACCAGAGAACC	53.1	27
rs2288799_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGAGAGGACCAGAGAAC	52.6	30
rs17712679_inv	CACCCTGCCGCTTTAGATGGAGTCCAC	66.6	27
rs17712679_A_VIC	CGCGCCGAGGAGCGGTCCCTGGTG	54.4	24
rs17712679_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGCGGTCCCTGGTG	54.4	28
rs1895689_inv	GCACGTCAATGGGTTTAATCCCGAGTAAGAATGTTCAGTTTGT	66.3	43
rs1895689_A_VIC	CGCGCCGAGGATTCCAAACTGCATGCAAACTT	53	32
rs1895689_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTTCCAAACTGCATGCAAAC	54.3	34
rs8091359_inv	GCGGTACAGCTTTAAAATGAGCAATCCTGCTCTGCA	66.3	36
rs8091359_C_VIC	CGCGCCGAGGCGGAGGAAGTGGAGC	54.8	25

rs8091359_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGGAGGAAGTGGAGCA	52.6	30
rs1786568_inv	CTTCTCTGTAATTCTCTCAGGCTTCAGCTCAAACCTAGAGTTT**A**	66.2	44
rs1786568_C_VIC	CGCGCCGAGGCGTCTCCTATAAAGCAGTTC	54.3	30
rs1786568_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGTCTCCTATAAAGCAGTTC	54.3	34
rs1786569_inv	CCCACTGTTAGATCATAGGCCTTATTTTTTCCAGCTTTATAAATGAGGAAATTGAG**T**	66.4	57
rs1786569_A_VIC	CGCGCCGAGGACCAGAAAAGAGAGGCATC	53.9	29
rs1786569_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCCAGAAAAGAGAGGCAT	53.5	32
rs602201_inv	CTTTTCAGGGAACCAGGGATTTTTTTCTCTCTCTCTAGACAATA**C**	66.1	45
rs602201_A_VIC	CGCGCCGAGGAGTTTCCTCATTAGTCTGCTAA	52.9	32
rs602201_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGTTTCCTCATTAGTCTGCTAA	52.9	36
rs1786581_inv	GCCACCCTTTGAAATGCTCTCTGTGTGTTAGAGAGATA**A**	65.8	39
rs1786581_C_VIC	CGCGCCGAGGCTATACCCTAGAAACTCTGAA	52.6	31
rs1786581_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTATACCCTAGAAACTCTGAAC	52.9	36
rs643652_inv	GAAGGGAAAGTTATGCTGAGAGCACCAGGCACA**A**	66.6	34
rs643652_C_VIC	CGCGCCGAGGCGTTGAACACCGCAGT	52.6	26
rs643652_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGTTGAACACCGCAGT	52.6	30
rs662515_inv	GTCATAGTTCTCCTTAAATGGGATGTCCCTTTCCTCTG**A**	65.8	39
rs662515_C_VIC	CGCGCCGAGGCAGGAGCAGCGTCTT	52.1	25
rs662515_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGAGGAGCAGCGTCTT	52.1	29
rs3974590_inv	CAGCAAGAACAGCTCATGTCTTCATTCGTTTTGTTCCAAGGAT**T**	66.2	44
rs3974590_A_VIC	CGCGCCGAGGATAATAAGCAAAACACTGTGACAAC	53.9	35
rs3974590_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTAATAAGCAAAACACTGTGACA	53.3	37
rs673735_inv	CAGTAGTAAGTACAACTTCCATAAAATCTCCAGCTCAAGCTGACA**A**	65.9	46
rs673735_C_VIC	CGCGCCGAGGCTGATTCGTGGATTCTCTG	53.9	29
rs673735_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTGATTCGTGGATTCTCTGG	54.3	34
rs8097892_inv	ACAACCCGCAGTGTCCACCTCAGTGCTT**A**	66.2	29
rs8097892_C_VIC	CGCGCCGAGGCTGTGAGGATAGAAAAAAAATCAG	53.6	34
rs8097892_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTGTGAGGATAGAAAAAAAATCAGA	52.3	39
rs9517312_inv	GGCTCTGTCCCCTCCCTATAGCTTAGAG**T**	66.2	29
rs9517312_A_VIC	CGCGCCGAGGACCACTAGACCAGCAGA	53.1	27

rs9517312_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCCACTAGACCAGCA	52.1	29
rs9517313_inv	CCCATTTTGGCCATAAAAATAGTGATGCAGTCCAAGAATCTATTTCCTAA	65.6	50
rs9517313_C_VIC	CGCGCCGAGGCAACTGCTTCCGAAATATGG	54.3	30
rs9517313_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGAACTGCTTCCGAAATATGG	54.3	34
rs3783006_inv	CACTCTGAACTCTAGGGTAGCAAATATCATTCTTAAAAATACATTGGA	64.05	48
rs3783006_C_VIC	CGCGCCGAGGCAAAGATGCCTGTGAGTTTA	52.2	30
rs3783006_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGAAAGATGCCTGTGAGTTTA	52.2	34
rs9805187_inv	CCTCCCCCAACCCGTCCACAAGT	65.8	23
rs9805187_A_VIC	CGCGCCGAGGACCAACTATGACAATAATTAGATTTAG	52.9	37
rs9805187_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCCCAACTATGACAATAATTAGATTTA	52.6	40
rs9517328_inv	CAGAGACTAAGAATGTGCCTGCCGCTCC	66.4	28
rs9517328_A_VIC	CGCGCCGAGGAGTCACCAGCCATGC	52.1	25
rs9517328_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGTCACCAGCCATGC	52.1	29
rs9556964_inv	GTGCTGGCCGACACTAGGCCTCTGTAAAA	66.2	29
rs9556964_C_VIC	CGCGCCGAGGCGTGCAGCTGGGC	53.8	23
rs9556964_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGTGCAGCTGGGCG	54.4	28
rs7324994_inv	CGAGCCTCGAGCCCCACAAGCA	66.02	22
rs7324994_C_VIC	CGCGCCGAGGCGCCTCACACTGATGA	52.6	26
rs7324994_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGCCTCACACTGATGAG	53.1	31
rs9325202_inv	TGAATGAGATGTTTGTGGTAGGAGTAAAAACAGGAGAGATTTATTATTATCATTAGTCTCTCTGTATCCCTATCT	67.8	75
rs9325202_A_VIC	CGCGCCGAGGATGCCTTTCTTGAGCAGAG	53.9	19
rs9325202_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTGCCTTTCTTGAGCAG	53.1	17
rs1386494_inv	CTGAGGCTTGAAAATCAATTGCCAGGGATGTGTCACTCA	66.9	39
rs1386494_T_VIC	CGCGCCGAGGTGGTTTTTACTAGTTGCTAGCT	52.9	22
rs1386494_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCGGTTTTTACTAGTTGCTAGC	54.5	21
rs4290270_inv	CAAGCAAGAAGGGCAACTGCGGGCC	67	25
rs4290270_A_VIC	CGCGCCGAGGATATGGAGCAGGACTCC	53.1	17
rs4290270_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTATGGAGCAGGACTCC	53.1	17
rs7305115_inv	CATGGCTCAGATCCCCTCTACACCCCT	66.5	27
rs7305115_A_VIC	CGCGCCGAGGAGAACCGTGAGTACCTAC	53.5	18

rs7305115_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGAACCGTGAGTACCTA	53.1	17
rs4960681_inv	GAGCCTCTAACCTCGGGAAAACCCGG**A**	66.5	27
rs4960681_C_VIC	CGCGCCGAGGCGGTTATTTTATTATAACGTCAAAATC	52.9	37
rs4960681_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGGTTATTTTATTATAACGTCAAAATCC	53.2	42
rs2581841_inv	GCCATGAGTCAGGTGATGCAGGTTAGCATTTCATC**A**	66.3	36
rs2581841_C_VIC	CGCGCCGAGGCTAGTCTATTCTTTTTCTTTGCAAATT	53	37
rs2581841_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTAGTCTATTCTTTTTCTTTGCAAATTAC	53.4	43
rs2698515_inv	CTGGGTCAATGGGTTCTTAGTGTCCAGAAAATATGCTAAAAAAAAACAAAAA**A**	64.5	53
rs2698515_C_VIC	CGCGCCGAGGCCAGCTTGGAGATCAC	52.6	26
rs2698515_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTCAGCTTGGAGATCACTC	53.5	32
rs1730215_inv	GCAGTGGAAGTAGCTCCAGGTGAATCAGC**T**	66	30
rs1730215_G_VIC	CGCGCCGAGGGAGGGAGTGAGTGGA	52.1	25
rs1730215_A_FAM	ATGACGTGGCAGACAAGGGAGTGAGTGGAG	52.6	30
rs6320_inv	GGTCTCCTGACCCAGAGATGGATTTACC**C**	66.2	29
rs6320_T_VIC	CGCGCCGAGGTGTGAACCTAACCTCCTTTT	52.2	30
rs6320_A_FAM	ATGACGTGGCAGACAGTGAACCTAACCTCCTTTT	52.2	34
rs7807281_inv	CGAGGTGAAGAAGGAAGGTAAGTTGAAAGAGAATATATTGCAACA**A**	65.1	46
rs7807281_G_VIC	CGCGCCGAGGGCCTAGGCAGTACTGT	52.6	26
rs7807281_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTCCTAGGCAGTACTGTTAAC	54.3	34
rs10254608_inv	CTGTTGAATGCTCCAACACTCCCCTTGTGACAGAT**T**	66.3	36
rs10254608_C_VIC	CGCGCCGAGGCCCCGAGAAAACAACCT	53.1	27
rs10254608_A_FAM	ATGACGTGGCAGACACCCGAGAAAACAACCTG	53.5	32
rs2581845_inv	GTCTTAATTTCCTAGGGTGGCTGTTAACAATGTGCCACAA**C**	66.6	41
rs2581845_A_VIC	CGCGCCGAGGACTGTGGGGCTTAAAACAAC	54.3	30
rs2581845_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTCTGTGGGGCTTAAAACAAC	54.3	34
rs7457899_inv	CCCAGTATATATTGTGACCCAGCTATGAATAATAATCTTTACACAGCT**A**	64.8	49
rs7457899_T_VIC	CGCGCCGAGGTTAATAATAAAACACTGAATATTTATTATATAGC	52.1	44
rs7457899_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTAATAATAAAACACTGAATATTTATTATATAG	51.8	47
rs2873379_inv	CCCAATACTGCCATTTCAGAGGTACCATATGGCAGA**A**	66.1	37
rs2873379_T_VIC	CGCGCCGAGGTGGGAGTTTTATACCTTTTCAG	52.9	32

rs2873379_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**GGGAGTTTTATACCTTTTCA	52.6	35
rs1561600_inv	GGATCTGACCCACTGGTTACCAAGATCTTTTCATGC**T**	66.1	37
rs1561600_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**ATGATTGCCACATCTATGTATTTAC	54.2	36
rs1561600_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**ATGATTGCCACATCTATGTATTTA	53.9	39
rs2698497_inv	CCAGTGGACAGAAAGCCTCTGGTTCTTCTAAGC**T**	66.6	34
rs2698497_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**CAGATATTGTGATTATATCTAGGAC	54.2	36
rs2698497_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**CAGATATTGTGATTATATCTAGGA	53.9	39

Inv, Invader проба; VIC, VIC проба; FAM, FAM проба; Последният нуклеотид при всички Invader проби е удебелен. VIC (10 нуклеотида) и FAM (14 нуклеотида) пробите са дадени в син цвят, а непосредствено до тях в червено са означени съответните алели на полиморфизма

Приложение 3

Таблица 9: Използвани праймери за генотипиране на топ100 полиморфизми след цялостния геномен скан

N	Ген (NCBI)	db SNP	Нуклеотидна последователност	Дължина	Tm (C°)	Дължина на ампликона
1	LOC728103*	rs1971058F	TGCTGTTCCTGGAGCATGTG	20	61-63	533
		rs1971058R	GGGAAATCTTGCCAGTCTCAG	21	61-63	
2	интергенен	rs1506223F	TGAACACAGTTTGAGATAATGG	22	59.07	489
		rs1506223R	GTGAAACTTTCGTATCATTGG	21	58.51	
3	LOC728103	rs6859725F	CTGGTGGTGGGAGTGTG	17	61.31	482
		rs6859725R	ATATCATGAGATGTCTAATGGGC	23	60.57	
4	GRIK5*	rs8099939F	AGGCCTGGTCTGAACAATGG	20	62	161
		rs8099939R	CAACATCCAGTCATCCCTCG	20	62	
5	~ ZNF626	rs8109263F	GAACCAGACACTCAAATAGCTAC	23	58.43	380
		rs8109263R	GGACAAGATTACAGTAGAGGGC	22	60.52	
6	~ EIF3S6	rs1975804F	TGTGATTCTACTGAGGCTTCC	21	60.81	370
		rs1975804R	CACAGAGCCAGGAAGAAG	18	58.55	
7	PARD6B	rs6122972F	CACCAGTATTCTCGAATGTCC	21	60.93	357
		rs6122972R	CAAGTATGCAGCAGCCAC	18	60.62	
8	CTSH*	rs2289700F	ACAGCACCCTTAGCCAATGC	20	60	500
		rs2289700R	GGTGGTGATTGGGAGTCCAC	20	60	
9	CTSH	rs16970287F	CCTACCTGAGGCTCTGACC	19	61.42	448
		rs16970287R	AAATTAGGCAGCAGGTGG	18	60.23	
10	FSTL4	rs10491291F	CGTTTGTTCATGTGTTCACTC	21	60.63	496
		rs10491291R	GTGGGTAATTGCTTAGTAAATGG	23	60.14	
11	RALBP1*	rs1813100F	CATGCATCGTAGAATCAGTGGTC	23	60	546
		rs1813100R	GCAGGAAGCACTCAGTCATGC	21	60	
12	TACC1	rs1135990F	CAAGCCAAAGGTCTAAGAAGTC	22	60.79	485
		rs1135990R	CATTACACAGACCACCACAG	20	58.98	
13	RGS6	rs2283380F	TTTGGAACGGAGGAGGTCTG	20	60	851
		rs2283380R	TTCATCATTGCTGGTGGATG	20	60	

14	интергенен	rs11192617F	GCAAGGTATAGGAATGTGGG	20	60.74	424
		rs11192617R	CTGAATCCATGTGCGAAC	18	60.23	
15	интергенен	rs951030F	ACTATCAATGTTGGGCAGG	19	59.94	346
		rs951030R	AAAGGTAACTTATGTGAGGTGG	22	58.53	
16	MAGI1	rs6795228F	CTCAAACCTGCCACGTTC	18	61.94	488
		rs6795228R	CTTGGATCCCAGCTTTACC	19	61.01	
17	интергенен	rs4814074F	TGTGATATCAGGGCCAGAG	19	61.26	463
		rs4814074R	TTATAGAGACGGCTGCTGC	19	60.69	
18	LOC391530	rs11129950F	CTAGCACTTCTGGCCCAC	18	61.02	466
		rs11129950R	ACCAAGGGTCAGCAAATG	18	61.13	
19	PTBP2	rs10875032F	CATAGGCTTTAATATGCTCATACTC	25	58.83	413
		rs10875032R	CAGATGAAGTACAAATTTCACTACC	25	59.5	
20	интергенен	rs12479608F	AGACAATGTAGAACACAATTTGG	23	59.43	412
		rs12479608R	GAGGTGTCTGGGTGATAGC	19	59.65	
21	~ RGS7	rs4660080F	CCATGGGTTATGTAGCTCTTTC	22	61.24	467
		rs4660080R	TTATGAGCTGTTATCTTGTGGC	22	60.66	
22	интергенен	rs2029516F	GAGCCCTGAAATCAGAGAAAC	21	61.68	631
		rs2029516R	CTTAATCTCAGTTACAGCAGATCAC	25	59.87	
23	~ CLEC14A	rs2249395F	TAATCCTCAGGGTAATTACTTGG	23	59.75	499
		rs2249395R	AATGTCCGTCTTTATCTTTAGTGAG	25	60.41	
24	COX17P/LRCH1	rs9534415F	AAGGGAAGGTGAACCTCAG	19	60.66	463
		rs9534415R	CAGGGACACAAACACTGC	18	60.32	
25	интергенен*	rs11951994F	ACTTGCACCCACAGGATGAG	20	61	381
		rs11951994R	TGAACAGTTACAGATGCCAAAGAG	24	61	
26	~ HTR3D	rs7621975F	TTGCTCCTCAGTTTCCAG	18	59.01	418
		rs7621975R	GGTTACAGGGTGCTGCTC	18	60.88	
27	~ GABRA6	rs10476364F	GGCAGAGGATGAATCAACCAG	21	62	117
		rs10476364R	AGCAGAGTTCAGGGACCAGC	20	62	
28	~ LOC653702	rs6673531F	AATTATACAACAATGCACATTTCC	24	60.37	535
		rs6673531R	TTAGTAGCTGACAAGTTATGGGAC	24	60.09	

29	~ LOC728103	rs11958003F	GGTGGAGCATGTACTGGG	18	61.63	483
		rs11958003R	TGGAAATCTGAGGGTCTGAG	20	61.8	
30	интергенен*	rs1959718F	CTGGTCATATTGGATATGGAG	21		194
		rs1959718R	TGCACACCATGCCTCCTGCTT	21		
31	~ LOC728103	rs733250F	GGCCAAAGTCAGCATAGAATAG	22	61.49	430
		rs733250R	TTGCATTTCTAGAAAGATCGTG	22	60.77	
32	интергенен	rs1862019F	ACCAGGGTAGGGAACAGG	18	61.38	467
		rs1862019R	TTGAGGATCGACGTAAGAAAG	21	60.78	
33	~ TRPM3	rs10746876F	AGACCTGAGGGCTGAGAC	18	59.47	536
		rs10746876R	CATAATATTAGTAGGAAGGCTGGAG	25	59.93	
34	~GABRA1*	rs11951528F	TCCCAAACCATATCACAGTTCAAG	24	61-62	195
		rs11951528R	TCATGACTGGAAATAACACAGCTC	24	61-62	
35	~SORCS1	rs1903905F	GGAGAGAGTGTGCTAAGAAGAAG	23	60.21	497
		rs1903905R	TGAAGATGCAAGCACTTGAG	20	61.76	
36	IFNWP19	rs10965002F	GGCCAAATGAGGAGAATC	18	59.53	422
		rs10965002R	TCTTGCAAACTTGTGGATG	19	59.82	
37	интергенен	rs10095297F	ACTTATTCTCATGACTGTAGCTTTC	25	58.58	410
		rs10095297R	CTGTGCCAGTAGAAAGCATAG	21	59.13	
38	интергенен	rs875069F	TCCTCCCTCCTGTCTTCC	18	61.82	499
		rs875069R	GCCAATTACAGCTCAGATTTC	21	60.24	
39	~TCERG1L	rs3123209F	GTATCTACCCAGAGGAAAGAAAC	23	58.68	422
		rs3123209R	GAGGAACTGATTGCCTGG	18	60.81	
40	~ TACC1	rs13252226F	ATGACAGACATCAATGAATTAGAG	24	58.63	502
		rs13252226R	TCTTCATCTGGCTGTAGAATTAG	23	59.03	
41	интергенен	rs708345F	CATATTGGCAAGAAGAGGC	19	59.78	475
		rs708345R	TGTAGTGTCCTGTGTGTGAGTC	22	60.29	
42	TMEM77	rs325921F	TTCAGACTTCTGGCCTCC	18	60.51	471
		rs325921R	TTAATTATAAGCACAATGGTTTCG	24	60.58	
43	RGS6*	rs4903024F	CTCCCTGCCTATTGTGGCTC	20	61 - 62	191
		rs4903024R	CCCTGCACTTAGATATGGACTGAG	24	61 - 62	

44	TMPRSS4	rs11216747F	CAGGTGATCTGCATAAAGC	19	58.34	482
		rs11216747R	GTGAAGGCCAAGCTGAAG	18	61.15	
45	~TMEM77	rs325894F	GCACTGCAGATTTATGTATTTATTC	25	59.49	465
		rs325894R	CATGCTTCACCTTCCTTTG	19	60.82	
46	SLC28A1*	rs2290272F	CTGCAGACAGGCTGGAGTTC	20	60	562
		rs2290272R	CCCGGGTGCTATTGTGTG	18	60	
47	~ RGS7	rs1557078F	CAGTATTCCCTTTCACACATATTC	24	60.14	362
		rs1557078R	GGAAGTGTCTCCTATACCATACC	23	59.27	
48	GABRA1*	rs4317369F	CCTGCAACTTGCCACCATAG	20	62 - 63	505
		rs4317369R	GGTCTCCAAGAGGCATGCTG	20	62 - 63	
49	~ UBE2E2	rs7619223F	CAGGAGGGTAATAGGAGGC	19	60.05	435
		rs7619223R	GGTGGAAGCAAACAGTATGG	20	61.91	
50	OR4U1P	rs2775220F	TGTGGTCTCAGTGTTGTGG	19	60.85	504
		rs2775220R	CCTCCACTTCAGTGTCTTTG	20	59.87	
51	COL13A1	rs2763342F	CCAACCACATTGTACAACG	19	59.86	402
		rs2763342R	TTGGGAGTAGAGGATGGG	18	60	
52	USP34	rs4387777F	CAAGGTTATGGTGACCAATG	20	60.24	520
		rs4387777R	CTGTGCTATCCTTTCTTAAGCC	22	60.76	
53	EVA1	rs1624780F	AGACGTGCTCATGCTCGTTC	20	60	574
		rs1624780R	AATGGCATGTAACCTGAGATTAG	23	60.75	
54	~ LOC728103	rs1472034F	AAGAAGCAGTCAATAACCCAAC	22	60.91	492
		rs1472034R	AACACACCTACAGAACATGTCC	22	60.35	
55	интергенен	rs12489378F	AGCTTGCTCCATACCAGG	18	60.39	428
		rs12489378R	GAAGTGGCCACTTGAGTTAG	20	58.9	
56	интергенен	rs1376481F	GACTGTGGAGTTTGCTGG	18	59.34	514
		rs1376481R	TGTAATTCTCCAGGTCCTACAG	22	59.63	
57	~ RGS7	rs1341446F	CTGGGATTGCTTCTGAGTAAC	21	60.27	478
		rs1341446R	TACTCTGTAGCCCTTCAAATTTC	23	60.15	
58	RGS6	rs2190937F	CAGTGAGACCCATTTCAGAC	20	59.68	467
		rs2190937R	CCAAAGTCATTACGAGCAAC	20	59.73	

59	интергенен	rs9867153F	GGGATAACAACACTCCAGC	19	59.51	468
		rs9867153R	CCCTCCTACAACTACCAGAGTC	22	60.56	
60	~ DEDD2*	rs11880124F	AACCGCCCTTCGCTTTG	17	62	117
		rs11880124R	TTCTCCATACACGTGGGCAG	20	62	
61	интергенен	rs2077857F	TCATGTCCTACCACACATATATTG	24	60.03	440
		rs2077857R	GTATCATGCCTTCATTCCC	19	59.28	
62	SLC12A8	rs2945118F	GATTATAGGCACCTTCCACC	20	59.79	432
		rs2945118R	CCAACCCTAAATGTAACTCTAACC	24	60.5	
63	SLC12A8	rs2981514F	ATCTCTAGACAGTGCTGGATTG	22	59.9	356
		rs2981514R	CCATCGAAACTGTAGGTGTG	20	60.59	
64	PALLD	rs11132322F	GATTAGGAACGGAGCATAGAG	21	59.32	437
		rs11132322R	CTGAAATGGAACAGCTGG	18	59.31	
65	интергенен	rs2309979F	CTTTCCACAGCTCAGACAAG	20	60.18	444
		rs2309979R	GCAAAGCTAGAAGACGGG	18	60.1	
66	интергенен	rs7042172F	TTCATATAGCATTGTAATTGTAGGG	25	59.7	476
		rs7042172R	TTTGAAGTTGAGTTAGGTGGTC	22	59.65	
67	ZNF508*	rs1064059F	GGACTGTGGAAGGTTAGCATCTG	23	60	567
		rs1064059R	TGATACATTAACGCATCCTGGC	22	60	
68	ZNF508	rs9304062F	ACTTCATCAGGATTCTGCC	19	59.17	370
		rs9304062R	CAAGCTCCACAGAACAGTAATC	22	60.32	
69	~ RALBP1	rs1979368F	CTCTGTGCTAGGTATGAATGG	21	58.79	400
		rs1979368R	ATATGGACCAAGGCAATG	18	58.23	
70	~TRPM3	rs10869019F	AGCAGAAGCAACACCTGG	18	61.67	413
		rs10869019R	AATGTTTAGCTCGCACTTGG	20	61.75	
71	BAT5*	rs1266071F	TTTCAGACCCACCTGTCCTC	20	60	688
		rs1266071R	GACAGGGACAGGCAATCAATAC	22	60	
72	DGKB	rs6977358F	TCAATCACCGATACCCTTTC	20	61.27	420
		rs6977358R	AAGAGGTCCTTCCCATCC	18	60.43	
73	~ CEP135	rs2702340F	CCACTATCCATTGCCTGAAC	20	61.89	339
		rs2702340R	CAGGCTGACTTAAGGAGGG	19	61.35	

74	интергенен	rs1477268F	GACTATGTGGTGGATATAGAGCC	23	60.25	351
		rs1477268R	AATGTATTGGACTTATGTCTTTGC	24	59.81	
75	интергенен	rs10982853F	GATTGCATCTCCAGATAGGC	20	61.15	454
		rs10982853R	TTATAGGTCTGTGTTTCCAGGG	22	61.64	
76	интергенен	rs702192F	CTGTTTATTCTGTCCATTGACG	22	60.94	377
		rs702192R	AATTATTTCTGGAGGACCACTG	22	60.74	
77	~ NCOA4P	rs12894020F	CCAAAGCATTTCTTAGTGCAG	21	61.32	478
		rs12894020R	CCAAGATCCAGAGGAACAAG	20	61.21	
78	PCDH15	rs1561674F	CTGTTTAAACACCAACTTGGG	21	60.82	542
		rs1561674R	CACGTAGGTATTACTTCATTATCCC	25	60.37	
79	PCDH15	rs7078920F	AATTAGAGAAATGCACTGAGGG	22	61	369
		rs7078920R	GGCCCACATTTCTATTTGATATAC	24	61.11	
80	RALBP1	rs329017F	ATTCCGTGTGTTTAGACAAATG	22	60.29	430
		rs329017R	CAGTCAGAGAACAGCCTGG	19	61.23	
81	PTPRN2	rs11773068F	GGGTGAATTCCATAAATTAAGG	22	59.92	390
		rs11773068R	CCTTACTCACTCCTGGTGG	19	59.68	
82	интергенен	rs17291402F	AAAGATTTGCAGATGCAGG	19	60.37	419
		rs17291402R	TGAGCAGAGATGAGATCAGC	20	60.87	
83	интергенен	rs11591564F	TGAGCTCAAGCAATATGCC	19	61.52	464
		rs11591564R	TCCAAATACAGTAGAAAGTTCAGTG	25	60.11	
84	интергенен	rs1563797F	GTTGTAGATTACGTGGGCTG	20	59.61	517
		rs1563797R	CCATTTCAAATTAGATTGCTCTC	23	60.45	
85	ACN9	rs12671685F	GTGAGTCTTTCTACCCAAGATG	22	59.23	323
		rs12671685R	GGAAACAACCAACATCAGG	19	60.37	
86	интергенен	rs7653056F	TTTCTGTAAGCTAAATTAGGTCCC	24	60.36	530
		rs7653056R	AGAAATAGCCACAAATACTTCCTC	24	60.38	
87	SYNPR	rs6767034F	ATAGAAGAGTTAGATTGGCATGG	23	60	456
		rs6767034R	GGACAGTCAACCTTTACCG	19	59.55	
88	интергенен	rs10507408F	TGAGATAATGTGTCTGGCTTG	21	60.28	435
		rs10507408R	TCCAAAGATCCTGATGCTG	19	61.39	

89	CLDN10	rs7993213F	TACTGCCTTGGCCTCTTAAC	20	60.79	487
		rs7993213R	TTCATTCTTCATTGACTTCTGAG	23	59.87	
90	CDKAL1	rs10946415F	CCAACTCTGTTACCTGGAGC	20	61.27	384
		rs10946415R	GATTATATATGGCAAAGAGGGATTC	25	61.46	
91	SIL1*	rs11745848F	AAGTCCCACCTCCTGTCAGC		62	162
		rs11745848R	GAAGCCTTGCTATGGGTTGC		62	
92	FAM98B*	rs4924268F	TGATGTCCCTGGAACTATTCTGC		63-64	126
		rs4924268R	ATCGGTTCTGGATTGGAGGC		63-64	
93	EVA1	rs3759001F	CTCATTCACCCTGCCATC	18	61.73	451
		rs3759001R	AACTGCATGTGTAATCTTCATCC	23	61.68	
94	интергенен	rs961013F	CTCTCTCAGCTGGATTAAAGG	21	59.59	372
		rs961013R	AACAGTCTATGGGTGGGTAAC	21	59.22	
95	интергенен	rs5019857F	AAAGGAGGTGATGGTTGAG	19	59.05	491
		rs5019857R	TCAGCATCCACAATAACTCAG	21	60.28	
96	CHRNA9	rs4447895F	GCTGGGACTATAGGCATGAG	20	61.19	480
		rs4447895R	TCTCAGGAGACCACCACC	18	61.38	
97	интергенен	rs1537966F	GGTAACTTGGGAATGGGTG	19	61.59	419
		rs1537966R	CCTGTCACTAATTCACCGTAAAC	23	61.17	
98	DLG2*	rs7121214F	GTTCCGGGCAAATAGAACTGT			164
		rs7121214R	GCTTCATAGAGGTAGTGATAC			
99	MAPKAP1	rs829179F	TCTATGAACAGTCTTGCTGGTC	22	60.86	404
		rs829179R	AAGGTCTCACTGTGTTGCC	19	60.32	
100	~LOC645261*	rs2032794F	GGGAATGTGTTCTGTATGGTGC		61-62	369
		rs2032794R	GAGGAGGACCTGAAATTCTTGC		61-62	

Маркерите са подредени по нарастване на минималната стойност на P (P_{min}) след цялостния геномен асоциативен скрининг.

*Двойките праймери са любезно предоставени за ползване от Лабораторията по развитие на методите за генотипиране към институт RIKEN в Йокохама, Япония

~Маркерът е разположен на разстояние не повече от 100kb от съответния ген

Приложение 4

Таблица 10: Използвани проби (Invader, VIC и FAM) при генотипиране на стоте кандидат маркера.

N	Ген (NCBI)	SNP ID	VIC: CGCGCCGAGG Проба FAM: ATGACGTGGCAGAC	Tm (C°)±	Дължина**
		rs1971058_inv	GCAAAAATACCTTTTATACTCATTTCTAATATAGCCTATTAAGAGGACTTTTTGTTTTTGT		61
1	LOC728103*	rs1971058_C_VIC	CGCGCCGAGGCTTTCTAGCAATTCATGACTG		31
		rs1971058_A_FAM	ATGACGTGGCAGACATTTCTAGCAATTCATGACTG		35
		rs1506223_inv	CATATGTAAAATTAGTTTTATTTCAACTTTCTATGAAATGGTGAAAGATCAGGATTTGT		59
2	интергенен*	rs1506223_A_VIC	CGCGCCGAGGACATGTAGTTTAACAGCCT		29
		rs1506223_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCATGTAGTTTAACAGCCT		33
		rs6859725_inv	GCCCAAGCTGTATTTGTCTCCTCCTAACACTATTGCAATT	65.7	40
3	LOC728103	rs6859725_A_VIC	CGCGCCGAGGAGCCTCCTAACTTTTTAAACTTC	53.3	33
		rs6859725_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGCCTCCTAACTTTTTAAACTT	52.9	36
		rs8099939_inv	CATCCCTCGATTAAAACAAGAGGTGCATTTCTGGAGATTTTGGTTTATATTATT		54
4	GRIK5*	rs8099939_A_VIC	CGCGCCGAGGAATCATGCAAAAAAAAAAAACTTG		34
		rs8099939_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCATCATGCAAAAAAAAAAAACTTG		38
		rs8109263_inv	GATTTTGTTCAGTCAGGCACCCCCAAATCAAAAGTCAAATTAAAGA	65.1	46
5	~ ZNF626	rs8109263_G_VIC	CGCGCCGAGGGTGCCCTCCAGTAAGT	52.6	26
		rs8109263_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTTGCCCTCCAGTAAGTAG	53.5	32
		rs1975804_inv	GTATCGTTGTTAATTTTTAAAGTTGAACCATGGTTTATATACTGGTCCTTTGTGAATA	64.2	58
6	~ EIF3S6	rs1975804_T_VIC	CGCGCCGAGGTTGAGTAGTGTGAGATGAAGA	52.6	31
		rs1975804_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTGAGTAGTGTGAGATGAA	51.7	33
		rs6122972_inv	GACTAATGGGGCTGGTCAGTAGTCAGAGTGTTCT	66.6	34
7	PARD6B	rs6122972_A_VIC	CGCGCCGAGGAGAGTGGGAGGATGTTG	53.1	27
		rs6122972_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGAGTGGGAGGATGTT	52.6	30
		rs2289700_inv	AGCCACAGGCGACCCCCTGCT		21
8	CTSH*	rs2289700_A_VIC	CGCGCCGAGGAGAGGACACCCCATC		25
		rs2289700_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGAGGACACCCCATC		29
9	CTSH	rs16970287_inv	CCACTGCAACCCATCTCCTTTAAGTTTTTGTATTTAATATAATTCAGTAGATAATTCAT	64.1	59
		rs16970287_A_VIC	CGCGCCGAGGATCAGCCCTTACAGTGC	53.1	27

		rs16970287_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**TCAGCCCTTACAGTG	52.6	30
		rs10491291_inv	GGGGCTGGCACTGGAGTAGGTCTCTA**A**	66.6	27
10	FSTL4	rs10491291_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**TTCAATACCCAATCTGAGC	54.3	30
		rs10491291_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**TTCAATACCCAATCTGAGCA	52.6	35
		rs1813100_inv	GTTCCTTGGTGTTAGGTGACTCTGCTAATGTTTTTTCTCTTGGT**T**	66.1	45
11	RALBP1	rs1813100_G_VIC	CGCGCCGAGG**G**CAGGTGTAATGGATAGG	53.5	28
		rs1813100_A_FAM	ATGACGTGGCAGAC**A**CAGGTGTAATGGATAGGTAA	52.6	35
		rs1135990_inv	GTCTCCATAGAGTAACAGTAAAGAAACTGATGTAACAGACTCTC**A**	65.2	45
12	TACC1	rs1135990_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**TCTCAAAGGATCTCCTC	53.5	28
		rs1135990_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**TCTCAAAGGATCTCCTCTG	54.3	34
		rs2283380_inv	GGGCAATTCCTGAACCGTCCAGGGCT**T**		27
13	RGS6*	rs2283380_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**GAAAACCTGTAGCAAAGG		29
		rs2283380_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**GAAAACCTGTAGCAAAGG		33
		rs11192617_inv	CTAGTGTTGTCTACACTGCAGGACAGTGGCAACAA**T**	66.3	36
14	интергенен	rs11192617_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**AGTCAACAGATTAAGATAAAAATTACC	53.2	38
		rs11192617_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**AGTCAACAGATTAAGATAAAAATTAC	52.9	41
		rs951030_inv	CCATGAACAAAAATTGTGTGTGGGAAAAGGGAAGAGGTCAAAAAACA**T**	65.7	48
15	интергенен	rs951030_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**TACATTCTTTTCTTCTGACACC	53.3	33
		rs951030__G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**TACATTCTTTTCTTCTGACAC	52.9	36
		rs6795228_inv	GCATTACCCATTATCTCTCAAAACTAGCTGTTATTTTTTTCCGCATTTAT**A**	63.8	51
16	MAGI1	rs6795228_T_VIC	CGCGCCGAGG**T**CACTCACATGCCTATTAC	51.7	29
		rs6795228_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**CACTCACATGCCTATTA	51.2	32
		rs4814074_inv	GGTCACCATCCATTTCCCTCCATTTTCTTCATTATTGGGC**T**	66.6	41
17	интергенен	rs4814074_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**TGAGAGATCAGACAACCAT	52.2	30
		rs4814074_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**TGAGAGATCAGACAACC	53.5	32
		rs11129950_inv	GCATTTACCATATTGTATCTTAATTTCCTACAATAGGGCTTGGGAC**T**	64.9	47
18	LOC391530	rs11129950_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**TAGCTGCTCAATGAATATTTGTT	51.9	34
		rs11129950_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**TAGCTGCTCAATGAATATTTG	52.9	36
19	PTBP2	rs10875032_inv	GGCTGTAAATTTATGCCAACCTATAGACACAACTTTGGTTACGTCT	65.9	46
		rs10875032_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**TTCTCTCAACGCCTGTTG	53.9	29

		rs10875032_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTTCTCTCAACGCCTGT	53.1	31
		rs12479608_inv	CAGCCTGCCCTGTATGTAGGCAGAGAGT	66.4	28
20	интергенен	rs12479608_A_VIC	CGCGCCGAGGATTTGGGAAGCCAGAAAGAG	54.3	30
		rs12479608_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTTTGGGAAGCCAGAAAG	53.5	32
		rs4660080_inv	CACTTCAAACAAGGATAACCTGGATTTCTGTTGCCACATTAGATAGAT	65.8	48
21	~ RGS7	rs4660080_A_VIC	CGCGCCGAGGACAGTTTGCAGCAGACTC	53.5	28
		rs4660080_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCAGTTTGCAGCAGACT	53.1	31
		rs2029516_inv	GGCATAATTTTTCTTCTTTATAGACCAGTGTCTATTGTAGTAGACCCTAGA	65.4	51
22	интергенен	rs2029516_T_VIC	CGCGCCGAGGTAAGCATTTGTTATTTGAATAAATATGCAG	53.7	40
		rs2029516_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCAAGCATTTGTTATTTGAATAAATATGC	53.2	42
		rs2249395_inv	GTGTGTTTAATATAATTACCACTAAGAGAGGATTTACACCTACTGTTTTCTT	63.8	52
23	~ CLEC14A	rs2249395_T_VIC	CGCGCCGAGGATTTGTTTTCCACATGTCTTATGT	52	34
		rs2249395_C_FAM	ATGACGTGGCAGACGTTTGTTTTCCACATGTCTTAT	51.1	36
		rs9534415_inv	CCAGATTGTAATTGTCTTGTGGGTCAAGCCAAGAAGTTTAGATGTTT	65.8	47
24	COX17P/LRCH1	rs9534415_A_VIC	CGCGCCGAGGATCTTAGAGGTAGTCATAAGC	52.6	31
		rs9534415_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTCTTAGAGGTAGTCATAAG	52.2	34
		rs11951994_inv	TGTACCTGATATTTACATGTATTTTATAGCTAATTCTGCAATAATCCACAATTGT		55
25	интергенен*	rs11951994_G_VIC	CGCGCCGAGGGATTGCATTGACTTGAGTTT		30
		rs11951994_A_FAM	ATGACGTGGCAGACAATTGCATTGACTTGAGTTTT		35
		rs7621975_inv	GCCTTCAGGAAAGACACAGTACTAGTAATAATAACCACCAGTTACTGAT	66.4	49
26	~ HTR3D	rs7621975_A_VIC	CGCGCCGAGGATTATTAATACGCGGCAGGC	54.25	30
		rs7621975_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTTATTAATACGCGGCAGG	53.9	33
		rs10476364_inv	CGAGGTTCCACCATTGCCACTCCAACTCAT		30
27	~ GABRA6*	rs10476364_A_VIC	CGCGCCGAGGACAAGGATCAGCCCC		25
		rs10476364_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCAAGGATCAGCCC		28
		rs6673531_inv	GAAATGATAGCTTTAGTGGTTTTCTATTGGGAACCAAAAGTCATATATAACAAATTCAT	64.1	59
28	~ LOC653702	rs6673531_A_VIC	CGCGCCGAGGATAAGAGTGAGGAGAATGACT	52.6	31
		rs6673531_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTAAGAGTGAGGAGAATGA	51.7	33
29	~ LOC728103	rs11958003_inv	GCCCACATCCATGGGTGGTAACATTAATTCATGTCCT	66.1	37

		rs11958003_A_VIC	CGCGCCGAGGAACAAATCCATAGTTTTCCCAAAG	53.6	34
		rs11958003_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGACAAATCCATAGTTTTCCCAAA	53.3	37
		rs1959718_inv	catggaatttcatctgaacaactaaaaaggtggagtagctgtttaaggA		49
30	интергенен*	rs1959718_T_VIC	CGCGCCGAGGTgttaggaaatgtcccag		28
		rs1959718_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCgttaggaaatgtcccag		32
		rs733250_inv	CATTGCTAGAAAATGATGCTACTTACAGCAAGTGACAAGTCAAAGAAGA	65.6	49
31	~ LOC728103	rs733250_T_VIC	CGCGCCGAGGTTACACATTCCTGCTCTTCAAA	52.9	32
		rs733250_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTACACATTCCTGCTCTTC	53.9	33
		rs1862019_inv	TTGCCCTGGTTCTATGATGTGAACTGCCCATTTCTTTTAGTTATCA	65.9	46
32	интергенен	rs1862019_T_VIC	CGCGCCGAGGTGCCTCTAGAGAAAGGTAG	53.9	29
		rs1862019_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCGCCTCTAGAGAAAGGT	53.1	31
		rs10746876_inv	GCTATGGGAAAATTATACTCCCTTTTAGGAAAAAAACAATCTCATATATTCCCTGA	65.1	56
33	~ TRPM3	rs10746876_T_VIC	CGCGCCGAGGTGGCATCTGTTGACAAGTC	53.9	29
		rs10746876_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCGGCATCTGTTGACAAG	53.1	31
		rs11951528_inv	TCAAGACATTTTTACAGAACAATTAAAAATGCTAATCCAATAATAATTTGCCAT		54
34	~ GABRA1*	rs11951528_A_VIC	CGCGCCGAGGAACCTAACCATGATCTAAACC		31
		rs11951528_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGACCTAACCATGATCTAAACC		35
		rs1903905_inv	GCGTACCCTAGGCATCCTAATAAATGGTATGGGTCA	66.3	36
35	~ SORCS1	rs1903905_T_VIC	CGCGCCGAGGTTAGCACTGAGGAACAAAAATG	52.9	32
		rs1903905_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTAGCACTGAGGAACAAAAAT	52.6	35
		rs10965002_inv	GTCTCCAGGTGTTCCAGCTGCTGATGACT	66.2	29
36	IFNWP19	rs10965002_A_VIC	CGCGCCGAGGATAAAGTGTGGAGTTGGTCC	54.25	30
		rs10965002_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTAAAGTGTGGAGTTGGTC	53.9	33
		rs10095297_inv	GACTTGAATGACTGAGCTGATATTGAGAACTTTGATCAGGAAAACATGA	65.6	49
37	интергенен	rs10095297_A_VIC	CGCGCCGAGGATGGAAGAGAAGTCATTTTGAAG	53.3	33
		rs10095297_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTGGAAGAGAAGTCATTTTGAA	52.9	36
		rs875069_inv	CACTGCAATTAAAAGTAGGTCATTTGAGACAATCCCATGGCT		42
38	интергенен*	rs875069_G_VIC	CGCGCCGAGGGTCACATATAGGAATATTTCTTGTc		35
		rs875069_A_FAM	ATGACGTGGCAGACATCACATATAGGAATATTTCTTGTc		39

		rs3123209_inv	GTCTGAGAATCGATTCAGGTGGTGCATGTGGAC**T**	66.6	34
39	~TCERG1L	rs3123209_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**CACTCCACGACTGATTC	53.5	28
		rs3123209_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**CACTCCACGACTGATT	53.1	31
		rs13252226_inv	GATAAATCTCAAGACTGACTGGCAAAGAAAAAAAAATGAACAATATCAAGAATGA**T**	63.6	56
40	~ TACC1	rs13252226_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**AGAAGGGACATTATTACTTTGG	53.3	33
		rs13252226_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**AGAAGGGACATTATTACTTTG	52.9	36
		rs708345_inv	ggtcacacagcatagtggctgcagttccag**A**		31
41	интергенен*	rs708345_T_VIC	CGCGCCGAGG**T**gtatgtccagaaacaaca		29
		rs708345_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**gtatgtccagaaacaaca		33
		rs325921_inv	GCAATTATTAGGCATCTCTTTAAATGCAGGCAACCACAGC**T**	65.6	41
42	TMEM77	rs325921_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**ATAAGAGAATTTTTTCCAATCCTGC	54.2	36
		rs325921_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**ATAAGAGAATTTTTTCCAATCCTG	53.9	39
		rs4903024_inv	gccacttccagacctggaccataaaaactcctacat**T**		37
43	RGS6*	rs4903024_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**gctctccttagctctg		27
		rs4903024_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**gctctccttagctct		30
		rs11216747_inv	CAGACGGCTTCTATCCCAGGTGACTTCTTCT**T**	65.7	32
44	TMPRSS4	rs11216747_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**GAGGGAGAGCACAGT	52.6	26
		rs11216747_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**GAGGGAGAGCACAG	54.8	29
		rs325894_inv	GCTTGGAGGAAAGACAGAAGAGAGTAAGGATTTCTCTG**T**	65.8	39
45	~ TMEM77	rs325894_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**GAACCCAAGGAATTCTCC	53.9	29
		rs325894_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**GAACCCAAGGAATTCTC	53.5	32
		rs2290272_inv	TGGTGTCCTTCGCAGGAATCTGCGTGTTC**T**		30
46	SLC28A1*	rs2290272_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**TCGCTCTCCTCTTTGC		27
		rs2290272_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**TCGCTCTCCTCTTTG		30
		rs1557078_inv	TTTCCTTGCTCAGGCTGTGCTAAAGTCTGACCC**A**	66.6	34
47	~ RGS7	rs1557078_T_VIC	CGCGCCGAGG**T**GTTTATTGGCCTGAAGTCAAT	52.9	32
		rs1557078_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**GTTTATTGGCCTGAAGTC	53.9	33
		rs4317369_inv	TGCCATGAGTGTGGCCAAGAATAAAATGTAGAAAA**T**		36
48	GABRA1*	rs4317369_G_VIC	CGCGCCGAGG**G**CATAACACTCCATTGGA		28
		rs431736_A_FAM	ATGACGTGGCAGAC**A**CATAACACTCCATTGGATAA		35

		rs7619223_inv	GTCCTAAGTTGAACTGCTAATATTCCTCTCAGAGGTGCTTTAC**T**	66.2	44
49	~ UBE2E2	rs7619223_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**CTCAGTCTTCCCCCTT	53.1	27
		rs7619223_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**CTCAGTCTTCCCCC	54.8	29
		rs2775220_inv	TCCAGGGGGTCTTCCAAAACTCTGTCCAC**A**	66	30
50	OR4U1P	rs2775220_T_VIC	CGCGCCGAGG**T**CTTTCAGCCCACATTATGG	54.3	30
		rs2775220_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**CTTTCAGCCCACATTATG	53.9	33
		rs2763342_inv	CCGGGGACGCTGCGAGGAGAG**A**		22
51	COL13A1*	rs2763342_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**TGACTAATAAACCTTCCCC		30
		rs2763342_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**TGACTAATAAACCTTCCCC		34
		rs4387777_inv	CAGTAATTAGTTCAAAATGATTTAGAAGTAGTGCAGTAGAGTAAGACC**A**	64	49
52	USP34	rs4387777_T_VIC	CGCGCCGAGG**T**GGATTCTAGGACTCTTCT	51.7	29
		rs4387777_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**GGATTCTAGGACTCTTC	53.5	32
		rs1624780_inv	GGTAAGAGCCGGCGGGCTTCTCTCAG**T**		27
53	EVA1*	rs1624780_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**GTTTCCTCCTTCACTGC		28
		rs1624780_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**GTTTCCTCCTTCACTG		31
		rs1472034_inv	GGAAAGCAATCCATTTGGCTGGAGCACAGGAG**A**	66.7	33
54	~ LOC728103	rs1472034_T_VIC	CGCGCCGAGG**T**GGAAGTGAAAGTGAGGG	53.5	28
		rs1472034_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**GGAAGTGAAAGTGAGG	53.1	31
		rs12489378_inv	GAGTCTCCTTTTCCAAATCTACATTTAGATGTCCTCCCTTTAC**T**	65.3	44
55	интергенен	rs12489378_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**ACTGCTTCTGTGACCATC	53.9	29
		rs12489378_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**ACTGCTTCTGTGACCA	53.1	31
		rs1376481_inv	ACAGCTTTAATTCCTAAATTTCTGGGCCTTATGGCAAAAAGGGAG**T**	65.9	46
56	интергенен	rs1376481_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**GGGAAAACTGGATGAAATTTATTC	53.9	35
		rs1376481_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**GGGAAAACTGGATGAAATTTATT	53.6	38
		rs1341446_inv	CTCTCTTTTCTGGTTTCCTTCACCAGGAAAAAGTATAGTCCTAAATGAC**A**		50
57	~RGS7*	rs1341446_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**GAAATAGCTCTCAGTGTC		29
		rs1341446_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**GAAATAGCTCTCAGTGTC		33
		rs2190937_inv	GGCCAAATTGTTCATCCTCTTTGTCTTTAATATACCAGCATCTCC**T**	65.9	46
58	RGS6	rs2190937_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**AGCACCCCGCTGAC	54.7	25
		rs2190937_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**AGCACCCCGCTG	53.8	27

		rs9867153_inv	GCACACACACGAGCGTCGGTTGTTTTATCATTGCAAATAG**A**	66.6	41
		rs9867153_T_VIC	CGCGCCGAGGTTCTTAGTTATGCACAACCTGT	52.9	32
		rs9867153_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTCTTAGTTATGCACAACCTG	54.6	35
		rs11880124_inv	GAGGGTCCCGCGTGTCCACTCAGTA**A**		26
60	~ DEDD2*	rs11880124_T_VIC	CGCGCCGAGGTGCATGGGGTAGCC		24
		rs11880124_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCGCATGGGGTAGC		27
		rs2077857_inv	ggaggctcagggaacttaaatagatttcataaagttaaattcttagaaaata**A**		53
61	интергенен*	rs2077857_T_VIC	CGCGCCGAGGTtgggactgagaccttt		27
		rs2077857_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCtgggactgagacctt		30
		rs2945118_inv	GTGCCTGGCCTGCACATTTGTTATAGGGG**A**	66	30
62	SLC12A8	rs2945118_T_VIC	CGCGCCGAGGTTCACACACTGTGGCTG	53.1	27
		rs2945118_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTCACACACTGTGGCT	52.6	30
		rs2981514_inv	CTCCCTGCATCACAACGATGATCTGTCTGGTC**A**	66.7	33
63	SLC12A8	rs2981514_T_VIC	CGCGCCGAGGTGCACACTGTTACCATGTG	53.9	29
		rs2981514_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGCACACTGTTACCATGT	53.5	32
		rs11132322_inv	GAGAGGGGTAATTTGCTGCAGGTGGAACCA**A**	65.8	31
64	PALLD	rs11132322_T_VIC	CGCGCCGAGGTTTTATTCAGACCTGAGCACC	54.6	31
		rs11132322_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTTTATTCAGACCTGAGCAC	54.3	34
		rs2309979_inv	GAACACTTTGGTGTCTTGAATTTAAAAGGCTCCTTTGATCTCC**A**	65.3	44
65	интергенен	rs2309979_T_VIC	CGCGCCGAGGTACACAACTTAGCAGCTGC	53.9	29
		rs2309979_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCACACAACTTAGCAGCTG	53.5	32
		rs7042172_inv	GAGTAATCACAAGAAGGAGAAGCATAAACTACAAAATCTGCAGGG**A**	65.9	46
66	интергенен	rs7042172_T_VIC	CGCGCCGAGGTTGGAACATTTAAAAAATACATACATTTATC	52.6	41
		rs7042172_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTGGAACATTTAAAAAATACATACATTTAT	52.3	44
		rs1064059_inv	AGTTGTGGGAAGGCACTTCAGAATGTTCCATGC**T**		34
67	ZNF508	rs1064059_A_VIC	CGCGCCGAGGACCTGTCCGGAAAGTC		26
		rs1064059_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGCCTGTCCGGAAAGT		29
		rs9304062_inv	GTTTTTCACAAGAAACTACTGTCTTTCATGGGTGGTAGGTG**A**	65.5	42
68	ZNF508	rs9304062_T_VIC	CGCGCCGAGGTTATGAATAATGACTGTGAAGTGG	53.6	34
		rs9304062_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTATGAATAATGACTGTGAAGTG	53.3	37

		rs1979368_inv	GAGCTGAAGTGAATGTTTCTGGCTGAGTCACAAATAGC**T**	65.9	39
69	~ RALBP1	rs1979368_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**TATCTACATGTTGCAGCCAG	54.6	31
		rs1979368_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**TATCTACATGTTGCAGCC	53.9	33
		rs10869019_inv	GTGGTTTAACAAGCCCTCCAGGTGATTCTGATATATGCTAACA**A**	66.2	44
70	~ TRPM3	rs10869019_T_VIC	CGCGCCGAGG**T**CGAGAACCACCATCATAG	53.9	29
		rs10869019_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**CGAGAACCACCATCATA	53.5	32
		rs1266071_inv	CTGGTCCCCAAGAGATGCGCAAACGTCA**A**	66.2	29
71	BAT5	rs1266071_T_VIC	CGCGCCGAGG**T**CACAGGAACTGTGCCA	53.1	27
		rs1266071_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**CACAGGAACTGTGC	52.1	29
		rs6977358_inv	GCCATGGTTTTCAGCTCCATCAGGTCATTTAAAGTCTTCTCT**T**	66.3	43
72	DGKB	rs6977358_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**CATTGCTTATTCTAGTTAGCCA	53.3	33
		rs6977358_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**CATTGCTTATTCTAGTTAGC	52.6	35
		rs2702340_inv	ccagaatatgggaagagaaggttttaccatttgttcttggaagc**A**		45
73	~ CEP135*	rs2702340_C_VIC	CGCGCCGAGG**C**aggatactatgacatcaaag		31
		rs2702340_T_FAM	ATGACGTGGCAGAC**T**aggatactatgacatcaaagc		36
		rs1477268_inv	CGCCATGAAGGCATGACACTAGGCAATGAGTAGTCAAATA**A**	66.6	41
74	интергенен	rs1477268_T_VIC	CGCGCCGAGG**T**GGAAAGGCATTGATTTGGTG	54.6	31
		rs1477268_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**GGAAAGGCATTGATTTGG	53.9	33
		rs10982853_inv	GCTGACATAGAAGGCTTGAGGCCATAAGATTATGAAGGA**A**	65.7	40
75	интергенен	rs10982853_T_VIC	CGCGCCGAGG**T**AGACCCTCCCGGC	54.4	24
		rs10982853_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**AGACCCTCCCGG	53.8	27
		rs702192_inv	GAGGGAACAAACCACCATGAGCAAGTCATGAGAAACA**T**	66	38
76	интергенен	rs702192_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**CAACAAAGCACATTATTCTATCTATAA	53.2	38
		rs702192_G_FAM	ATGACGTGGCAGAC**G**CAACAAAGCACATTATTCTATC	53.3	37
		rs12894020_inv	ATGCCGGTGGGCACAGGTCTGTGTGA**T**	66.6	27
77	~ NCOA4P	rs12894020_A_VIC	CGCGCCGAGG**A**TTCTCTGTGCTCTGTAAGC	54.3	30
		rs12894020_C_FAM	ATGACGTGGCAGAC**C**TTCTCTGTGCTCTGTAAG	53.9	33
78	PCDH15	rs1561674_inv	GACAAAGCATAAGAGAAAAATGACAAAAAAATGTTATCTCCTCAGCCAGTTTTAAT**A**	64.3	57
		rs1561674_T_VIC	CGCGCCGAGG**T**ACTTGGTAGTAGTTGCCT	51.7	29

		rs1561674_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCACTTGGTAGTAGTTGCC	53.5	32
		rs7078920_inv	GAGTATAAGTTATCCAAGCCAGCCTGTGCAACAGATGAA**T**	65.7	40
79	PCDH15	rs7078920_A_VIC	CGCGCCGAGGAGATTTCAAAGCCTAGAACATG	52.9	32
		rs7078920_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGATTTCAAAGCCTAGAACAT	52.6	35
		rs329017_inv	CTCCTCCCTAAACCCTGGCTACTACTAATCCTTC**A**	66.4	35
80	RALBP1	rs329017_T_VIC	CGCGCCGAGGTACTGTCTCTATAGTTTTGCTTTTTG	54.2	36
		rs329017_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCACTGTCTCTATAGTTTTGCTTTTT	53.9	39
		rs11773068_inv	CATGGAATCAAAATGCGATCAGAGCATTATGGCCAAATAATCCCTAAG**T**	66.5	49
81	PTPRN2	rs11773068_A_VIC	CGCGCCGAGGAAAAACACTGATGGTACACACAA	53.3	33
		rs11773068_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGAAAACACTGATGGTACACAC	54.6	35
		rs17291402_inv	GGCCTAATCTGGGTTCAAGACTCATTCTAGGTCAG**A**	66.3	36
82	интергенен	rs17291402_T_VIC	CGCGCCGAGGTGGCCATGAGTAACCAG	53.1	27
		rs17291402_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCGGCCATGAGTAACCA	52.6	30
		rs11591564_inv	GAGAGCTTCCAAAAAGGTATGAATGATCCTCTGCTCTGAACT**T**	66.3	43
83	интергенен	rs11591564_A_VIC	CGCGCCGAGGAGATCAAATGATCTCCCAAAG	52.6	31
		rs11591564_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGATCAAATGATCTCCCAAA	52.2	34
		rs1563797_inv	CTTCTCTCACCTTTTGATTTGGAAGCCAACTGTCAGTTTT**A**		41
84	интергенен*	rs1563797_C_VIC	CGCGCCGAGGCGATGTCTTCACCTGATAAA		30
		rs1563797_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTGATGTCTTCACCTGATAAAA		35
		rs12671685_inv	CCCATAATTATTATAAATTATACCCTAAGTGAAATATTCTCTGAAATTATGCACA**T**	62.1	56
85	ACN9	rs12671685_A_VIC	CGCGCCGAGGAAGTTATGAAAATTTTCAAAAATGGG	51	36
		rs12671685_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGAGTTATGAAAATTTTCAAAAATGG	50.6	39
		rs7653056_inv	GGTCAGATATAGGTTCTGAGATCATTTGGCAGTTTGGCTTC**T**	66.4	42
86	интергенен	rs7653056_A_VIC	CGCGCCGAGGAGCCTGGCTGGTCC	54.4	24
		rs7653056_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGCCTGGCTGGTC	53.8	27
		rs6767034_inv	CCATGCAAGCTAAGTCTCAACCACAGACTTTGGGTAT**T**	65.9	38
87	SYNPR	rs6767034_A_VIC	CGCGCCGAGGATTCATGGGCAGATCAACATC	54.6	31
		rs6767034_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTTCATGGGCAGATCAACAT	54.3	34
88	интергенен	rs10507408_inv	GTGCTGCTGGAGAAATTGTTGGGCTTGTTACCTAGTTATCT**T**	66.5	42
		rs10507408_A_VIC	CGCGCCGAGGAGTTACCAGTTGCATCTGG	53.9	29

		rs10507408_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGTTACCAGTTGCATCTG	53.5	32
		rs7993213_inv	GCACATAGGAGGTAATTTGAAAATCTCACCCACTGACAATGCT**A**	66.4	44
89	CLDN10	rs7993213_T_VIC	CGCGCCGAGGTCCCTAAGAACAAGTACAATTAAATTAA	53.2	38
		rs7993213_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCCCCTAAGAACAAGTACAATTAA	53.3	37
		rs10946415_inv	GGTCCAGCAATCTTTGTTTTTAATAAGCCAGCCAAGCGACT**T**	66.4	42
90	CDKAL1	rs10946415_A_VIC	CGCGCCGAGGATGCTGTTCCTTAATGTTTGAG	52.9	32
		rs10946415_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTGCTGTTCCTTAATGTTTGA	52.6	35
		rs11745848_inv	GCCCTTGCATCTACCTTTCACACTGTTGATGACAAT**A**		37
91	SIL1*	rs11745848_C_VIC	CGCGCCGAGGCAAGGTAGAAAAAAGATGTGAG		32
		rs11745848_T_FAM	ATGACGTGGCAGACTAAGGTAGAAAAAAGATGTGAGA		37
		rs4924268_inv	ACTATTCTGCTAC**A**TCCATGTATTACAGGGGACACCCC**T**		39
92	FAM98B*	rs4924268_inv	ACTATTCTGCTAC**G**TCCATGTATTACAGGGGACACCCC**T**		39
		rs4924268_G_VIC	CGCGCCGAGGGTGGCAATCCTAATCCC		27
		rs4924268_A_FAM	ATGACGTGGCAGACATGGCAATCCTAATCCC		31
		rs3759001_inv	GGTAAATGATTTGCCCAAGGTTGCACAGCTACCATG**A**	66.1	37
93	EVA1	rs3759001_T_VIC	CGCGCCGAGGTGGCAAAACCAGAACTTTTCTTA	53.3	33
		rs3759001_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCGGCAAAACCAGAACTTTTC	54.3	34
		rs961013_inv SNP	GCTACCACTTAATAGCTAATGTATGATGGTGATTGTTCCAAGCAC**T**	65.9	46
94	интергенен	rs961013_A_VIC	CGCGCCGAGGATATGCAATAAGAGGTGGACC	54.5	31
		rs961013_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTATGCAATAAGAGGTGGAC	54.3	34
		rs5019857_inv	TTTGTTTAGATTCCAGTGAGGCCTCTCTGGTGCTTTCA**T**	65.8	39
95	интергенен	rs5019857_A_VIC	CGCGCCGAGGATGATAGGGAACCAGGG	53.1	27
		rs5019857_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTGATAGGGAACCAGG	52.6	30
		rs4447895_inv	GCATATGCTCTGTTGGGAATTTTAAAGAAAAATCTTCCATGGTGTGGATT**T**	65.5	51
96	CHRNA9	rs4447895_A_VIC	CGCGCCGAGGATTACATCTTCTGCCTTAGTAAG	53.3	33
		rs4447895_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTTACATCTTCTGCCTTAGTAA	52.9	36
		rs1537966_inv	GGGGGGTTTTCAGAAAGAGGGAAGTGGCCAACATTATTAA**T**	66.6	41
97	интергенен	rs1537966_A_VIC	CGCGCCGAGGATGATGTAGAAACGTTTAATAAGATGAG	54.7	38
		rs1537966_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGTGATGTAGAAACGTTTAATAAGATG	54.2	40
98	DLG2*	rs7121214_inv	CACCAAGGTGTTACATGCTTTTCTGTATTTTTCATTTCTGCTCAAAAATTT**T**		52

		rs7121214_A_VIC	CGCGCCGAGGATCTCTTTTTATCTGCTTAACAAA		34
		rs7121214_C_FAM	ATGACGTGGCAGACCTCTCTTTTTATCTGCTTAACAA		37
		rs829179_inv	GTATAGACCAAGCAACAGATAAAGTAGAGTGACCAATCTGGTTTACCTAT	66.4	50
99	MAPKAP1	rs829179_A_VIC	CGCGCCGAGGAGATGGAGGAAGGGGTT	53.1	27
		rs829179_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGATGGAGGAAGGGG	54.7	29
		rs2032794_inv	CTGTTCTTTGCTCTGAATGTCTTATTGCTTTTTGTAATACATATTTTATCAAAT		54
100	~ LOC645261*	rs2032794_A_VIC	CGCGCCGAGGAGTGCCCAGAGAGATG		26
		rs2032794_G_FAM	ATGACGTGGCAGACGGTGCCCAGAGAGAT		29

Полиморфизмите са подредени по нарастване на минималната им P стойност (P_{min}) след цялостния геномен скан

*Пробите (Invader, VIC и FAM) са любезно предоставени от Лабораторията по развитие на методите за генотипиране в институт RIKEN, Йокохама, Япония

~Маркерът се намира на разстояние до 100kb от съответния ген

±Температура на топене

**Дължина на пробата

9. ЛИТЕРАТУРНА СПРАВКА

[1] Vuoristo JT, Berrettini WH, Overhauser J, Prockop DJ, Ferraro TN, Ala-Kokko L. Sequence and genomic organization of the human G-protein Golfalpha gene (GNAL) on chromosome 18p11, a susceptibility region for bipolar disorder and schizophrenia. Molecular psychiatry. 2000 Sep;5(5):495-501.

[2] Wing JK, Babor T, Brugha T, Burke J, Cooper JE, Giel R, et al. SCAN. Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry. Archives of general psychiatry. 1990 Jun;47(6):589-93.

[3] Mitchell PB, Malhi GS. Bipolar depression: phenomenological overview and clinical characteristics. Bipolar disorders. 2004 Dec;6(6):530-9.

[4] Strober M, Carlson G. Bipolar illness in adolescents with major depression: clinical, genetic, and psychopharmacologic predictors in a three- to four-year prospective follow-up investigation. Archives of general psychiatry. 1982 May;39(5):549-55.

[5] Rihmer Z, Kiss K. Bipolar disorders and suicidal behaviour. Bipolar disorders. 2002;4 Suppl 1:21-5.

[6] Mackin P, Young AH. Rapid cycling bipolar disorder: historical overview and focus on emerging treatments. Bipolar disorders. 2004 Dec;6(6):523-9.

[7] Kramlinger KG, Post RM. Ultra-rapid and ultradian cycling in bipolar affective illness. Br J Psychiatry. 1996 Mar;168(3):314-23.

[8] Baldassano CF, Marangell LB, Gyulai L, Ghaemi SN, Joffe H, Kim DR, et al. Gender differences in bipolar disorder: retrospective data from the first 500 STEP-BD participants. Bipolar disorders. 2005 Oct;7(5):465-70.

[9] Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Faravelli C, Greenwald S, Hwu HG, et al. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. Jama. 1996 Jul 24-31;276(4):293-9.

[10] Sajatovic M. Bipolar disorder: disease burden. The American journal of managed care. 2005 Jun;11(3 Suppl):S80-4.

[11] Faravelli C, Guerrini Degl'Innocenti B, Aiazzi L, Incerpi G, Pallanti S. Epidemiology of mood disorders: a community survey in Florence. Journal of affective disorders. 1990 Oct;20(2):135-41.

[12] Szadoczky E, Papp Z, Vitrai J, Rihmer Z, Furedi J. The prevalence of major depressive and bipolar disorders in Hungary. Results from a national epidemiologic survey. Journal of affective disorders. 1998 Sep;50(2-3):153-62.

[13] Regeer EJ, ten Have M, Rosso ML, Hakkaart-van Roijen L, Vollebergh W, Nolen WA. Prevalence of bipolar disorder in the general population: a Reappraisal Study of the Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study. Acta psychiatrica Scandinavica. 2004 Nov;110(5):374-82.

[14] Weissman MM, Myers JK. Affective disorders in a US urban community: the use of research diagnostic criteria in an epidemiological survey. Archives of general psychiatry. 1978 Nov;35(11):1304-11.

[15] Lloyd T, Kennedy N, Fearon P, Kirkbride J, Mallett R, Leff J, et al. Incidence of bipolar affective disorder in three UK cities: results from the AESOP study. Br J Psychiatry. 2005 Feb;186:126-31.

[16] Arnold LM, McElroy SL, Keck PE, Jr. The role of gender in mixed mania. Comprehensive psychiatry. 2000 Mar-Apr;41(2):83-7.

[17] Smoller JW, Finn CT. Family, twin, and adoption studies of bipolar disorder. American journal of medical genetics. 2003 Nov 15;123C(1):48-58.

[18] Gershon ES, Hamovit J, Guroff JJ, Dibble E, Leckman JF, Sceery W, et al. A family study of schizoaffective, bipolar I, bipolar II, unipolar, and normal control probands. Archives of general psychiatry. 1982 Oct;39(10):1157-67.
[19] Andreasen NC, Rice J, Endicott J, Coryell W, Grove WM, Reich T. Familial rates of affective disorder. A report from the National Institute of Mental Health Collaborative Study. Archives of general psychiatry. 1987 May;44(5):461-9.
[20] Heun R, Maier W. The distinction of bipolar II disorder from bipolar I and recurrent unipolar depression: results of a controlled family study. Acta psychiatrica Scandinavica. 1993 Apr;87(4):279-84.
[21] Pauls DL, Morton LA, Egeland JA. Risks of affective illness among first-degree relatives of bipolar I old-order Amish probands. Archives of general psychiatry. 1992 Sep;49(9):703-8.
[22] James NM. Early- and late-onset bipolar affective disorder. A genetic study. Archives of general psychiatry. 1977 Jun;34(6):715-7.
[23] Taylor MA, Abrams R. Early- and late-onset bipolar illness. Archives of general psychiatry. 1981 Jan;38(1):58-61.
[24] Grigoroiu-Serbanescu M, Martinez M, Nothen MM, Grinberg M, Sima D, Propping P, et al. Different familial transmission patterns in bipolar I disorder with onset before and after age 25. American journal of medical genetics. 2001 Dec 8;105(8):765-73.
[25] Somanath CP, Jain S, Reddy YC. A family study of early-onset bipolar I disorder. Journal of affective disorders. 2002 Jun;70(1):91-4.
[26] Geller B, Tillman R, Bolhofner K, Zimerman B, Strauss NA, Kaufmann P. Controlled, blindly rated, direct-interview family study of a prepubertal and early-adolescent bipolar I disorder phenotype: morbid risk, age at onset, and comorbidity. Archives of general psychiatry. 2006 Oct;63(10):1130-8.
[27] Bertelsen A, Harvald B, Hauge M. A Danish twin study of manic-depressive disorders. Br J Psychiatry. 1977 Apr;130:330-51.
[28] Kendler KS, Pedersen N, Johnson L, Neale MC, Mathe AA. A pilot Swedish twin study of affective illness, including hospital- and population-ascertained subsamples. Archives of general psychiatry. 1993 Sep;50(9):699-700.
[29] Mendlewicz J, Rainer JD. Adoption study supporting genetic transmission in manic--depressive illness. Nature. 1977 Jul 28;268(5618):327-9.
[30] Wender PH, Kety SS, Rosenthal D, Schulsinger F, Ortmann J, Lunde I. Psychiatric disorders in the biological and adoptive families of adopted individuals with affective disorders. Archives of general psychiatry. 1986 Oct;43(10):923-9.
[31] Schroeder SR. Mental retardation and developmental disabilities influenced by environmental neurotoxic insults. Environ Health Perspect. 2000 Jun;108 Suppl 3:395-9.
[32] Boog G. Obstetrical complications and subsequent schizophrenia in adolescent and young adult offsprings: is there a relationship? Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2004 Jun 15;114(2):130-6.
[33] Curatolo P, Arpino C, Stazi MA, Medda E. Risk factors for the co-occurrence of partial epilepsy, cerebral palsy and mental retardation. Dev Med Child Neurol. 1995 Sep;37(9):776-82.
[34] Torrey EF, Rawlings RR, Ennis JM, Merrill DD, Flores DS. Birth seasonality in bipolar disorder, schizophrenia, schizoaffective disorder and stillbirths. Schizophrenia research. 1996 Sep 18;21(3):141-9.
[35] Torrey EF, Miller J, Rawlings R, Yolken RH. Seasonality of births in schizophrenia and bipolar disorder: a review of the literature. Schizophrenia research. 1997 Nov 7;28(1):1-

38.
[36] Mortensen PB, Pedersen CB, Westergaard T, Wohlfahrt J, Ewald H, Mors O, et al. Effects of family history and place and season of birth on the risk of schizophrenia. N Engl J Med. 1999 Feb 25;340(8):603-8.
[37] Yearwood EL, Crawford S, Kelly M, Moreno N. Immigrant youth at risk for disorders of mood: recognizing complex dynamics. Arch Psychiatr Nurs. 2007 Jun;21(3):162-71.
[38] Cantor-Graae E, Pedersen CB. Risk for schizophrenia in intercountry adoptees: a Danish population-based cohort study. J Child Psychol Psychiatry. 2007 Nov;48(11):1053-60.
[39] Craddock N, Jones I. Molecular genetics of bipolar disorder. Br J Psychiatry. 2001 Jun;178(Suppl 41):S128-33.
[40] Gottesman, II, Shields J. A critical review of recent adoption, twin, and family studies of schizophrenia: behavioral genetics perspectives. Schizophr Bull. 1976;2(3):360-401.
[41] Lindblad K, Nylander PO, De bruyn A, Sourey D, Zander C, Engstrom C, et al. Detection of expanded CAG repeats in bipolar affective disorder using the repeat expansion detection (RED) method. Neurobiol Dis. 1995 Feb;2(1):55-62.
[42] O'Donovan MC, Guy C, Craddock N, Murphy KC, Cardno AG, Jones LA, et al. Expanded CAG repeats in schizophrenia and bipolar disorder. Nature genetics. 1995 Aug;10(4):380-1.
[43] O'Donovan MC, Guy C, Craddock N, Bowen T, McKeon P, Macedo A, et al. Confirmation of association between expanded CAG/CTG repeats and both schizophrenia and bipolar disorder. Psychol Med. 1996 Nov;26(6):1145-53.
[44] Oruc L, Lindblad K, Verheyen GR, Ahlberg S, Jakovljevic M, Ivezic S, et al. CAG repeat expansions in bipolar and unipolar disorders. American journal of human genetics. 1997 Mar;60(3):730-2.
[45] Nicholls RD, Knoll JH, Butler MG, Karam S, Lalande M. Genetic imprinting suggested by maternal heterodisomy in nondeletion Prader-Willi syndrome. Nature. 1989 Nov 16;342(6247):281-5.
[46] Feinberg AP. Genomic imprinting and gene activation in cancer. Nature genetics. 1993 Jun;4(2):110-3.
[47] Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. Nature. 1993 Nov 25;366(6453):362-5.
[48] Nicholls RD. New insights reveal complex mechanisms involved in genomic imprinting. American journal of human genetics. 1994 May;54(5):733-40.
[49] Hall JG. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. American journal of human genetics. 1990 May;46(5):857-73.
[50] Flint J. Implications of genomic imprinting for psychiatric genetics. Psychol Med. 1992 Feb;22(1):5-10.
[51] Kato T, Winokur G, Coryell W, Keller MB, Endicott J, Rice J. Parent-of-origin effect in transmission of bipolar disorder. American journal of medical genetics. 1996 Nov 22;67(6):546-50.
[52] Grigoroiu-Serbanescu M, Wickramaratne PJ, Hodge SE, Milea S, Mihailescu R. Genetic anticipation and imprinting in bipolar I illness. Br J Psychiatry. 1997 Feb;170:162-6.
[53] Grigoroiu-Serbanescu M, Nothen M, Propping P, Poustka F, Magureanu S, Vasilescu R, et al. Clinical evidence for genomic imprinting in bipolar I disorder. Acta psychiatrica Scandinavica. 1995 Nov;92(5):365-70.
[54] Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, Jirtle RL. Genomic imprinting: implications for human disease. Am J Pathol. 1999 Mar;154(3):635-47.
[55] Morison IM, Reeve AE. A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in

humans and animals. Human molecular genetics. 1998;7(10):1599-609.
[56] McMahon FJ, Stine OC, Meyers DA, Simpson SG, DePaulo JR. Patterns of maternal transmission in bipolar affective disorder. American journal of human genetics. 1995 Jun;56(6):1277-86.
[57] Stine OC, Xu J, Koskela R, McMahon FJ, Gschwend M, Friddle C, et al. Evidence for linkage of bipolar disorder to chromosome 18 with a parent-of-origin effect. American journal of human genetics. 1995 Dec;57(6):1384-94.
[58] De Luca V, Likhodi O, Kennedy JL, Wong AH. Differential expression and parent-of-origin effect of the 5-HT2A receptor gene C102T polymorphism: analysis of suicidality in schizophrenia and bipolar disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007 Apr 5;144B(3):370-4.
[59] De Luca V, Likhodi O, Kennedy JL, Wong AH. Parent-of-origin effect and genomic imprinting of the HTR2A receptor gene T102C polymorphism in psychosis. Psychiatry research. 2007 Jun 30;151(3):243-8.
[60] Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1980 Nov;77(11):6715-9.
[61] Kato T. The role of mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. Drug News Perspect. 2006 Dec;19(10):597-602.
[62] Johns DR. The other human genome: mitochondrial DNA and disease. Nat Med. 1996 Oct;2(10):1065-8.
[63] Schon EA, Manfredi G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. J Clin Invest. 2003 Feb;111(3):303-12.
[64] Jou SH, Chiu NY, Liu CS. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. Chang Gung Med J. 2009 Jul-Aug;32(4):370-9.
[65] Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, Torroni A, Yang CC, Wallace DC. Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. Genetics. 1992 Jan;130(1):163-73.
[66] Prezant TR, Agapian JV, Bohlman MC, Bu X, Oztas S, Qiu WQ, et al. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. Nature genetics. 1993 Jul;4(3):289-94.
[67] McMahon FJ, Chen YS, Patel S, Kokoszka J, Brown MD, Torroni A, et al. Mitochondrial DNA sequence diversity in bipolar affective disorder. The American journal of psychiatry. 2000 Jul;157(7):1058-64.
[68] Iwamoto K, Bundo M, Kato T. Altered expression of mitochondria-related genes in postmortem brains of patients with bipolar disorder or schizophrenia, as revealed by large-scale DNA microarray analysis. Human molecular genetics. 2005 Jan 15;14(2):241-53.
[69] Kato T, Kakiuchi C, Iwamoto K. Comprehensive gene expression analysis in bipolar disorder. Can J Psychiatry. 2007 Dec;52(12):763-71.
[70] Kato T. Role of mitochondrial DNA in calcium signaling abnormality in bipolar disorder. Cell Calcium. 2008 Jul;44(1):92-102.
[71] Munakata K, Fujii K, Nanko S, Kunugi H, Kato T. Sequence and functional analyses of mtDNA in a maternally inherited family with bipolar disorder and depression. Mutation research. 2007 Apr 1;617(1-2):119-24.
[72] Washizuka S, Kakiuchi C, Mori K, Tajima O, Akiyama T, Kato T. Expression of mitochondria-related genes in lymphoblastoid cells from patients with bipolar disorder. Bipolar disorders. 2005 Apr;7(2):146-52.
[73] Munakata K, Tanaka M, Mori K, Washizuka S, Yoneda M, Tajima O, et al.

Mitochondrial DNA 3644T-->C mutation associated with bipolar disorder. Genomics. 2004 Dec;84(6):1041-50.
[74] Munakata K, Iwamoto K, Bundo M, Kato T. Mitochondrial DNA 3243A>G mutation and increased expression of LARS2 gene in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. Biological psychiatry. 2005 Mar 1;57(5):525-32.
[75] Washizuka S, Kametani M, Sasaki T, Tochigi M, Umekage T, Kohda K, et al. Association of mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 at 18p11 with schizophrenia in the Japanese population. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2006 Apr 5;141B(3):301-4.
[76] Kakiuchi C, Ishiwata M, Kametani M, Nelson C, Iwamoto K, Kato T. Quantitative analysis of mitochondrial DNA deletions in the brains of patients with bipolar disorder and schizophrenia. Int J Neuropsychopharmacol. 2005 Dec;8(4):515-22.
[77] Kato T, Takahashi Y. Deletion of leukocyte mitochondrial DNA in bipolar disorder. Journal of affective disorders. 1996 Apr 12;37(2-3):67-73.
[78] Kato T, Stine OC, McMahon FJ, Crowe RR. Increased levels of a mitochondrial DNA deletion in the brain of patients with bipolar disorder. Biological psychiatry. 1997 Nov 15;42(10):871-5.
[79] Washizuka S, Kakiuchi C, Mori K, Kunugi H, Tajima O, Akiyama T, et al. Association of mitochondrial complex I subunit gene NDUFV2 at 18p11 with bipolar disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2003 Jul 1;120B(1):72-8.
[80] Bamne MN, Talkowski ME, Moraes CT, Manuck SB, Ferrell RE, Chowdari KV, et al. Systematic association studies of mitochondrial DNA variations in schizophrenia: focus on the ND5 gene. Schizophr Bull. 2008 May;34(3):458-65.
[81] Martorell L, Segues T, Folch G, Valero J, Joven J, Labad A, et al. New variants in the mitochondrial genomes of schizophrenic patients. Eur J Hum Genet. 2006 May;14(5):520-8.
[82] Marchbanks RM, Ryan M, Day IN, Owen M, McGuffin P, Whatley SA. A mitochondrial DNA sequence variant associated with schizophrenia and oxidative stress. Schizophrenia research. 2003 Dec 1;65(1):33-8.
[83] Blackwood DH, Visscher PM, Muir WJ. Genetic studies of bipolar affective disorder in large families. The British journal of psychiatry. 2001 Jun;41:s134-6.
[84] St Clair D, Blackwood D, Muir W, Carothers A, Walker M, Spowart G, et al. Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. Lancet. 1990 Jul 7;336(8706):13-6.
[85] Blackwood DH, Fordyce A, Walker MT, St Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. American journal of human genetics. 2001 Aug;69(2):428-33.
[86] Millar JK, Wilson-Annan JC, Anderson S, Christie S, Taylor MS, Semple CA, et al. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. Human molecular genetics. 2000 May 22;9(9):1415-23.
[87] Muir WJ, Gosden CM, Brookes AJ, Fantes J, Evans KL, Maguire SM, et al. Direct microdissection and microcloning of a translocation breakpoint region, t(1;11)(q42.2;q21), associated with schizophrenia. Cytogenetics and cell genetics. 1995;70(1-2):35-40.
[88] MacIntyre DJ, Blackwood DH, Porteous DJ, Pickard BS, Muir WJ. Chromosomal abnormalities and mental illness. Molecular psychiatry. 2003 Mar;8(3):275-87.
[89] Baysal BE, Potkin SG, Farr JE, Higgins MJ, Korcz J, Gollin SM, et al. Bipolar affective disorder partially cosegregates with a balanced t(9;11)(p24;q23.1) chromosomal translocation in a small pedigree. American journal of medical genetics. 1998 Feb 7;81(1):81-

91.
[90] Calzolari E, Aiello V, Palazzi P, Sensi A, Calzolari S, Orrico D, et al. Psychiatric disorder in a familial 15;18 translocation and sublocalization of myelin basic protein of 18q22.3. American journal of medical genetics. 1996 Apr 9;67(2):154-61.
[91] Freedman R, Leonard S, Gault JM, Hopkins J, Cloninger CR, Kaufmann CA, et al. Linkage disequilibrium for schizophrenia at the chromosome 15q13-14 locus of the alpha7-nicotinic acetylcholine receptor subunit gene (CHRNA7). American journal of medical genetics. 2001 Jan 8;105(1):20-2.
[92] Leonard S, Gault J, Moore T, Hopkins J, Robinson M, Olincy A, et al. Further investigation of a chromosome 15 locus in schizophrenia: analysis of affected sibpairs from the NIMH Genetics Initiative. American journal of medical genetics. 1998 Jul 10;81(4):308-12.
[93] Kamnasaran D. Genetic analysis of psychiatric disorders associated with human chromosome 18. Clinical and investigative medicine. 2003 Dec;26(6):285-302.
[94] Mahr RN, Moberg PJ, Overhauser J, Strathdee G, Kamholz J, Loevner LA, et al. Neuropsychiatry of 18q- syndrome. American journal of medical genetics. 1996 Apr 9;67(2):172-8.
[95] Tsukahara M, Imaizumi K, Fujita K, Tateishi H, Uchida M. Familial Del(18p) syndrome. American journal of medical genetics. 2001 Feb 15;99(1):67-9.
[96] Mors O, Ewald H, Blackwood D, Muir W. Cytogenetic abnormalities on chromosome 18 associated with bipolar affective disorder or schizophrenia. Br J Psychiatry. 1997 Mar;170:278-80.
[97] Hampson RM, Malloy MP, Mors O, Ewald H, Flannery AV, Morten J, et al. Mapping studies on a pericentric inversion (18) (p11.31 q21.1) in a family with both schizophrenia and learning disability. Psychiatric genetics. 1999 Sep;9(3):161-3.
[98] Zinkstok J, van Amelsvoort T. Neuropsychological profile and neuroimaging in patients with 22Q11.2 Deletion Syndrome: a review. Child Neuropsychol. 2005 Feb;11(1):21-37.
[99] Murphy KC, Jones LA, Owen MJ. High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. Archives of general psychiatry. 1999 Oct;56(10):940-5.
[100] Papolos DF, Faedda GL, Veit S, Goldberg R, Morrow B, Kucherlapati R, et al. Bipolar spectrum disorders in patients diagnosed with velo-cardio-facial syndrome: does a hemizygous deletion of chromosome 22q11 result in bipolar affective disorder? The American journal of psychiatry. 1996 Dec;153(12):1541-7.
[101] Pulver AE, Nestadt G, Goldberg R, Shprintzen RJ, Lamacz M, Wolyniec PS, et al. Psychotic illness in patients diagnosed with velo-cardio-facial syndrome and their relatives. The Journal of nervous and mental disease. 1994 Aug;182(8):476-8.
[102] Craddock N, Jones I. Genetics of bipolar disorder. Journal of medical genetics. 1999 Aug;36(8):585-94.
[103] Morton NE. Sequential tests for the detection of linkage. American journal of human genetics. 1955 Sep;7(3):277-318.
[104] Schulze TG, McMahon FJ. Genetic linkage and association studies in bipolar affective disorder: a time for optimism. American journal of medical genetics. 2003 Nov 15;123C(1):36-47.
[105] Wright AF. Neurogenetics II: complex disorders. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2005 May;76(5):623-31.
[106] Serretti A, Mandelli L. The genetics of bipolar disorder: genome 'hot regions,' genes, new potential candidates and future directions. Molecular psychiatry. 2008 Aug;13(8):742-71.

[107] Badner JA, Gershon ES. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. Molecular psychiatry. 2002;7(4):405-11.
[108] Segurado R, Detera-Wadleigh SD, Levinson DF, Lewis CM, Gill M, Nurnberger JI, Jr., et al. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part III: Bipolar disorder. American journal of human genetics. 2003 Jul;73(1):49-62.
[109] Middleton FA, Pato MT, Gentile KL, Morley CP, Zhao X, Eisener AF, et al. Genomewide linkage analysis of bipolar disorder by use of a high-density single-nucleotide-polymorphism (SNP) genotyping assay: a comparison with microsatellite marker assays and finding of significant linkage to chromosome 6q22. American journal of human genetics. 2004 May;74(5):886-97.
[110] Dick DM, Foroud T, Flury L, Bowman ES, Miller MJ, Rau NL, et al. Genomewide linkage analyses of bipolar disorder: a new sample of 250 pedigrees from the National Institute of Mental Health Genetics Initiative. American journal of human genetics. 2003 Jul;73(1):107-14.
[111] Kelsoe JR, Spence MA, Loetscher E, Foguet M, Sadovnick AD, Remick RA, et al. A genome survey indicates a possible susceptibility locus for bipolar disorder on chromosome 22. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001 Jan 16;98(2):585-90.
[112] Detera-Wadleigh SD, Badner JA, Berrettini WH, Yoshikawa T, Goldin LR, Turner G, et al. A high-density genome scan detects evidence for a bipolar-disorder susceptibility locus on 13q32 and other potential loci on 1q32 and 18p11.2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999 May 11;96(10):5604-9.
[113] Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. Nature reviews. 2002 Apr;3(4):299-309.
[114] Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. Nature. 2000 Jun 15;405(6788):847-56.
[115] Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. Science (New York, NY. 1996 Sep 13;273(5281):1516-7.
[116] Camp NJ. Genomewide transmission/disequilibrium testing--consideration of the genotypic relative risks at disease loci. American journal of human genetics. 1997 Dec;61(6):1424-30.
[117] Cardon LR, Bell JI. Association study designs for complex diseases. Nature reviews. 2001 Feb;2(2):91-9.
[118] Dunning AM, Durocher F, Healey CS, Teare MD, McBride SE, Carlomagno F, et al. The extent of linkage disequilibrium in four populations with distinct demographic histories. American journal of human genetics. 2000 Dec;67(6):1544-54.
[119] Collins A, Lonjou C, Morton NE. Genetic epidemiology of single-nucleotide polymorphisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1999 Dec 21;96(26):15173-7.
[120] Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, et al. Linkage disequilibrium in the human genome. Nature. 2001 May 10;411(6834):199-204.
[121] Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. Science (New York, NY. 2002 Jun 21;296(5576):2225-9.
[122] Chapman NH, Thompson EA. Linkage disequilibrium mapping: the role of population history, size, and structure. Advances in genetics. 2001;42:413-37.
[123] Kwok PY, Gu Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? Molecular medicine today. 1999 Dec;5(12):538-43.

[124] Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. Nature genetics. 1999 Jul;22(3):231-8.
[125] Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. Nature genetics. 2001 Oct;29(2):229-32.
[126] Olivier M. A haplotype map of the human genome. Physiological genomics. 2003 Mar 18;13(1):3-9.
[127] Patil N, Berno AJ, Hinds DA, Barrett WA, Doshi JM, Hacker CR, et al. Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. Science (New York, NY. 2001 Nov 23;294(5547):1719-23.
[128] Jeffreys AJ, Kauppi L, Neumann R. Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. Nature genetics. 2001 Oct;29(2):217-22.
[129] Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, Smith AN, Heward J, Di Genova G, et al. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. Nature genetics. 2001 Oct;29(2):233-7.
[130] Clark AG, Weiss KM, Nickerson DA, Taylor SL, Buchanan A, Stengard J, et al. Haplotype structure and population genetic inferences from nucleotide-sequence variation in human lipoprotein lipase. American journal of human genetics. 1998 Aug;63(2):595-612.
[131] Consortium IH. The International HapMap Project. Nature. 2003 Dec 18;426(6968):789-96.
[132] Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. Nature genetics. 1995 Nov;11(3):241-7.
[133] Pritchard JK, Rosenberg NA. Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. American journal of human genetics. 1999 Jul;65(1):220-8.
[134] Turakulov R, Easteal S. Number of SNPS loci needed to detect population structure. Human heredity. 2003;55(1):37-45.
[135] Detera-Wadleigh SD, McMahon FJ. Genetic association studies in mood disorders: issues and promise. International review of psychiatry (Abingdon, England). 2004 Nov;16(4):301-10.
[136] Falk CT, Rubinstein P. Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. Annals of human genetics. 1987 Jul;51(Pt 3):227-33.
[137] Terwilliger JD, Ott J. A haplotype-based 'haplotype relative risk' approach to detecting allelic associations. Human heredity. 1992;42(6):337-46.
[138] Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). American journal of human genetics. 1993 Mar;52(3):506-16.
[139] Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. Journal of medical genetics. 2005 Mar;42(3):193-204.
[140] Preisig M, Bellivier F, Fenton BT, Baud P, Berney A, Courtet P, et al. Association between bipolar disorder and monoamine oxidase A gene polymorphisms: results of a multicenter study. The American journal of psychiatry. 2000 Jun;157(6):948-55.
[141] Jones I, Craddock N. Candidate gene studies of bipolar disorder. Ann Med. 2001 May;33(4):248-56.
[142] Anguelova M, Benkelfat C, Turecki G. A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: I. Affective

disorders. Molecular psychiatry. 2003 Jun;8(6):574-91.
[143] Lasky-Su JA, Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT. Meta-analysis of the association between two polymorphisms in the serotonin transporter gene and affective disorders. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2005 Feb 5;133B(1):110-5.
[144] Lucki I. The spectrum of behaviors influenced by serotonin. Biological psychiatry. 1998 Aug 1;44(3):151-62.
[145] Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, et al. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993 Mar 15;90(6):2542-6.
[146] Rudnick G, Clark J. From synapse to vesicle: the reuptake and storage of biogenic amine neurotransmitters. Biochim Biophys Acta. 1993 Oct 4;1144(3):249-63.
[147] Furlong RA, Ho L, Walsh C, Rubinsztein JS, Jain S, Paykel ES, et al. Analysis and meta-analysis of two serotonin transporter gene polymorphisms in bipolar and unipolar affective disorders. American journal of medical genetics. 1998 Feb 7;81(1):58-63.
[148] Cho HJ, Meira-Lima I, Cordeiro Q, Michelon L, Sham P, Vallada H, et al. Population-based and family-based studies on the serotonin transporter gene polymorphisms and bipolar disorder: a systematic review and meta-analysis. Molecular psychiatry. 2005 Aug;10(8):771-81.
[149] Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H, et al. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. Science (New York, NY. 2003 Jan 3;299(5603):76.
[150] Harvey M, Shink E, Tremblay M, Gagne B, Raymond C, Labbe M, et al. Support for the involvement of TPH2 gene in affective disorders. Molecular psychiatry. 2004 Nov;9(11):980-1.
[151] Lopez VA, Detera-Wadleigh S, Cardona I, Kassem L, McMahon FJ. Nested association between genetic variation in tryptophan hydroxylase II, bipolar affective disorder, and suicide attempts. Biological psychiatry. 2007 Jan 15;61(2):181-6.
[152] Van Den Bogaert A, Sleegers K, De Zutter S, Heyrman L, Norrback KF, Adolfsson R, et al. Association of brain-specific tryptophan hydroxylase, TPH2, with unipolar and bipolar disorder in a Northern Swedish, isolated population. Archives of general psychiatry. 2006 Oct;63(10):1103-10.
[153] Harvey M, Gagne B, Labbe M, Barden N. Polymorphisms in the neuronal isoform of tryptophan hydroxylase 2 are associated with bipolar disorder in French Canadian pedigrees. Psychiatric genetics. 2007 Feb;17(1):17-22.
[154] Cichon S, Winge I, Mattheisen M, Georgi A, Karpushova A, Freudenberg J, et al. Brain-specific tryptophan hydroxylase 2 (TPH2): a functional Pro206Ser substitution and variation in the 5'-region are associated with bipolar affective disorder. Human molecular genetics. 2008 Jan 1;17(1):87-97.
[155] De Luca V, Mueller DJ, Tharmalingam S, King N, Kennedy JL. Analysis of the novel TPH2 gene in bipolar disorder and suicidality. Molecular psychiatry. 2004 Oct;9(10):896-7.
[156] Mann JJ, Currier D, Murphy L, Huang YY, Galfalvy H, Brent D, et al. No association between a TPH2 promoter polymorphism and mood disorders or monoamine turnover. Journal of affective disorders. 2008 Feb;106(1-2):117-21.
[157] Ranade SS, Mansour H, Wood J, Chowdari KV, Brar LK, Kupfer DJ, et al. Linkage and association between serotonin 2A receptor gene polymorphisms and bipolar I disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2003 Aug 15;121B(1):28-34.
[158] Schneier FR, Liebowitz MR, Abi-Dargham A, Zea-Ponce Y, Lin SH, Laruelle M.

Low dopamine D(2) receptor binding potential in social phobia. The American journal of psychiatry. 2000 Mar;157(3):457-9.
[159] Kienast T, Heinz A. Dopamine and the diseased brain. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2006 Feb;5(1):109-31.
[160] Fuxe K, Manger P, Genedani S, Agnati L. The nigrostriatal DA pathway and Parkinson's disease. J Neural Transm Suppl. 2006(70):71-83.
[161] Mihara K, Kondo T, Suzuki A, Yasui-Furukori N, Ono S, Sano A, et al. Relationship between functional dopamine D2 and D3 receptors gene polymorphisms and neuroleptic malignant syndrome. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2003 Feb;117B(1):57-60.
[162] Faraone SV, Khan SA. Candidate gene studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. J Clin Psychiatry. 2006;67 Suppl 8:13-20.
[163] Hummel M, Unterwald EM. D1 dopamine receptor: a putative neurochemical and behavioral link to cocaine action. J Cell Physiol. 2002 Apr;191(1):17-27.
[164] Muglia P, Petronis A, Mundo E, Lander S, Cate T, Kennedy JL. Dopamine D4 receptor and tyrosine hydroxylase genes in bipolar disorder: evidence for a role of DRD4. Molecular psychiatry. 2002;7(8):860-6.
[165] Lopez Leon S, Croes EA, Sayed-Tabatabaei FA, Claes S, Van Broeckhoven C, van Duijn CM. The dopamine D4 receptor gene 48-base-pair-repeat polymorphism and mood disorders: a meta-analysis. Biological psychiatry. 2005 May 1;57(9):999-1003.
[166] Ni X, Trakalo JM, Mundo E, Macciardi FM, Parikh S, Lee L, et al. Linkage disequilibrium between dopamine D1 receptor gene (DRD1) and bipolar disorder. Biological psychiatry. 2002 Dec 15;52(12):1144-50.
[167] Severino G, Congiu D, Serreli C, De Lisa R, Chillotti C, Del Zompo M, et al. A48G polymorphism in the D1 receptor genes associated with bipolar I disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2005 Apr 5;134B(1):37-8.
[168] Dmitrzak-Weglarz M, Rybakowski JK, Slopien A, Czerski PM, Leszczynska-Rodziewicz A, Kapelski P, et al. Dopamine receptor D1 gene -48A/G polymorphism is associated with bipolar illness but not with schizophrenia in a Polish population. Neuropsychobiology. 2006;53(1):46-50.
[169] Vandenbergh DJ, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Li X, Jabs EW, et al. Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. Genomics. 1992 Dec;14(4):1104-6.
[170] Souery D, Lipp O, Mahieu B, Mendelbaum K, De Martelaer V, Van Broeckhoven C, et al. Association study of bipolar disorder with candidate genes involved in catecholamine neurotransmission: DRD2, DRD3, DAT1, and TH genes. American journal of medical genetics. 1996 Nov 22;67(6):551-5.
[171] Gomez-Casero E, Perez de Castro I, Saiz-Ruiz J, Llinares C, Fernandez-Piqueras J. No association between particular DRD3 and DAT gene polymorphisms and manic-depressive illness in a Spanish sample. Psychiatric genetics. 1996 Winter;6(4):209-12.
[172] Bocchetta A, Piccardi MP, Palmas MA, Chillotti C, Oi A, Del Zompo M. Family-based association study between bipolar disorder and DRD2, DRD4, DAT, and SERT in Sardinia. American journal of medical genetics. 1999 Oct 15;88(5):522-6.
[173] Heiden A, Schussler P, Itzlinger U, Leisch F, Scharfetter J, Gebhardt C, et al. Association studies of candidate genes in bipolar disorders. Neuropsychobiology. 2000;42 Suppl 1:18-21.
[174] Georgieva L, Dimitrova A, Nikolov I, Koleva S, Tsvetkova R, Owen MJ, et al. Dopamine transporter gene (DAT1) VNTR polymorphism in major psychiatric disorders: family-based association study in the Bulgarian population. Acta psychiatrica Scandinavica.

2002 May;105(5):396-9.
[175] Keikhaee MR, Fadai F, Sargolzaee MR, Javanbakht A, Najmabadi H, Ohadi M. Association analysis of the dopamine transporter (DAT1)-67A/T polymorphism in bipolar disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2005 May 5;135B(1):47-9.
[176] Ohadi M, Keikhaee MR, Javanbakht A, Sargolzaee MR, Robabeh M, Najmabadi H. Gender dimorphism in the DAT1 -67 T-allele homozygosity and predisposition to bipolar disorder. Brain Res. 2007 May 4;1144:142-5.
[177] Greenwood TA, Alexander M, Keck PE, McElroy S, Sadovnick AD, Remick RA, et al. Evidence for linkage disequilibrium between the dopamine transporter and bipolar disorder. American journal of medical genetics. 2001 Mar 8;105(2):145-51.
[178] Greenwood TA, Schork NJ, Eskin E, Kelsoe JR. Identification of additional variants within the human dopamine transporter gene provides further evidence for an association with bipolar disorder in two independent samples. Molecular psychiatry. 2006 Feb;11(2):125-33, 15.
[179] Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, Le Bourdelles B, Heavens RP, et al. Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. Ann N Y Acad Sci. 1999 Apr 30;868:645-53.
[180] Glatt K, Glatt H, Lalande M. Structure and organization of GABRB3 and GABRA5. Genomics. 1997 Apr 1;41(1):63-9.
[181] Papadimitriou GN, Dikeos DG, Karadima G, Avramopoulos D, Daskalopoulou EG, Vassilopoulos D, et al. Association between the GABA(A) receptor alpha5 subunit gene locus (GABRA5) and bipolar affective disorder. American journal of medical genetics. 1998 Feb 7;81(1):73-80.
[182] Otani K, Ujike H, Tanaka Y, Morita Y, Katsu T, Nomura A, et al. The GABA type A receptor alpha5 subunit gene is associated with bipolar I disorder. Neuroscience letters. 2005 Jun 10-17;381(1-2):108-13.
[183] Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L, Palicio M, Abderrahim H, et al. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002 Oct 15;99(21):13675-80.
[184] Williams NM, Green EK, Macgregor S, Dwyer S, Norton N, Williams H, et al. Variation at the DAOA/G30 locus influences susceptibility to major mood episodes but not psychosis in schizophrenia and bipolar disorder. Archives of general psychiatry. 2006 Apr;63(4):366-73.
[185] Hattori E, Liu C, Badner JA, Bonner TI, Christian SL, Maheshwari M, et al. Polymorphisms at the G72/G30 gene locus, on 13q33, are associated with bipolar disorder in two independent pedigree series. American journal of human genetics. 2003 May;72(5):1131-40.
[186] Prata D, Breen G, Osborne S, Munro J, St Clair D, Collier D. Association of DAO and G72(DAOA)/G30 genes with bipolar affective disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2008 Sep 5;147B(6):914-7.
[187] Schumacher J, Jamra RA, Freudenberg J, Becker T, Ohlraun S, Otte AC, et al. Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. Molecular psychiatry. 2004 Feb;9(2):203-7.
[188] Chen YS, Akula N, Detera-Wadleigh SD, Schulze TG, Thomas J, Potash JB, et al. Findings in an independent sample support an association between bipolar affective disorder and the G72/G30 locus on chromosome 13q33. Molecular psychiatry. 2004 Jan;9(1):87-92; image 5.

[189] Szpirer C, Molne M, Antonacci R, Jenkins NA, Finelli P, Szpirer J, et al. The genes encoding the glutamate receptor subunits KA1 and KA2 (GRIK4 and GRIK5) are located on separate chromosomes in human, mouse, and rat. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1994 Dec 6;91(25):11849-53.
[190] Pickard BS, Malloy MP, Christoforou A, Thomson PA, Evans KL, Morris SW, et al. Cytogenetic and genetic evidence supports a role for the kainate-type glutamate receptor gene, GRIK4, in schizophrenia and bipolar disorder. Molecular psychiatry. 2006 Sep;11(9):847-57.
[191] Pickard BS, Knight HM, Hamilton RS, Soares DC, Walker R, Boyd JK, et al. A common variant in the 3'UTR of the GRIK4 glutamate receptor gene affects transcript abundance and protects against bipolar disorder. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008 Sep 30;105(39):14940-5.
[192] Talbot K, Eidem WL, Tinsley CL, Benson MA, Thompson EW, Smith RJ, et al. Dysbindin-1 is reduced in intrinsic, glutamatergic terminals of the hippocampal formation in schizophrenia. J Clin Invest. 2004 May;113(9):1353-63.
[193] Raybould R, Green EK, MacGregor S, Gordon-Smith K, Heron J, Hyde S, et al. Bipolar disorder and polymorphisms in the dysbindin gene (DTNBP1). Biological psychiatry. 2005 Apr 1;57(7):696-701.
[194] Breen G, Prata D, Osborne S, Munro J, Sinclair M, Li T, et al. Association of the dysbindin gene with bipolar affective disorder. The American journal of psychiatry. 2006 Sep;163(9):1636-8.
[195] Pae CU, Serretti A, Mandelli L, Yu HS, Patkar AA, Lee CU, et al. Effect of 5-haplotype of dysbindin gene (DTNBP1) polymorphisms for the susceptibility to bipolar I disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007 Jul 5;144B(5):701-3.
[196] Joo EJ, Lee KY, Jeong SH, Chang JS, Ahn YM, Koo YJ, et al. Dysbindin gene variants are associated with bipolar I disorder in a Korean population. Neuroscience letters. 2007 May 18;418(3):272-5.
[197] Yoshikawa T, Turner G, Esterling LE, Sanders AR, Detera-Wadleigh SD. A novel human myo-inositol monophosphatase gene, IMP.18p, maps to a susceptibility region for bipolar disorder. Molecular psychiatry. 1997 Sep;2(5):393-7.
[198] Sjoholt G, Ebstein RP, Lie RT, Berle JO, Mallet J, Deleuze JF, et al. Examination of IMPA1 and IMPA2 genes in manic-depressive patients: association between IMPA2 promoter polymorphisms and bipolar disorder. Molecular psychiatry. 2004 Jun;9(6):621-9.
[199] Ohnishi T, Yamada K, Ohba H, Iwayama Y, Toyota T, Hattori E, et al. A promoter haplotype of the inositol monophosphatase 2 gene (IMPA2) at 18p11.2 confers a possible risk for bipolar disorder by enhancing transcription. Neuropsychopharmacology. 2007 Aug;32(8):1727-37.
[200] Dimitrova A, Milanova V, Krastev S, Nikolov I, Toncheva D, Owen MJ, et al. Association study of myo-inositol monophosphatase 2 (IMPA2) polymorphisms with bipolar affective disorder and response to lithium treatment. Pharmacogenomics J. 2005;5(1):35-41.
[201] Saito T, Parsia S, Papolos DF, Lachman HM. Analysis of the pseudoautosomal X-linked gene SYBL1in bipolar affective disorder: description of a new candidate allele for psychiatric disorders. American journal of medical genetics. 2000 Jun 12;96(3):317-23.
[202] Muller DJ, Schulze TG, Jahnes E, Cichon S, Krauss H, Kesper K, et al. Association between a polymorphism in the pseudoautosomal X-linked gene SYBL1 and bipolar affective disorder. American journal of medical genetics. 2002 Jan 8;114(1):74-8.
[203] Seidah NG, Benjannet S, Pareek S, Chretien M, Murphy RA. Cellular processing of the neurotrophin precursors of NT3 and BDNF by the mammalian proprotein convertases. FEBS Lett. 1996 Feb 5;379(3):247-50.

[204] Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim YM, Tsan G, et al. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. Brain-derived neutrophic factor. Molecular psychiatry. 2002;7(6):579-93.
[205] Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F, Kennedy JL. The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. American journal of human genetics. 2002 Sep;71(3):651-5.
[206] Geller B, Badner JA, Tillman R, Christian SL, Bolhofner K, Cook EH, Jr. Linkage disequilibrium of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. The American journal of psychiatry. 2004 Sep;161(9):1698-700.
[207] Oswald P, Del-Favero J, Massat I, Souery D, Claes S, Van Broeckhoven C, et al. Non-replication of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) association in bipolar affective disorder: a Belgian patient-control study. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2004 Aug 15;129B(1):34-5.
[208] Skibinska M, Hauser J, Czerski PM, Leszczynska-Rodziewicz A, Kosmowska M, Kapelski P, et al. Association analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene Val66Met polymorphism in schizophrenia and bipolar affective disorder. World J Biol Psychiatry. 2004 Oct;5(4):215-20.
[209] Hong CJ, Huo SJ, Yen FC, Tung CL, Pan GM, Tsai SJ. Association study of a brain-derived neurotrophic-factor genetic polymorphism and mood disorders, age of onset and suicidal behavior. Neuropsychobiology. 2003;48(4):186-9.
[210] Nakata K, Ujike H, Sakai A, Uchida N, Nomura A, Imamura T, et al. Association study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder. Neuroscience letters. 2003 Jan 30;337(1):17-20.
[211] Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, et al. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. American journal of human genetics. 2002 Oct;71(4):877-92.
[212] Ozaki M, Sasner M, Yano R, Lu HS, Buonanno A. Neuregulin-beta induces expression of an NMDA-receptor subunit. Nature. 1997 Dec 18-25;390(6661):691-4.
[213] Cannella B, Hoban CJ, Gao YL, Garcia-Arenas R, Lawson D, Marchionni M, et al. The neuregulin, glial growth factor 2, diminishes autoimmune demyelination and enhances remyelination in a chronic relapsing model for multiple sclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998 Aug 18;95(17):10100-5.
[214] Green EK, Raybould R, Macgregor S, Gordon-Smith K, Heron J, Hyde S, et al. Operation of the schizophrenia susceptibility gene, neuregulin 1, across traditional diagnostic boundaries to increase risk for bipolar disorder. Archives of general psychiatry. 2005 Jun;62(6):642-8.
[215] Thomson PA, Christoforou A, Morris SW, Adie E, Pickard BS, Porteous DJ, et al. Association of Neuregulin 1 with schizophrenia and bipolar disorder in a second cohort from the Scottish population. Molecular psychiatry. 2007 Jan;12(1):94-104.
[216] Walss-Bass C, Raventos H, Montero AP, Armas R, Dassori A, Contreras S, et al. Association analyses of the neuregulin 1 gene with schizophrenia and manic psychosis in a Hispanic population. Acta psychiatrica Scandinavica. 2006 Apr;113(4):314-21.
[217] Georgieva L, Dimitrova A, Ivanov D, Nikolov I, Williams NM, Grozeva D, et al. Support for neuregulin 1 as a susceptibility gene for bipolar disorder and schizophrenia. Biological psychiatry. 2008 Sep 1;64(5):419-27.
[218] Arai M, Itokawa M, Yamada K, Toyota T, Haga S, Ujike H, et al. Association of neural cell adhesion molecule 1 gene polymorphisms with bipolar affective disorder in

Japanese individuals. Biological psychiatry. 2004 Apr 15;55(8):804-10.
[219] Atz ME, Rollins B, Vawter MP. NCAM1 association study of bipolar disorder and schizophrenia: polymorphisms and alternatively spliced isoforms lead to similarities and differences. Psychiatric genetics. 2007 Apr;17(2):55-67.
[220] McClung CA. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. Pharmacology & therapeutics. 2007 May;114(2):222-32.
[221] Harvey AG. Sleep and circadian rhythms in bipolar disorder: seeking synchrony, harmony, and regulation. The American journal of psychiatry. 2008 Jul;165(7):820-9.
[222] Larsen JK, Lindberg ML, Skovgaard B. Sleep deprivation as treatment for endogenous depression. Acta psychiatrica Scandinavica. 1976 Sep;54(3):167-73.
[223] Fahndrich E. Effects of sleep deprivation on depressed patients of different nosological groups. Psychiatry research. 1981 Dec;5(3):277-85.
[224] Wehr TA, Goodwin FK, Wirz-Justice A, Breitmaier J, Craig C. 48-hour sleep-wake cycles in manic-depressive illness: naturalistic observations and sleep deprivation experiments. Archives of general psychiatry. 1982 May;39(5):559-65.
[225] Benedetti F, Serretti A, Colombo C, Barbini B, Lorenzi C, Campori E, et al. Influence of CLOCK gene polymorphism on circadian mood fluctuation and illness recurrence in bipolar depression. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2003 Nov 15;123B(1):23-6.
[226] Mansour HA, Wood J, Logue T, Chowdari KV, Dayal M, Kupfer DJ, et al. Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia. Genes, brain, and behavior. 2006 Mar;5(2):150-7.
[227] Serretti A, Benedetti F, Mandelli L, Lorenzi C, Pirovano A, Colombo C, et al. Genetic dissection of psychopathological symptoms: insomnia in mood disorders and CLOCK gene polymorphism. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2003 Aug 15;121B(1):35-8.
[228] Serretti A, Cusin C, Benedetti F, Mandelli L, Pirovano A, Zanardi R, et al. Insomnia improvement during antidepressant treatment and CLOCK gene polymorphism. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2005 Aug 5;137B(1):36-9.
[229] Nievergelt CM, Kripke DF, Barrett TB, Burg E, Remick RA, Sadovnick AD, et al. Suggestive evidence for association of the circadian genes PERIOD3 and ARNTL with bipolar disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2006 Apr 5;141B(3):234-41.
[230] Shi J, Wittke-Thompson JK, Badner JA, Hattori E, Potash JB, Willour VL, et al. Clock genes may influence bipolar disorder susceptibility and dysfunctional circadian rhythm. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2008 Oct 5;147B(7):1047-55.
[231] WTCCC. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. Nature. 2007 Jun 7;447(7145):661-78.
[232] Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. Genome-wide association studies in psychiatry: lessons from early studies of non-psychiatric and psychiatric phenotypes. Molecular psychiatry. 2008 Jul;13(7):649-53.
[233] Maresso K, Broeckel U. Genotyping platforms for mass-throughput genotyping with SNPs, including human genome-wide scans. Advances in genetics. 2008;60:107-39.
[234] Steemers FJ, Gunderson KL. Whole genome genotyping technologies on the BeadArray platform. Biotechnology journal. 2007 Jan;2(1):41-9.
[235] Barrett JC, Cardon LR. Evaluating coverage of genome-wide association studies. Nature genetics. 2006 Jun;38(6):659-62.
[236] McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, Ioannidis JP, et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. Nature reviews. 2008 May;9(5):356-69.
[237] Ferreira MA, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR, Ruderfer DM, Jones L, et al.

Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. Nature genetics. 2008 Sep;40(9):1056-8.
[238] Sklar P, Smoller JW, Fan J, Ferreira MA, Perlis RH, Chambert K, et al. Whole-genome association study of bipolar disorder. Molecular psychiatry. 2008 Jun;13(6):558-69.
[239] Baum AE, Akula N, Cabanero M, Cardona I, Corona W, Klemens B, et al. A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. Molecular psychiatry. 2008 Feb;13(2):197-207.
[240] Hennah W, Thomson P, McQuillin A, Bass N, Loukola A, Anjorin A, et al. DISC1 association, heterogeneity and interplay in schizophrenia and bipolar disorder. Molecular psychiatry. 2009 Sep;14(9):865-73.
[241] Schumacher J, Laje G, Abou Jamra R, Becker T, Muhleisen TW, Vasilescu C, et al. The DISC locus and schizophrenia: evidence from an association study in a central European sample and from a meta-analysis across different European populations. Human molecular genetics. 2009 Jul 15;18(14):2719-27.
[242] Saetre P, Agartz I, De Franciscis A, Lundmark P, Djurovic S, Kahler A, et al. Association between a disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) single nucleotide polymorphism and schizophrenia in a combined Scandinavian case-control sample. Schizophrenia research. 2008 Dec;106(2-3):237-41.
[243] Baum AE, Hamshere M, Green E, Cichon S, Rietschel M, Noethen MM, et al. Meta-analysis of two genome-wide association studies of bipolar disorder reveals important points of agreement. Molecular psychiatry. 2008 May;13(5):466-7.
[244] Ahn SJ, Costa J, Emanuel JR. PicoGreen quantitation of DNA: effective evaluation of samples pre- or post-PCR. Nucleic acids research. 1996 Jul 1;24(13):2623-5.
[245] Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1991 Aug 15;88(16):7276-80.
[246] Kwok PY. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. Annual review of genomics and human genetics. 2001;2:235-58.
[247] Lyamichev V, Brow MA, Dahlberg JE. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. Science (New York, NY. 1993 May 7;260(5109):778-83.
[248] Lyamichev V, Mast AL, Hall JG, Prudent JR, Kaiser MW, Takova T, et al. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. Nature biotechnology. 1999 Mar;17(3):292-6.
[249] Olivier M. The Invader assay for SNP genotyping. Mutat Res. 2005 Jun 3;573(1-2):103-10.
[250] Hall JG, Eis PS, Law SM, Reynaldo LP, Prudent JR, Marshall DJ, et al. Sensitive detection of DNA polymorphisms by the serial invasive signal amplification reaction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000 Jul 18;97(15):8272-7.
[251] Ohnishi Y, Tanaka T, Ozaki K, Yamada R, Suzuki H, Nakamura Y. A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies. J Hum Genet. 2001;46(8):471-7.
[252] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. Nucleic acids research. 1988 Dec 9;16(23):11141-56.
[253] Shuber AP, Skoletsky J, Stern R, Handelin BL. Efficient 12-mutation testing in the

CFTR gene: a general model for complex mutation analysis. Human molecular genetics. 1993 Feb;2(2):153-8.
[254] Mutirangura A, Greenberg F, Butler MG, Malcolm S, Nicholls RD, Chakravarti A, et al. Multiplex PCR of three dinucleotide repeats in the Prader-Willi/Angelman critical region (15q11-q13): molecular diagnosis and mechanism of uniparental disomy. Human molecular genetics. 1993 Feb;2(2):143-51.
[255] Choi HJ, Cho YM, Moon MK, Choi HH, Shin HD, Jang HC, et al. Polymorphisms in the ghrelin gene are associated with serum high-density lipoprotein cholesterol level and not with type 2 diabetes mellitus in Koreans. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2006 Nov;91(11):4657-63.
[256] Becker KG, Barnes KC, Bright TJ, Wang SA. The genetic association database. Nature genetics. 2004 May;36(5):431-2.
[257] Gratacos M, Costas J, de Cid R, Bayes M, Gonzalez JR, Baca-Garcia E, et al. Identification of new putative susceptibility genes for several psychiatric disorders by association analysis of regulatory and non-synonymous SNPs of 306 genes involved in neurotransmission and neurodevelopment. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2009 Sep 5;150B(6):808-16.
[258] Shibata H, Aramaki T, Sakai M, Ninomiya H, Tashiro N, Iwata N, et al. Association study of polymorphisms in the GluR7, KA1 and KA2 kainate receptor genes (GRIK3, GRIK4, GRIK5) with schizophrenia. Psychiatry research. 2006 Jan 30;141(1):39-51.
[259] Blackwood DH, He L, Morris SW, McLean A, Whitton C, Thomson M, et al. A locus for bipolar affective disorder on chromosome 4p. Nature genetics. 1996 Apr;12(4):427-30.
[260] Fallin MD, Lasseter VK, Wolyniec PS, McGrath JA, Nestadt G, Valle D, et al. Genomewide linkage scan for bipolar-disorder susceptibility loci among Ashkenazi Jewish families. American journal of human genetics. 2004 Aug;75(2):204-19.
[261] Sklar P, Pato MT, Kirby A, Petryshen TL, Medeiros H, Carvalho C, et al. Genome-wide scan in Portuguese Island families identifies 5q31-5q35 as a susceptibility locus for schizophrenia and psychosis. Molecular psychiatry. 2004 Feb;9(2):213-8.
[262] Francks C, Tozzi F, Farmer A, Vincent JB, Rujescu D, St Clair D, et al. Population-based linkage analysis of schizophrenia and bipolar case-control cohorts identifies a potential susceptibility locus on 19q13. Molecular psychiatry. 2008 Sep 16.
[263] Hattori E, Ebihara M, Yamada K, Ohba H, Shibuya H, Yoshikawa T. Identification of a compound short tandem repeat stretch in the 5'-upstream region of the cholecystokinin gene, and its association with panic disorder but not with schizophrenia. Molecular psychiatry. 2001 Jul;6(4):465-70.
[264] Hosing VG, Schirmacher A, Kuhlenbaumer G, Freitag C, Sand P, Schlesiger C, et al. Cholecystokinin- and cholecystokinin-B-receptor gene polymorphisms in panic disorder. J Neural Transm Suppl. 2004(68):147-56.
[265] Wang Z, Wassink T, Andreasen NC, Crowe RR. Possible association of a cholecystokinin promoter variant to schizophrenia. American journal of medical genetics. 2002 Jul 8;114(5):479-82.
[266] Shindo S, Yoshioka N. Polymorphisms of the cholecystokinin gene promoter region in suicide victims in Japan. Forensic science international. 2005 May 28;150(1):85-90.
[267] Bowen T, Norton N, Jacobsen NJ, Guy C, Daniels JK, Sanders RD, et al. Linked polymorphisms upstream of exons 1 and 2 of the human cholecystokinin gene are not associated with schizophrenia or bipolar disorder. Molecular psychiatry. 1998 Jan;3(1):67-71.
[268] Hattori E, Yamada K, Ebihara M, Toyota T, Nankai M, Shibuya H, et al. Association study of the short tandem repeat in the 5' upstream region of the cholecystokinin gene with

mood disorders in the Japanese population. American journal of medical genetics. 2002 Jul 8;114(5):523-6.
[269] Crawley JN, Corwin RL. Biological actions of cholecystokinin. Peptides. 1994;15(4):731-55.
[270] Horiuchi Y, Nakayama J, Ishiguro H, Ohtsuki T, Detera-Wadleigh SD, Toyota T, et al. Possible association between a haplotype of the GABA-A receptor alpha 1 subunit gene (GABRA1) and mood disorders. Biological psychiatry. 2004 Jan 1;55(1):40-5.
[271] Petryshen TL, Middleton FA, Tahl AR, Rockwell GN, Purcell S, Aldinger KA, et al. Genetic investigation of chromosome 5q GABAA receptor subunit genes in schizophrenia. Molecular psychiatry. 2005 Dec;10(12):1074-88, 57.
[272] Shi J, Hattori E, Zou H, Badner JA, Christian SL, Gershon ES, et al. No evidence for association between 19 cholinergic genes and bipolar disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007 Sep 5;144B(6):715-23.
[273] Schiffer HH. Glutamate receptor genes: susceptibility factors in schizophrenia and depressive disorders? Mol Neurobiol. 2002 Apr;25(2):191-212.
[274] Yosifova A, Mushiroda T, Stoianov D, Vazharova R, Dimova I, Karachanak S, et al. Case-control association study of 65 candidate genes revealed a possible association of a SNP of HTR5A to be a factor susceptible to bipolar disease in Bulgarian population. Journal of affective disorders. 2009 Sep;117(1-2):87-97.
[275] McMahon FJ, Akula N, Schulze TG, Muglia P, Tozzi F, Detera-Wadleigh SD, et al. Meta-analysis of genome-wide association data identifies a risk locus for major mood disorders on 3p21.1. Nature genetics. 2010 Feb;42(2):128-31.
[276] Scott LJ, Muglia P, Kong XQ, Guan W, Flickinger M, Upmanyu R, et al. Genome-wide association and meta-analysis of bipolar disorder in individuals of European ancestry. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009 May 5;106(18):7501-6.
[277] Zeng Z, Wang T, Li T, Li Y, Chen P, Zhao Q, et al. Common SNPs and haplotypes in DGKH are associated with bipolar disorder and schizophrenia in the Chinese Han population. Molecular psychiatry. 2011 May;16(5):473-5.
[278] Hsu TM, Law SM, Duan S, Neri BP, Kwok PY. Genotyping single-nucleotide polymorphisms by the invader assay with dual-color fluorescence polarization detection. Clin Chem. 2001 Aug;47(8):1373-7.
[279] Birkett JT, Arranz MJ, Munro J, Osbourn S, Kerwin RW, Collier DA. Association analysis of the 5-HT5A gene in depression, psychosis and antipsychotic response. Neuroreport. 2000 Jun 26;11(9):2017-20.
[280] Arias B, Collier DA, Gasto C, Pintor L, Gutierrez B, Valles V, et al. Genetic variation in the 5-HT5A receptor gene in patients with bipolar disorder and major depression. Neuroscience letters. 2001 May 4;303(2):111-4.
[281] Shimron-Abarbanell D, Erdmann J, Vogt IR, Bryant SP, Spurr NK, Knapp M, et al. Human 5-HT5A receptor gene: systematic screening for DNA sequence variation and linkage mapping on chromosome 7q34-q36 using a polymorphism in the 5' untranslated region. Biochemical and biophysical research communications. 1997 Apr 7;233(1):6-9.
[282] Grailhe R, Grabtree GW, Hen R. Human 5-HT(5) receptors: the 5-HT(5A) receptor is functional but the 5-HT(5B) receptor was lost during mammalian evolution. Eur J Pharmacol. 2001 Apr 27;418(3):157-67.
[283] Thomas DR. 5-ht5A receptors as a therapeutic target. Pharmacology & therapeutics. 2006 Sep;111(3):707-14.
[284] Nelson DL. 5-HT5 receptors. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord. 2004

Feb;3(1):53-8.
[285] Detera-Wadleigh SD, Badner JA, Yoshikawa T, Sanders AR, Goldin LR, Turner G, et al. Initial genome scan of the NIMH genetics initiative bipolar pedigrees: chromosomes 4, 7, 9, 18, 19, 20, and 21q. American journal of medical genetics. 1997 May 31;74(3):254-62.
[286] Cichon S, Schumacher J, Muller DJ, Hurter M, Windemuth C, Strauch K, et al. A genome screen for genes predisposing to bipolar affective disorder detects a new susceptibility locus on 8q. Human molecular genetics. 2001 Dec 1;10(25):2933-44.
[287] Etain B, Mathieu F, Rietschel M, Maier W, Albus M, McKeon P, et al. Genome-wide scan for genes involved in bipolar affective disorder in 70 European families ascertained through a bipolar type I early-onset proband: supportive evidence for linkage at 3p14. Molecular psychiatry. 2006 Jul;11(7):685-94.
[288] Cassidy F, Zhao C, Badger J, Claffey E, Dobrin S, Roche S, et al. Genome-wide scan of bipolar disorder and investigation of population stratification effects on linkage: support for susceptibility loci at 4q21, 7q36, 9p21, 12q24, 14q24, and 16p13. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007 Sep 5;144B(6):791-801.
[289] Rapport MM, Green AA, Page IH. Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum. J Biol Chem. 1948 Jun;174(2):735-41.
[290] Twarog BM, Page IH. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. Am J Physiol. 1953 Oct;175(1):157-61.
[291] Turlejski K. Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. Acta Neurobiol Exp (Wars). 1996;56(2):619-36.
[292] Pletscher A, Shore PA, Brodie BB. Serotonin release as a possible mechanism of reserpine action. Science (New York, NY. 1955 Aug 26;122(3165):374-5.
[293] Coppen AJ. Biochemical aspects of depression. Int Psychiatry Clin. 1969;6(2):53-81.
[294] Prange AJ, Jr., Wilson IC, Lynn CW, Alltop LB, Stikeleather RA. L-tryptophan in mania. Contribution to a permissive hypothesis of affective disorders. Archives of general psychiatry. 1974 Jan;30(1):56-62.
[295] Gaddum JH, Picarelli ZP. Two kinds of tryptamine receptor. Br J Pharmacol Chemother. 1957 Sep;12(3):323-8.
[296] Bradley PB, Engel G, Feniuk W, Fozard JR, Humphrey PP, Middlemiss DN, et al. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. Neuropharmacology. 1986 Jun;25(6):563-76.
[297] Lin YM, Yang HC, Lai TJ, Fann CS, Sun HS. Receptor mediated effect of serotonergic transmission in patients with bipolar affective disorder. Journal of medical genetics. 2003 Oct;40(10):781-6.
[298] Vincent JB, Masellis M, Lawrence J, Choi V, Gurling HM, Parikh SV, et al. Genetic association analysis of serotonin system genes in bipolar affective disorder. The American journal of psychiatry. 1999 Jan;156(1):136-8.
[299] Bonnier B, Gorwood P, Hamon M, Sarfati Y, Boni C, Hardy-Bayle MC. Association of 5-HT(2A) receptor gene polymorphism with major affective disorders: the case of a subgroup of bipolar disorder with low suicide risk. Biological psychiatry. 2002 May 1;51(9):762-5.
[300] Chee IS, Lee SW, Kim JL, Wang SK, Shin YO, Shin SC, et al. 5-HT2A receptor gene promoter polymorphism -1438A/G and bipolar disorder. Psychiatric genetics. 2001 Sep;11(3):111-4.
[301] Dubin AE, Huvar R, D'Andrea MR, Pyati J, Zhu JY, Joy KC, et al. The pharmacological and functional characteristics of the serotonin 5-HT(3A) receptor are specifically modified by a 5-HT(3B) receptor subunit. J Biol Chem. 1999 Oct

22;274(43):30799-810.
[302] Rodd ZA, Gryszowka VE, Toalston JE, Oster SM, Ji D, Bell RL, et al. The reinforcing actions of a serotonin-3 receptor agonist within the ventral tegmental area: evidence for subregional and genetic differences and involvement of dopamine neurons. J Pharmacol Exp Ther. 2007 Jun;321(3):1003-12.
[303] Ciranna L. Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology. Curr Neuropharmacol. 2006 Apr;4(2):101-14.
[304] Garner C, McInnes LA, Service SK, Spesny M, Fournier E, Leon P, et al. Linkage analysis of a complex pedigree with severe bipolar disorder, using a Markov chain Monte Carlo method. American journal of human genetics. 2001 Apr;68(4):1061-4.
[305] Crowe RR, Vieland V. Report of the Chromosome 5 Workshop of the Sixth World Congress on Psychiatric Genetics. American journal of medical genetics. 1999 Jun 18;88(3):229-32.
[306] Ohtsuki T, Ishiguro H, Detera-Wadleigh SD, Toyota T, Shimizu H, Yamada K, et al. Association between serotonin 4 receptor gene polymorphisms and bipolar disorder in Japanese case-control samples and the NIMH Genetics Initiative Bipolar Pedigrees. Molecular psychiatry. 2002;7(9):954-61.
[307] Green E, Craddock N. Brain-derived neurotrophic factor as a potential risk locus for bipolar disorder: evidence, limitations, and implications. Curr Psychiatry Rep. 2003 Dec;5(6):469-76.
[308] Strauss J, Barr CL, George CJ, King N, Shaikh S, Devlin B, et al. Association study of brain-derived neurotrophic factor in adults with a history of childhood onset mood disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2004 Nov 15;131B(1):16-9.
[309] Strauss J, Barr CL, George CJ, Devlin B, Vetro A, Kiss E, et al. Brain-derived neurotrophic factor variants are associated with childhood-onset mood disorder: confirmation in a Hungarian sample. Molecular psychiatry. 2005 Sep;10(9):861-7.
[310] Green EK, Raybould R, Macgregor S, Hyde S, Young AH, O'Donovan MC, et al. Genetic variation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in bipolar disorder: case-control study of over 3000 individuals from the UK. Br J Psychiatry. 2006 Jan;188:21-5.
[311] Lohoff FW, Sander T, Ferraro TN, Dahl JP, Gallinat J, Berrettini WH. Confirmation of association between the Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar I disorder. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2005 Nov 5;139B(1):51-3.
[312] Johnston-Wilson NL, Sims CD, Hofmann JP, Anderson L, Shore AD, Torrey EF, et al. Disease-specific alterations in frontal cortex brain proteins in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder. The Stanley Neuropathology Consortium. Molecular psychiatry. 2000 Mar;5(2):142-9.
[313] Schizophrenia Linkage Collaborative Group for Chromosomes 3 a. Additional support for schizophrenia linkage on chromosomes 6 and 8: a multicenter study. Schizophrenia Linkage Collaborative Group for Chromosomes 3, 6 and 8. American journal of medical genetics. 1996 Nov 22;67(6):580-94.
[314] Blouin JL, Dombroski BA, Nath SK, Lasseter VK, Wolyniec PS, Nestadt G, et al. Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21. Nature genetics. 1998 Sep;20(1):70-3.
[315] Brzustowicz LM, Hodgkinson KA, Chow EW, Honer WG, Bassett AS. Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22. Science (New York, NY. 2000 Apr 28;288(5466):678-82.

[316] Kendler KS, Myers JM, O'Neill FA, Martin R, Murphy B, MacLean CJ, et al. Clinical features of schizophrenia and linkage to chromosomes 5q, 6p, 8p, and 10p in the Irish Study of High-Density Schizophrenia Families. The American journal of psychiatry. 2000 Mar;157(3):402-8.
[317] Gurling HM, Kalsi G, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Sherrington R, Mankoo BS, et al. 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. American journal of human genetics. 2001 Mar;68(3):661-73.
[318] Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, et al. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. American journal of human genetics. 2003 Jul;73(1):34-48.
[319] Nakata K, Ujike H, Sakai A, Takaki M, Imamura T, Tanaka Y, et al. The human dihydropyrimidinase-related protein 2 gene on chromosome 8p21 is associated with paranoid-type schizophrenia. Biological psychiatry. 2003 Apr 1;53(7):571-6.
[320] Nakata K, Ujike H, Tanaka Y, Takaki M, Sakai A, Nomura A, et al. No association between the dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2) gene and bipolar disorder in humans. Neuroscience letters. 2003 Oct 9;349(3):171-4.
[321] Hong LE, Wonodi I, Avila MT, Buchanan RW, McMahon RP, Mitchell BD, et al. Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2) gene and association to deficit and nondeficit schizophrenia. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2005 Jul 5;136B(1):8-11.
[322] Fallin MD, Lasseter VK, Avramopoulos D, Nicodemus KK, Wolyniec PS, McGrath JA, et al. Bipolar I disorder and schizophrenia: a 440-single-nucleotide polymorphism screen of 64 candidate genes among Ashkenazi Jewish case-parent trios. American journal of human genetics. 2005 Dec;77(6):918-36.
[323] Siffert W, Rosskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, et al. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. Nature genetics. 1998 Jan;18(1):45-8.
[324] Siffert W. G-protein beta3 subunit 825T allele and hypertension. Curr Hypertens Rep. 2003 Feb;5(1):47-53.
[325] Benjafield AV, Jeyasingam CL, Nyholt DR, Griffiths LR, Morris BJ. G-protein beta3 subunit gene (GNB3) variant in causation of essential hypertension. Hypertension. 1998 Dec;32(6):1094-7.
[326] Dong Y, Zhu H, Sagnella GA, Carter ND, Cook DG, Cappuccio FP. Association between the C825T polymorphism of the G protein beta3-subunit gene and hypertension in blacks. Hypertension. 1999 Dec;34(6):1193-6.
[327] Hengstenberg C, Schunkert H, Mayer B, Doring A, Lowel H, Hense HW, et al. Association between a polymorphism in the G protein beta3 subunit gene (GNB3) with arterial hypertension but not with myocardial infarction. Cardiovasc Res. 2001 Mar;49(4):820-7.
[328] Zill P, Baghai TC, Zwanzger P, Schule C, Minov C, Riedel M, et al. Evidence for an association between a G-protein beta3-gene variant with depression and response to antidepressant treatment. Neuroreport. 2000 Jun 26;11(9):1893-7.
[329] Serretti A, Lorenzi C, Cusin C, Zanardi R, Lattuada E, Rossini D, et al. SSRIs antidepressant activity is influenced by G beta 3 variants. Eur Neuropsychopharmacol. 2003 Mar;13(2):117-22.
[330] Bondy B, Baghai TC, Zill P, Bottlender R, Jaeger M, Minov C, et al. Combined action of the ACE D- and the G-protein beta3 T-allele in major depression: a possible link to

cardiovascular disease? Molecular psychiatry. 2002;7(10):1120-6.
[331] Freedman R, Leonard S, Olincy A, Kaufmann CA, Malaspina D, Cloninger CR, et al. Evidence for the multigenic inheritance of schizophrenia. American journal of medical genetics. 2001 Dec 8;105(8):794-800.
[332] Lin D, Edwards AS, Fawcett JP, Mbamalu G, Scott JD, Pawson T. A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. Nat Cell Biol. 2000 Aug;2(8):540-7.
[333] Shi SH, Jan LY, Jan YN. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. Cell. 2003 Jan 10;112(1):63-75.
[334] McAuley EZ, Blair IP, Liu Z, Fullerton JM, Scimone A, Van Herten M, et al. A genome screen of 35 bipolar affective disorder pedigrees provides significant evidence for a susceptibility locus on chromosome 15q25-26. Molecular psychiatry. 2009 May;14(5):492-500.
[335] McInnes LA, Escamilla MA, Service SK, Reus VI, Leon P, Silva S, et al. A complete genome screen for genes predisposing to severe bipolar disorder in two Costa Rican pedigrees. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996 Nov 12;93(23):13060-5.
[336] Muglia P, Tozzi F, Galwey NW, Francks C, Upmanyu R, Kong XQ, et al. Genome-wide association study of recurrent major depressive disorder in two European case-control cohorts. Molecular psychiatry. 2010 Jun;15(6):589-601.

Ачкова М., Алексиев А., Дончев П., Машева С., Михов В., Попов Г., Поглев М., Стамболова С., Станкушев Т., Стойчев Р., Танчев О., Тодоров С., Цонев Ц., Шишков А. Психиатрия. ”Знание” ЕООД 1998.
Димитрова А.: ”Фамилно-базирани асоциативни проучвания при биполарно афективно разстройство”, докторска дисертация, София, 2004
Бечева Е.: ” Цялостно геномно сканиране на единични нуклеотидни полиморфизми при български пациенти с шизофрения и здрави контроли”, докторска дисертация, София, 2010

ДЕКЛАРАЦИЯ ЗА ОРИГИНАЛНОСТ

Декларирам, че представените в настоящия дисертационен труд резултати са плод на собствени изследвания, а обсъждането и изводите не са заимствани от други източници без цитиране.

Дата:..... Подпис.....

гр. София /Аделина Йосифова/