МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

КАТЕДРА ПО МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

ЦЕНТЪР ПО МОЛЕКУЛНА МЕДИЦИНА

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

АСОЦИАТИВНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ НА КАНДИДАТ ГЕНИ ПРИ БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ С АФЕКТИВНИ РАЗСТРОЙСТВА

Научни ръководители:
Академик проф. д-р В. Митев, дм, дбн;
Доц. Радка Кънева, дб
Консултант: Проф. Иво Кременски

Докторант:
Мина Ангелова Иванова-Стоевска

София, 2015 г.

Дисертационният труд съдържа 197 страници, 37 таблици и 16 фигури. Библиографията включва 510 литературни източника. Обсъден е и е насочен за публична защита от катедра Медицинска химия и биохимия към медицински факултет на МУ– София на 18.05.2015 г.

Публичната защита ще се проведе на **30.09.2015**, пред научно жури, назначено съгласно чл.73 ал.2 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в МУ– София и въз основа на заповед РК 36-1124 / 15.06.15 на ректора на МУ– София, в състав:

Председател:

Академик проф. д-р Ваньо Иванов Митев, дм, дбн – вътрешен член за МУ-София; Катедра по медицинска химия и биохимия, ректор МУ-София; научен ръководител на докторанта;

Членове:

Доц. д-р Иванка Истилианова Димова, дм - вътрешен член за МУ-София; Катедра по медицинска генетика на Медицински факултет при МУ-София;

Проф. д-р Валентин Христов Акабалиев, дмн - външен член за МУ-София; Катедра по психиатрия и медицинска психология, МУ-Пловдив;

Доц. д-р Венета Любомирова Георгиева-Абаждиева, дм - външен член за МУ-София; пенсиониран преподавател от повече от пет години от академичния състав на МУ-София;

Проф. Елена Иванова Георгиева, дб – външен член за МУ-София; Институт по Физиология на Растенията и Генетика, БАН.

Резервни членове:

Доц. Радка Кънева, дб - вътрешен резервен член за МУ-София; Катедра по медицинска химия и биохимия, МУ-София, Център по молекулна медицина, научен ръководител на докторанта, който става редовен при отсъствие на титуляр;

Доц. Маргарита Димитрова Апостолова, дб - външен резервен член за МУ-София, Институт по молекулярна биология БАН, , който става редовен при отсъствие на титуляр.

Всички изследвания по дисертационния труд са извършени в Центъра по Молекулна Медицина, Катедра Медицинска Химия и Биохимия, МФ, МУ – София. Материалите по защитата са на разположение в Катедра Медицинска Химия и Биохимия и в Център по Молекулна Медицина, МУ– София, 14ти етаж, СБАЛАГ „Майчин дом", ул. Здраве № 2, София.

Автор:	Мина Ангелова Иванова-Стоевска
Заглавие:	Асоциативни изследвания на кандидат гени при български пациенти с афективни разстройства
Област на висше образование:	4.Природни науки, математика и информатика
Професионално направление:	4.3.Биологически науки
Докторска програма:	Молекулярна генетика

СЪДЪРЖАНИЕ

I. ВЪВЕДЕНИЕ 5
II. ЦЕЛ 7
III. ЗАДАЧИ 7
IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ 8
V. РЕЗУЛТАТИ 13
V. 1. Резултати за кандидат-ген *TPH2* 13
V. 2. Резултати за кандидат-ген SLC6A4 14
V. 3. Резултати за кандидат-ген *DRD2* 16
V. 4. Резултати за кандидат-ген *DISC1* 18
V. 5. Резултати за кандидат-ген *BDNF* 20
V. 6. Резултати за кандидат-ген *CLOCK* 24
V. 7. Резултати за кандидат-ген *CRH* 25
V. 8. Резултати за кандидат ген *CACNA1C* 25
V. 9. Резултати за кандидат ген ANK3 26
V. 10. Резултати от анализ за статистическа епистаза между изследваните генетични варианти 27
VI. ДИСКУСИЯ 31
VI. 1. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *TPH2* 31
VI. 2. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *SLC6A4* 32
VI. 3. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *DRD2* 34
VI. 4. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *DISC1* 36
VI. 5. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *BDNF* 38
VI. 6. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *CLOCK* 40
VI. 7. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *CRH* 41
VI. 8. Дискусия на резултатите за кандидат ген *CACNA1C* 41
VI. 9. Дискусия на резултатите за кандидат ген *ANK3* 43
VI. 10. Дискусия на резултатите получени при анализ за статистическа епистаза 44
VII. ОБОБЩЕНИ РЕЗУЛТАТИ 49
VIII. ИЗВОДИ 51
IX. НАУЧНИ ПРИНОСИ 53
X. ФИНАНСИРАНЕ 54
XI. ПУБЛИКАЦИИ 55
XII. БИБЛИОГРАФИЯ 57
SUMMARY 65

Използвани съкращения

Кирилица:

БАР I - биполярно афективно разстройство I тип; БАР II - II тип

ДНК – дезоксирибонуклеинова киселина

КОФ – Кортикотропин освобождаващ фактор

УАР - униполярно афективно разстройство

ХХН - хипоталамус-хипофиза-надбъбрек

ЦНС - централната нервна система

Латиница:

ADHD - Attention-Deficit Hyperactivity Disorder

BDNF - brain derived neutrophylic factor

COMT - катехол–О–метилтрансферазата

DAT1 - dopamine transporter 1, SLC6A3

DISC1 - Disrupted-In-Schizophrenia-1

DIP - Diagnostic Interview for Psychoses

DRD2 - dopamine receptor D2; DRD4 - dopamine receptor D4

DSM - Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

fMRI – функционален ядрено магнитен резонанс

GWA - Genome Wide Association

5-HT – 5-хидрокситриптамин, серотонин

5-HTT - серотонинов транспортер

MDD – Major depressive disorder

MRI – Magnetic Resonance Imaging (ядрено магнитен резонанс)

NDEL1 - Nuclear distribution protein nudE-like 1

NRG1 - neuregulin 1

PCR-полимеразна верижна реакция

PET - позитрон емисионната томография

RFLP - restriction fragment length polymorphism

SERT - серотонинов транспортер

SNP - single nucleotide polymorphism

SLC6A4 - solute carrier family 6, невротрансмитерния транспортер, серотонин

SSRIs - Selective serotonin reuptake inhibitors

TDT - transmission disequilibrium test

TPH - триптофан хидроксилаза

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Афективните разстройства (АР) представляват едни от най-тежките психиатрични заболявания, затрудняващи нормалното функциониране на пациентите, интеграцията им в обществото и са признати като водещ инвалидизиращ фактор в световен мащаб (WHO, 2008). При тях се наблюдава висок коморбиден риск от самоубийства ~20% (Bostwick, 2000; Keck, 2001) и злоупотреба с наркотични вещества ~29 % (Regier, 1990; Cassidy, 2001).

Най-често срещаните диагностични подкатегории са биполярно афективно разстройство I тип (БАР I), биполярно афективно разстройство II тип (БАР II), с честота между 0.4% и 1.6% (Yutzy, 2012; Bland, 1997; Maj, 2002) и униполярно афективно разстройство (УАР) с честота между 3.4% и 18% (Burt, 2002; Kessler, 2003).

Психопатологията на афективните разстройства се изразява в промени в настроението и поведението, в когнитивното функциониране както и някои соматични функции. Диагностицирането се базира на съвкупност от критерии, отчитащи продължителност и тежест на симптоматиката. В настоящото изследване е използван диагностичен наръчник на Американската Психиатрична Асоциация, 2013, DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders).

АР са комплексни заболявания, чието развитие се дължи на множество генетични варианти и фактори на околната среда. Наблюдават се епистатични взаимодействия между вариантите, които модифицират самостоятелното им влияние.

Хипотезите относно причините за заболяването се базират основно на наблюдаваните нарушения в невромедиаторните системи и промени в невропластичността и неврогенезата.

Наблюдава се абнормно функциониране на системите, участващи в преноса на информация и контролиращи функции като, емоционален статус, сън, будно състояние и сексуално желание. В настоящото проучване обект на изследване са кандидат гени от серотониновата и допаминовата невромедиация. Изследвани са варианти в *TPH2* гена, регулиращ синтеза на серотонин и в *SLC6A4* гена, регулиращ транспорта му. Изследвани са също така и генетични варианти в допаминов рецептор тип 2, *DRD2*.

Невропластичността представлява способността на мозъчните клетки да обработват и интегрират различни сигнали и дразнители и да адаптират реакциите си спрямо тях. Предполага се, че промени във функционалността на рецептори, йонни канали и елементи от сигналните пътища, участващи в този процес могат да допринасят за повишен риск от АР. В нашето проучване са изследвани варианти в експресиращите се в цялата ЦНС и свързани с неврогенеза и невронно оцеляване кандидат гените *DISC1* и *BDNF*.

DISC1 (Disrupted-In-Schizophrenia-1) се отличава с много разнообразна функционалност, свързва се с микротубули, центрозомни протеини и транскрипционни фактори и участва във вътреклетъчния транспорт, миграцията на невроните и предаването на сигнали между тях.

BDNF (brain derived neurotrophic factor) повлиява преживяемостта и адаптивността на невроните. По време на индивидуалното развитие участва в промяната на морфологията на аксоните, растежа на дендритите (Binder, 2004; Bibel, 2000), възбудимостта (Pezet, 2006; Yano, 2006) и в процеса на клетъчна смърт. Промени в експресията и съотношението между proBDNF и зрял продукт водят до функционални изменения (Huang, 2001) и могат да повлияят патологията на АР.

В настоящото проучване е изследван също и вариант в *CLOCK* гена, участващ в регулацията на циркадните ритми в човешкия организъм, контролиращи физиологични, биохимични и поведенчески функции. *CLOCK* генът кодира транскрипционен фактор, задействащ последователната експресия на гени в авторегулиращ се кръг, съответстващ на 24 часовите нужди. Изменения във функционирането на циркадните ритми съответстват на характерната симптоматика при АР (McClung, 2007; Harvey, 2008).

Изследван е и гена кодиращ кортикотропиноосвобождаващия фактор (КОФ) *CRH*, който синхронизира ендокринния и поведенчески отговор в следствие на стрес. Дисрегулация на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек е описана при различни невропсихиатрични заболявания включително и АР (Arborelius, 1999; Daban, 2005).

Изследвани са също така и генетични варианти в гените *CACNAC* и ANK3. CACNA1C гена, кодира алфа 1 С субединицата на калциев канал от L тип и участва в преноса на Ca^{2+} през клетъчната мембрана. Концентрацията на Ca^{2+} повлиява междуклетъчната комуникация, способността на генериране и предаване на сигнали както и регулацията на експресията на някои гени. Промени във функционирането на канала могат да доведат до по-продължителното му отворено или затворено състояние. Кандидат генът *ANK3* кодира анкирин 3 участващ в свързването на мембранните белтъци с цитоскелета на клетката и участва в структурното поддържане на йонните канали и на други мембранни структури (Kordeli, 1995).

Резултати от някои геномни асоциативни проучвания демонстрират връзката на йонните канали към повишен риск от АР посредством участието им в селективен транспорт на заредени йони, променящ мембранния потенциал и способността за комуникация. между невроните. Функционалността на йонните канали съответства на наличието на цикличност при протичането на АР.

Мета-анализ на геномни асоциативни проучвания посочва кандидат гените *CACNA1C* и *ANK3* също и с най-добри статистически резултати във връзка с АР (Lee, 2012).

В настоящото изследване са подбрани и генотипирани различни генетични варианти и е анализиран потенциалния ефект на всички възможни епистатични комбинации.

Изследването на генетичните и биологичните основи на АР може да спомогне за разработване на нови терапевтични подходи, евентуално повишаване качеството на живот на пациентите и намаляване на относителния дял на икономическа им тежест.

II. ЦЕЛ

Целта на настоящата дисертация е оценка на приноса на генетични варианти в кандидат гени, подбрани на базата на ключови хипотези за етиологията на АР и асоциирания с тях риск чрез провеждане на асоциативно изследване от типа случаи–контроли и фамилно асоциативно изследване при българи и роми.

III. ЗАДАЧИ

1. Събиране на биологичен материал и екстракция на ДНК от венозна кръв от пациенти с поставена клинична диагноза АР, както и събиране на материал от техни родственици и здрави контроли. Клиничната диагноза на пациентите е поставена чрез валидизирани диагностични инструменти (DSM-IV, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders).

2. Подбор на подходящи кандидат гени и ДНК полиморфизми с предполагаемо участие в патогенезата на афективните разстройства.

3. Избор на подходящ метод за генотипиране и оптимизиране на условията на реакциите.

4. Генотипиране на избраните маркери в група от пациенти с афективни разстройства от български и ромски произход, техни родственици и съответстващите им контроли чрез Real-Time PCR.

5. Статистическа обработка и анализ на получените резултати.

5.1. Определяне на алелните и генотипните честоти на изследваните маркери.

5.2. Сравняване на алелните и генотипните честоти между групите на болни с афективни разстройства и съответстващите им здрави контроли от български и ромски етнически произход.

5.3. Провеждане на фамилно-асоциативно изследване на ядрени семейства от двете етнически групи и търсене на неравновесно предаване на определени генетични варианти в засегнатото поколение.

5.4. Хаплотипен анализ и търсене на асоциирани хаплотипи или неравновесно предаване на определени хаплотипи на пациентите от техните родители при семействата.

5.6. Изследване за статистическа епистаза между всички генотипирани варианти.

IV. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Биологичен материал

Включените пациенти с афективни разстройства са събрани в рамките на съвместни изследователски проекти на Център по Молекулна Медицина, МУ-София и Катедра по психиатрия, УМБАЛ „Александровска", София. Биологичен материал е взиман само от пълнолетни лица и е събиран в психиатричните болници и отделения в София, Плевен, Русе, Търговище, Лом и Петрич. Всички пациенти са диагностицирани посредством SCAN (Schedules for Clinical Assessment in Neuropsychiatry) и DIP (Diagnostic Interview for Psychoses). Поставените диагнози на пациентите, включени в настоящето изследване съответстват на критериите на DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) на Американската Психиатрична Асоциация от 2000 година. Диагнозите са поставяни от двама лекари психиатри, запознати със случая. Членовете на семействата на пробандите са изследвани чрез FIGS (Family Interview for Genetic Studies) за уточняване на диагностичния им статут.

Контролната група от изследването от тип случаи-контроли е съставена от скринирани индивиди, за които е потвърдена липсата на психично заболяване.

Контролната група е съставена от доброволни участници, подбрани съобразно следните критерии:

- Съответстваща възраст с изследваната група пациенти;
- Принадлежност към една и съща етническа група с пациентите;
- Липса на родствена връзка с пациентите;
- Липса на фамилна история за психични заболявания.

Всички изследвани индивиди (пробанди, техни родственици и контроли) са информирани за целите на проучването и са подписали информирано съгласие. Изследването е одобрено и проведено в съответствие с изискванията и препоръките на Етичната Комисия към Медицински Университет София.

В настоящото изследване бяха генотипирани общо 1240 индивида, от които 1010 човека с български етнически произход и 230 с ромски произход.

Асоциативно изследване

В Таблица №1 е представено детайлно описание на изследваните пациентите по клинични диагнози и афективни статуси в асоциативното проучване. Преобладава процентното съдържание на жените (79% жени и 21% мъже) в извадката, а контролната група е в съответствие на пациентите с афективни разстройства по пол, възраст и етнически произход.

Таблица №1: Представяне на разпределението на пациентите от асоциативното проучване по диагнози и афективни статуси.

Афективен статус/ n=брой пациенти	**БАР тип I**	**БАР тип II**	**Шизоафективно р-во, биполярен тип**	**УАР**	**Здрави контроли**
А 1 n=304	270	29	5	0	171
А 2 n=414	270	29	5	110	205

Фамилно изследване

Детайлно описание на изследваните пациентите по клиничните диагнози, афективни статуси и етнически произход от фамилната извадка е представено в Таблица №2. Във фамилното изследване са включени общо 175 семейства от тип триоси от български и ромски произход, от които 119 семейства са от български етнически произход а 56 от ромски.

Таблица №2: Представяне разпределението на индивидите от българските и ромските семейства по диагнози и афективни статуси.

n-брой семейства	**БАР тип I**	**БАР тип II**	**ША**	**УАР**	**А 1**	**А 2**	**Здрави родственици**
Български с-ва n=119	96	16	9	50	121	171	220
Ромски с-ва n=56	58	9	9	22	76	98	132
Общо с-ва n=175	154	25	18	72	197	269	352

Избрани генетични варианти

Изследвани са 24 SNP (единични нуклеотидни замени) в 9 кандидат гена за АР. Информация за подбраните генетични варианти е представена в таблица №3.

Таблица №3: Изследвани генетични варианти, локация и функционалност.

Кандидат ген	SNP	Алели	Хромозома, позиция в гена	Локация	Функционалност на варианта
DISC1	rs3738401	A; G	1, exon 2	231830295	Arg264Gln
	rs6675281	C; T	1, exon 9	231954101	Leu607Phe
	rs821577	T; G	1, intron 9	232067057	
	rs821616	A; T	1, exon 11	232144598	Ser704Cys
	rs980989	T; G	1, exon 13	232176195	
CLOCK	rs3805154	C; T	4, intron	56363927	
CRH	rs12721510	A,C	8, promotor	67091182	
ANK3	rs9804190	C; T	10, 3' end	61839831	
	rs10994336	C; T	10, 5' end	62179812	
BDNF	rs6265	A,G	11, exon 2	27679916	Val66Met
	rs16917237	T; G	11, exon-intron boundaries	27702383	
	rs12273363	C; T	11, promotor	27744859	
DRD2	rs6277	C,T	11, exon 7	113283459	957C/T, Pro319Pro
	rs12800853	C; T	11, intron	113302514	
	rs7350522	T; G	11, intron	113305203	
	rs6589377	A; G	11, 5' end	113355736	
CACNA1C	rs1006737	A; G	12 intron 3	2345295	
TPH2	rs4570625	T; G	12, upstream	72331923	703G/T
	rs11178998	A; G	12, 5′ UTR (exon1)	72332715	A90G
	rs1386483	A,G	12, intron 8	72412494	
	rs4290270	A; T	12, exon 9	72416235	A57T, Ala375Ala
	rs1872824	C; T	12, intron 9	72430314	
SLC6A4	rs12150214	C; G	17, promotor	28550888	
	5-HTTLPR	L; S	17, promotor	28564346	

Използвани методи

За провеждане на генетичния анализ е използвана високомолекулна ДНК, изолирана от ядрени лимфоцити. При възможност кръв е вземана при оптималните за целта условия между 30 мин. и 1 час след хранене в епруветка с антикоагулант - К3 EDTA (етилен диамин тетраацетат). Пробата е съхранявана максимум 48 часа при +4°C.

Изолиране на ДНК

Използвани са два метода за екстракция на ДНК от венозна кръв с цел получаване на високомолекулна ДНК с минимални примеси на белтъци, РНК и гликопротеини:

- Екстракция чрез солеви метод (Miller, 1988);
- Екстракция чрез полуавтоматична сепарираща система - CHEMAGEN® Magnetic Separation метод.

При изолиране на високомолекулна ДНК от венозна кръв чрез изсолване на белтъците по метода на Miller et al., 1988 се преминава през няколко етапа: получаване на клетъчно-ядрен лизат; разграждане на ядрените мембрани, белтъците и РНК в лизатит и преципитация на изчистената ДНК. Очакваният добив от 10 ml кръв е около 300-800 ng/ μl ДНК.

При изолиране на ДНК от венозна кръв чрез CHEMAGEN® Magnetic Separation метод се преминава през следните етапи: получаване на клетъчно-ядрен лизат и разграждане на белтъците и РНК; свързване на ДНК с магнитните частици; активиране на магнитното поле и пречистване на ДНК пробите; елуиране на ДНК.

Изолирането на ДНК от кръв с Chemagen полуавтоматичната сепарираща система, се извършва посредством магнитни частици, съдържащи –COOH групи, които свързват молекули с амино групи като белтъци, амино-лиганди и други. Активирането на –COOH група на матрицата се извършва чрез смяна на pH на средата. Магнитните частици се пренасят през различни разтвори заедно със свързаната към тях ДНК, за оптимално пречистване. Получената ДНК чрез този метод е с висок добив и чистота.

Качеството на получената високомолекулна ДНК е оценено и тествано чрез агарозна гел електрофореза и спектрофотометрично с NanoDrop (Thermo Scientific).

Генотипиране

Използван е TaqMan® метод, представляващ количествен анализ за генотипиране на полиморфизми. Комплементарната верига се изгражда като Taq полимеразата добавя нуклеотиди по растящата верига и същевременно премахва нуклеотидите от сондата прикрепена към таргетната ДНК верига чрез 5’->3’ нуклеазната си активност. По време на реакцията в началото сондата е интактна и близостта на гасителя до репортера потиска флуоресценцията на репортера. Процесът на синтез постепенно разделя репортера и гасителя като по този начин репортера се активира. Натрупването на PCR

продукти се отчита посредством лазер следящ увеличаването на флуоресценцията на репортера, а обработката на резултатите се извършва компютърно.

Статистически методи

Фенотипни модели

Използвани са два различни фенотипни модела, при които са проведени анализите:

- A1 - "тесен" фенотипен модел, при който като засегнати бяха включени пациенти с БАР I тип, БАР II тип и шизоафективно разстройство, докато всички други индивиди бяха считани, че са с неизвестна диагноза;
- A2 - "широк" фенотипен модел, който включва всички засегнати според "тесния" модел, както и всички пациенти с УАР (рекурентна депресия).

Резултатите от генотипирането бяха статистически анализирани посредством програмите Vassar stats (http://www.vassarstats.net), PLINK (Purcell, 2007) и SPSS (SPSS IBM, New York, USA).

Поради липса на статистически значими разлики в алелните и генотипните честоти на всички изследвани варианти между българи и роми е проведен статистически анализ, включващ едновременно семейства от двата етноса. Увеличаването на фамилната извадка цели постигане на по-голяма статистическа сила на анализа, като същевременно е проведено и отделно изследване на двете етнически групи.

TDT transmission disequilibrium test

Статистическият анализ на фамилно-базирани асоциативни изследвания е извършен чрез TDT метода (transmission disequilibrium test), при който алелите предадени от хетерозиготните родители на засегнато потомство се сравняват с очакваното разпределение на алелите в поколението (Spielman, 1993). В настоящото проучване за прилагането на TDT метода при обработката на фамилните данни е използвана статистическата програма PLINK.

Анализ за статистическа епистаза

Анализът за епистаза предоставя възможност да се идентифицират генетични варианти, които чрез други подходи и методи биха могли да останат незабелязани. Статистическата епистаза между два или повече генетични варианта не се обяснява непременно с наличие на биологически механизми, а може да се дължи на едновременно присъствие или отсъствие на генетичните варианти участващи в нея. Идентифицирането на статистическа епистаза може да се използва като изходна точка за по-детайлно изследване посредством мултидисциплинарни експериментални подходи. Оценката на статистическата епистаза в настоящото изследване е осъществена чрез използването на логистична регресия в програмите PLINK и SPSS for Windows. Логистичната регресия прогнозира наличието или отсъствието на определена характеристика в зависимост от набор променливи.

V. РЕЗУЛТАТИ

Кандидат-гени от серотониновата невромедиация - *TPH2*, *SLC6A4*

V. 1. Резултати за кандидат-ген *TPH2* (Tryptophan hydroxylase 2 gene)

Продуктът на *TPH2* гена кодира скоростопределящия ензим в синтезата на ключовия невромедиатор серотонин, с най-високи нива на експресия установени в мозъчната зона raphe nucleus. В настоящото проучване са изследвани 5 еднонуклеотидни замени в триптофан хидроксилазния ензим (TPH; EC 1.14.16.4), които повлияват нормалното функциониране на ензима. Анализирани са 2 генетични варианта разположени в 5'UTR, rs4570625 (703G/T), rs11178998 (A90G) и 3 генетични варианта (rs1386483, rs4290270, rs1872824) намиращи се съответно в интрон 8, екзон 9 и интрон 9.

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на TPH2 кандидат ген

При сравнение на алелните и генотипните честоти на петте изследвани генетични варианта между пациенти и контроли от български произход не са открити статистически значими разлики при двата фенотипа. Проведеното проучване показва липса на асоциация на rs457062512, rs11178998, 1386483, rs4290270 и rs1872824 с афективни разстройства в българската популация.

Анализирани са допълнително и всички възможни хаплотипи формирани от изследваните генетични варианти в *TPH2* гена, но не са идентифицирани хаплотипи, асоциирани с A1 или A2 афективните статуси.

Фамилно изследване на полиморфизми в TPH2 кандидат гена

Проведен е TDT анализ на изследваните пет еднонуклеотидни замени в *TPH2* гена, но не е установена неравновесна трансмисия за някой от алелите на пациенти от техните родители при тясна и широка фенотипна характеристика. Анализирани са съвместно и отделно българските и ромските семейства. Не е идентифицирано преференциално предаване на алели на rs457062512, rs11178998, 1386483, rs4290270 и rs1872824 при TDT анализа независимо от етноса и изследвания фенотипен модел.

TDT анализ на TPH2 хаплотипи

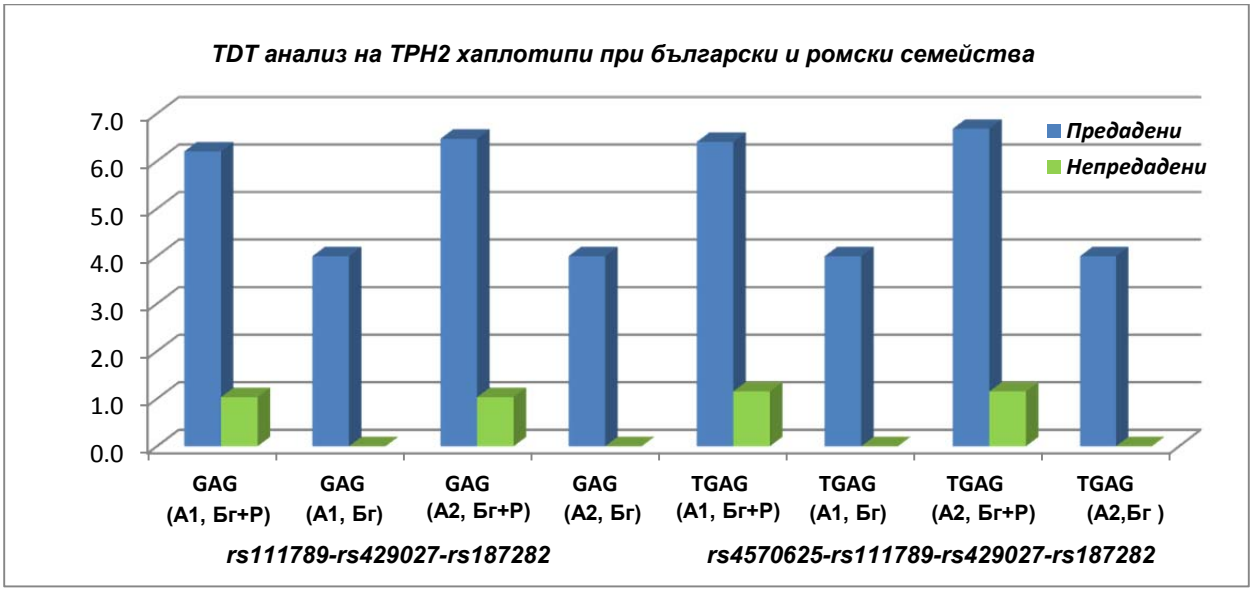
Проведен е хаплотипен TDT анализ в двете етнически групи заедно и поотделно. Идентифицирани са статистически гранични резултати за два *TPH2* хаплотипа, които вероятно имат връзка с повишен риск от развитие на заболяването в изследваната фамилна група. За хаплотип rs111789/rs429027/rs187282, GAG е установено, че е по-често предаван от родители на пробанди при анализа включващ едновременно български и ромски семейства, както и при отделно проведеният TDT тест само на български семейства при двата фенотипни модела. Същата тенденция е установена и за сходният хаплотип rs4570625/ rs11178998/ rs4290270 / rs1872824, TGAG, който също е по-често предаван на пациентите при съвместния TDT анализ на български и ромски семейства, както и само при българските семейства при A1 и A2. Получените резултати и за двата хаплотипа са с гранична статистическа значимост, и най-вероятно имат слабо влияние върху риска от АР при български и ромски семейства независимо от фенотипа.

Резултатите от хаплотипния TDT анализ са представени в Таблица №4, а графичното съотношение на предадени към непредадени хаплотипи е представено на Фигура №1.

Таблица №4: TDT анализ на *TPH2* хаплотипи в семейства от български и ромски произход. *В таблицата са отбелязани само статистически значимите резултати.*

Хаплотип		**CHISQ**	**p-value**	**Етнос**	**Фенотип**
rs111789/rs4290270/rs187282	GAG	3.67	0.055	български+ромски с-ва	A1
	GAG	3.94	0.047	български+ромски с-ва	A2
	GAG	4	0.046	български с-ва	A1
	GAG	4	0.046	български с-ва	A2
s4570625/ rs11178998/ rs4290270 / rs1872824	TGAG	3.65	0.056	български+ромски с-ва	A1
	TGAG	3.9	0.048	български+ромски с-ва	A2
	TGAG	4	0.046	български с-ва	A1
	TGAG	4	0.046	български с-ва	A2

Фигура №1: Графично представяне на съотношението предавани към непредавани *TPH2* хаплотипи в български и ромски семейства при тясна (A1) и широка (A2) фенотипна дефиниция.



V. 2. Резултати за кандидат-ген SLC6A4

В генът *SLC6A4*, картиран в район 17q11.1–q12 и кодиращ Na^+ и Cl^- зависим серотонинов транспортер са изследвани двата полиморфизма, rs12150214 и 5-HTTLPR. Разположеният в интрон 1, rs12150214 е позициониран в район с множество регулаторни участъци, а другия изследван генетичен вариант 5-HTTLPR представлява 43 bp инсерция или делеция в промоторния регион на гена. Вариантът с инсерцията (L) има по-високи нива на транскрипция спрямо генетичния вариант с делецията (S) (Lesch, 1996), а S вариантът е асоцииран с АР както и с други психиатрични разстройства (Cho, 2005, Hauser, 2003).

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на SLC6A4 кандидат гена

В настоящото изследване е установена асоциация на вариант rs12150214 с АР и при двата изследвани фенотипа. Алел С е по-често срещан при пациенти спрямо контроли и за него са получени идентични в статистическо отношение резултати при А1 и А2. Това се потвърждава и от анализа на генотипните данни, където генотип G/G е по-рядък при пациенти (p=0.03, А1 и p=0.3, А2), а генотипите С/С и С/G с участието на алел С са по-чести при пациенти. Резултатите демонстрират или доминантен ефект на по-редкия алел С, повишаващ риска от афективни разстроиства или рецесивен протективен ефект на алел G в българската популация независимо от фенотипната дефиниция.

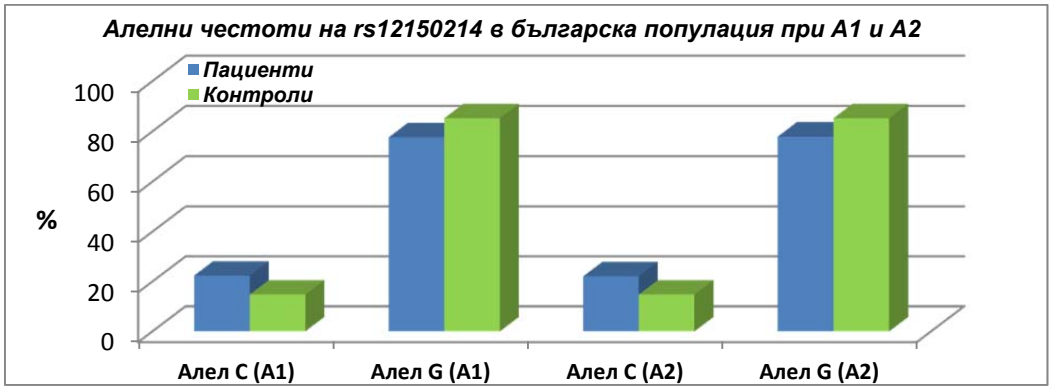
Асоциативното проучване не показва данни за асоциация на промоторния полиморфизъм 5-HTTLPR с АР в изследваната извадка. При сравняване на алелните и генотипните честоти между болни и контроли не са установени статистически значими разлики при тесен и широк фенотипен модел.

Резултатите от асоциативното проучване на rs12150214 в *SLC6A4* гена са представени в Таблица №5, а на Фигура №2 е представено графично разпределението на алелните честоти в групите на пациенти и контроли.

Таблица №5: Алелна и генотипна асоциация на генетични варианти в *SLC6A4* гена в българска популация.

SLC6A4	**Пациенти А1**	**Контроли А1**	**Пациенти А2**	**Контроли А2**	**P A1**	**OR A1**	**P A2**	**OR A2**
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)				
rs12150214								
Алели								
C	115/22.37	39 / 14.77	144/22.09	39 / 14.77	0.01	1.66	0.01	1.63
G	399/77.63	225 / 85.23	508/77.91	225 / 85.23	0.01	0.60	0.01	0.61
Генотипи								
C/C	14/5.45	2 / 1.51	17/5.22	2 / 1.51	0.06	3.74	0.07	3.58
C/G	87/33.85	35 / 26.52	110/33.74	35 / 26.52	0.14	1.42	0.13	1.41
G/G	156/60.70	95 / 71.97	199/61.04	95 / 71.97	0.03	0.60	0.03	0.61
Доминантен модел					0.03		0.03	
Рецесивен модел					0.06		0.07	

Фигура №2: Графично разпределение на алелните честоти на rs12150214 в *SLC6A4* гена:



Проведеното изследване на *SLC6A4* хаплотипи, не са установява статистически значими резултати и не идентифицира хаплотипи с участието на изследваните *SLC6A4* варианти, асоциирани с АР.

Фамилно изследване на полиморфизми в SLC6A4 гена

Въпреки данните за асоциация получени за rs12150214 в SLC6A4 гена, фамилното изследване не установява неравновесно предаване от родители на пробанди на алелите и на двата изследвани полиморфизма в кандидат-гена на серотониновия транспортер. Не се потвърждава връзката на rs12150214 с повишен риск от АР във фамилната извадка от български и ромски семейства.

Кандидат-гени от допаминова невромедиация

V. 3. Резултати за кандидат-ген *DRD2*

Кандидат-генът *DRD2,* намиращ се на 11 хромозома, кодира допаминов рецептор от тип 2 и в него са изследвани 4 еднонуклеотидни замени, rs6277, rs12800853, rs7350522, rs6589377. Генетичният вариант rs6277 се намира в екзон 7 и води до синонимна аминокиселинна замяна, повлияваща стабилноста на матричната РНК, rs12800853 и rs7350522 са разположени в интронни участъци, а rs6589377 в 5' края на *DRD2* кандидат гена.

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на DRD2 гена

При сравняване на алелните и генотипните честоти и на четирите изследвани варианта в *DRD2* кандидат-гена не се откриват статистически значими разлики между пациенти и контроли както при тесен така и при широк фенотипен статус. Настоящото изследване показва липса на алелна и генотипна асоциация на rs6277, rs12800853, rs7350522 и rs6589377 с АР при българи.

Проведеният анализ за хаплотипна асоциация, при който са изследвани всички възможни хаплотипи между rs6277, rs12800853, rs7350522 и rs6589377, не се идентифицира асоциация с повишен риск от развитие на АР в българската популация.

Фамилно изследване на полиморфизми в DRD2 гена

Проведеният TDT анализ на изследваните генетични варианти в кандидат гена *DRD2* не установява преференциално предаване на някои от алелите на rs6277, rs12800853 и rs7350522 от родители в засегнатото поколение. Съвместният TDT анализ на семейства от български и ромски произход, както и анализа отделно на двете етнически групи потвърждава липсата на неравновесно предаване на алелите на тези три генетични варианта при тесен и при широк фенотип. За генетичен маркер rs6589377 са получени статистически гранични резултати (p=0.04) при съвместен анализ на български и ромски семейства при A1 и A2, като е установено по-рядко предаване на алел G и по-често предаване на алел A в засегнатото поколение. Забелязана е и тенденция за rs7350522 (p=0.05), алел G да е по-често унаследяван само при българските семейства при широк фенотип. Резултатите от TDT анализа се припокриват с тези от асоциативното изследване за rs6277, rs12800853, rs7350522, демонстрирайки липса на асоциация с АР, а за алел G на rs6589377 е получен слаб протективен ефект.

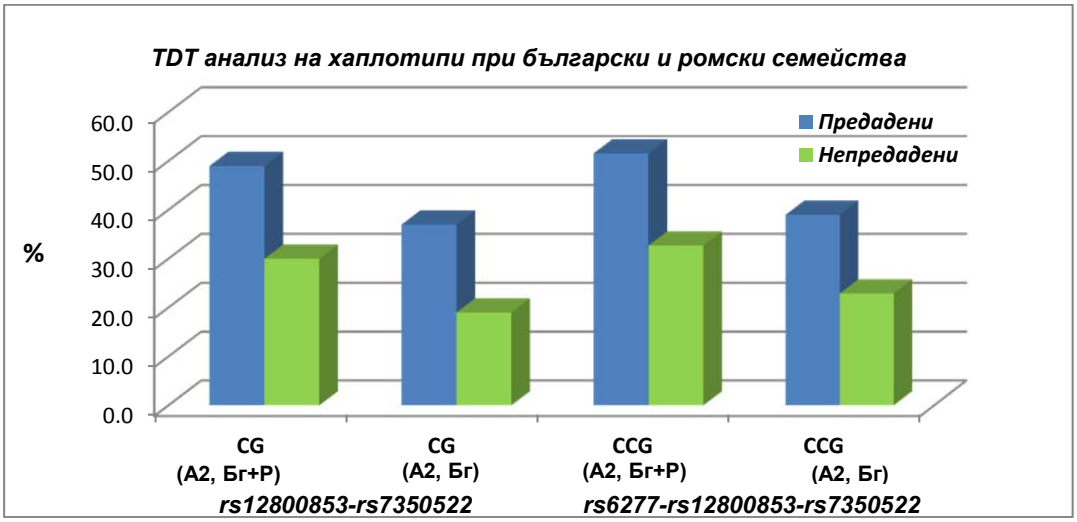
TDT анализ на DRD2 хаплотипи

Проведен е хаплотипен TDT анализ на всички възможни хаплотипи формирани от изследваните варианти в *DRD2* кандидат гена и са идентифицирани няколко неравновесно предавани хаплотипа в извадката от български и ромски семейства. За хаплотипи rs12800853/rs7350522, CG и rs6277/rs12800853/rs7350522, CCG, притежаващи еднаква основна част е установено, че са по-често предавани на пациенти при A2. Хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377, CCTG е по-рядко предаван в засегнатото поколение отново при A2. Отделният анализ на същите хаплотипи само при българските семейства установява за rs12800853/rs7350522, CG статистически по-силна тенденция да е по-често предаван от родители на пациенти. За хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522, CCG са получени идентични резултати при A2 независимо от етноса. При българските семейства не се реплицират резултатите за по-рядко предаване на хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377, CCTG на пробандите. Резултатите от проведеният хаплотипен TDT тест са представени в Таблица №6, а Фигура №3 графично представя съотношението предавани към непредавани хаплотипи.

Таблица №6: TDT анализ на *DRD2* хаплотипи в семейства от български и ромски произход: *В таблицата са отбелязани само статистически значимите резултати.*

Хаплотип		**CHISQ**	**p-value**	**Етнос**	**Фенотип**
rs12800853/rs7350522	CG	4.57	0.03	български+ромски с-ва	A2
	CG	5.79	0.02	български с-ва	A2
rs6277/rs12800853/rs7350522	CCG	4.23	0.04	български+ромски с-ва	A2
	CCG	4.21	0.04	български с-ва	A2
rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377	CCTG	4.18	0.04	български+ромски с-ва	A2

Фигура №3: Графично представяне на съотношение предавани към непредавани *DRD2* хаплотипи в български и ромски семейства при широка (A2) фенотипна дефиниция.



Кандидат-гени, имащи връзка с невропластичността - *DISC1, BDNF*

V. 4. Резултати за кандидат-ген *DISC1*

В *DISC1* гена, картиран в 1q42.1, са изследвани 5 еднонуклеотидни замени, 3 функционални замени, водещи до аминокиселинна замяна, rs3738401 (Arg264Gln, екзон 2), rs6675281 (Leu607Phe, екзон 9), rs821616 (Ser704Cys, екзон 11) и 2 генетични варианта, намиращи се съответно в 3' UTR, rs980989 и в интрон 9, rs821577. Продуктът на гена участва в неврогенеза, пролиферация, диференциация и миграция и се свързва с транскрипционните фактори ATF4 и ATF5.

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на DISC1 гена

Не са установени статистически значими разлики в алелните и генотипните честоти между изследваните пациенти и контроли и следователно липсва алелна и генотипна асоциация при тесен и широк фенотипен модел. Не са идентифицирани и *DISC1* хаплотипи, които да са асоциирани с повишен риск от развитие на АР.

Фамилно изследване на полиморфизми в DISC1 гена

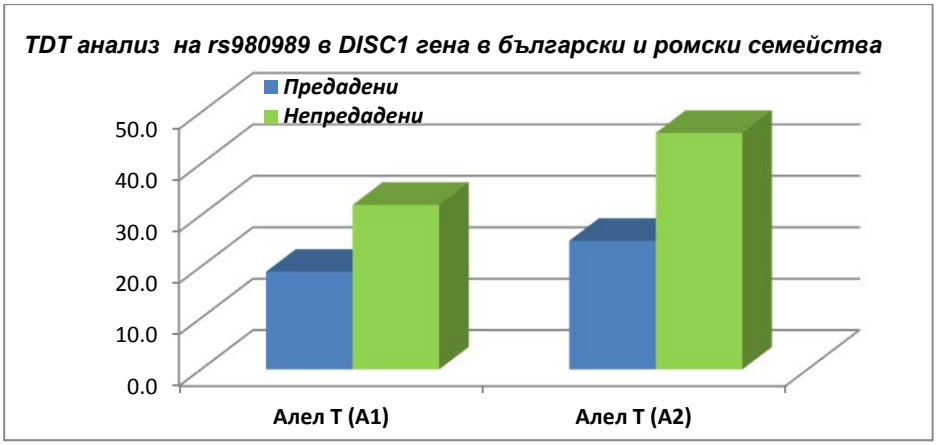
Проведеният съвместен TDT анализ на семейства от български и ромски произход показва преференциална трансмисия само на по-честия G алел на rs980989 при широк фенотипен модел (p=0.009). За другите изследвани маркери в рамките на *DISC1* кандидат гена, rs3738401, rs6675281, rs821577, rs821616 не се установява неравновесно предаване в поколението при A1 и A2. Резултати от TDT анализа на български и ромски семейства са представени в Таблица №7, а на Фигура №4 графично е представено съотношението между предадени и непредадени алели за rs980989. Не се установява преференциална трансмисия на алелите на маркери rs3738401, rs6675281, rs821577 и rs821616 в отделно проведения TDT анализ в двата етноса. Потвърждават се получените резултати за rs980989 при широк фенотип при ромските семейства (p=0.03). Въпреки липсата на статистическа значимост при българските семейства се забелязва тенденцията алел G на rs980989 да е по-често предаван в поколението. Възможно е приносът на ромските

семейства за получените резултати от съвместния TDT анализ на двата етноса да е по-голям, което може да се дължи на генетичната им хомогенност.

Таблица №7: TDT анализ на генетични варианти в *DISC1* кандидат гена в семейства от български и ромски произход:

Български и Ромски семейства	**Алел 1**	**Алел 2**	**A1**			**A2**		
			CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs980989	T	G	3.31	0.07	0.59	6.91	0.009	0.52
Български семейства								
rs980989	T	G	0.9	0.34	0.74	3.5	0.06	0.6
Ромски семейства								
rs980989	T	G	4.46	0.03	0.22	4.57	0.03	0.27

Фигура №4: Графично представяне на съотношението предадени към непредадени алели от TDT анализа на rs980989 в *DISC1* гена.



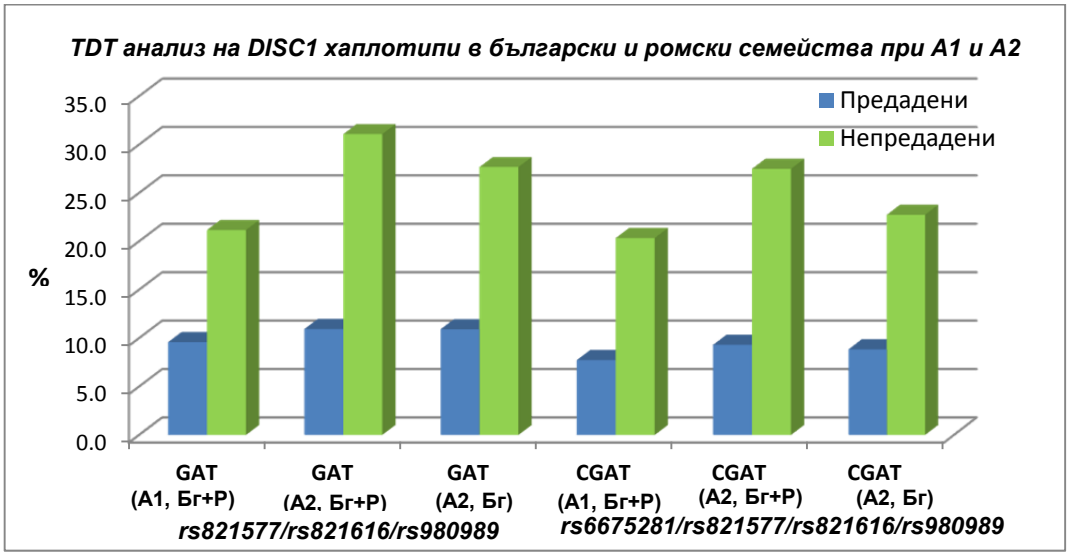
TDT анализ на DISC1 хаплотипи

Идентифицирани са няколко хаплотипа, които имат връзка с повишен риск от развитие на АР в изследваната извадка. Преференциална трансмисия е установена за хаплотип rs6675281/rs821577/rs821616, TGT (T/U, 6.37/0.84, p=0.039), а протективен ефект е идентифициран за хаплотипите: rs3738401/rs6675281/rs821577, ATT, (T/U, 0.91/6.62, p=0.037); rs3738401/rs6675281/rs821577/ rs821616, ATTA (T/U=0.23/5.08, p=0.035); rs821577/rs821616/rs980989, GAT, (T/U=10.95/31.09, p=0.002) и rs6675281/rs821577/rs821616/rs980989, CGAT (T/U=9.31/27.5, p=0.003), които са по-рядко предавани на пациенти при A2. Хаплотипите rs821577/rs821616/rs980989, GAT и rs6675281/rs821577/rs821616/rs980989, CGAT показват по-слаби, но статистически значими резултати на протективен ефект и при A1 като тенденцията се забелязва и при отделния анализ на двете етнически групи. Резултатите за неравновесно предаваните *DISC1* хаплотипи са представени в Таблица №8, а Фигура №5 демонстрира графичното съотношение на предадени към непредадени *DISC1* хаплотипи.

Таблица №8: TDT анализ на *DISC1* хаплотипи в семейства от български и ромски произход. *В таблицата са отбелязани само статистически значимите резултати.*

Хаплотип		CHISQ	p-value	Етнос	Фенотип
rs3738401 / rs6675281 / rs821577	ATT	4.33	0.037	български+ромски с-ва	A2
	ATT	4.67	0.031	български с-ва	A2
rs6675281 / rs821577 / rs821616	TGT	4.25	0.039	български+ромски с-ва	A2
rs821577 / rs821616 / rs980989	GAT	4.36	0.037	български+ромски с-ва	A1
	GAT	9.65	0.002	български+ромски с-ва	A2
	GAT	7.27	0.007	български с-ва	A2
rs3738401 / rs6675281 / rs821577 / rs821616	ATTA	4.43	0.035	български+ромски с-ва	A2
rs6675281 / rs821577 / rs821616 / rs980989	CGAT	5.66	0.017	български+ромски с-ва	A1
	CGAT	8.98	0.003	български+ромски с-ва	A2
	CGAT	6.11	0.013	български с-ва	A2

Фигура №5: Графично представяне на съотношение предавани/непредавани *DISC1* хаплотипи в български и ромски семейства при тясна (A1) и широка (A2) фенотипна дефиниция.



V. 5. Резултати за кандидат-ген *BDNF*

Кандидат-генът *BDNF* кодира малък димерен протеин, играещ роля на растежен фактор и участващ в процесите на оцеляване, диференциация, зреене и апоптоза на невроните. Генът е картиран в 11p14 и е с дължина около 70 kb, състои се от 11 екзона, 9

функционални промотора и 2 различни сигнала за полиаденилиране (Pruunsild, 2007), което позволява тъканно-специфична експресия, както и експресия в зависимост от етапа на развитие. Превръщането на про-BDNF в зрял BDNF се извършва вътреклетъчно и регулацията на нивата и съотношението им е от съществено значение за невронната пластичност (Teng, 2005). В *BDNF* гена са изследвани функционалния полиморфизъм rs6265, водещ до замяна на аминокиселината Val на 66 място с Met, и два други варианта, намиращи се преди промотора, rs12273363 и в екзон-интронните граници rs16917237, които повлияват регулацията на транскрипцията.

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на BDNF кандидат гена

Не са установени статистически значими разлики в алелните и генотипните честоти между контроли и пациенти за маркери rs6265 и rs12273363. Въпреки това се забелязва тенденция алел C (Val) да е по-чест в групата на пациентите при A1 (p=0.093), което е в унисон и с наблюдаваната гранично значима асоциация за по-рядко срещания при пациенти генотип T/T (Met/Met) при A1 (p=0.05).

В настоящата извадка асоциация с АР е получена за rs16917237, и в двата изследвани афективни статуса се наблюдава по-голяма честота на алел G и по-ниска на алел T при пациенти, въпреки че статистически значим резултат е получен само за A1. След корекция на Бонферони, статистическата значимост за алелна асоциация се запазва. Установява се, че генотип T/T е по-рядък в групата на пациентите както при тесен, така и при широк фенотип (p=0.002, A1; p=0.011, A2), като статистическата значимост се запазва и след корекция на Бонферони и при двата фенотипа. Настоящото изследване демонстрира, че рецесивен модел най-добре описва действието на алел T на rs16917237 в извадката (p= 0.002, A1, p= 0.011, A2).

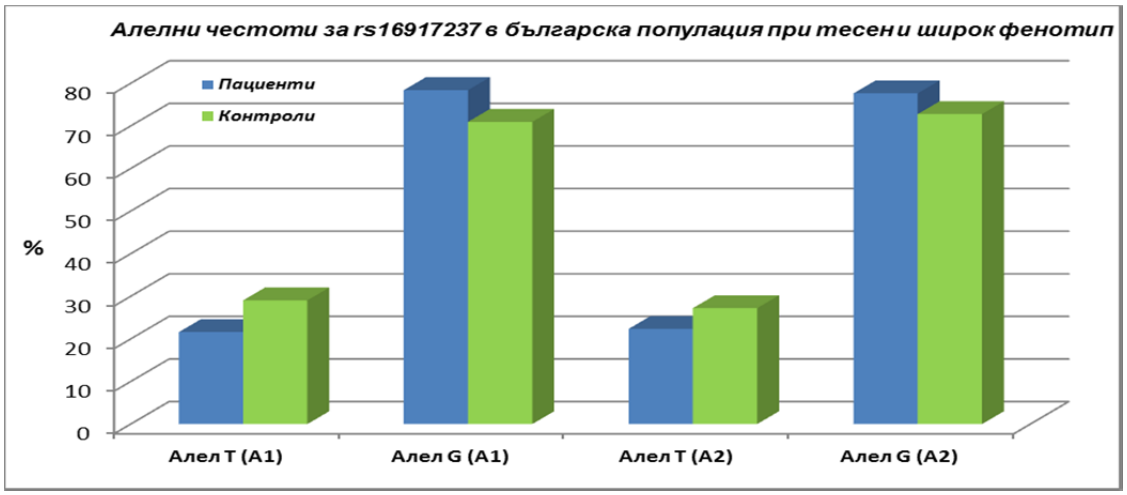
За rs12273363 не са установени разлики в алелните и генотипните честоти между пациенти и контроли при A1 и A2. Резултатите от асоциативното проучване на изследваните варианти в *BDNF* гена са представени в Таблица №9, а Фигура №6 и №7 графично представят разликите в алелните и генотипните честоти на rs16917237 между пациенти и контроли при A1 и A2.

Таблица № 9: Алелна и генотипна асоциация на генетични варианти в *BDNF* гена в българска популация: *Представени са статистически значимите и гранично значимите резултати.*

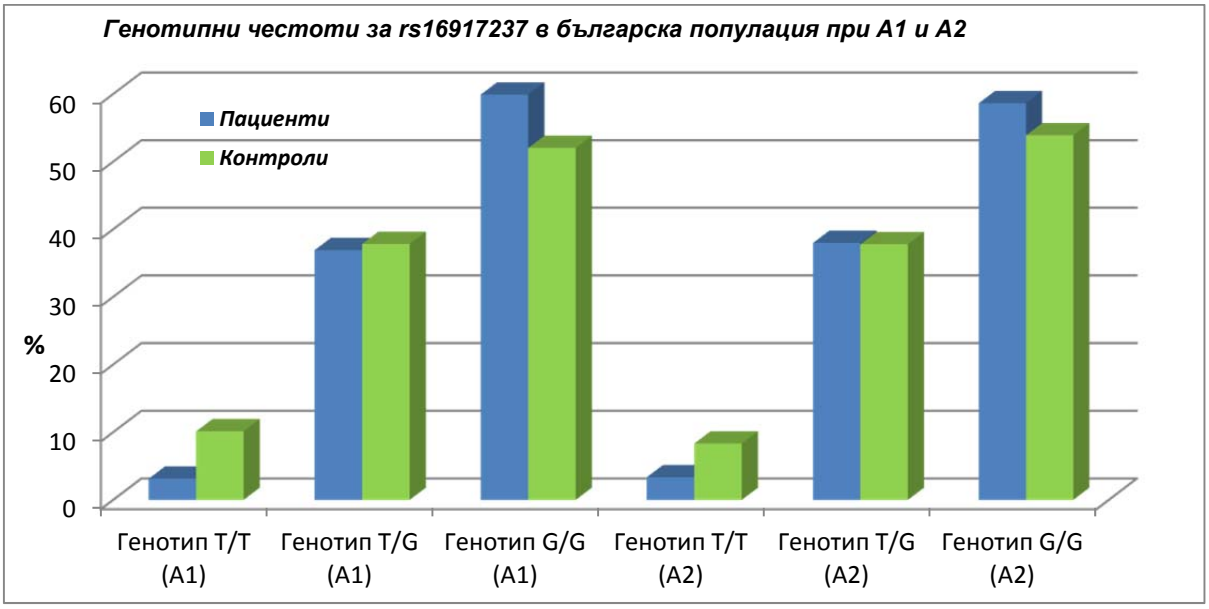
BDNF	**Пациенти A1**	**Контроли A1**	**Пациенти A2**	**Контроли A2**	**P A1**	**OR A1**	**P A2**	**OR A2**
	n (%)	**n (%)**	**n (%)**	**n (%)**				
rs6265								
T (Met)	113/19.28	76/24.05	157/19.67	86/22.63	0.09	0.75	0.24	0.84
C (Val)	473/80.72	240/75.95	641/80.33	294/77.37	0.09	1.33	0.24	1.19
Генотипи								
T/T	9/3.07	11/6.96	13/3.26	11/5.79	0.05	0.42	0.22	0.55
T/C	95/32.42	54/34.17	131/32.83	64/33.68	0.71	0.92	0.92	0.96
C/C	189/64.5	93/58.86	255/63.91	115/60.53	0.24	1.27	0.48	1.15
Доминантен модел					0.24		0.43	
Рецесивен модел					0.06		0.15	
rs16917237								
T	124/21.60	86/29.05	173/22.35	98/27.22	0.015	0.67	0.09	0.77
G	450/78.40	210/70.95	601/77.65	262/72.78	0.015	1.49	0.09	1.3
Генотипи								
T/T	9/3.14	15/10.13	13/3.36	15/8.33	0.002*	0.29	0.011*	0.38
T/G	106/36.93	56/37.84	147/37.98	68/37.78	0.86	0.96	1.00	1.01
G/G	172/59.93	77/52.03	227/58.66	97/53.89	0.12	1.38	0.29	1.21
Доминантен модел					0.11		0.29	
Рецесивен модел					0.002*		0.011*	

** Статистически значим резултат след корекция на Бонферони*

Фигура № 6: Графично представяне на алелните честоти на rs16917237 в *BDNF* гена в българска популация.



Фигура № 7: Графично представяне на генотипните честоти на rs16917237 в *BDNF* кандидат гена в българска популация.



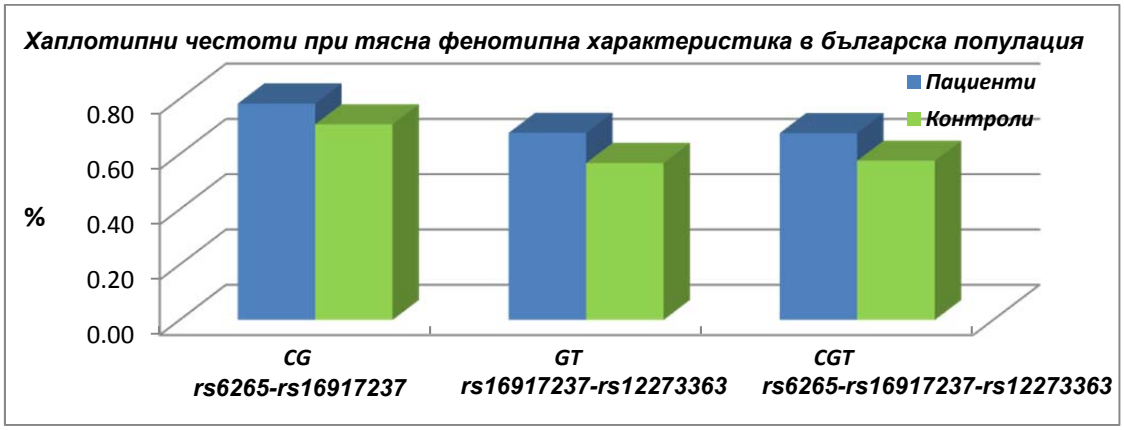
Асоциативно изследване на BDNF хаплотипи

Идентифицирани са няколко хаплотипа, които се свързват с повишен риск от АР в изследваната извадка. Хаплотип rs6265/rs16917237, CG, (p=0.015) е с по-висока честота при пациенти с тясна диагностична дефиниция. Въпреки липсата на алелна или генотипна асоциация за маркер rs12273363, са установени няколко хаплотипа с негово участие заедно с rs16917237, които имат връзка с повишен риск от АР. Хаплотип rs16917237/rs12273363, TT, (p=0.008, A1, p=0.047, A2) е по-рядък в групата на пациентите и при A1 и A2, а хаплотип rs16917237/rs12273363, GT, (p=0.002, A1, p= 0.023, A2) е по-чест при пациенти отново при двата афективни модела. Резултатите най-вероятно се дължат предимно на влиянието на rs16917237, тъй като повтарят установената тенденция алел T да е по-чест при контроли, а алел G при пациенти. Идентифициран е тримаркерен хаплотип, rs6265/rs16917237/rs122733 CGT, (p=0.003, A1, p=0.028, A2), по-често срещан при пациенти, особено при A1. Резултатите са представени в Таблица №10, а на Фигура №8 е представено графично съотношението на хаплотипните честоти между пациенти и контроли.

Таблица №10: Асоциативен анализ на *BDNF* хаплотипи в българска популация.

Хаплотип		**CHISQ**	**p-value**	**Фенотип**
rs6265 / rs16917237	CG	5.92	0.015	A1
	CG	3.2	0.071	A2
rs16917237 / rs12273363	TT	7.07	0.008	A1
	TT	3.94	0.047	A2
	GT	9.77	0.002	A1
	GT	5.16	0.023	A2
rs6265 / rs16917237 / rs12273363	CGT	8.91	0.003	A1
	CGT	4.83	0.028	A2

Фигура №8: Графично представяне на асоциираните *BDNF* хаплотипи в българска популация. *Представени са резултатите с най-голяма статистическа значимост*.



Фамилно изследване на полиморфизми и хаплотипи в BDNF гена

Проведеният TDT анализ на изследваните *BDNF* полиморфизми не идентифицира неравновесна трансмисия на алелните варианти в болното поколение. Не се потвърждават резултатите от асоциативното изследване нито при съвместния анализ на български и ромски семейства, нито при анализа на двата етноса поотделно.

Хаплотипния TDT анализ не установява неравновесно предавани *BDNF* хаплотипи в засегнатото поколение и не потвърждава резултатите от хаплотипното асоциативно проучване.

V. 6. Резултати за кандидат-ген CLOCK

Кандидат-генът *CLOCK* (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput), картиран на 4 хромозома, кодира транскрипционен фактор, участващ в регулацията на циркадните ритми и метаболизма. В следствие на алтернативен сплайсинг е установено наличието на множество транскрипти. Съществуват данни за асоциация на полиморфизми в този кандидат ген и поведенчески промени или психиатрични заболявания (Serretti, 2003; 2005; Benedetti, 2003). Също така някои медикаменти, прилагани при АР целят възстановяване на баланса в циркадните ритми. В настоящото проучване е изследван полиморфизма rs3805154 в CLOCK кандидат-гена.

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на CLOCK гена

Не са установени статистически значими разлики в алелните и генотипните честоти между пациенти и контроли и няма данни за асоциация на rs3805154 с афективни разстройства както при тесен, така и при широк фенотип.

Фамилно изследване на полиморфизми в CLOCK гена

TDT анализът на rs3805154 не показва неравновесно предаване на алелите му в засегнатото поколение при съвместно изследване на български и ромски семейства и при отделно проведения анализ в двете етнически подгрупи.

V. 7. Резултати за кандидат-ген CRH

Кортикотропин освобождаващия фактор – КОФ представлява консервативен пептиден хормон, който стимулира синтеза на ацетилхолин в рамките на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек при стрес. Зрелият КОФ се състои от 41 аминокиселини, получени от препрохормон от 196 аминокиселини и се отличава с висока консервативност. В кандидат-гена *CRH*, картиран на 8 хромозома е изследвана еднонуклеотидната замяна rs12721510, за която се предполага, че повлиява функционалноста на кортикотропин освобождаващия фактор.

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на CRH гена

При проведеното асоциативно проучване от тип случаи-контроли не са установени статистически значими разлики в алелните и генотипните честоти между пациенти и контроли. Генотип T/T е с очаквано ниска честота и в нашата извадка не е наблюдаван. За другите два генотипа не са установени статистически значими разлики и при двата фенотипни модела.

Фамилно изследване на полиморфизми в CRH гена

Проведеното изследване на rs12721510 във фамилната извадка от български и ромски семейства не установява неравновесно предаване на алелите му в засегнатото поколение при A1 и A2. В отделния TDT анализ на семействата от двете етнически подгрупи също не се установява неравновесно предаване на алелите на rs12721510. Потвърждават се данните от асоциативното проучване за липса на връзка на изследвания *CRH* полиморфизъм с повишен риск от АР.

Кандидат гени, свързани с каналопатии

V. 8. Резултати за кандидат ген *CACNA1C*

CACNA1C генът е локализиран в хромозома 12p13.3 и кодира 1C субединицата на волтаж зависим калциев канал от L тип. Субединицата 1C участва във формирането на пора и повлиява правилното функциониране на канала. Преноса на Ca^{2+} и нивата му са есенциално важни за междуклетъчната комуникация, способността на клетката да генерира и предава електрически сигнали както и за регулацията на експресията на някои гени. Генетични варианти, водещи до по-продължително отворено или затворено състояние на канала, предизвикват дисбаланс в Ca^{2+} концентрация. В настоящото проучване е изследван полиморфизма rs1006737, за който е получен най-силен статистически резултат в цялостно геномно асоциативно проучване, с изследвани 1.8 милиона генетични варианта в 4 387 пациенти с БАР и 6 209 здрави контроли (Ferreira, 2008).

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на CACNA1C гена

В нашето изследване не са открити статистически значими разлики между болните и контролите за rs3805154 и при двата изследвани фенотипа. Не е установена асоциация на еднонуклеотидната замяна в *CACNA1C* кандидат-гена с АР.

Фамилно изследване на полиморфизми в CACNA1C гена

Проведеният TDT анализ в български и ромски семейства не показва неравновесна трансмисия на някой от алелите на изследвания полиморфизъм rs1006737 в засегнатото поколение. Отделното изследване включващо само българските и само ромските семейства потвърждава липсата на преференциално предавани алели в болните.

V. 9. Резултати за кандидат ген ANK3

Генът *ANK3* е локализиран в 10 хромозома и кодира белтъка анкирин, който свързва мембранните белтъци с цитоскелета на клетката. Установено е наличието на множество транскрипти в следствие на алтернативен сплайсинг и няколко стартови екзона. ANK3 продуктът взима участие в подвижноста на клетката, пространственото поддържане на мембранни региони и е важен за нормалното групиране и функциониране на натриевите канали в аксона (Pan, 2006). Изследвани са 2 варианта в *ANK3* кандидат-гена (rs9804190 и rs10994336), разположени в 3’ и 5’ края на гена на 380kb един от друг. За тези два варианта са получени едни от най-значимите статистически резултати за асоциация в геномни асоциативни изследвания (Ripke, 2011; Tesli, 2011).

Асоциативно изследване от тип случаи-контроли на ANK3 гена

При сравнение са алелните и генотипните честоти на rs9804190 не са установени статистически разлики между групите на болните и здравите. Резултатите демонстрират липса на асоциация на rs9804190 с АР и при двата фенотипа в изследваната извадка.

За втория изследван маркер rs10994336 в *ANK3* кандидат-гена също не се установява асоциация с АР при А1 и А2. Не се установява и генотипна асоциация, но поради факта, че генотип Т/Т не се наблюдава в контролните групи за разлика от тези с пациентите, за него е получена статистически гранична стойност за асоциация (p=0.05) при А1 и е наблюдавана същата тенденция (p=0.06) при А2.

Не са идентифицирани асоциирани с АР хаплотипи с участието на изследваните генетични варианти в рамките на *ANK3* гена при тесен и широк фенотип.

Фамилно изследване на полиморфизми в ANK3 гена

Извършеният TDT анализ на rs9804190 в български и ромски семейства установява, че алел Т е по-рядко предаван на индексните пациенти от техните родители при А2 (p=0.03). Тенденция, алел Т да е по-рядко предаван в поколението се забелязва и при тесен фенотип, въпреки че резултати не достигат статистическа значимост. Възможно е алел Т на rs9804190 да има протективен ефект относно развитието на АР или противоположния по-често предаван алел С да допринася за повишен риск от заболяването. Вероятно съществен принос за получените резултати е наличието на пациенти с УАР, тъй като статистическа значимост е полученя при А2, където те са включени, а при А1 само тенденция. При TDT анализът проведен отделно в двете етнически групи не са получени статистически значими резултати. Възможно е разделянето на общата извадка на две по-малки подгрупи в зависимост от етническата принадлежност да води до загуба на статистическата сила за детекция влиянието на генетични варианти с по-слабо влияние върху фенотипа. Въпреки това при ромските семейства ясно се забелязва тенденцията

алел Т на rs9804190 да е по-рядко предаван, а алел С по-често предаван в засегнатото поколение.

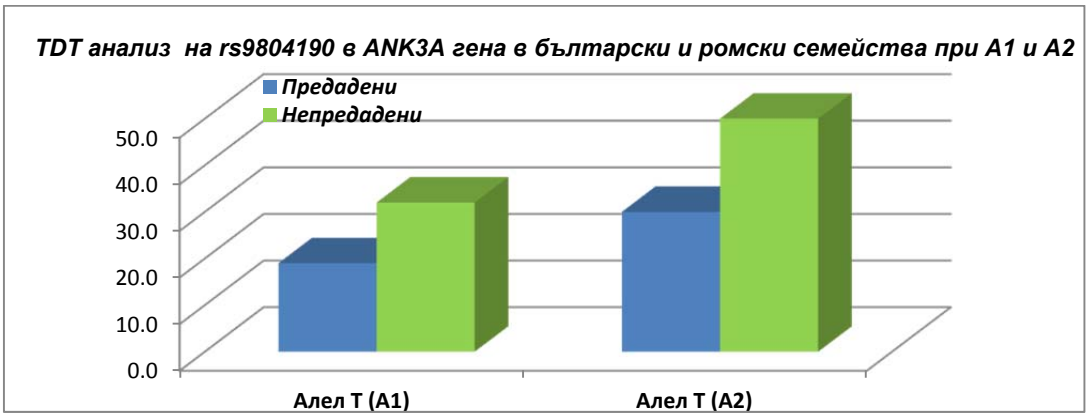
Фамилното изследване на rs10994336 не показва неравновесно предаване на алелите му в болното поколение при тясна и широка фенотипна характеристика.

Резултатите от проведеният TDT анализ на rs9804190 и rs10994336 са представени в Таблица №11. На Фигура №9 графично е представено съотношението на предадени към непредадени алели на rs9804190 (алел Т) при при А1 и А2.

Таблица №11: TDT анализ на rs9804190 в *ANK3* кандидат гена в семейства от български и ромски произход и отделен TDT анализ на двете етнически групи:

Български и Ромски семейства	**Алел 1**	**Алел 2**	**A1**			**A2**		
			CHISQ	**p-value**	**OR**	**CHISQ**	**p-value**	**OR**
rs9804190	T	C	3.31	0.07	0.59	5	0.03	0.60
Български семейства								
rs9804190	T	C	1.49	0.22	0.65	2.20	0.14	0.67
Ромски семейства								
rs9804190	T	C	2	0.16	0.5	3.24	0.07	0.47

Фигура №9: Графично представяне на съотношението предадени към непредадени алели на rs9804190 (*ANK3*) в български и ромски семейства.



Не са идентифицирани хаплотипи с участието на rs9804190 и rs10994336 в *ANK3* гена, които да са неравновесно предавани на пациенти от родителите им и които да имат връзка с повишен риск от развитие на АР.

V. 10. Резултати от анализ за статистическа епистаза между изследваните генетични варианти

Афективните разстройства, спадайки към групата на комплексните психиатрични заболявания, се причиняват от сложна комбинация на множество генетични фактори и влияние от околната среда, които взаимодействат помежду си и допълват или променят ефекта си. В настоящото проучване са изследвани всички възможни комбинации на епистаза между проучваните генетични варианти. Като скриниращ метод за оценка на

епистазата е използвана PLINK програмата, а за по-детайлно проучване, логистична регресия (SPSS version 21.0). Идентифицирани са статистически значими епистатични взаимодействия между кандидат гените *DISC1, TPH2, CRH, CLOCK* и *BDNF*, *ANK3A, SLC6A4* обобщени в Таблица №12 и визуално представени на Фигура №10.

Фигура №10: Визуално представяне на установените епистатични взаимодействия между изследваните кандидат-гени.

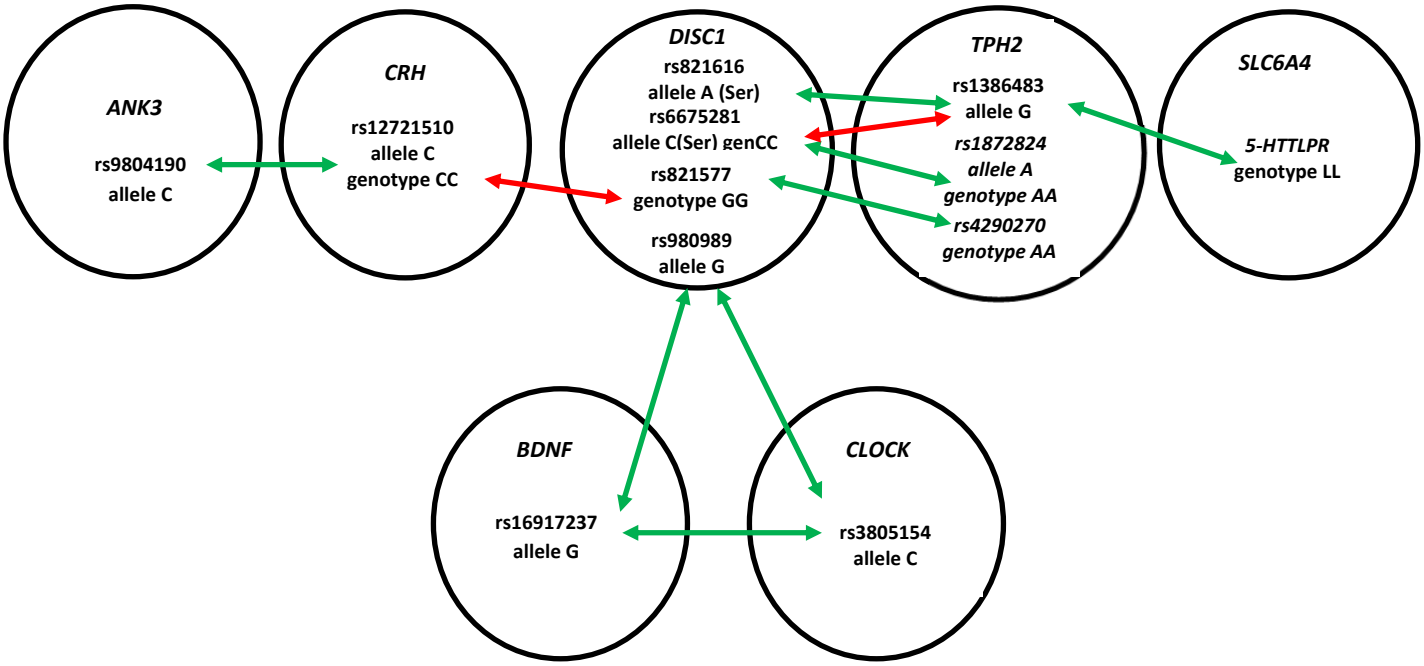


Таблица № 12А: Статистически най-добрите резултати показали нива на значимост p < 0.04

Локус 1			Локус 2			Plink_Случаи-контроли		Регресионен анализ				
Канд-ген	Ген. Вариант	Хр.	Канд-ген	Ген. Вариант	Хр.	P	Фенотип	B	OR	p	Фенотип	R^2
DISC1	rs6675281	1	***TPH2***	rs1386483	12	0.02	A2					
rs6675281=C * rs1386483=G								1.71	5.54	0.02	A2	0.02
DISC1	rs6675281	1	***TPH2***	rs4290270	12	0.04	A2					
rs6675281=CC * rs4290270=AA								-2.64	0.07	0.02	A2	0.04
DISC1	rs6675281	1	***TPH2***	rs1872824	12	0.005	A1					
rs6675281=CC * rs1872824=AA								-2.56	0.08	0.03	A1	0.05
r**s6675281=C * rs1872824=A**								-1.43	0.24	0.005	A1	0.04
DISC1	rs6675281	1	***TPH2***	rs1872824	12	0.005	A2					
rs6675281=CC * rs1872824=AA								-2.61	0.07	0.02	A2	0.05
rs6675281=C * rs1872824=A								-1.43	0.24	0.004	A2	0.03
DISC1	rs821577	1	***CRH***	rs12721510	8	0.03	A1					
rs821577=GG * rs12721510=CC								2.63	13.91	0.04	A1	0.02
DISC1	rs821577	1	***CRH***	rs12721510	8	0.03	A2					
rs821577=GG * rs12721510=CC								2.64	14.0	0.04	A2	0.02
DISC1	rs821616	1	***TPH2***	rs1386483	12	0.02	A2					
rs821616=A * rs1386483= G								-1.61	0.2	0.008	A2	0.02
DISC1	rs980989	1	***CLOCK***	rs3805154	4	0.03	A2					
rs980989=G * rs3805154=C								-1.03	0.36	0.02	A2	0.03
DISC1	rs980989	1	***BDNF***	rs16917237	11	0.02	A2					
rs980989=G * rs16917237=G								-0.82	0.44	0.03	A2	0.02
CLOCK	rs3805154	4	***BDNF***	rs16917237	11	0.04	A1					
rs3805154=C * rs16917237=G								-1.03	0.36	0.03	A1	0.03
CLOCK	rs3805154	4	***BDNF***	rs16917237	11	0.03	A2					
rs3805154=C * rs16917237=G								-0.92	0.40	0.04	A2	0.02
CRH	rs12721510	8	***ANK3***	rs9804190	10	0.03	A1					
rs12721510= C * rs9804190=C								-1.55	0.21	0.02	A1	0.02
CRH	rs12721510	8	***ANK3***	rs9804190	10	0.04	A2					
rs12721510= C * rs9804190=C								-1.45	0.23	0.02	A2	0.02
SLC6A4	5-HTTLPR	17	***TPH2***	rs1386483	12	NS	A1					
5-HTTLPR =LL * rs1386483= GA								-3.14	0.04	0.01	A1	
5-HTTLPR =LL * rs1386483= GG								-2.89	0.06	0.02	A1	0.04
SLC6A4	5-HTTLPR	17	***TPH2***	rs1386483	12	0.04	A2					
5-HTTLPR =LL * rs1386483= GA								-3.08	0.05	0.01	A2	
5-HTTLPR =LL * rs1386483= GG								-3.11	0.05	0.01	A2	0.03

DISC1 – TPH2

Епистаза повишаваща риска от АР е установена между алел С на rs6675281 и алел G на rs1386483 при широка фенотипна дефиниция. Същевременно алел С и генотип СС на rs6675281 взаимодействат с други два *TPH2* полиморфизма, като указват протективно

действие. Генотип CC и алел C на rs6675281 е в епистаза с генотип AA и алел A на rs4290270 само при широк фенотип, а с генотип AA и алел A на rs1872824 и при двата фенотипа. Статистически най-значима епистаза с вероятен протективен ефект е получена при взаимодействието на алел C на rs6675281 и алел A на rs1872824 при широка фенотипна характеристика (p=0.004). Протективен ефект е установен и за епистазата между алел A на rs821616 и алел C на rs1386483 ппри двата изследвани фенотипа. Настоящите резултати демонстрират, че епистатични взаимодействия между *DISC1* и *TPH2* гените, могат да имат както протективен, така и повишаващ риска от АР ефект.

DISC1 rs980989 - BDNF rs16917237 / CLOCK rs3805154

Установени са две епистази с протективен ефект при широк фенотип с участието на алел G на rs980989 в *DISC1* гена и варианти в *BDNF* и *CLOCK* гените. Регресионният анализ идентифицира взаимодействие на G варианта на rs980989 с алел G в rs16917237 (*BDNF*), (p=0.03) и алел C на rs3805154 (*CLOCK*), (p=0.02).

CLOCK rs3805154 - BDNF rs16917237

Друга епистаза с протективен ефект е установена при взаимодействието на алел C на rs3805154 в *CLOCK* гена с алел G на rs16917237 (p=0.03) и при двата фенотипа, но статистически по-добър резултат е получен в групата с пациенти с БАР.

CRH rs12721510 - DISC1 rs821577 / ANK3 rs9804190

CRH вариантът, rs12721510 участва в епистаза с rs821577 в *DISC1*, която увеличава риска от АР и с rs9804190 в *ANK3*, която има протективен ефект. Нашите резултати подкрепят хипотезата, че rs12721510 повлиява риска от АР в зависимост от взаимодействията в които участва (Hennah et al.2009). Генотип CC на rs12721510 (*CRH*) взаимодейства с генотип GG на rs821577 (*DISC1*), а алел C на rs12721510 е в епистаза с алел C в rs9804190 като двете взаимодействия имат противоположен ефект върху риска от АР в българската популация независимо от афективния статус.

TPH2 rs1386483 - SLC6A4 5-HTTLPR

Протективен ефект на епистазата между генотипите с присъствие на алел G на rs1386483 (G/G и G/A) и генотип L/L на *SLC6A4* също е установена, независимо от фенотипа. Настоящите резултати подкрепят хипотезата, че *SLC6A4* участва във взаимодействия, имащи отношение към развитието на психиатрични разстройства.

VI. ДИСКУСИЯ

Дискусия на резултатите получени при изследване на кандидат-гени от серотонинова невромедиация - *TPH2*, *SLC6A4*

VI.1. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *TPH2* (Tryptophan hydroxylase 2 gene)

В кандидат-гена *TPH2*, кодиращ скоростопределящия ензим в биосинтезата на серотонин, триптофан хидроксилазата са изследвани общо пет генетични варианта, rs4570625 и rs11178998 разположени в 5'UTR, и rs1386483, rs4290270 и rs1872824 намиращи се съответно в интрон 8, екзон 9 и интрон 9. Установена е липса на алелна и генотипна асоциация за изследваните *TPH2* генетични варианти при широк и тесен фенотип и не са открити хаплотипи с тяхно участие, които да са асоциирани с АР. Въпреки че TDT анализа в извадката със семействата не установява неравновесно предаване на алели в засегнатото поколение и асоциативното проучване не идентифицира наличие на асоциация със заболяването, хаплотипният TDT анализ установява статистически гранична зависимост за два хаплотипа. По-често предавани от родители на пробанди са хаплотипи rs111789/rs4290270/rs187282, GAG и s4570625/ rs11178998/rs4290270/rs1872824, TGAG. В тях участва s4570625, който е асоцииран с УАР в мета анализ (Gao, 2012) и с шизофрения (Schuhmacher, 2012), а за неговия алел T, влизащ в състава на по-често предаваните в поколението хаплотипи е съобщена по-висока честота при пациенти с паническо разстройство. Липсата на асоциация с повишен риск от АР от асоциативното изследване за s4570625 в българската извадка реплицира резултатите на (Serretti, 2011), където също не се установява асоциация с БАР и УАР. Въпреки това хаплотипният TDT анализ в настоящото проучване демонстрира, че макар и този полиморфизъм да не се асоциира с пряко самостоятелно влияние върху риска от АР, неговия алел T в контекста на хаплотип с други *TPH2* варианти увеличава риска от АР.

За водещия до синонимна замяна полиморфизъм rs4290270, участващ в идентифицираните хаплотипи има данни за асоциация с БАР (Harvey, 2007) и УАР (Shen, 2011). Алел A на rs4290270, участващ в идентифицираните два по-често предавани на пациенти хаплотипи е асоцииран с риск от самоубийства и УАР (Grohmann, 2010). Предполага се че генетичният вариант rs4290270 повлиява процеса на сплайсинг като биологичните механизми чрез които това се осъществява все още не са напълно изяснени (Grohmann, 2010). В настоящото изследване хаплотипи с този алел са преференциално предавани на пациенти и повишават риска от АР.

Другият вариант в 5'UTR регион освен rs4290270, участващ в идентифицираните в нашето изследване хаплотипи е алел G на rs11178998, който е асоцииран с УАР, БАР (Van Den Bogaert, 2006; Cichon, 2008) и посттравматичен стресов синдром (Goenjian, 2012). Въпреки наличните данни, че алел A води до намалена до 22% транскрипционна активност в мозъчна тъкан (Scheuch, 2007), в настоящото изследване са идентифицирани два хаплотипа с присъствието на противоположния алел G, които допринасят за повишен риск от АР, подобно на проучване в Хан китайската популация, където също е установен хаплотип с участието на същия вариант асоцииран с шизофрения.

Отношението на разположените в 5'UTR на *TPH2* гена генетични варианти към развитието на различни психиатрични заболявания със сходна или частично припокриваща се симптоматика с тази на АР се демонстрира също така и от няколко други изследователски групи (Walitza, 2005; Cichon, 2008; Grigoroiu-Serbanescu, 2008; Kim, 2009), като е описана и асоциация с нарушения в когнитивното функциониране (Strobel, 2007). Други проучвания също съобщават, че алелите участващи в установените от нас неравновесно предавани хаплотипи се срещат в различни комбинации при пациенти с психиатрични разстройства (Yi, 2012).

Може да се обобщи, че въпреки важната функционална роля на продукта на *TPH2* гена и наличните литературни данни за връзката на различни генетични варианти в този кандидат ген към широк спектър от психиатрични разстройства и характерни симптоми и състояния при тези заболявания в настоящото проучване са установени гранични статистически резултати само за два хаплотипа, които са по-често предавани от родители на пробанди. Получените резултати предполагат, че двата хаплотипа (GAG и TGAG) увеличават риска от АР независимо от фенотипната дефиниция и етническия произход. Неравновесното предаване на тези хаплотипи е установено при съвместния анализ на български и ромски семейства както и при хаплотипния TDT анализ само на български семейства. Двата хаплотипа споделят еднаква обща част и са съставени от алели за които са налични данни от различни проучвания за връзка с психиатрични разстройства. Въпреки че не се открива самостоятелното влияние на участващите алели в преференциално предаваните хаплотипи, нашите резултати демонстрират, че съвместното им присъствие в рамките на хаплотипи вероятно повишава риска от АР.

Възможно е липсата на асоциация със заболяването на отделните полиморфизми да се дължи на недостатъчната статистическа сила на изследваната извадка, необходима за идентифициране на това влияние или на относително слабия им самостоятелен принос към риска от АР.

VI.2. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *SLC6A4*

За асоциирания с високи нива на депресия *SLC6A4* вариант rs12150214 е установена алелна и генотипна асоциация и при двата изследвани фенотипа. Настоящите резултати подкрепят хипотезата за отношение на rs12150214 към депресия и демонстрира също така и принос на този полиморфизъм към развитие на БАР, тъй като идентични от статистическа гледна точка резултати са получени при широка и тясна афективна дефиниция. При пациентите се наблюдава по-висока честота на алел С и по-ниска на алел G. Генотипният асоциативен анализ демонстрира по-ниска честота на генотип G/G при пациенти и по-висока при контроли. На базата на тези резултати може да предположи, че вероятно алел G има рецесивен протективен ефект или алел С има доминантен повишаващ риска от АР ефект. Получените почти идентични от статистически гледна точка резултати при А1 и при А2, предполага, че наблюдавания ефект в изследваната българска извадка не се повлиява от фенотипната дефиниция.

При опит да се реплицират резултатите от асоциативното проучвани и във фамилната извадка от български и ромски семейства, не е установено преференциално предаване на алелите на rs12150214 от родители на пробанди. Възможно е липсата на

асоциация при изследваните семейства да се дължи на факта, че фамилната извадка с която разполагаме е сравнително малка и недостатъчна за откриване на асоциация с полиморфизми с по-слабо влияние към риска от определено заболяване. Като се има предвид разположението на полиморфизма, rs12150214 в район с множество регулаторни елементи и резултатите от проведеното асоциативно проучване предоставящи доказателства за връзката му с повишен риск от АР в българската популация изследването му в по-голяма извадка е резонно и би могло да изясни в по-голяма степен влиянието му.

В литературата са налични макар и косвени данни, демонстриращи възможна връзка на асоциирания с АР в нашата извадка генетичен вариант rs12150214 с депресивни симптоми. Полиморфизмът rs12150214 е асоцииран с високи нива на депресия (Su, 2009), а за скачени с него варианти е съобщена асоциация с тежко протичащи депресивни епизоди (Lazary, 2008) и наличие на повишена тревожност и депресия (Wray, 2009).

Нашите резултати не потвърждават хипотезата късия S вариант на промоторния полимолфизъм 5-HTTLPR, представляващ 43 bp инсерция или делеция, съответстващ на три пъти по-ниски нива на транскрипция да повлиява риска от развитие на АР в българската популация.

Хомозиготното носителство на късия S алел е асоциирано с повишен риск от БАР (Cho, 2005; Lotrich, 2004; Lasky-Su, 2005), риск от УАР (Hauser, 2003; Lotrich 2004), склонност към депресия (Cervilla, 2006; Zalsman 2006) и засилена потиснатост и безпокойство (Melke, 2001). Предполагаемо влияние в зависимост от пола на генотипи съответстващи на по-ниска транскрипционна активност е установена само при мъже с БАР тип I и БАР тип II (Wang, 2014). Въпреки тези данни в настоящото проучване не е установена алелна и генотипна асоциация за 5-HTTLPR и не е открито неравновесно предаване на алели в засегнатото поколение. Вероятно, въпреки функционалността на този полиморфизъм и данните за асоциация с редица психиатрични разстройства (Zalsman, 2006; Lotrich, 2004; Lasky-Su, 2005), включително и с АР при български пациенти (Al-Djassem, 2014), настоящите резултати не подкрепят хипотезата за отношение на 5-HTTLPR към повишен риск от АР. Реплицирани са резултатите за липса на асоциация на промоторния *SLC6A4* полиморфизъм с АР (Mendlewicz, 2004; Mansour, 2005), както и липса на неравновесно предаване на алели от родители на пробанди (Voyiaziakis, 2011).

Получените резултати от проведеното проучване на двата генетични варианта в гена кодиращ серотонинов транспортер (*5-HTTLPR*, *SLC6A4, SERT*), който участва в преноса на серотонин от синаптичното пространство към невроните и е демонстрирана връзка с повишен риск от АР на разположеният в интрон 1 вариант, rs12150214, но не и на функционалния промоторен полиморфизъм 5-HTTLPR.

Дискусия на резултатите, получени при изследване на кандидат-гени от допаминова невромедиация

VI.3. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *DRD2*

В рамките на *DRD2* гена кодиращ допаминов рецептор от тип 2 са изследвани следните 4 еднонуклеотидни замени, rs6277 разположен в екзон 7, rs12800853 и rs7350522 намиращи се в интронните участъци и rs6589377 в 5' края.

Установена е липса на алелна, генотипна и хаплотипна асоциация с участието на изследваните 4 генетични варианти в рамките на гена. TDT анализът не открива неравновесно предаване на алелите на rs6277, rs12800853, rs7350522, но за алел G на rs6589377 е установена по-ниска честота на предаване от родители на пробанди.

За rs6589377 при съвместния анализ на български и ромски семейства е открито преференциално предаване на алел A на болните от техните родители и по-рядко предаване на алел G. Такава зависимост не се потвърждава при анализа на двете етнически подгрупи поотделно, вероятно поради слабата статистическа сила на по-малките извадки.

TDT анализът, проведен в двете изследвани етнически групи поотделно установява от своя страна, че алел G на rs7350522 е статистически гранично по-често предаван в засегнатото поколение в подгрупата на българските семейства.

Идентифицираните неравновесно предавани алели повлияват резултатите и от хаплотипния TDT анализ, при който са установени няколко неравновесно предавани хаплотипа в засегнатото поколение. По-често предавани на пробанди са хаплотипи rs12800853/rs7350522, CG и rs6277/rs12800853/rs7350522, CCG при широк фенотипен модел и хаплотип rs12800853/rs7350522, CG. При отделния анализ само на българските семейства се наблюдава засилване на резултатите от статистически гледна точка, което може да се дължи на по-силно влияние на тези хаплотипи в българската етническа група. Възможно е също така резултатите, получени при съвместния анализ на български и ромски семейства да е основно повлиян от наблюдаваната зависимост при семействата от български произход.

Идентифициран е и един по-рядко предаван в засегнатото посоление хаплотип, rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377, CCTG при широк фенотип.

Хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522, CCG съдържащ алел C на водещия до синонимна аминокиселинна замяна полиморфизъм rs6277 е асоцииран с няколко психиатрични състояния включително и с шизофрения в българска популация (Betcheva, 2009). За този генетичен вариант е налична доста противоречива информация в литературата, тази еднонуклеотидна замяна влияе на стабилността на матричната РНК, което съответно повлиява експресията на крайния продукт и е асоциирана с шизофрения в българската популация (Betcheva, 2009). Алел C повлиява когнитивното функциониране (Bolton, 2010) и е асоцииран с посттравматичен стресов синдром (Voisey, 2009) и алкохолна зависимост при мъже (Swagell, 2012). Същевременно са налични и данни за асоциация на противоположния T алел с шизофрения (Fan, 2010) и с наркотична зависимост (Doehring, 2009). Въпреки наличието на противоречиви резултати за връзка

на rs6277 с психиатрични разстройства, резултатите в настоящото проучване не идентифицират самостоятелното му влияние върху фенотипа, тъй като не се установява асоциация и неравновесно предаване на алелите му в засегнатото поколение при TDT анализа, но са идентифицирани неравновесно предавани хаплотипи с негово участие повлияващи риска от АР.

Установените хаплотипи с участието на варианти на rs6277, са едновременно по-често и по-рядко предавани в засегнатото поколение. Хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522, CCG с участието на алел C е по-често предаван от родители на пациенти при широка фенотипна дефиниция, докато хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377, CCTG със същия алел на rs6277 е по-рядко предаван в поколението.

Статистически най-значими резултати при хаплотипния TDT анализ е установен за хаплотип rs12800853/rs7350522, CG при A2. Възможно е резултатът за този хаплотип да е повлиян от статистически граничната тенденция алел G на rs7350522 да е по-често предаван в засегнатото поколение при български семейства, широк фенотип.

Хаплотипите rs12800853/rs7350522, CG и rs6277/rs12800853/rs7350522, CCG съдържащи алел C на rs12800853 и алел G на rs7350522 са по-често предавани на пробанди при A2 и е възможно да допринасят за повишен риск от АР. Същевременно хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377, CCTG с участието на същия алел C на rs12800853 и противоположния алел T на rs7350522 е по-рядко предаван от родители на пациенти при A2 и вероятно може да има протективен ефект.

Възможно е протективният ефект на по-рядко предавания хаплотип rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377, CCTG да се дължи на факта, че в него участва и алел G на генетичния вариант rs6589377, за който е установено неравновесно предаване в поколенията. За rs6589377 не е установена алелна, генотипна или хаплотипна асоциация при проведеното асоциативно проучване от тип случаи-контроли, но той е единственият маркер, за който TDT анализът установява по-рядко предаване на алел G от родители на пробанди, което вероятно повлиява и резултата за целия хаплотип.

Настоящите резултати потвърждават отношението на допаминовата система към развитието на АР в българската популация. Най-вероятно изследваните от нас генетични варианти имат относително слаб ефект и това би могло да е причината да не се установява асоциация или неравновесно предаване на алели в засегнатото поколение за самите полиморфизми, а да се идентифицират само хаплотипи с тяхно участие, имащи връзка с развитието на АР. Както потвърждават и данните от анализа на епистазата и резултатите от хаплотипния TDT анализ при *DRD2* вариантите се наблюдава синергичност и в зависимост от алелните комбинации помежду им, ефекта върху фенотипа може да е протективен или повишаващ риска от АР. Евентуално бъдещо изследване в по-голяма или по-тясно дефинирана в диагностично отношение извадка може да изясни и техния самостоятелен ефект или да установи асоциация с отделни ендофенотипове.

Дискусия на резултатите, получени при изследване на кандидат-гени имащи връзка с невропластичността - *DISC1*, *BDNF*

VI.4. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *DISC1*

В DISC1 генът са изследвани общо пет полиморфизма, от които три водят до аминокиселинни замени rs3738401 (Arg264Gln), rs6675281 (Leu607Phe), rs821616 (Ser704Cys) и rs980989 и rs821577. Не е открита алелна, генотипна и хаплотипна асоциация за изследваните пет генетични варианта в рамките на кандидат гена, но е идентифицирано неравновесно предаване на rs980989, което повлиява някои когнитивни характеристики като визуална, вербална памет и психомоторна гъвкавост (Palo, 2007). В настоящото изследване алел G на rs980989 е по-често предаван (p=0.009) при широка фенотипна дефиниция и подобна тенденция, макар и недостигаща статистическа значимост се забелязва и при тесен фенотип (p=0.07). Проведеният TDT анализ в двете етнически подгрупи потвърждава тенденцията алел G да е преференциално предаван на пробандите само при широк фенотип. При българските семейства полученият резултат не достига статистическа значимост (p=0.06), а при ромските семейства, въпреки по-малката им бройка се потвърждава неравновесното предаване на алелите на rs980989 (p=0.03), което вероятно се дължи на факта, че те са генетично по-хомогенна група. Статистически най-значим резултат е получен при анализа едновременно на семействата от двата етноса, което се обяснява с по-голямата статистическа сила на по-голямата извадка.

Идентифицирани са няколко по-рядко предавани хаплотипи в засегнатото поколение rs3738401/rs6675281/rs821577, ATT, rs3738401/rs6675281/rs821577/rs821616, ATTA, rs821577/rs821616/rs980989, GAT, rs6675281/rs821577/rs821616/rs980989, CGAT, имащи протективен ефект, както и един по-често предаван хаплотип, rs6675281/rs821577/rs821616, TGT, който повишава риска от АР.

Нашите резултати, демонстрират, че алел A на rs3738401 участва в два по-рядко предавани хаплотипа в А2 и подкрепя докладваното и от други изследователски екипи участие на този полиморфизъм в хаплотипи имащи връзка с психиатрични разстройства като шизофрения, шизоафективно разстройство, БАР и УАР (Hennah, 2003; 2005).

Хаплотипи със съвместното участие на изследваните и в настоящото проучване, rs3738401 и rs6675281 са установени, че са преференциално предавани на мъже с психотично разстройство (Palo, 2007). В настоящото изследване са идентифицирани както по-често така и по-рядко предавани хаплотипи с участието на алел T на rs6675281, както и алел G на rs821577. По-редкият алел T на rs821577 е асоцииран с често срещания при психиатрични пациенти симптом, силна социална анхедония (Tomppo, 2009) и за него има данни, че повлиява мозъчната активност при изпълняване на когнитивни задачи (Chakirova, 2011). Интересно е да се отбележи, че първоначално rs821577 е асоцииран с наличие на психоза (Tomppo, 2009), докато в настоящето изследване се наблюдават статистически по-значими резултати за хаплотипи с негово участие в групата от пациенти с депресия.

В идентифицираните хаплотипи, имащи връзка с повишен риск от АР, алел Т (Cys) на rs821616, повлияващ способността *DISC1* да се свързва с транскрипционни фактори, присъства в по-често предавания хаплотип, а противоположния алел А (Ser) в по-рядко предаваните. Алелните варианти на rs821616 повлияват способността на *DISC1* да се свързва с белтъци като NUDEL, MAP1A и транскрипционни фактори като ATF4 и ATF5, което води до промени в експресионния профил или експресия на по-къси продукти. Същевременно именно високи нива на къси DISC1 транскрипти са открити в мозъци на пациенти с шизофрения (Nakata, 2009). За генетичният вариант rs821616 е получена противоречива информация, носителите на Т (Cys) алела и на хаплотипи с неговото участие са асоциирани с повишен риск от УАР (Hashimoto, 2006), а друго изследване установява, че хаплотипи с алел Т са по-рядко предавани на пациенти с БАР (Palo, 2007). Също така алел Т е асоцииран с шизофрения (Qu, 2007; Song, 2008), а противоположния алел А е описан, че е с по-високи честоти при пациенти с БАР (Ram Murthy, 2012) и отговаря за намален обем на сивото вещество и нарушено функциониране на хипокампуса по време на когнитивни дейности на здрави индивиди (Callicott, 2005). Нашите резултати подкрепят литературните данни за връзка на алел Т (Cys) на rs821616 с повишен риск от АР, тъй като той присъства в идентифицираните по-често предавани хаплотипи, а противоположния алел А (Ser) в по-рядко предаваните.

За изследвания от нас вариант rs980989 е описано, че повлиява някои когнитивни характеристики като визуална, вербална памет и психомоторна гъвкавост (Palo, 2007). По-доброто представяне при психомоторни действия се наблюдава при носителите на алел Т, макар че в същата група от пациенти с БАР е установено и по-рядко предаване на хаплотипи с участието на алел G (Palo, 2007). В настоящото изследване rs980989 е единственият генетичен вариант, за който е установен статистически значим резултат при TDT анализа на отделните полиморфизми. Алел G на rs980989 е по-често предаван при широка фенотипна дефиниция и подобна слаба тенденция е забелязана и при тесен фенотип. Преференциално предаване на алел G на пробандите е установен и при отделния TDT анализ в двете етнически подгрупи при А2. Проведеният допълнителен анализ показва, че по-честото предаване на алел G в засегнатото поколението идва предимно от бащите на пробандите. Идентифицирани са и няколко по-рядко предавани хаплотипи (GAT и CGAT) с участието на алел Т на rs980989, което е в противоречие с изследването на (Palo, 2007), което съобщава за по-рядко предавани хаплотипи с участието на алел G.

Вероятно получените резултати от хаплотипния TDT анализ в настоящото изследване са силно повлияни от факта, че локализираният в 3’ UTR вариант rs980989 е по-рядко предаван в засегнатото поколение.

Нашите резултати подкрепят връзката на *DISC1* с патологията на АР, като демонстрират участието на алелните му варианти в комбинации в зависимост, от които указват различно фенотипно влияние. Това се потвърждава и от резултатите от анализа за епистаза, където най-многобройни взаимодействия, повлияващи риска от АР са получени с участието на *DISC1* полиморфизми. Имайки предвид разнообразните функции, в които *DISC1* участва, както и данните за отношение на изследваните полиморфизми към по-специфичен клинични прояви като когнитивното функциониране,

може да се предположи, че *DISC1* полиморфизмите повлияват в по-голяма степен по-тесен диагностичен профил, който е част от проявата на АР и имат сравнително слабо влияние върху общия риск от АР.

VI.5. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *BDNF*

В настоящото изследване са изследвани три *BDNF* полиморфизма, функционален вариант rs6265 (Val66Met), разположен в кодиращ регион, rs16917237, който се намира в екзон-интронните граници и rs12273363, който е разположен в консервативен участък в 5' края на гена.

Установена е силна асоциация за rs16917237 в *BDNF* гена, която остава значима и след корекция на Бонферони, а за другите два изследвани варианта, rs6265 и 12273363 е демонстрирана липса на асоциация с АР.

Генотипите съдържащи алел T на rs16917237 имат рецесивен протективен ефект, а хомозиготното и хетерозиготното носителство на алел G увеличава риска от АР с OR=1.486 за БАР и OR=1.299 при широк фенотип, където са включени пациенти с УАР. Алел G е с по-високи честоти в групата на пациентите спрямо тази на здравите контроли (p=0.015), а генотипния анализ, демонстрира ниска честота на генотип T/T при пациенти (между 3.14% и 3.36% в сравнение с 10,14% и 8.33% при контроли). Не са налични в литературата данни за асоциация на rs16917237 с психиатрични разстройства, но скачения с него вариант rs2049045 е асоцииран с БАР (Muller, 2006) и в комбинация с rs79103411 са в хаплотипен блок с други генетични варианти, които са по-често срещани при пациенти с БАР с алкохолизъм (Lainig, 2011). Настоящите резултати и наличните косвени данни в литературата демонстрират възможното участие на rs16917237 в етиологията на АР и обосновават бъдещото му изследване.

Въпреки че за rs6265 (Val66Met) не е установена статистически значима асоциация е забелязана тенденцията алел C (Val) да е по-чест при пациенти при двата фенотипни модела, което реплицира геномно асоциативно изследване с участието на български пациенти, където също е открито слаба асоциация на Val алела с БАР ($p = 6.92 \times 10^{-3}$) (Yossifova, 2011). В нашето изследване е установена по-ниска честота на генотип T/T (Met/Met) при пациенти с тясна фенотипна характеристика (p=0.05), като резултатите предполагат рецесивен ефект на Met алела. Възможно е rs6265 да има относително слабо отношение към повишен риск от АР в българската популация и това да е причината да се забелязват тенденции, но не и статистически значими резултати. Този функционален полиморфизъм е бил обект на множество изследвания в следствие на които са получени доста противоречиви данни за влиянието му. Алел C (Val), за който се забелязва тенденция в нашата извадка да е по-чест при пациенти е асоцииран с БАР (Neves-Pereira, 2002; Sklar, 2002; Geller, 2004; Lohoff, 2005; Vincze, 2008; Xu, 2010), с ранно начало на БАР (Geller. 2004; Strauss, 2005; Tang, 2008), бързо циклиране (Muller, 2006; Green, 2006) и опити за самоубийство (Vincze, 2008). Същевременно е открита и асоциация на противоположния T алел (Met) със същите характеристики като бързо циклиране и опити за самоубийство (Skibinska, 2004; Kim, 2008) и БАР (Xu, 2010; Sears, 2011). Налични са и данни от няколко изследвания за липса на асоциация с АР (Kunugi, 2004; Nakata, 2003; Skibinska, 2004). TDT анализът във фамилната извадка не открива

преференциална трансмисия на алелите на rs6265 и не реплицира наблюдаваната тенденция от асоциативното проучване. Това може да се дължи на ниската информативност на фамилната извадка или малкото информативни трансмисии при TDT анализа, като не трябва да се изключва и вероятността за липса на връзка на rs6265 с повишен риск от АР и фалшиво положителна тенденция в асоциативното проучване.

За локализирания генетичен вариант rs12273363, водещ до намалена експресия на *BDNF* в хипокампуса (Hing, 2012), не е открита асоциация в настоящото изследване с АР. Въпреки че полиморфизмът е локализиран във висококонсервативен район и има данни за асоциация с АР, както за алел C (Liu, 2008), така и за алел T (Sears, 2011) в българската популация не е установена зависимост на никои от алелните варианти с повишен риск от АР.

TDT анализът не реплицира резултатите от асоциативното проучване за rs16917237 и не открива неравновесно предаване на алели на изследваните три полиморфизма или на хаплотипи с тяхно участие. Проведеният анализ в двете етнически групи също не установява зависимост между rs16917237 и наличието на АР. Вероятно това да се дължи на малкия брой информативни трансмисии или на малката извадка.

Идентифицирани са няколко асоциирани хаплотипи, които допринасят за повишен риск от АР, rs6265/rs16917237, CG, rs16917237/rs12273363, GT и rs6265/rs16917237/rs12273363, CGT. Асоциативният хаплотипен анализ показва, че хаплотип съдържащ алелите с по-ниска честота на двата полиморфизма, rs6265 и rs16917237 е статистически по-рядък при пациенти в сравнение с контроли. Хаплотип CG е по-чест при пациенти, като е получен значим резултат (p=0.015) за БАР и статистически гранична значимост (p=0.071) за извадката с присъствие на пациенти с УАР. Хаплотип rs6265/rs16917237/rs122733, CGT повтаря тенденцията също да е по-чест при пациенти в сравнение с контроли (p=0.003, A1 и p=0.028, A2). Резултатите получени за асоциация на хаплотипите са статистически по-значими от тези получени за самостоятелния риск на участващите алели, при алелната асоциация, което предполага, че риска асоцииран с хаплотипите, въпреки че е силно повлиян от присъствието на rs16917237 не се дължи само на него.

Хаплотипи rs16917237/rs12273363 (TT и GT), за които е идентифицирана асоциация с АР повтарят установената тенденция от асоциативното проучване на изследваните маркери алел, G на rs16917237 да е по-чест при пациенти, а алел A да е по-рядък при тях. Съответно хаплотип rs16917237 / rs12273363, T/T е по-рядък при пациенти и има протективен ефект, а хаплотип rs16917237 / rs12273363, G/T е по-чест при пациенти. Статистически значими резултати са получени и при двете фенотипни дефиниции, но при тесния фенотипен модел се получават по значими резултати, което предполага че риска е по-голям за пациентите с БАР.

Човешкият *BDNF* ген има сложен механизъм на транскрипция и транслация като регулацията на тези процеси се осъществява на различни етапи като е описано наличието на алтернативни промотори и тъканна специфичност на експресията. Тези процеси имат отношение към правилното формиране на синаптични връзки и косвено към когнитивното функциониране (Lu, 2003). Като се има предвид сложната регулация на

експресията както и ключовите процеси в които мозъчния невротрофичен фактор участва е възможно той да повлиява различни патологични механизми, чрез които да повишава риска от АР.

В настоящето проучване са получени статистически значими резултати за rs16917237, разположен в екзон-интронен район, който до този момент не е бил обект на изследвания и според получените резултати заслужава да бъде проучван в бъдеще. Установена е синергичност между изследваните полиморфизми повлияваща патогенния ефект в рамките на асоцииранте хаплотипи като също така анализа за епистаза идентифицира и протективни епистатични взаимодействия с варианти в *DISC1* и *CLOCK* гените.

VI.6. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *CLOCK*

В кандидат гена *CLOCK*, участващ в регулирането на циркадните ритми е изследван полиморфизма rs3805154.

Не се открива асоциация или неравновесно предаване на алелите на този полиморфизъм в българската извадка.

Нашите резултати не подкрепят хипотезата за отношение на изследвания *CLOCK* вариант към развитие на БАР и УАР и не реплицират наличните данни в литературата за положителна асоциация с АР (Mansour, 2005; 2006; Mitterauer, 2000). Получените резултати в настоящото проучване подкрепят проучванията на (Bailer, 2005; Desan, 2000; Johansson, 2003; Mansour, 2006; Nievergelt, 2006; Serretti, 2003), които също не откриват зависимост между варианти в *CLOCK* кандидат гена и БАР и УАР.

Няколко изследователски екипа при изследване на генетични варианти в рамките на *CLOCK* гена съобщават за асоциация на полиморфизма rs1801260 (T3111C) с БАР (Benedetti, 2003), и с нарушения в съня при пациенти с БАР и депресия (Serretti, 2003; 2005). Открита е асоциация на *CLOCK* варианта rs10462028 с БАР и УАР в проучване, описващо асоциации с АР и на варианти в други гени, регулиращи циркадните ритми (Soria, 2010). Разстройствата на съня при пациенти с БАР са доста чести и е описано, че се повлияват от епистаза между rs1801260 и rs11932595 (Maciukiewicz, 2014). Въпреки наличните доказателства за връзка на циркадните ритми с АР, за изследваният от нас полиморфизъм липсват данни за асоциация с АР в литературата и настоящите резултати не потвърждава хипотезата за потенциалното му влияние към повишен риск от АР в българската популация.

Въпреки това анализът на епистаза установява взаимодействие на изследвания *CLOCK* вариант с полиморфизми в *DISC1* и *BDNF* гените, имащ протективен ефект върху патологията на заболяването.

Като се има предвид, че *CLOCK* гена кодира транскрипционен фактор, който отключва или потиска експресията на редица гени в рамките на денонощието, генетичните вариации в него могат индиректно да повлияват риска от АР чрез промени в циркадните ритми. Нарушенията в циркадните ритми съответстват на специфична симптоматика и за да могат да бъдат направени по-категорични заключения относно ролята на циркадните ритми в етиологията на АР е необходимо изследването на повече

генетични варианти в кандидат гени, участващи в регулацията им както и изследване на по-тясно дефинирани диагностични подгрупи и ендофенотипи, където предполагаемият ефект би бил по-ясно изразен.

VI.7. Дискусия на резултатите за кандидат-ген *CRH*

В кандидат гена *CRH*, кодиращ кортикотропин освобождаващия фактор или хормон (КОФ), действащ като невромедиатор и синхронизиращ ендокринния отговор при стрес е изследван генетичния вариант rs12721510. Проведеното асоциативно проучване в настоящото изследване не открива статистически значими разлики в алелните и генотипните честоти на rs12721510 между групите на пациентите и контролите и при двете фенотипни дефиниции.

TDT анализът също не открива преференциално предаване на някои от алелите от родители на пробанди независимо от етноса. Получените резултати в нашето изследване не предполагат съществуването на пряка връзка между rs12721510 и риска от АР и реплицират предишни данни за липса на асоциация между *CRH* варианти и БАР, (Alda, 2000).

Същевременно е установена епистаза с участие на rs12721510 в *CRH* гена като ефекта му върху патологията зависи от това дали взаимодейства с варианти в *DISC1*, или *ANK3* кандидат гените.

Данни от животински модели сочат, че изследвания от нас вариант участва в хаплотипи указващи влияние на активността на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек и консумацията на алкохол (Barr, 2008), което е в унисон с наблюдаваното от нас липса на влияние върху общия риск от АР и вероятен ефект в по-тясно дефинирани диагностични подкатегории или при взаимодействие с други предразполагащи фактори както демонстрира анализа на епистазата.

Няколко изследователски екипа докладват асоциация на полиморфизми и хаплотипи в гена кодиращ КОФ рецептор тип 1 (*CRHR1*) с депресия (Liu, 2013; Schatzberg, 2014, Liu, 2006), и на хаплотипи в гена за КОФ рецептор тип 2 (*CRHR2*) с опити за самоубийство при пациенти с БАР (De Luca, 2007). Тъй като в регулацията на оста хипоталамус-хипофиза-надбъбрек, посредством която кортикотропин освобождаващия фактор повлиява ендокринния отговор при стрес, участват много фактори, допълнителното проучване на повече варианти могат да помогнат за по-добрата оценка на приноса им към развитието на АР.

Дискусия на резултатите, получени при изследване на кандидат гени, свързани с каналопатии

VI.8. Дискусия на резултатите за кандидат ген *CACNA1C*

Предпоставка за формулирането на хипотеза за отношение на калциевите канали към развитието на заболявания от психиатричния спектър стават получените резултати за силна асоциация на генетични варианти в *CACNA1C* от няколко геномни асоциативни проучвания (Ferreira, 2008; Sklar, 2008; GWAS Consortium 2011; Lee, 2012).

Изследвания в настоящата извадка генетичен вариант rs1006737 е асоцииран с БАР ($p = 7.0\times10^{-8}$) при изследване на 4 387 пациенти и 6 209 здрави индивиди с 1.8 милиона маркера в геномно асоциативно проучване (Ferreira, 2008). Също така данни за асоциация на генетичния вариант rs1006737 е открита с шизофрения и рекурентна депресия (Green, 2010), а фамилно изследване демонстрира асоциация на алел А с БАР, протичащо със засилена психотична симптоматика (Lett Tap, 2011). В настоящото изследване не е открита алелна или генотипна асоциация за rs1006737 в гена кодиращ субединица на калциев канал. TDT анализът също не идентифицира преференциално предаване на алели в пробанди.

Няколко проучвания демонстрират връзка на изследвания от нас генетичен вариант с промени в когнитивното функциониране както при пациенти така и при здрави индивиди. Алел А е асоцииран с повишена тревожност, наличие на параноидни идеи, висока реактивност при стрес (Roussos, 2011), повишена чувствителност, склонност към тревожност, депресия, обсесивно-компулсивни мисли (Erk, 2010) и нарушена когниция (Arts, 2013). Описано е абнормно функциониране на мозъка при носителите на този алел (Erk, 2010), както и затруднена ориентация, която се свързва с намалена активност на определени мозъчни зони, и по-ниски нива на комуникация между лявата и дясната част на хипокампуса (Thimm, 2010).

Нашето изследване не потвърждава наличието на асоциация между изследвания *CACNA1C* генетичен маркер и БАР и УАР в българската популация. Предполагаме че липсата на статистически разлики в алелните и генотипните честоти между пациентите и контролите може да се дължи на недостатъчно голямата извадка, тъй като наличните данни за асоциация на rs1006737, както и на други генетични варианти в рамките на *CACNA1C* гена в литературата произлизат от геномни асоциативни проучвания, където бройката на включените в анализа индивиди надхвърля изследваните от нас, а рискът асоцииран с носителството на съответния алел е сравнително малък (OR=1.21; Ferreira, 2008).

Липсата на неравновесно предаване при проведеният TDT анализ на семейства от български и ромски произход независимо от етническата принадлежност, съвпада с резултатите на (Gonzalez, 2013), който също не открива пряка зависимост между rs1006737 и БАР при фамилно проучване. Въпреки това (Gonzalez, 2013) идентифицира *CACNA1C* хаплотипи имащи отношение към заболяването, което допълнително демонстрира наличието на сравнително слабо самостоятелно отношение на rs1006737 към общия риск от АР и влияние в комбинация с други варианти. В настоящото проучване са изследвани потенциалните епистатични взаимодействия на rs1006737 с другите полиморфизми, но не са установени взаимодействия, които да имат ефект върху риска от АР.

Тъй като има акумулирани данни за асоциация на *CACNA1C* вариантите с по-специфично дефинирани диагностични подкатегории, предполагаме също, че rs1006737 би могъл да повлиява определен диагностичен профил, но не и риска от АР в българската популация.

Потенциалното влияние на гените кодиращи елементи от калциеви канали не може изцяло да се изключи, въпреки че не е установена такава зависимост в настоящото изследване, тъй като генетични варианти в тях могат да повлияват нормалното функциониране на канала като подържат по-продължително време затворено или отворено състояние, водещо до отклонения във нивата на Ca^{2+} йони, което от своя страна повлиява междуклетъчната комуникация и регулацията на експресията на други гени.

VI.9. Дискусия на резултатите за кандидат ген *ANK3*

Кандидат-генът, *ANK3* кодира белтъка анкирин, който се свързва със спектрина и актина и участва в пространственото поддържане на клетъчната структура, в пролиферацията, клетъчната подвижност и в групирането на натриеви канали в аксона. За двата варианта, rs9804190 и rs10994336 изследвани в *ANK3* гена не е открита алелна, генотипна и хаплотипна асоциация с АР в българската популация.

Проведеният TDT анализ не установява неравновесно предаване на алелите на rs10994336, но детектира по-рядко предаване на алел Т на rs9804190 при широк фенотипен модел. Установеното по-рядко предаване на редкия алел Т на rs9804190 във фамилното изследване съответства на по-често предаване на алел С като статистически значими резултати са получени само при широк фенотип, но същата тенденция макар и недостигаща статистическа значимост е наблюдавана и при тесен фенотип. На базата на получените от нас резултати може да предположим, че по-честото предаване на алел С повишава риска от АР, особено от УАР. TDT анализът в двете етнически подгрупи не установява неравновесно предаване на алелите на rs9804190 от родители на засегнати индивиди, което най-вероятно се обяснява с факта, че при изследване в по-малка извадка се губи статистическата сила за детекция на слаби ефекти. Независимо от това при ромските семейства отчетливо се забелязва тенденцията на по-рядко предаване на алел Т и по-често предаване на алел С в болното поколение, което може да се дължи на факта че ромите са генетично по-хомогенна група за разлика от българите, при които предразполагащите фактори се очаква да са по-отчетливо изразени. Установена е също така и епистаза с участието на алел С на rs9804190 с rs12721510 в *CRH*, имаща протективен ефект.

Геномно асоциативно изследване, както и мета анализ на геномни асоциативни изследвания от Великобритания и САЩ съобщават за асоциация на rs9804190 с БАР (Baum, 2008; Ferreira, 2008). Същият генетичен вариант е асоцииран и с посттравматичен стресов синдром (Logue, 2013) и съвместно с другия изследван от нас полиморфизъм, rs10994336 с повишен риск от БАР, но не и от шизофрения (Tesli, 2011). Алел С на rs9804190 е асоцииран и с ниска експресия на матрична РНК, лоша работна памет и повишена активност на префронталната мозъчна област при пациенти с шизофрения (Roussos, 2012), въпреки че друг изследователски екип отхвърля наличието на асоциация на този алел с невропсихологични промени и с промени в бялото вещество на мозъка (Linke, 2012).

За другия изследван от нас генетичен вариант rs10994336 в *ANK3* гена освен липса на асоциация с АР от проведеното асоциативно изследване, се установява и липса на неравновесно предаване на алелите му при TDT анализа. Нашите резултати не

подкрепят данните за отношение на този вариант към повишен риск от БАР (Schulze, 2009; Lett Tap, 2011; Lim, 2014), и БАР протичащ без психози (Lett Tap, 2011). Налични са данни, че носителството на алел Т повлиява когнитивното функциониране, като се наблюдава забавяне на реакцията, лоша прецизност при отговор (Zhang, 2014) и асоциация с анхедония (Roussos, 2011) както и с по-ниски нива на възбудимост в определени мозъчни области (Dima, 2013). Същевременно не е установено носителството на алел Т да повлиява когнитивни процеси като памет, способност за взимане на решения (Ruberto, 2011), както и връзка с абнормно функциониране на работната памет и промени в интелектуалния потенциал (Hatzimanolis, 2012).

Вероятно rs10994336 повлиява в по-голяма степен определени специфични когнитивни функции и няма отношение към други. Промени в когнитивното функциониране са често срещани при пациенти с АР и е възможно именно чрез тях да се допринася за повишен риск от заболявания от афективния спектър. Генетичният вариант, rs10994336 няма принос към общия риск от АР в българската популация, тъй като в настоящото изследване не се потвърждава влиянието му или повлиява слабо само по-тясно дефинирана подгрупа.

Настоящите резултати предоставят доказателства за отношението на алел С на rs9804190 към АР, но демонстрират по-силно влияние при пациенти с УАР вместо с БАР, каквито данни има в литературата. Анализът на епистазата демонстрира взаимодействия с участието на *ANK3* варианти с варианти в *CRH* гена.

VI.10. Дискусия на резултатите, получени при анализ за статистическа епистаза

Данни за епистаза са получени между *DISC1*, *TPH2, BDNF, CLOCK, CRH* и *SLC6A4* гените. Логистичната регресия демонстрира най-висока стойност на псевдо R^2=0.05, което показва, че сравнително малка част от вариабилноста на заболяването може да се обясни с установените епистатични взаимодействия. Въпреки това резултатите за някои от епистазите между варианти в *DISC1* и *TPH2* гените остават статистически значими и след консервативната корекция на Бонферони. Идентифицираните статистически взаимодействия могат да се използват като основа за бъдещи изследвания с различни подходи. Проучвания в по-тясно дефинирани групи от пациенти могат да предоставят възможноста за установяване на по-специфичен ефект върху фенотипа, които такива взаимодействия е възможно да имат.

В настоящата извадка за варианти в *DISC1* кандидат гена са установени най-много участия в епистази, повлияващи риска от АР. Идентифицираните взаимодействия са с варианти в *TPH2, BDNF, CLOCK* и *CRH* гените.

DISC1 – TPH2

В литературата са налични данни за епистатични взаимодействия с участието на *DISC1* варианти, повлияващи риска за шизофрения между rs821616 в DISC1 и полиморфизми в *COMT*, Catechol-O-methyltransferase гена (Nicodemus, 2007), както и с rs3784859, *NDE1*, NudE Neurodevelopment Protein 1 (Burdick, 2008). В зависимост от наличието на Cys или Ser алели е описан различен капацитет на свързване на DISC1

продукта с NDEL1 и NDE1, което е важно за развитието на невроните (Burdick, 2008). В настоящото проучване са идентифицирани няколко взаимодействия с *TPH2* варианти повлияващи риска от АР и е установена е епистаза между алел А (Ser) на несинонимната замяна, rs821616 и алел G на rs1386483 в *TPH2* гена при широк фенотипен модел. Регресионният анализ демонстрира, че алел Ser е статистически по-чест при пациенти при широк фенотип, но съвместното му присъствие с алел G е по-рядко при пациенти, което предполага протективен ефект на епистазата между тях (B= -1.614, p=0.008).

Същият *TPH2* полиморфизъм, rs1386483 от своя страна взаимодейства с друг *DISC1* вариант, rs6675281 като идентифицираната епистаза между алел G (rs1386483) и алел C (rs6675281) при широк модел повишава риска от АР за разлика от другото установено взаимодействие с този *TPH2* вариант, имащо протективен ефект. За rs1386483 също така има данни, че повлиява проявата на импулсивност в зависимост от пола и наличието на стрес (Stoltenberg et al., 2012).

Същевременно алел С и генотип СС на *DISC1* варианта, rs6675281 взаимодействат с други два TPH2 полиморфизма, като указват протективно действие. Статистически най-значима епистаза с протективен ефект е получена при взаимодействието на алел С на rs6675281, отговарящ за понижена експресия и намален обем на сиво вещество в мозъка и алел А на rs1872824 при широка фенотипна характеристика (p=0.004).

Установено е също така, че генотип СС на rs6675281 е в епистаза с генотип АА на rs4290270 само при широк фенотип, както и с генотип АА на rs1872824 при двата фенотипа. За rs4290270 има данни, че участва в епистаза повлияваща развитието на разстройства от аутистичния спектър (Singh, 2013), а нашите резултати демонстрират протективното му влияние върху риска от АР при взаимодействие с rs6675281. Алел А на rs1872824 (*TPH2*) и генотипите с неговото присъствие са по-чести при пациентите, но в контекста на епистаза с rs6675281, *DISC1* се установява протективен ефект, тъй като са по-рядко срещани при пациенти.

Няма докладвана от други изследователски групи епистаза с участието на несинонимната аминокиселинна замяна rs6675281 в *DISC1* гена. Наблюдаваното в настоящата извадка взаимодействие с *TPH2* вариантите, rs1386483, rs4290270 и rs1872824 повлиява риска от АР в българската популация и по-специално риска от УАР, тъй като получените резултати при широк фенотипен модел са статистически по-силни и по-многобройни.

Може да се обобщи, че идентифицираната епистаза между *DISC1* и *TPH2* кандидат гените има протективен ефект при взаимодействие на rs6675281 (DISC1) с rs4290270 и rs1872824 (*TPH2*), а епистазата на rs1386483 (*TPH2*) води до повишен риск от АР при взаимодействие с rs6675281 (*DISC1*) и има протективен ефект при взаимодействие с rs821616 (*DISC1*). Резултатите подкрепят хипотезата за участие на вариантите в *DISC1* и *TPH2* гените в епистатични взаимодействия повлияващи АР. Установеното по-голямо влияние на идентифицираните взаимодействия при широк фенотипен модел където са включени едновременно пациенти с БАР и УАР, подкрепя

тенденцията такъв род генетични взаимодействия като епистазата да имат по-силно влияние при генетично по-хетерогенни диагностични категории.

DISC1 rs980989 - BDNF rs16917237 / CLOCK rs3805154

Идентифицирани са две протективни взаимодействия между 3' разположения полиморфизъм rs980989 в *DISC1* гена и варианти в *BDNF* и *CLOCK* кандидат-гените.

Установена е протективна епистаза между асоциирания с повишена психомоторна скорост при БАР пациенти (Palo, 2007), алел G на rs980989 в *DISC1* и варианти в *BDNF* и *CLOCK* гените. В проведеният TDT анализ на фамилната извадка е установено по-рядко предаване на алел T на rs980989 (*DISC1*), както и на хаплотипи с негово присъствие от родители на пациенти (Ivanova, 2013A), което се потвърждава от резултатите от регресионният анализ. Реплицират се от регресията и резултатите от асоциативното изследване за алел G на rs16917237 (*BDNF*), демонстриращо по-високите му честоти при пациенти (Ivanova, 2013B). Въпреки това анализът за епистаза идентифицира по-висока честота на съвместно присъствие на алел G (rs980989) и алел G (rs16917237) в контролната група (p=0.03) и установява протективен ефект на взаимодействието между тях и модифициращ ефект върху фенотипа на двата участващи генетични варианта. Идентифицираната от нас епистаза се явява модифицираща спрямо предварително установените действия на участващите в нея варианти. Тъй като *DISC1* и *BDNF* са функционално въвлечени в процесите на растеж, развитие и оцеляване на невроните е възможно наличието на статистическа епистаза да потвърждава съвместната им връзка към етиологията на АР посредством синергично действие.

Другото идентифицирано протективно взаимодействие е между същия вариант в *DISC1* полиморфизма, rs980989 (алел G) и алел C на rs3805154 (*CLOCK*), като съвместното присъствие на взаимодействащите варианти е по-рядко при пациенти с широка фенотипна характеристика. Асоциираният с по-висока психомоторна скорост на реакция при пациенти с БАР, вариант rs980989 има протективен ефект в рамките на епистаза с rs3805154 в *CLOCK* кандидат гена. Потвърждава се слабото му отношение към етиологията на АР като се демонстрира и връзка на идентифицираната епистаза с развитието на УАР.

CLOCK rs3805154 - BDNF rs16917237

Епистаза с протективен ефект е установена при взаимодействието на алел C на rs3805154 (*CLOCK*) с алел G на rs16917237 (*BDNF*), като е установена значима алелна епистаза при тясна фенотипна дефиниция (p=0.03) и статистически гранична зависимост при широк фенотип. Наблюдава се по-силен ефект при пациенти с БАР и се потвърждават литературните данни за участие на *BDNF* варианти в епистатични взаимодействия повлияващи риска от БАР. Не се открити данни за епистаза с участието на rs16917237, но няколко изследователски екипа съобщават за епистаза с участието на функционалния *BDNF* полиморфизъм rs6265, които повлияват риска от БАР и други психиатрични заболявания (Montag, 2010A; Montag, 2010B; Xiao, 2011). Въпреки че в нашата извадка е идентифицирана епистаза с друг BDNF полиморфизъм, настоящите резултати предоставят допълнителни доказателства за участието на варианти в *BDNF*

гена в епистатични взаимодействия повлияващи риска от АР и по-специално риска от БАР както е установено в епистазата на rs16917237 с CLOCK варианта rs3805154.

CRH rs12721510 - DISC1 rs821577 / ANK3 rs9804190

CRH вариантът, rs12721510 участва в епистаза с rs821577 в *DISC1*, която увеличава риска от АР и с rs9804190 в *ANK3*, която има протективен ефект. Идентифицираната епистаза с участие на асоциирания с БАР и анхедония rs821577 (Tomppo, 2009), подкрепя хипотезата, че този *DISC1* вариант повлиява риска от АР в зависимост от взаимодействията, в които участва (Hennah, 2009). Честотата на съвместно присъствие на генотип C/C на rs12721510 (*CRH*) и генотип G/G на rs821577 (*DISC1*) е по-висока в групата на пациентите и при двата фенотипа. В рамките на изследваната от нас извадка, *DISC1* генетичният вариант rs821577 няма пряко самостоятелно влияние, но повлиява фенотипа при епистаза с rs12721510 (*CRH*), както и при съвместно присъствие с други *DISC1* варианти в хаплотипи имащи връзка със заболяването.

Другата установена епистаза с участието на rs12721510 в *CRH* и rs9804190 в *ANK3* гена има протективен ефект, тъй като съвместното присъствие на алел C (rs12721510) и алел C (rs9804190) е по-често в групата на здравите контроли.

Полиморфизмът rs9804190 в *ANK3* гена е асоцииран с посттравматично стресово разстройство (Logue, 2013), повишен риск от БАР (Schultze, 2009), понижена експресия на матрична РНК, съответстваща на ниски нива на белтъка анкирин при носителите на алел C (Roussos, 2012), а противоположният *CRH* алел на участващия в епистазата в нашето изследване е асоцииран с висока социална анхедония (Tompo, 2009). Настоящото проучване демонстрира връзката на *CRH* генетичен вариант rs9804190 в епистатични взаимодействия повлияващи риска от АР. Подобно на нашите резултати няколко скорошни изследвания също потвърждават участието на *ANK3* в различни епистатични взаимодействия и отношението им към повишен риск от БАР (Pandey, 2012; Judy, 2013).

Може да бъде обобщено, че епистазите между генотип CC на rs12721510 (*CRH*) с генотип GG на rs821577 (*DISC1*), и на алел C на rs12721510 (*CRH*) с алел C в rs9804190 (*ANK3*) имат противоположен ефект върху риска от АР в българската популация независимо от афективния статус, зависещо основно от комбинациите.

TPH2 rs1386483 - SLC6A4 5-HTTLPR

Установеният протективен ефект на епистазата между генотипите с присъствие на алел G на rs1386483 (G/G и G/A) и генотип L/L на SLC6A4 независимо от фенотипа подкрепят хипотезата, за участие на *SLC6A4* във взаимодействия, имащи отношение към психиатрични разстройства и идентифицират още едно епистатично взаимодействие с *TPH2* варианта rs1386483.

Освен другите идентифицирани взаимодействия с участие на варианти в *TPH2* кандидат гена е установена и епистаза с промоторния полиморфизъм, 5-HTTLPR в серотониновия транспортер. Едновременното носителство на генотипи G/G и G/A на rs1386483 и генотип L/L на *SLC6A4* е по-рядко при пациенти и при двата афективни модела, което предполага вероятен протективен ефект на взаимодействието. Друг изследователски екип, съобщаващ за епистаза между варианти в *TPH2* и промоторния

вариант в серотониновия транспортер, описва влияние върху наличието на специфична черта на темперамента, каквато е търсене на новости при жени с булимия (Thaler, 2013).

Описани са и участия на варианти в *SLC6A4* гена в епистатични взаимодействия, имащи отношение към различни психиатрични прояви. Генотип L/L, участващ в идентифицираната в настоящото изследване епистаза, взаимодейства с генотип Val/Val в *COMT* гена и проявява протективно от стрес влияние (Conway, 2010). Същевременно е описан и по-малък обем на сивото мозъчно вещество в амигдалата при епистаза на алел S (*SLC6A4*) и хомозиготни носители на алел Met (*COMT*) или алел L (*SLC6A4*) и алел Val (*COMT*) (Conway, 2010). Увеличен риск от УАР е установен също при епистаза с участието на алел S в *SLC6A4* и генетичен вариант в четвърта хромозома (Neff, 2010). Други изследователски екипи също описват наличие на епистаза с участието на *SLC6A4* варианти, повлияващи различни психиатрични заболявания и състояния (Outhred, 2012; Pezawas, 2008; Arias, 2012; Grabe, 2012). Настоящите резултати потвърждават, че промоторния полиморфизъм в *SLC6A4* кандидат гена участва във взаимодействия повлияващи риска от АР и идентифицира взаимодействие с rs1386483 варианта в *TPH2* гена, повлияващо едновременно и УАР и БАР.

VII. ОБОБЩЕНИ РЕЗУЛТАТИ

TPH2

- Установени са два по-често предавани хаплотипа (rs111789/rs4290270/rs187282, GAG и rs4570625/rs11178998/rs4290270/rs1872824, TGAG) на пациенти с участието на асоциираните алел T (rs4570625) с паническо разстройство, алел G (rs11178998) с АР и посттравматичен стресов синдром и алел A (rs4290270) с АР.
- Установена е липса на алелна и генотипна асоциация, което може да се дължи на недостатъчна сила на извадката или слабо самостоятелно влияние на изследваните *TPH2* варианти.
- Идентифицирани са епистатични взаимодействия между варианти в *TPH2* и *DISC1* гените с протективен и повишаващ риска от АР ефект и протективна епистаза с 5-HTTLPR.

SLC6A4

- Установена е алелна и генотипна асоциация за rs12150214, по-висока честота на алел C и генотипи с негово участие при пациенти, съответстващо на доминантен ефект, повишаващ риска от АР или рецесивен протективен ефект на алел G.
- Не се потвърждава хипотезата за асоциация с АР на промоторния полиморфизъм 5-HTTLPR. Идентифициран е протективен ефект на L варианта само в контекста на епистаза с rs1386483 (*TPH2*).

DRD2

- Установена е по-висока честота на предаване в засегнатото поколение на алел A на rs6589377.
- Идентифицирани са няколко неравновесно предавани хаплотипи (rs12800853/rs7350522, CG и rs6277/rs12800853/rs7350522, CCG са по-често, а rs6277/rs12800853/rs7350522/rs6589377 CCTG е по-рядко предаван).
- Установено е присъствието на алел C на rs6277 едновременно в по-често и в по-рядко унаследявани хаплотипи като ефекта му върху риска от АР се повлиява от другите участващи варианти.

DISC1

- Установено е по-често предаване на алел G на rs980989 на пациенти с АР.
- Идентифицирани са следните по-рядко предавани протективни хаплотипи rs3738401/rs6675281/rs821577**,** ATT; rs3738401/rs6675281/rs821577/rs821616, ATTA; rs821577/rs821616/rs980989**,** GAT; rs6675281/rs821577/rs821616/rs980989, CGAT и един по-често предаван, повишаващ риска от АР хаплотип, rs6675281/rs821577/rs821616, TGT. Хаплотипният анализ реплицира резултатите за rs980989 като повишен риск от АР е свързан с по-често предавани хаплотипи съдържащи алел G, а протективен ефект с по-често предавани хаплотипи с алел T. Алел T (Cys) на rs821616, повлияващ свързването на *DISC1* с транскрипционни

фактори участва само в по-често предавания хаплотип, а противоположния алел в по-рядко предаваните.

- ❖ Анализът за статистическа епистаза демонстрира най-многобройни взаимодействия повлияващи риска от АР с участието на варианти в *DISC1* гена.

BDNF

- ❖ Установена е асоциация за rs16917237, увеличен риск от АР е наблюдаван при хомозиготно и хетерозиготно носителство на алел G.
- ❖ Забелязва се тенденция алел C (Val) на rs6265 да е по-чест при болни и се потвърждават данните от друго българско проучване на пациенти с БАР (Yossifova 2011).
- ❖ Идентифицирани са асоциирани с АР хаплотипи с участието на алел C на rs6265 и алел G на rs16917237, както и протективни хаплотип с алел T на rs12273363. Рискът асоцииран с хаплотипите, въпреки че е силно повлиян от присъствието на rs16917237 не се дължи само на него тъй като резултатите от хаплотипния анализ са статистически по-значими от тези за самостоятелното влияние на rs16917237.
- ❖ Идентифицирани са протективни епистатични взаимодействия с варианти в *DISC1* и *CLOCK* гените.

CLOCK

- ❖ Не се открива асоциация или неравновесно предаване на алелите на rs3805154.
- ❖ Установена е статистическа епистаза с протективен ефект между rs3805154 и варианти в *DISC1* и *BDNF* гените.

CRH

- ❖ Не се открива асоциация и неравновесно предаване на алелите на rs12721510 с АР в българската популация.
- ❖ Идентифицирана е статистическа епистаза, с повишаващ риска от АР ефект при взаимодействие на rs12721510 с варианти в *DISC1* гена и протективен ефект при взаимодействие с варианти в *ANK3* гена.

CACNA1C

- ❖ Не са открити асоциация и неравновесно предаване на алелите на rs1006737 както и участие в епистатични взаимодействия.

ANK3

- ❖ Установено е по-често предаване на алел C и по-рядко предаване на алел T на rs9804190 в засегнатото поколение при A2.
- ❖ Установена е епистаза с протективен ефект с вариант в *CRH* гена.

VIII. ИЗВОДИ

1. **Изводи за кандидат-ген *TPH2***

Изследваните варианти в *TPH2* кандидат гена имат слаб самостоятелен ефект върху риска от АР. Идентифицираните два по-често предавани хаплотипа и епистатични взаимодействия с варианти в *DISC1* и *SLC6A4* гена показват, че ролята на *TPH2* е по-скоро модифицираща, а не определяща риска.

2. **Изводи за кандидат-ген *SLC6A4***

SLC6A4 кандидат ген има принос за повишаване на риска от АР, установен, чрез доказване на доминантния ефект на алел С (rs12150214, интрон 1), но същевременно е отхвърлена хипотезата за връзка на функционалния полиморфизъм 5-HTTLPR с развитие на АР в българската популация.

3. **Изводи за кандидат-ген *DRD2***

Потвърждава се приноса на *DRD2* гена за развитие на АР, идентифицирайки преференциално предаване на алел А (rs6589377, 5'UTR) и няколко по-често предавани хаплотипа с негово участие.

4. **Изводи за кандидат-ген *DISC1***

Подкрепя се връзката на DISC1 с повишен риск от АР чрез идентифицираните неравновесно предавани хаплотипи, наблюдаваното по-често предаване на алел G на намиращия се в 3'UTR rs980989 както и чрез участието на варианти в гена в множество епистази с различен фенотипен ефект.

5. **Изводи за кандидат-ген *BDNF***

За първи път се открива асоциация на намиращия се в екзон-интронния участък rs16917237 с АР, което заедно с идентифицираните асоциирани хаплотипи и епистатични взаимодействия с варианти в *DISC1* и *CLOCK* гените потвърждава ролята на *BDNF* варианти за повишен риск от АР.

6. **Изводи за кандидат-гените *CLOCK*, *CRH* и *CACNA1C***

Не се подкрепя хипотезата за самостоятелно влияние на изследваните вариантите в *CLOCK*, *CRH* и *CACNA1C* гените за развитието на АР, но са идентифицирани епистатични взаимодействия с тях с различен ефект върху риска от заболяването, което не позволява отхвърлянето им като кандидат-гени, допринасящи за развитието на заболяването.

7. **Изводи за кандидат-ген *ANK3***

По-честото предаване на алел С на rs9804190 (*ANK3*, 3'UTR) на пациенти с АР и установената епистаза с протективен ефект при взаимодействие с вариант в *CRH* гена показва, че *ANK3* гена е свързан с риск от развитие на АР.

8. **Общи изводи**

8.1. Липсата на асоциация с АР за някои от изследваните варианти може да се дължи на липсващо влияние при български пациенти, на слабата статистическа сила на изследваната кохорта от пациенти и контроли за идентифициране на варианти със слаб ефект, или на тяхното влияние само върху специфична симптоматика, но не и на диагнозата като цяло.

8.2. Наблюдавана е тенденция за статистически по-значими резултати за А2 при анализа на *DRD2* и *ANK3* кандидат гените, дължащо се на по-голямата сила на извадката или на по-силния им ефект при рекурентна депресия. Същевременно статистически по-значими резултати за *BDNF* гена са получени при А1, демонстрирайки по-силното влияние на този ген при БАР.

8.3. Резултатите от анализа за статистическа епистаза, въпреки ограниченията на метода, могат да бъдат използвани за генериране и приоритизиране на хипотези за бъдещи изследвания. Допълнителни анализи на по-тясно дефинирани ендофенотипи и в по-големи извадки могат да предоставят по-детайлна информация.

IX. НАУЧНИ ПРИНОСИ

IX. 1. Научни приноси с научно-теоретичен характер

❖ Проведено е за първи път асоциативно изследване на генетични варианти в *CLOCK, CRH, CACNA1C* и *ANK3A* кандидат гените в български пациенти с АР и е установено слабото им влияние върху риска от заболяването.

❖ Установена е и е докладвана за пръв път асоциация на rs16917237 в *BDNF* гена с АР.

❖ Описано е неравновесно предаване на хаплотипи с участието на генетични варианти в *TPH2, DRD2* и *DISC1* в български семейства с АР.

❖ Потвърдено е наличието на статистически взаимодействия между алелите и генотипите на някои кандидат гени (*DISC1-TPH2; DISC1-BDNF/CLOCK; CLOCK-BDNF; CRH-DISC1/ANK3; TPH2-SLC6A4*), които повлияват риска от АР.

IX. 2. Научни приноси с потвърдителен характер

❖ Потвърдена е ролята на полиморфизми в *BDNF* гена за предразположение към АР в българската популация.

❖ Потвърждава се ролята на невропластичността в патогенезата на АР на базата на многото епистатични взаимодействия с участие на варианти в *DISC1* и *BDNF* гените и идентифицираното неравновесно предаване за rs980989 и хаплотипи в *DISC1* гена както и откритата асоциация на rs16917237 и *BDNF* хаплотипи с АР.

X. ФИНАНСИРАНЕ

Всички изследвания, представени в дисертационния труд са финансирани от следните проекти:

- "Асоциативно изследване на кандидат гени *CACNA1C* и *ANK3* от геномни асоциативни проучвания, при болни с биполярно афективно разстройство в българската популация", МУ-2012г.;

- "Асоциативно проучване на кандидат гени за суицидно поведение при пациенти с различни психиатрични диагнози", МУ-2011г.;

- "Фамилно асоциативно изследване на неврокогнитивни нарушения и *DISC1* ген при болни с биполярно афективно разстройство", МУ-2009г.

Лабораторните изследвания са проведени в Център по молекулна медицина, Катедра по медицинска химия и биохимия, МФ, МУ-София.

XI. ПУБЛИКАЦИИ

Публикации, свързани с дисертационния труд, в международни и български списания с импакт фактор

1. Mina A. Ivanova, Tanya N. Christova, Christian S. Kostov, Ivo M. Kremensky, Vanio I. Mitev, Vihra K. Milanova, Radka P. Kaneva Case-control Study of DISC1 Genetic Variants in Bulgarian Affective Disorder Sample 2014, Comptes rendus de l'Acade'mie bulgare des Sciences, Vol 67, No6, pp.863-870

2. Ivanova MA, Kremensky IM, Christova TN, Kostov CS, Milanova VK, Mitev V, Kaneva RP, "Transmission disequilibrium of DISC1 haplotypes in Bulgarian families with affective disorder" Psychiatry Res Sep 30, 2013, IF=3.186, Цитати-1

3. Ivanova MA, Christova TN, Asan TS, Djurova NA, Alexiev SS, Kostov CS, Chorbov VM, Stoyanova VS, Onchev GN, Kancheva DM, Krastev SK, Vladimirova RK, Kremensky IM, Mitev V, Milanova VK, Kaneva RP, " Evidence of an a association between bipolar disorder and rs16917237 in the BDNF gene in a Bulgarian sample." Psychiatr genet., 2013 Jun;23(3):141-2, IF=2.274, Цитати-1

4. Kaneva R, Milanova V, Angelicheva D, Macgregor S, Kosov C, Vladimirova R, Aleksiev S, Angelova M, Stoyanova D, Loh A, Hallmayer J, Kalaydjieva L, Jablensky A, 2009, Bipolar disorder in the Bulgarian gypsies: Genetic heterogeneity in a young founder population, AM J MED Genet & Neuropsychiatric genet, Mar 5: 150B(2):191-201, IF=3.271, Цитати-7

Участия в международни научни форуми

1. Al-Djassem A, Dzhebir G, Ivanova M, Penchev M, Beltcheva O, Mitev V, Milanova V, Kaneva R. Association Study of the Triallelic 5-HTTLPR/rs25531 Polymorphism in the SerotoninTransporter Gene and Affective Disorders, Poster presentation, XXIInd World Congress of Psychiatric Genetics 2014.

2. Kaneva R, Ivanova MA, Christova TN, Kostov CS, Dzhebir G, Djurova NA, Spiridobov SA, Kremensky IM, Mitev VI, Milanova VM, " Association analysis of ANK3 and CACNA1C gene variants in Bulgarian affective disorder patients" Poster presentation, XXIth World Congress of Psychiatric Genetics, Boston, USA, 2013.

3. Ivanova MA, Christova TN, Djurova NA, Christova TN, Milanova VK, Mitev V, Kremensky IM and Kaneva RP. "Assosiation studies of DRD2 polymorphisms and affective disorders in case-control and family based study of patients with Bulgarian and Roma origin" Poster presentation, XXth World Congress of Psychiatric Genetics, Hamburg, Germany, 2012.

4. Mina Ivanova, Daliya Kancheva, Momchil Nikolov, Tania Hristova, Nikolina Djurova, Christian Kostov, Vihra Milanova, Ivo Kremenskyand Radka Kaneva Vanio Mitev "Association of TPH2 G-703T polymorphism and affective disorders revealed by family based association study" Poster presentation, XVIII World Congress on Psychiatric Genetics, Athens, Greece, 2010.

5. Mina Ivanova, Vesselin Chorbov, Christian Kostov, Vihra Milanova, Ivo Kremensky and Radka Kaneva "Association analysis of polymorphisms in serotonine and dopamine related genes and personality traits in Bulgarian subjects" - Poster Presentation, XIVth World Congress on Psychiatric Genetics, Cagliari, Italy – 2006.

6. Mina Ivanova, Vesselin Chorbov, Christian Kostov, Vihra Milanova, Ivo Kremensky and Radka Kaneva "Polymorphisms in serotonine and dopamine related genes and their relationship to personality traits in Bulgarian subjects" Poster Presentation, 7th Balkan Meeting of Human Genetics, Skopje, Macedonia – 2006.

7. Radka Kaneva, Mina Ivanova, Vesselin Chorbov, Garabed Barakian, Antoaneta Galabova, Eleonora Nesheva, Ivo Kremensky, Alexandre Todorov, "Association analysis of the 5-HT2A receptor and serotonin and dopamine transporter genes with heroin abuse in Bulgarian subjects", Poster presentation XIIIth World Congress on Psychiatric Genetics, Boston MA, USA – 2005.

XII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Alda M, Turecki G, Grof P, Cavazzoni P, Duffy A, Grof E, et al. Association and linkage studies of CRH and PENK genes in bipolar disorder: a collaborative IGSLI study. Am J Med Genet. 2000 Apr 3;96(2):178-81.
2. Al-Djassem A, Dzhebir G, Ivanova M, Penchev M, Beltcheva O et al. Association Study of the Triallelic 5-HTTLPR/rs25531 Polymorphism in the SerotoninTransporter Gene and Affective Disorders, XXIInd World Congress of Psychiatric Genetics 2014.
3. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders, 4th ed, Washington (DC): American Psychiatric Association; 1994.
4. Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (1999) The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. J En-docrinol 160:1–12.
5. Arias B, Serretti A, Mandelli L, Gastó C, Catalán R et al. Dysbindin gene (DTNBP1) in major depression: association with clinical response to selective serotonin reuptake inhibitors. Pharmacogenet Genomics. 2009.
6. Arts B, Simons CJ, Os Jv. Evidence for the impact of the CACNA1C risk allele rs1006737 on 2-year cognitive functioning in bipolar disorder. Psychiatr Genet. 2013 Feb;23(1):41-2.
7. Austin C.P, B Kya, L Maa, J.A Morrisa, P.J Shughruea, Expression of disrupted-in-schizophrenia-1, a schizophrenia-associated gene, is prominent in the mouse hippocampus throughout brain development, Neuroscience Volume 124, Issue 1, 2004, Pages 3–10.
8. Bailer U, Wiesegger G, Leisch F, Fuchs K, Leitner I et al. No association of clock gene T3111C polymorphism and affective disorders. Eur Neuropsychopharmacol 2005;15:51–55.
9. Baum AE, Akula N, Cabanero M, Cardona I, Corona W et al. A genome-wide association study implicates diacylglycerol kinase eta (DGKH) and several other genes in the etiology of bipolar disorder. Mol Psychiatry. 2008 Feb;13(2):197-207. Epub 2007 May 8.
10. Benedetti F, Serretti A, Colombo C, Barbini B, Lorenzi C 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;123:23–26.
12. Betcheva ET, Mushiroda T, Takahashi A, Kubo M, Karachanak SK et al. Case-control association study of 59 candidate genes reveals the DRD2 SNP rs6277 (C957T) as the only susceptibility factor for schizophrenia in the Bulgarian population. J Hum Genet. 2009 Feb;54(2):98-107.
13. Bibel M. Barde Y.A. (2000), Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. Genes Dev. 2000;14:2919–2937.
14. Binder D.K. Scharfman H.E. (2004), Brain-derived neurotrophic factor. Growth Factors 2004;22:123–131.
15. Bland RC. Epidemiology of affective disorders: a review. Can J Psychiatry 1997;42:367–377.
16. Bolton JL, Marioni RE, Deary IJ, Harris SE, Stewart MC, et al. Association between polymorphisms of the dopamine receptor D2 and catechol-o-methyl transferase genes and cognitive function. Behav Genet. 2010 Sep;40(5):630-8. doi: 10.1007/s10519-010-9372-y. Epub 2010 Jun 22.
17. Bostwick JM, Pankratz VS. Affective Disorders and Suicide Risk: A Reexamination. Am J Psychiatry. 2000; 157:1925-1932.
18. Burdick KE, Kamiya A, Hodgkinson CA, Lencz T, DeRosse P, Ishizuka K, Elashvili S, Arai H, Goldman D, Sawa A, Malhotra AK. Elucidating the relationship between DISC1, NDEL1 and NDE1 and the risk for schizophrenia: evidence of epistasis and competitive binding. Hum Mol Genet. 2008 Aug 15;17(16):2462-73.
19. Burt VK, Stein K (2002). Epidemiology of depression throughout the female life cycle. J Clin Psychiatry 63 Suppl 7:9-15. Review.
20. Callicott J., Straub R., Pezawas L,. Egan M, Mattay V et al. Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia, Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 June 14; 102(24): 8627–8632.
21. Cassidy F, Ahearn EP, Carroll BJ. Substance abuse in bipolar disorder. Bipolar Disord 2001;3:181–188.
22. Cervilla JA et al. The 5-HTTLPR s/s genotype at the serotonin transporter gene (SLC6A4) increases the risk for depression in a large cohort of primary care attendees: the PREDICT-gene study. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2006 Dec 5;141B(8):912-7.

23. Chakirova G, Whalley HC, Thomson PA, Hennah W, Moorhead TW, Welch KA, et al. The effects of DISC1 risk variants on brain activation in controls, patients with bipolar disorder and patients with schizophrenia., Psychiatry Res. 2011 Apr 30;192(1):20-8. Epub 2011 Mar 3.

24. 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.

25. Cichon S, Winge I, Mattheisen M, Georgi A, Karpushova A, Freudenberg J, et al. Brainspecific 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.

26. Conway CC, Hammen C, Brennan PA, Lind PA, Najman JM. Interaction of chronic stress with serotonin transporter and catechol-O-methyltransferase polymorphisms in predicting youth depression. Depress Anxiety. 2010 Aug;27(8):737-45.

27. Daban C, Vieta E, Mackin P, Young AH. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis and bipolar disorder. Psychiatr Clin North Am. 2005 Jun;28(2):469-80. Review

28. 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.

29. Desan PH, Oren DA, Malison R, Price LH, Rosenbaum J, Smoller J, et al.. Genetic polymorphism at the CLOCK gene locus and major depression. Am J Med Genet 2000;96:418–421.

30. Dima D, Jogia J, Collier D, Vassos E, Burdick KE, Frangou S. Independent modulation of engagement and connectivity of the facial network during affect processing by CACNA1C and ANK3 risk genes for bipolar disorder. JAMA Psychiatry. 2013 Dec;70(12):1303-11.

31. Doehring A, Hentig Nv, Graff J, Salamat S, Schmidt M, Geisslinger G, et al. Genetic variants altering dopamine D2 receptor expression or functionmodulate the risk of opiate addiction and the dosage requirements of methadone substitution. Pharmacogenet Genomics. 2009 Jun;19(6):407-14.

32. Ekelund J, Hennah W, Hiekkalinna T, Parker A, Meyer J, Lönnqvist J and Peltonen L, Replication of 1q42 linkage in Finnish schizophrenia pedigrees, Molecular Psychiatry (2004) 9, 1037–1041

33. Ekelund J, Hovatta I, Parker A, Paunio T, Varilo T, Martin R, et al. Chromosome 1 loci in Finnish schizophrenia families, Hum. Mol. Genet. (2001) 10 (15): 1611-1617.

34. Ekelund J, Lichtermann D, Hovatta I, Ellonen P, Suvisaari J, Terwilliger JD, et al. Genome-wide scan for schizophrenia in the Finnish population: Evidence for a locus on chromosome 7q22. Hum Mol Genet. 2000 Apr 12;9(7):1049-57.

35. Erk S, Meyer-Lindenberg A, Schnell K, Opitz von Boberfeld C, Esslinger C, Kirsch P, et al. Brain function in carriers of a genome-wide supported bipolar disorder variant. Arch Gen Psychiatry. 2010 Aug;67(8):803-11.

36. Fan H, Zhang F, Xu Y, Huang X, Sun G, Song Y, et al. An association study of DRD2 gene polymorphisms with schizophrenia in a Chinese Han population. Neurosci Lett. 2010 Jun 21;477(2):53-6.

37. Ferreira MA, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR, Ruderfer DM, Jones L, et al. Wellcome Trust Case Control Consortium. Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. Nat Genet. 2008 Sep;40(9):1056-8.

38. Ferreira MA, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR, Ruderfer DM, Jones L, et al. Wellcome Trust Case Control Consortium. Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. Nat Genet. 2008 Sep;40(9):1056-8.

39. Gao J, Pan Z, Jiao Z, Li F, Zhao G, Wei Q, et al., TPH2 Gene Polymorphisms and Major Depression – A Meta-Analysis, May 31, 2012

40. Geller B, Badner JA, Tillman R, Christian SL, Bolhofner K, Cook Jr EH. (2004), Linkage disequilibrium of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism in children with a prepubertal and early adolescent bipolar disorder phenotype. Am J Psychiatry 2004; 161: 1698–1700.

41. Goenjian AK, Bailey JN, Walling DP, Steinberg AM, Schmidt D, Dandekar U, Noble EP. Association of TPH1, TPH2, and 5HTTLPR with PTSD and depressive symptoms. J Affect Disord. 2012 Nov;140(3):244-52. Epub 2012 Apr 6.

42. Gonzalez S, Xu C, Ramirez M, Zavala J, Armas R, Contreras SA, et al. Suggestive evidence for association between L-type voltage-gated calcium channel (CACNA1C) gene haplotypes and bipolar disorder in Latinos: a family-based association study. Bipolar Disord. 2013 Mar;15(2):206-14.

43. Grabe HJ, Schwahn C, Mahler J, Appel K, Schulz A, Spitzer C, et al. Genetic epistasis between the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism and the 5-HTT promoter polymorphism moderates the susceptibility to depressive disorders after childhood abuse. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2012 Mar 30;36(2):264-70.

44. Green EK, Grozeva D, Jones I, Jones L, Kirov G, Caesar S, et al. The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. Mol Psychiatry. 2010 Oct;15(10):1016-22.

45. Green EK, Raybould R, Macgregor S, Hyde S, Young AH, O'Donovan MC et al, (2006), Genetic variation of brain-derived neuro-trophic factor (BDNF) in bipolar disorder: case–control study of over 3000 individuals from the UK. Br J Psychiatry 2006; 188: 21–25.

46. Grigoroiu-Serbanescu M, Diaconu CC, Herms S, Bleotu C, Vollmer J, Mühleisen TW, et al. Investigation of the tryptophan hydroxylase 2 gene in bipolar I disorder in the Romanian population., Psychiatr Genet. 2008 Oct;18(5):240-7.

47. Grohmann M, Hammer P, Walther M, Paulmann N, Büttner A, Eisenmenger Wet al. Alternative splicing and extensive RNA editing of human TPH2 transcripts. PLoS One. 2010 Jan 29;5(1):e8956.

48. Hamshere ML, Bennett P, Williams N, Segurado R, Cardno A, Norton N, et al. Genomewide linkage scan in schizoaffective disorder: significant evidence for linkage at 1q42 close to DISC1, and suggestive evidence at 22q11 and 19p13., Arch Gen Psychiatry. 2005 Oct;62(10):1081-8.

49. 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.

50. Harvey M, Gagné B, Labbé M, Barden N. Polymorphisms in the neuronal isoform of tryptophan hydroxylase 2 are associated with bipolar disorder in French Canadian pedigrees. Psychiatr Genet. 2007 Feb;17(1):17-22.

51. Hashimoto R, Numakawa T, Ohnishi T, Kumamaru E, Yagasaki Y, Ishimoto T, et al. Impact of the DISC1 Ser704Cys polymorphism on risk for major depression, brain morphology and ERK signaling. Hum Mol Genet. 2006 Oct 15;15(20):3024-33.

52. Hatzimanolis A, Smyrnis N, Avramopoulos D, Stefanis CN, Evdokimidis I, Stefanis NC. Bipolar disorder ANK3 risk variant effect on sustained attention is replicated in a large healthy population. Psychiatr Genet. 2012 Aug;22(4):210-3.

53. Hauser J, Leszczynska A, Samochowiec J, Czerski PM, Ostapowicz A., ChlopockaM, et al. Association analysis of the insertion/deletion polymorphism in serotonin transporter gene in patients with affective disorder. Eur Psychiatry 18(3):129–132.

54. Hennah W, Tuulio-Henriksson A, Paunio T, Ekelund J, Varilo T, Partonen T, et al. A haplotype within the DISC1 gene is associated with visual memory functions in families with a high density of schizophrenia., Mol Psychiatry. 2005 Dec;10(12):1097-103.

55. Hennah W, Varilo Teppo, Kestilä Marjo, Paunio Tiina, Arajärvi Ritva, Haukka Jari, et al., Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects, Hum. Mol. Genet. (2003) 12 (23): 3151-3159.

56. Hing B, Davidson S, Lear M, Breen G, Quinn J, McGuffin P, et al. (2012), A Polymorphism Associated with Depressive Disorders Differentially Regulates Brain Derived Neurotrophic Factor Promoter IV Activity., Biol Psychiatry. 2012 Jan 18.

57. Hofer M, Pagliusi S.R. , Hohn A. , Leibrock J. , Barde Y.A. , (1990), Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain, EMBO J 9 (1990) 2459–2464.

58. Hovatta I, Varilo T, Suvisaari J,. Terwilliger J D, Ollikainen V, Arajärvi R, et al. A Genomewide Screen for Schizophrenia Genes in an Isolated Finnish Subpopulation, Suggesting Multiple Susceptibility Loci, Am J Hum Genet. 1999 October; 65(4): 1114–1124.

59. Huang EJ, Reichardt LF. (2001), Neurotrophins: roles in neuronal development and function. Annu Rev Neurosci 2001;24:677–736.

60. IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp

61. Ivanova MA, Christova TN, Asan TS, Djurova NA, Alexiev SS, Kostov CS, Chorbov VM, Stoyanova VS, Onchev GN, Kancheva DM, Krastev SK, Vladimirova RK, Kremensky IM, Mitev V, Milanova VK, Kaneva RP, " Evidence of an a association between bipolar disorder and rs16917237 in the BDNF gene in a Bulgarian sample." Psychiatr genet., 2013B Jun;23(3):141-2

62. Ivanova MA, Kremensky IM, Christova TN, Kostov CS, Milanova VK, Mitev V, Kaneva RP, “Transmission disequilibrium of DISC1 haplotypes in Bulgarian families with affective disorder” Psychiatry Res Sep 30, 2013A

63. Johansson C, Willeit M, Smedh C, Ekholm J, Paunio T, Kieseppa T, et al. Circadian clock-related polymorphisms in seasonal affective disorder and their relevance to diurnal preference. Neuropsychopharmacology 2003;28:734–739.

64. Judy JT, Seifuddin F, Pirooznia M, Mahon PB; Bipolar Genome Study Consortium, et al. Converging Evidence for Epistasis between ANK3 and Potassium Channel Gene KCNQ2 in Bipolar Disorder. Front Genet. 2013 May 17;4:87.

65. Keck PE, Jr., McElroy SL, Arnold LM. Bipolar disorder. Med Clin North Am 2001;85:645–61, ix.

66. Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). Journal of the American Medical Association, 2003; Jun 18;289(23):3095-105.

67. Kim YK, Lee HJ, Yang JC, Hwang JA, Yoon HK., A tryptophan hydroxylase 2 gene polymorphism is associated with panic disorder., Behav Genet. 2009 Mar;39(2):170-5. Epub 2009 Jan 9.

68. Kordeli, E., Lambert, S., Bennett, V. Ankyrin-G: a new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. J. Biol. Chem. 270: 2352-2359, 1995.

69. Kunugi H, Iijima Y, Tatsumi M, Yoshida M, Hashimoto R, Kato T, et. al. (2004), No association between the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and bipolar disorder in a Japanese population: a multicenter study., Biol Psychiatry. 2004 Sep 1;56(5):376-8.

70. 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.

71. Lazary J, Lazary A, Gonda X, Benko A, Molnar E, Juhasz G, Bagdy G. New evidence for the association of the serotonin transporter gene (SLC6A4) haplotypes, threatening life events, and depressive phenotype. Biol Psychiatry. 2008 Sep 15;64(6):498-504.

72. Lee KW, Woon PS, Teo YY, Sim K. Genome wide association studies (GWAS) and copy number variation (CNV) studies of the major psychoses: what have we learnt? Neurosci Biobehav Rev. 2012 Jan;36(1):556-71.

73. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region., Science. 1996 Nov 29;274(5292):1527-31.

74. Lett TA, Zai CC, Tiwari AK, Shaikh SA, Likhodi O, Kennedy JL, et al. ANK3, CACNA1C and ZNF804A gene variants in bipolar disorders and psychosis subphenotype., World J Biol Psychiatry. 2011 Aug;12(5):392-7.

75. Lim CH, Zain SM, Reynolds GP, Zain MA, Roffeei SN, Zainal NZ, et al. Genetic association of LMAN2L gene in schizophrenia and bipolar disorder and its interaction with ANK3 gene polymorphism. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2014 Oct 3;54:157-62.

76. Linke J, Witt SH, King AV, Nieratschker V, Poupon C, Gass A, et al. Genome-wide supported risk variant for bipolar disorder alters anatomical connectivity in the human brain. Neuroimage. 2012 Feb 15;59(4):3288-96.

77. Liu L, Foroud T, Xuei X, Berrettini W, Byerley W, Coryell W, et al. (2008), Evidence of association between brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar disorder, Psychiatr Genet. 2008 December ; 18(6): 267–274.

78. Liu Z, Liu W, Yao L, Yang C, Xiao L, Wan Q, et al. Negative life events and corticotropin-releasing-hormone receptor1 gene in recurrent major depressive disorder. Sci Rep. 2013;3:1548.

79. Logue MW, Baldwin C, Guffanti G, Melista E, Wolf EJ, Reardon AF, et al. A genome-wide association study of post-traumatic stress disorder identifies the retinoid-related orphan receptor alpha (RORA) gene as a significant risk locus. Mol Psychiatry. 2013 Aug;18(8):937-42.

81. Lohoff F.W., Sander T., Ferraro T.N., Dahl J.P., Gallinat J., and Berrettini W.H., (2005), Confirmation of Association Between the Val66Met Polymorphism in the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Gene and Bipolar I Disorder, American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics) 139B:51–53 (2005)

82. Lotrich FE, Pollock BG. Meta-analysis of serotonin transporter polymorphisms and affective disorders. Psychiatr Genet. 2004 Sep;14(3):121-9.

83. Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. Learn Mem. 2003 Mar-Apr;10(2):86-98. Review.

84. Maciukiewicz M, Dmitrzak-Weglarz M, Pawlak J, Leszczynska-Rodziewicz A, Zaremba D, Skibinska M, Hauser J. Analysis of genetic association and epistasis interactions between circadian clock genes and symptom dimensions of bipolar affective disorder. Chronobiol Int. 2014 Jul;31(6):770-8.

85. Maj M. et al. Bipolar Disorder. Chichester, UK: John Wiley & Son Ltd, 2002.

86. Mansour H, Monk T, Nimgaonkar V. Circadian genes and bipolar disorder. Ann Med 2005;37:196–205.

87. Mansour HA, Talkowski ME, Wood J, Pless L, Bamne M, Chowdari KV, et al. Serotonin gene polymorphisms and bipolar I disorder: focus on the serotonin transporter. Ann Med. 2005;37(8):590-602.

88. 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.

89. McClung CA. Circadian genes, rhythms and the biology of mood disorders. Pharmacol Ther 2007;114:222-232

90. Melke J, Landén M, Baghei F, Rosmond R, Holm G, Björntorp P, et al. Serotonin transporter gene polymorphisms are associated with anxiety-related personality traits in women. Am J Med Genet. 2001 Jul 8;105(5):458-63.

91. Mendlewicz J, Massat I, Souery D, Del-Favero J, Oruc L, Nöthen MM, et al. Serotonin transporter 5HTTLPR polymorphism and affective disorders: no evidence of association in a large European multicenter study. Eur J Hum Genet. 2004 May;12(5):377-82.

92. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res. 1988 Feb 11;16(3):1215.

93. Mitterauer B. Clock genes, feedback loops and their possible role in the etiology of bipolar disorders: an integrative model. Med Hypotheses 2000;55:155–159.

94. Montag C, Markett S, Basten U, Stelzel C, Fiebach C, Canli T and Reuter M, Neuropsychopharmacology. Aug 2010; 35(9): 1860–1867.

95. Montag C, Weber B, Fliessbach K, Elger C, Reuter M. The BDNF Val66Met polymorphism impacts parahippocampal and amygdala volume in healthy humans: incremental support for a genetic risk factor for depression. Psychol Med. 2009 Nov;39(11):1831-9.

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

97. Nakata K, Lipska B, Hyde T, Ye T, Newburn E, Morita Y, et al. DISC1 splice variants are upregulated in schizophrenia and associated with risk polymorphisms, Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Sep 15;106(37):15873-8. Epub 2009 Sep 2.

98. Nakata K, Ujike H, Sakai A, Uchida N, Nomura A, Imamura T, et al. (2003), Association study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with bipolar disorder., Neurosci Lett. 2003 Jan 30;337(1):17-20.

99. Neff CD, Abkevich V, Potter J, Riley R, Shattuck D, Katz DA. Evidence for epistasis between SLC6A4 and a chromosome 4 gene as risk factors in major depression. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2010 Jan 5;153B(1):321-2.

100. Neves-Pereira M, Mundo E, Muglia P, King N, Macciardi F & Kennedy JL. (2002), The brain-derived neurotrophic factor gene confers susceptibility to bipolar disorder: evidence from a family-based association study. Am J Hum Genet 2002; 71: 651−655.

101. Nicodemus KK, Kolachana BS, Vakkalanka R, Straub RE, Giegling I, Egan MF, Rujescu D, Weinberger DR. Evidence for statistical epistasis between catechol-O-methyltransferase (COMT) and polymorphisms in RGS4, G72 (DAOA), GRM3, and DISC1: influence on risk of schizophrenia. Hum Genet. 200 Feb;120(6):889-906.

102. 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;141:234–241

103. Outhred T, Das P, Dobson-Stone C, Griffiths K, Felmingham KL, Bryant RA, Malhi G, Kemp AH. The functional epistasis of 5-HTTLPR and BDNF Val66Met on emotion processing: a preliminary study. Brain Behav. 2012 Nov;2(6):778-88.

104. Palo OM, Antila M, Silander K, Hennah W, Kilpinen H, Soronen P, et al. Association of distinct allelic haplotypes of DISC1 with psychotic and bipolar spectrum disorders and with underlying cognitive impairments., Hum Mol Genet. 2007 Oct 15;16(20):2517-28. Epub 2007 Aug 2.

105. Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul JY, Cranstoun SD, et al. A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. J Neurosci. 2006;26:2599–2613.

106. Pandey A, Davis NA, White BC, Pajewski NM, Savitz J, Drevets WC, McKinney BA. Epistasis network centrality analysis yields pathway replication across two GWAS cohorts for bipolar disorder. Transl Psychiatry. 2012 Aug 14;2:e154.

107. Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Goldman AL, Verchinski BA, Chen G, Kolachana BS, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Weinberger DR. Evidence of biologic epistasis between BDNF and SLC6A4 and implications for depression. Mol Psychiatry. 2008 Jul;13(7):709-16.

108. Pezet S. McMahon S.B., (2006), Neurotrophins: mediators and modulators of pain. Annu. Rev. Neurosci. 2006;29:507–538.

109. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K, Timmusk T. (2007), Dissecting the human BDNF locus: bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. Genomics 2007; 90: 397–406.

110. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ & Sham PC (2007) PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. American Journal of Human Genetics, 81.

111. Qu M, Tang F, Yue W, Ruan Y, Lu T, Liu Z, et al. Positive association of the Disrupted-in-Schizophrenia-1 gene (DISC1) with schizophrenia in the Chinese Han population., Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2007 Apr 5;144B(3):266-70.

112. Ram Murthy A, Purushottam M, Kiran Kumar HB, ValliKiran M, Krishna N, Jayramu Sriharsha K, et al. Gender-specific association of TSNAX/DISC1 locus for schizophrenia and bipolar affective disorder in South Indian population. J Hum Genet. 2012 Aug;57(8):523-30.

113. Regier D, Farmer M E, Rae D, Locke B, Comorbidity of Mental Disorders With Alcohol and Other Drug Abuse, Results From the Epidemiologic Catchment Area (ECA) Study, 1990;264(19):2511-2518.

114. Ripke S, Sanders AR, Kendler KS, Levinson DF, Sklar P, Holmans PA, Lin DY, Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium., Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci., Nat Genet. 2011 Sep 18;43(10):969-76.

115. Roussos P, Giakoumaki SG, Georgakopoulos A, Robakis NK, Bitsios P., The CACNA1C and ANK3 risk alleles impact on affective personality traits and startle reactivity but not on cognition or gating in healthy males., Bipolar Disord. 2011 May;13(3):250-9.

117. Ruberto G, Vassos E, Lewis CM, Tatarelli R, Girardi P, Collier D, Frangou S. The cognitive impact of the ANK3 risk variant for bipolar disorder: initial evidence of selectivity to signal detection during sustained attention. PLoS One. 2011 Jan 31;6(1):e16671.

118. Schatzberg A, Keller J, Tennakoon L, Lembke A, Williams G, Kraemer FB, et al. HPA axis genetic variation, cortisol and psychosis in major depression. Mol Psychiatry. 2014 Feb;19(2):220-7.

119. Scheuch, K., Lautenschlager, M., Grohmann, M., Stahlberg, S., Kirchheiner, J., Zill, P., et al. (2007) Characterization of a functional promoter polymorphism of the human tryptophan hydroxylase 2 gene in serotonergic raphe neurons. Biol. Psychiatry

120. Schuhmacher A, Becker T, Rujescu D, Quednow BB, Lennertz L, Wagner M, et al. Investigation of tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) in schizophrenia and in the response to antipsychotics. J Psychiatr Res. 2012 Aug;46(8):1073-80.

121. Schulze T. G., Detera-Wadleigh S. D., Akula N., Gupta A., Kassem L., Steele J., et al. (2009) Two variants in ankyrin 3 (ANK3) are independent genetic risk factors for bipolar disorder. Mol. Psychiatry 14 487–491.10.1038

122. Sears C, Markie D, Olds R, Fitches A, (2011), Evidence of associations between bipolar disorder and the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene, Bipolar Disord. 2011 Nov-Dec;13(7-8):630-7.

123. 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;121:35–38.

125. Serretti A, Chiesa A, Porcelli S, Han C, Patkar AA, Lee SJ, et al. Influence of TPH2 variants on diagnosis and response to treatment in patients with major depression, bipolar disorder and schizophrenia. Psychiatry Res. 2011 Aug 30;189(1):26-32.

126. 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;137:36–39.

127. Shen X, Wu Y, Qian M, Wang X, Hou Z, Liu Y, et al. Tryptophan hydroxylase 2 gene is associated with major depressive disorder in a female Chinese population. J Affect Disord. 2011 Oct;133(3):619-24.

128. Singh AS, Chandra R, Guhathakurta S, Sinha S, Chatterjee A, Ahmed S, et al. Genetic association and gene-gene interaction analyses suggest likely involvement of ITGB3 and TPH2 with autism spectrum disorder (ASD) in the Indian population. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2013 Aug 1;45:131-43.

129. Skibinska M, Hauser J, Czerski PM, Leszczynska-Rodziewicz A, Kosmowska M, Kapelski P, Slopien A, Zakrzewska M, Rybakowski JK. Association analysis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene Val66Met polymorphism in schizophrenia and bipolar affective disorder. World J Biol Psychiatry. 2004 Oct;5(4):215-20.

130. Sklar P, Gabriel SB, McInnis MG, Bennett P, Lim Y-, Tsan G, Schaffner S, Kirov G, Jones I, Owen M, Craddock N, DePaulo JR, Lander ES. Family-based association study of 76 candidate genes in bipolar disorder: BDNF is a potential risk locus. Brain-derived neutrophic factor. Mol Psychiatry. 2002;7(6):579-93.

131. Song W, Li W, Feng J, Heston LL, Scaringe WA, Sommer SS. Identification of high risk DISC1 structural variants with a 2% attributable risk for schizophrenia. Biochem Biophys Res Commun. 2008 Mar 14;367(3):700-6.

132. Soria V, Martínez-Amorós E, Escaramís G, Valero J, Pérez-Egea R, García C, et al. Differential association of circadian genes with mood disorders: CRY1 and NPAS2 are associated with unipolar major depression and CLOCK and VIP with bipolar disorder. Neuropsychopharmacology. 2010 May;35(6):1279-89.

133. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). Am J Hum Genet. 1993 Mar;52(3):506-16.

134. Strauss J, Barr CL, George CJ, Devlin B, Vetró A, Kiss E, Baji I, King N,Shaikh S, Lanktree M, Kovacs M, Kennedy JL. Brain-derived neurotrophic factor variants are associated with childhood-onset mood disorder: confirmation in a Hungarian sample. Mol Psychiatry. 2005 Sep;10(9):861-7.

135. Strobel A, Dreisbach G, Müller J, Goschke T, Brocke B, Lesch KP. Genetic variation of serotonin function and cognitive control. J Cogn Neurosci. 2007 Dec;19(12):1923-31.

136. Su S, Zhao J, Bremner JD, Miller AH, Tang W, Bouzyk M, et al. Serotonin transporter gene, depressive symptoms, and interleukin-6. Circ Cardiovasc Genet. 2009 Dec;2(6):614-20.

137. Swagell CD, Lawford BR, Hughes IP, Voisey J, Feeney GF, van Daal A, et al. DRD2 C957T and TaqIA genotyping reveals gender effects and unique low-risk and high-risk genotypes in alcohol dependence. Alcohol Alcohol. 2012 Jul-Aug;47(4):397-403.

138. Tang J, Xiao L, Shu C, Wang G, Liu Z, Wang X, et al., (2008), Association of the brain-derived neurotrophic factor gene and bipolar disorder with early age of onset in mainland China., Neurosci Lett. 2008 Mar 12;433(2):98-102. Epub 2008 Jan 10.

139. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, et al. (2005), ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. J Neurosci 2005;25:5455–5463.

140. Tesli M, Koefoed P, Athanasiu L, Mattingsdal M, Gustafsson O, Agartz I, et al. Association analysis of ANK3 gene variants in nordic bipolar disorder and schizophrenia case-control samples. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2011 Dec;156B(8):969-74.

142. Thaler L, Groleau P, Joober R, Bruce KR, Israel M, Badawi G, et al. Epistatic interaction between 5HTTLPR and TPH2 polymorphisms predicts novelty seeking in women with bulimia nervosa spectrum disorders. Psychiatry Res. 2013 Jun 30;208(1):101-3.

143. Thimm M, Kircher T, Kellermann T, Markov V, Krach S, Jansen A, et al. Effects of a CACNA1C genotype on attention networks in healthy individuals. Psychol Med. 2011 Jul;41(7):1551-61.

144. Tomppo L, Hennah W, Miettunen J, Järvelin MR, Veijola J, Ripatti S, et al. Association of variants in DISC1 with psychosis-related traits in a large population cohort., Arch Gen Psychiatry. 2009 Feb;66(2):134-41.

146. Van Den Bogaert A, Sleegers K, De Zutter S, Heyrman L, Norrback KF, 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.

147. Vincze I, Perroud N, Buresi C, Baud P, Bellivier F, Etain B et al. (2008), Association between brain-derived neurotrophic factor gene and a severe form of bipolar disorder, but no interaction with the serotonin transporter gene. Bipolar Disord 2008; 10: 580–587.

148. Voisey J, Swagell CD, Hughes IP, Morris CP, van Daal A, Noble EP, Kann B, Heslop KA, Young RM, Lawford BR. The DRD2 gene 957C>T polymorphism is associated with posttraumatic stress disorder in war veterans. Depress Anxiety. 2009;26(1):28-33.

149. Voyiaziakis E, Evgrafov O, Li D, Yoon HJ, Tabares P, Samuels J, et al. Association of SLC6A4 variants with obsessive-compulsive disorder in a large multicenter US family study. Mol Psychiatry. 2011 Jan;16(1):108-20.

150. Walitza S, Renner TJ, Dempfle A, Konrad K, Wewetzer Ch, Halbach A, et al. Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in attention-deficit/hyperactivity disorder., Mol Psychiatry. 2005 Dec;10(12):1126-32.

151. Wang F, Simen A, Arias A, Lu QW, Zhang H. A large-scale meta-analysis of the association between the ANKK1/DRD2 Taq1A polymorphism and alcohol dependence. Hum Genet. 2013 Mar;132(3):347-58.

152. Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, et al. (2005), Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. Nat Neurosci 2005;8:1069–1077.

153. World Health Organization. International Statistical Classificationof Diseases and Related Health Problems, Tenth Revision (ICD10). World Health Organization, Geneva; 1999.

154. Wray NR, James MR, Gordon SD, Dumenil T, Ryan L, Coventry WL, et al. Accurate, Large-Scale Genotyping of 5HTTLPR and Flanking Single Nucleotide Polymorphisms in an Association Study of Depression, Anxiety, and Personality Measures. Biol Psychiatry. 2009 Sep 1;66(5):468-76.

155. Xiao Z, Liu W, Gao K, Wan Q, Yang C, Wang H, Wang X, Wang G, Liu Z. Interaction between CRHR1 and BDNF genes increases the risk of recurrent major depressive disorder in Chinese population. PLoS One. 2011;6(12):e28733.

156. Xu J, Liu Y, Wang P, Li S, Wang Y, Li J, et al. (2010, Positive association between the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene and bipolar disorder in the Han Chinese population., Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2010 Jan 5;153B(1):275-9.

157. Yano H, Ninan I, Zhang H, Milner T, Arancio O, Chao M., (2006), BDNF-mediated neurotransmission relies upon a myosin VI motor complex., Nat Neurosci. 2006 Aug;9(8):1009-18. Epub 2006 Jul 2.

158. Yi Z, Zhang C, Lu W, Song L, Liu D, Xu Y, Fang Y. Common variants in the TPH2 promoter confer susceptibility to paranoid schizophrenia. J Mol Neurosci. 2012 Jul;47(3):465-9.

159. Yosifova A, Mushiroda T, Kubo M, Takahashi A, Kamatani Y, Kamatani N, et al.. Genome-wide association study on bipolar disorder in the Bulgarian population. Genes Brain Behav. 2011 Oct;10(7):789-97.

160. Yutzy SH, Woofter CR, Abbott CC, Melhem IM, Parish BS. The increasing frequency of mania and bipolar disorder: causes and potential negative impacts. J Nerv Ment Dis. 2012 May;200(5):380-7.

161. Zalsman G, Huang YY, Oquendo MA, Burke AK, Hu XZ, Brent DA, et al. Association of a triallelic serotonin transporter gene promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with stressful life events and severity of depression. Am J Psychiatry. 2006 Sep;163(9):1588-93.

162. Zhang C, Li Z, Shao Y, Xie B, Du Y, Fang Y, Yu S. Association study of tryptophan hydroxylase-2 gene in schizophrenia and its clinical features in Chinese Han population. J Mol Neurosci. 2011 Mar;43(3):406-11.

163. Zhou D, Lambert S, Malen P, Carpenter S, Boland L, Bennett V, AnkyrinG Is Required for Clustering of Voltage-gated Na Channels at Axon Initial Segments and for Normal Action Potential Firing, J Cell Biol. Nov 30, 1998; 143(5): 1295–1304.

SUMMARY

Affective disorders (AD) are among the most severe psychiatric conditions having great impact on normal life of the patients with high comorbid risk for suicide attempts and addiction behavior. They are recognized as global burden in the annual reports of the WHO. The detailed understanding of the etiology and pathology of AD is aiming development of more individualized treatment approach and improvement of patient's quality of life.

There are few hypothesis based mainly on the observed changes in neurotransmission, neuroplasticity, inefficient communication between neurons and some somatic functions. In the present study we investigated genetic variants in *TPH2* and *SLC6A4,* responsible for serotonin synthesis and transport and variants in *DRD2* candidate gene from the dopamine neurotransmission. Genetic variants in *BDNF* and *DISC1* genes, involved in genesis, survival and differentiation of neurons were investigate in relation to neuroplasticity changes.

Apart from inadequate neuroplasticity, the inefficient communication between neurons could be as well consequence from membrane transport changes. Moreover recent genome-wide association studies (GWAS) drew attention to variants in genes coding membrane channels and therefore we investigated variants in *CACNA1C* and *ANK3A* candidate genes.

Dysregulation of circadian rhythms and hypothalamic-pituitary axis are common in AD as well and variants in *CLOCK* and *CRH* genes were investigated.

Case control study, family association study and analysis of statistical epistasis were conducted. Two affection status definitions were considered, the narrow (A1) included subjects with Bipolar Disorder type I (BDI), BD II and schizoaffective disorder, bipolar type (SAD) while in the broad (A2) major depressive disorder (MDD) patients were included. The case control study consisted of 304 patients from A1, 414 from A2 and 205 healthy prescreened controls, matched by gender, ethnicity and age. The family sample consisted of 119 Bulgarian and 56 Roma families with 197 patients from A1 and 269 from A2 status definitions. All cases met DSM–IV criteria for AD and all participants provided written informed consent. Totally 1240 individuals with Bulgarian and 230 with Roma origin were genotyped.

Genomic DNA was extracted from venous blood and genotyping was performed with TaqMan™ method with call rate for 384 plates over 95%. Overall 24 SNPs situated in 9 AD candidate genes were investigated.

The results for ***TPH2*** are demonstrating small effect for the investigated polymorphisms in regards to AD susceptibility. Two preferentially transmitted haplotypes with the participation of previously associated with panic disorder allele T of rs4570625 and the associated with AD allele G of rs11178998 and allele A of rs4290270 were identified. Epistasis with variants in *DISC1* and *SLC6A4* genes were also observed.

Allele and genotype association for rs12150214 (***SLC6A4)*** with higher frequency of allele C and genotypes containing it among patients was observed corresponding to dominant effect of this allele leading to high AD risk. No association of the functional promoter polymorphism but protective effect of L variant only in the context of epistasis with the ***TPH2*** variant rs1386483 was noticed.

The relatively small effect of **DRD2** gene for AD susceptibility was confirmed with the identification of preferentially transmitted allele A of the situated in 5'UTR variant rs6589377 and transmission disequilibrium for few haplotypes (CG, CCG - over-transmitted; CCTG -

under-transmitted). No involvement in statistical interactions of DRD2 polymorphisms is detected.

The important role of neuroplasticity and more specifically the impact of ***DISC1*** was supported with the identification of transmission disequilibrium of several haplotypes and the located in 3'UTR variant rs980989 as well as with the participation of ***DISC1*** variants in numerous interactions with different phenotype effect. Allele G of rs980989 and haplotype TGT were found to be more frequently transmitted while haplotypes ATT, ATTA, GAT and CGAT are under-transmitted.

Association for the situated in exon-intron boundaries rs16917237 in ***BDNF*** surviving Bonferroni correction was reported for first time. Homozygote and heterozygote presence of allele G was associated with high AD risk and several associated haplotypes were identified. Interactions with protective effect with variants in ***DISC1*** and ***CLOCK*** genes are also observed.

The hypothesis of influence of the investigated variants rs3805154 in ***CLOCK***, rs12721510 in ***CRH*** and rs1006737 in ***CACNA1C*** on AD susceptibility cannot be rejected. Though no association or transmission disequilibrium was detected, interactions with various phenotype effect of the investigated ***CLOCK*** and ***CRH*** variants with ***DISC1***, ***BDNF*** and ***ANK3*** variants were observed.

Preferential transmission of allele C of rs9804190 in ***ANK3*** and participation in protective epistasis with ***CRH*** variants were identified.

The lack of association for some of the investigated variants may be consequence of absence of impact in our sample, insufficient sample size for detection of small effect variants or influence only on certain endophenotype. Nevertheless the limitations of the statistical epistasis analysis, the obtained results could be further used in hypothesis generating and prioritization of approaches. Further studies in larger samples or in specific endophenotypes could provide more detailed information about the impact of the investigated variants.