

Estudio de asociación y enlace génico (Linkage) con el receptor D2 a dopamina como gene candidato en esquizofrenia

Humberto Nicolini,¹ Beatriz Camarena,¹ Celbia Guerra,^{1,2} Manuela Monteiro Grazina,³ Deborah Sidenberg,³ Art Petronis,³ James Kennedy³

Summary

This paper reports an association study with the D2 dopamine receptor gene in schizophrenic patients and non-schizophrenic subjects. The D2 receptor alleles were studied using the polymerase chain reaction technique (PCR). Also, a linkage analysis was performed using the same gene in two multiple affected schizophrenic families. No significant associations with the D2 receptor alleles were observed. The linkage analysis significantly excluded this gene, assuming an autosomal dominant pattern and complete penetrance, although, when the lod scores were calculated at different penetrance values, they lost their significance.

Resumen

En este trabajo se reporta un estudio de asociación entre los alelos generados por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) del gen para el receptor D2 de dopamina, en pacientes esquizofrénicos comparados con sujetos sanos. También se realizó un estudio de enlace génico utilizando este mismo gen, en dos familias de pacientes con esquizofrenia. No se encontraron asociaciones significativas entre los alelos del receptor D2 y esquizofrenia. En el estudio de enlace génico se excluye significativamente este gen como causa genética de la enfermedad, bajo la hipótesis de una transmisión autosómica dominante y penetrancia completa. Aunque al variar las cifras de la penetrancia, se pierde la significancia de los índices Lod.

El término esquizofrenia agrupa a una serie de padecimientos mentales crónicos e incapacitantes, que se caracterizan por trastornos peculiares del pensamiento, del afecto y de la conducta, que no se deben a padecimientos físicos diagnosticables.

El componente genético en la esquizofrenia ha sido demostrado a través de diversas metodologías de estudio genético, como los estudios de familia, gemelos y adopción.^{6,7}

Por otro lado, los resultados provenientes de los estudios de segregación apoyan la presencia en algunas familias de genes con un efecto fundamental en la susceptibilidad a estos trastornos.^{12,18,19}

La evidencia más sólida de que una enfermedad es genética, se refiere a la localización de su *locus* dentro del mapa genético. La presencia de alteraciones cromosómicas que se presentan concomitantemente con algunos trastornos psiquiátricos, han dado buenas pistas en

¹ División de Investigaciones Clínicas. Instituto Mexicano de Psiquiatría Calz. México-Xochimilco No. 101, San Lorenzo Huipulco, 14370, México, D.F.

² Hospital Psiquiátrico Fray Bernardino Alvarez.

³ Clarke Institute of Psychiatry.

cuanto a cuáles pudieran ser los sitios más probables y en dónde se debe empezar la búsqueda de estos genes. Como ejemplo tenemos el caso de la esquizofrenia en donde se reportó una alteración en el cromosoma 5 que cosegregaba con la enfermedad¹ y debido a este hallazgo se procedió a llevar el mapeo con marcadores de ADN en esta región. Poco tiempo después, se encontró evidencia significativa de enlace génico en un grupo de familias,²⁵ pero hasta el momento y después de una gran cantidad de estudios similares no ha sido posible reproducir estos hallazgos por ningún otro grupo de investigación.¹⁰

En la actualidad se han clonado varios genes cuyos productos (enzimas, receptores y neurotransmisores) son de especial relevancia en el funcionamiento del sistema nervioso central (SNC). En algunos de ellos existe evidencia sugerente de que su mal funcionamiento puede contribuir al desarrollo de la esquizofrenia, y por esta razón, constituyen interesantes genes candidatos para el mapeo molecular de la esquizofrenia. Uno de estos genes es el receptor D2 a la dopamina.

La dopamina ha sido el neurotransmisor más comúnmente asociado con la patogénesis y síntomas de la esquizofrenia. Medicamentos que potencializan la acción dopaminérgica como las anfetaminas, empeoran los síntomas en los esquizofrénicos y producen psicosis parecidas a las de los esquizofrénicos en sujetos normales.²⁷ Por otro lado, existe gran cantidad de evidencia de que los medicamentos antipsicóticos ejercen su acción mediante el bloqueo de los receptores D2.⁵

En su forma original, la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia postulaba que existía un aumento en el tono dopaminérgico en la regulación de este neurotransmisor en distintas áreas cerebrales, especialmente la corteza mesolímbica, originada en el área tegmental ventral y que estaban asociadas con los síntomas de la enfermedad.^{5,24,28}

Posteriormente esta hipótesis se ha modificado, postulando más bien, un tono dopaminérgico disminuido especialmente en la corteza prefrontal dorsolateral, lo que resulta en una relativa hiperactividad de estructuras subcorticales secundarias a una alteración en la regulación de las vías descendentes corticales y subcorticales.³

Otras metodologías para estudiar la función dopaminérgica como: mediciones hormonales, de receptores, de dopamina y sus metabolitos; también se han evaluado produciendo resultados inconsistentes, contradictorios y que resulta difícil establecer qué tanto los efectos observados, se deben a la medicación previa.¹⁴

Hasta hace pocos años, sólo se sabía de la existencia de dos subtipos de receptores dopaminérgicos (D1 y D2). Los receptores D1 activan la enzima adenilato ciclasa e incrementan los niveles intracelulares de AMPc.

Los receptores D2 ejercen una influencia inhibitoria en esta enzima y están acoplados al sistema de segundos mensajeros como la inhibición de fosfatidil inositol, la activación de los canales de potasio y la inhibición de los canales de calcio.²⁹ Ambos receptores están acoplados a sus funciones efectoras específicas a través de las proteínas G.¹⁴ En la actualidad gracias a las técnicas de biología molecular ha sido posible el identificar 5 subtipos de receptores a través de su secuencia de nucleótidos, en vez del criterio único de sus propiedades bioquímicas.²⁶

El receptor D2 fue el primero en ser clonado y como consecuencia es a la fecha el que mejor se ha estudiado. Este receptor tiene 7 dominios transmembranales, donde el N-terminal se encuentra localizado en la superficie membranal y el C-terminal en el citosol. Esta estructura se ha sugerido para todos los receptores acoplados a proteínas G. Las áreas de mayor expresión de este gen en el cerebro corresponden a las principales proyecciones dopaminérgicas como el caudado, putamen, núcleo *acumbens* y el tubérculo olfatorio.^{13,32} También se encuentra presente en los cuerpos neuronales de la sustancia negra, parte compacta y las áreas tegmentales ventrales.¹⁴ Se ha sugerido una función tanto presináptica como postsináptica. Para este receptor existen dos isoformas de esta proteína que no difieren en sus propiedades farmacológicas, aunque esto no excluye alguna diferencia funcional.^{14,16}

El gen del receptor D2 es único en el genoma; se han detectado la presencia de 8 exones y se encuentra en el cromosoma 11q22-23.⁸ En este mismo estudio también se reporta que una secuencia de ADN que comprende: al exon 3' completamente, a una porción intrónica 5' y a un fragmento 3' no codificador (λ -hD2GI), identifica un polimorfismo generado con la enzima TaqI y que posee dos alelos: el alelo A1 con una banda de 6.6 Kb y una frecuencia del 25%, y el alelo A2 que se presenta como 2 bandas de 2.9 y 3.7 Kb y con una frecuencia del 76%.

Hipótesis

Dada la evidencia que involucra a la dopamina en la etiopatogenia de la esquizofrenia y en especial al receptor D2 (sitio de acción de los antipsicóticos), este último resulta ser un buen gen candidato para el mapeo molecular de la esquizofrenia.

Objetivos

Estudiar si existen asociaciones o bien enlace génico entre los alelos del gene del receptor D2 y esquizofrenia.

Métodos

Los pacientes se eligieron a través de la División de Investigaciones Clínicas del Instituto Mexicano de Psiquiatría, y de las áreas para pacientes internados en el Hospital Psiquiátrico "Fray Bernardino Alvarez".

A todos los sujetos y a las familias que se consideraron para participar, se les pidió firmar una hoja de consentimiento. Los diagnósticos se realizaron por medio de una entrevista estructurada (DIS),⁴ y el criterio clínico de dos psiquiatras basándose en el DSMIII-R.

Los casos de esquizofrenia y todos los familiares de primer grado disponibles fueron entrevistados personalmente. Esta información se complementó por medio de entrevistas telefónicas, información por otros parientes que se consideraron confiables y por expedientes médicos.

Todos los evaluadores clínicos fueron psiquiatras y recibieron un breve curso de entrenamiento para la aplicación de la entrevista estructurada.

Una vez evaluados los casos se procedió a la toma de la historia familiar de manera indirecta a través del probando y del familiar considerado como el mejor informante. Posteriormente, a todos los miembros disponibles de la familia se les evaluó de manera personal.

Los pacientes y sus familias fueron seleccionados a partir de un estudio anterior.⁹ Los pacientes esquizofrénicos escogidos fueron aquellos que presentaban familias con múltiples afectados (cuando menos dos sujetos con esquizofrenia en la familia nuclear).

A los probandos y a todos los familiares que así lo consintieron se les tomó una muestra de sangre (30cc en tubos tipo vacutainer con ACD, mismos que se congelaron a -80° C hasta el momento de su procesamiento), a partir de la cual se obtuvo el ácido desoxirribonucleico (ADN).

Extracción del ADN

De las muestras congeladas se descongelaron a temperatura ambiente, para posteriormente hacer un lisado de la sangre total, por medio de la solución lítica de Bell.² Después se centrifugaron a 2500 rpm por 10 min. a 4° C, se descarta una tercera parte del sobrenadante y se repite la operación 2 veces, después se agrega amortiguador NE con 1 mg de proteinasa K, incubándose las muestras a 55° C por 90 min. Posteriormente se realizaron 3 extracciones con fenol y cloroformo; finalmente, se precipitó el ADN con la adición de una sal (acetato de amonio 7.5M) y etanol frío, transfiriéndose el ADN a un tubo con 200 µl de TE -4, almacenándose a 4° C hasta su uso posterior. Para medir la concentración del ADN se hace con un fluorómetro, que es el método más exacto

para su determinación. Este paso es de importancia, ya que en cada gel se utilizan 10 µg de ADN y dado que el mapeo requiere de numerosos geles para poder hibridar el ADN de los pacientes con las distintas sondas, es importante conocer la concentración exacta y así obtener una eficiencia máxima.

Determinación de los genotipos

Utilizamos una estrategia novedosa de mapeo por medio de los polimorfismos conocidos como multisatélites (secuencias repetitivas de ADN). Estos polimorfismos es posible detectarlos con oligonucleótidos iniciadores y amplificación de secuencias específicas, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como secuencias iniciadoras fueron provistas por el Dr. J. Kennedy y son las siguientes:

5'-CAGGAGCACGTTTCTCATAC-3'; 5'-GGAGGGCGGTGCGGTCAT-3'

Las condiciones de amplificación: un ciclo de preincubación del templado 3 min. a 95° C; y 25 ciclos: desnaturalización 30 segs. a 94° C; acoplamiento 30 segs. a 62° C; polimerización 30 segs. a 74° C. Al final un ciclo con: 30 segs. a 94° C; 30 segs. a 62° C y 2 min a 74° C. Posteriormente, las muestras se corrieron en un gel de secuencia (PAGE al 6%) por 3 hrs., y se expusieron a una placa autorradiográfica durante 10 hrs. aproximadamente.

Análisis del enlace génico (Linkage)

La idea fundamental de los estudios de Linkage es la de analizar la cosegregación de una enfermedad con un marcador polimórfico. La evidencia estadística del enlace génico es el índice "Lod".¹⁷

El Comité del Mapeo del Genoma Humano ha establecido ciertos requisitos que tienen que ser cubiertos para poder asignar un *locus* determinado a un gen, estos son: la evidencia significativa de enlace (Lod > 3), y la replicación de este resultado encontrado por dos laboratorios distintos y de manera independiente.¹¹

En el presente estudio los resultados fueron analizados por medio del cálculo del índice Lod, a las estimaciones convencionales de la frecuencia de recombinación (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4). Estos cálculos se realizarán por medio del programa computacional LIPED (otorgado al Dr. Nicolini por el Dr. J. Ott). Se utilizó la definición del fenotipo "afectado" en los sujetos que reunían los criterios para el DSMIII-R para esquizofrenia, y trastorno esquizotípico.

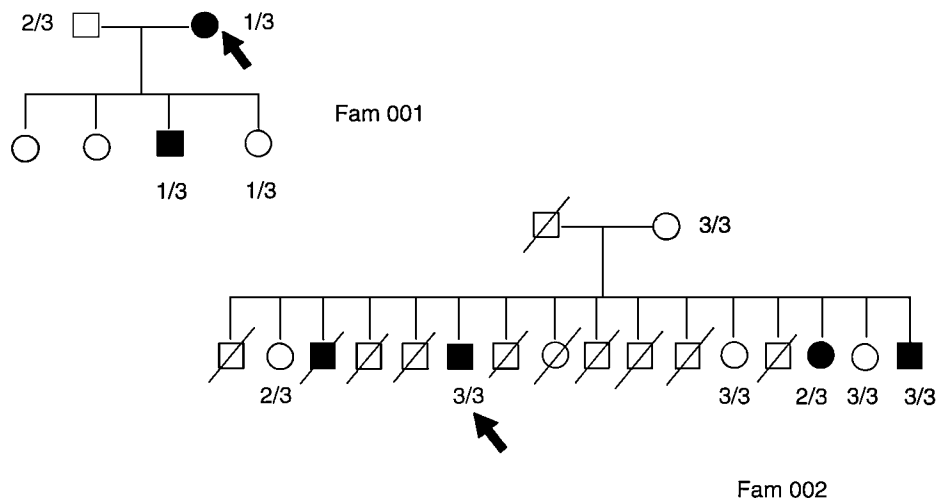


Figura 1. D2 y esquizofrenia.

Estudio de asociación

Se agruparon a los pacientes de acuerdo a sus genotipos y se determinaron las diferencias entre los casos y los controles para las frecuencias de los diferentes alelos del gene del receptor D2, por medio de la prueba Chi cuadrada.

Resultados

Estudiamos a 12 esquizofrénicos y 12 sujetos sanos para el estudio de asociación. El estudio de enlace génico se realizó en 2 familias de pacientes esquizofrénicos, que presentaban varios afectados. En todos los sujetos disponibles se llevó a cabo la determinación de sus genotipos para el receptor a dopamina D2. Las frecuencias para los diferentes alelos del receptor D2 tanto en los esquizofrénicos y los controles se presentan en el cuadro 1. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

CUADRO 1
Esquizofrénicos controles

Esquizofrénicos		Controles		p*	Frecuencia total n (%)
ALELO	n (%)	ALELO	n (%)		
A-1	8 (40)	A-1	8 (40)	N.S.	16 (40)
A-2	2 (10)	A-2	2 (10)	N.S.	4 (10)
A-3	8 (40)	A-3	9 (45)	N.S.	17 (42.5)
A-4	1 (5)	A-4	1 (5)	N.S.	2 (5)
A-5	1 (5)	A-5	0 (0)	N.S.	1 (2.5)

* N.S. valor de p no significativo (prueba Chi cuadrada)

En la figura 1 se presentan los pedigrees de las familias estudiadas con sus genotipos del receptor D2, para el estudio de enlace génico. En el cuadro 2 se presentan los índices Lod a las frecuencias de recombinación convencionales para cada una de las familias estudiadas, se hicieron varios cálculos de los índices Lod, asumiendo diferentes valores para la penetrancia (100, 70, y 50). No se encontró evidencia de enlace génico entre el D2 y esquizofrenia. Por otro lado, se puede excluir significativamente este loci como contribuyente a la susceptibilidad de la enfermedad, únicamente si consideramos una penetrancia del 100 %, ya que con valores menores de la penetrancia, los índices Lod permanecen negativos pero no alcanzan el nivel de significancia para la exclusión de enlace. También es necesario mencionar que la mayor contribución del índice Lod, proviene de una sola familia, y aunque la segunda familia también generó índices Lod negativos, estos fueron valores menores.

CUADRO 2
Análisis de enlace génico

Penetrancia	Frecuencia de Recombinación (Θ)						
	0.0	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
100 %	0.0	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
Fam 001 (Z)	-α	-1.4	-0.72	-0.44	-0.19	-0.07	-0.17
Fam 002 (Z)	-α	-4.2	-2.16	-1.33	-0.58	-0.22	-0.05
Lod total	-α	*-5.6	*-2.88	-1.77	-0.77	-0.29	-0.22
70 %	0.0	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
Fam 001 (Z)	-0.33	-0.32	-0.25	-0.18	-0.09	-0.04	-0.009
Fam 002 (Z)	-0.63	-0.61	-0.52	-0.42	-0.23	-0.10	-0.02
Lod total	-0.96	-0.93	-0.77	-0.60	-0.32	-0.14	-0.029
50 %	0.0	0.01	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40
Fam 001 (Z)	-0.18	-0.17	-0.14	-0.10	-0.06	-0.02	-0.005
Fam 002 (Z)	-0.46	-0.44	-0.37	-0.28	-0.15	-0.07	-0.02
Lod total	-0.64	-0.61	-0.51	-0.38	-0.21	-0.09	-0.025

Índice Lod máximo Z = -5.244 Θ = 0.01 Penetrancia 100%

Discusión

El gen del receptor D2 a dopamina dado sus características farmacológicas, constituye un evidente gen candidato para el mapeo molecular de la esquizofrenia. Existen pocos estudios describiendo este hallazgo. El receptor D2 a dopamina ha sido estudiado hasta el momento en 2 familias de esquizofrénicos, una de ellas proveniente de Suecia y la otra de California, como parte de un mismo estudio, y donde en el análisis realizado no sólo no se encontró evidencia de enlace génico sino que fue posible excluir de manera significativa esta región (27 centi-Morgans (cM) del *locus* del D2). En el análisis de enlace génico los parámetros empleados fueron una frecuencia de la enfermedad de acuerdo a la prevalencia en la población en Suecia que es del 3% aproximadamente; varios valores de la penetrancia, que oscilaron desde 0.56 hasta 0.72; y una hipótesis de transmisión de tipo dominante.¹⁵ Este estudio difiere con el nuestro en cuanto a que la prevalencia de la enfermedad empleada (frecuencia del alelo mutado) la consideramos del 1%. Por otro lado, dado las características de las familias estudiadas (dos generaciones), no es posible hacer una estimación de la penetrancia, a partir de ellas. Sin embargo en el análisis estadístico, los índices Lod sí se calcularon a diferentes valores de la penetrancia, y empleamos como referencia para esta variación las del estudio de Moises y cols.¹⁵ Esta variación tuvo un efecto importante en el índice Lod ya que al disminuirla, se perdió la significancia de exclusión.

Una penetrancia disminuida parece ser un modelo más realista, ya que si observamos a la familia 2 en la figura 1, donde estamos asumiendo que la enfermedad se transmite en forma autosómica dominante, esperaríamos que alguno de los padres estuviera afectado, sin embargo no es así. Por lo que la alternativa a considerar es que alguno de los padres es un portador obligado del gen pero que no manifiesta la enfermedad (penetrancia disminuida).

Otro grupo de investigadores²³ estudiaron la relación de este gen y la esquizofrenia. La metodología que emplearon fue el secuenciar directamente el gen del receptor D2 en 14 pacientes esquizofrénicos y 4 controles, sin encontrar diferencias estructurales.

El mejor conocimiento de los mecanismos dopaminérgicos nos ayudará a identificar la manera precisa en que esta vía metabólica contribuye a la esquizofrenia, por ejemplo: Pilowsky y cols. en 1992, demostraron por medio de la técnica de tomografía por emisión de fotones únicos un pobre bloqueo de los receptores D2, en pacientes que clínicamente respondieron a la droga clozapina. Este hallazgo genera dudas acerca del mecanismo por el cual los neurolépticos convencionales ejer-

cen realmente su acción antipsicótica. En este sentido, se sabe que la clozapina actúa en otros receptores como: 5HT₂, 5HT₃ y D₄.³⁰ Estos receptores constituyen también, interesantes genes candidatos para el estudio de la esquizofrenia y merecen consideración.

En el presente estudio no utilizamos la sonda del receptor D2 (λ hDRD2) utilizada por otros investigadores. Se utilizó en cambio un fragmento de ADN repetitivo dentro del gen del receptor D2. El uso de este tipo de sondas de ADN es una estrategia de mapeo relativamente novedosa, que dado las características de las sondas empleadas generan mucha mayor información polimórfica.³¹ Por otro lado, el uso de la tecnología de RCP permite estudiar a un mayor número de sujetos en menor tiempo. El problema principal de esta metodología es que para generar las secuencias iniciadoras (*primers*) es necesario conocer de antemano algo de la secuencia del gen que nos interesa, lo cual, limita en la actualidad, el número de sondas disponibles. Este inconveniente dejará de serlo en el futuro, cuando se hayan secuenciado mayores porciones del genoma humano.

Muchos de los genes de interés para la psiquiatría ya han sido clonados y algunos de ellos se encuentran en proceso de secuenciación como es el caso del receptor D₄, la enzima tirosino-hidroxilasa (TH) y la monoamino-oxidasa (MAO), entre otros. Por lo que el uso de esta metodología promete ser de gran utilidad en nuestro campo.

Referencias

1. BASSET A, MCGILLIVRAY B, JONES B, PANTZAR T: Partial trisomy chromosome 5 cosegregating with schizophrenia. *The Lancet*, 9:799-801, 1988.
2. BELL G, KARAM J, RUTTER W: Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78(9):5759-5763, 1981.
3. BERMAN K, ILLOWSKY B, WEINBERGER D: Physiological dysfunction of dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 45:616-622, 1988.
4. CARAVEO-ANDUAGA J, GONZALEZ-FORTEZA C, RAMOS-LIRA L: Concurrent validity of the DIS: Experience with psychiatric patients in Mexico city. *Hispanic J. Behav. Sci.*, 13:63-77, 1991.
5. CREESE I, BURT I, SNYDER S: Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*, 192:481-483, 1976.
6. GOTTESMAN I, BERTELSEN A: Confirming unexpressed genotypes for schizophrenia. Risks in the offspring of Fischer's Danish identical and fraternal discordant twins. *Arch. Gen. Psychiatry*, 46:867-872, 1989.
7. GOTTESMAN I, SHIELDS J: A critical review of recent adoption, twin and family studies of schizophrenia: behavioral genetics and perspectives. *Schizophrenia Bulletin*, 2(3):360-398, 1976.
8. GRANDY D, LITT M, ALLEN L, BUNZOW J, MARCHIONI M, MAKAM H, REED L, MAGENIS E, CIVELLI O: The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a taqI RFLP. *Am. J. Human Genet.*, 45:778-785, 1989.

9. GUERRA C, NICOLINI H: Estudio del efecto del orden de nacimiento en esquizofrenia familiar y esporádica. *Salud Mental*, 15(3):25-30, 1992.
10. KENNEDY J, GIUFFRA L, MOISES H, CAVALLISFORZA L, PAKSTIS H, KIDD J, CASTIGLIONE C, WETTERBERG L, KIDD K: Evidence against linkage of schizophrenia to markers on chromosome 5 in a northern Swedish pedigree. *Nature*, 336:167-170, 1988.
11. KLINGER HP: Human Gene Mapping 9 (Paris). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 46:1-4, 1987.
12. MCGUE M, GOTTESMAN I, RAO D: The analysis of schizophrenia family data. *Behavior. Genetics*, 16(1):75-87, 1986.
13. MEADOR-WOODRUFF J, MANSOUR A, BUNZOW J, VAN TOL H, WATSON S., CIVELLI O. Distribution of D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:7625-7628, 1989.
14. MEADOR-WOODRUFF J, MANSOUR A: Expression of the dopamine D2 receptor gene in Brain. *Biol. Psychiatry*, 30:985-1007, 1991.
15. MOISES H, GELERNTER J, GIUFFRA L, ARCONI V, WETTERBERG L, CIVELLI O, KIDD K, CAVALLISFORZA L: No linkage between D2 dopamine receptor gene region and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 47:643-647, 1990.
16. MONSMA F, MCVITTIE L, GERFEN C, MAHAN L, SIBLEY D: Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature*, 342:926-929, 1989.
17. NICOLINI H. Los nexos genéticos (Linkage) de las entidades psiquiátricas. *Salud Mental*, 12:47-51, 1989.
18. RISCH N, BARON M: Segregation analysis of schizophrenia and related disorders. *Am. J. Hum. Genet*, 36:1039-1059, 1984.
19. O'ROURKE, GOTTESMAN I, SUAREZ B, RICE J, REICH T: Refutation of the general single-locus model for the etiology of schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet*, 34:630-649, 1982.
20. PILOWSKY L, COSTA D, ELL P, MURRAY R, VERHOEFF N, KERWIN R: Clozapine, single photon emission tomography, and the D2 dopamine receptor blockade hypothesis of schizophrenia. *The Lancet*, 340 (25):199-202, 1992.
21. RISCH N, BARON M: Segregation analysis of schizophrenia and related disorders. *Am. J. Hum. Genet*, 36:1039-1059, 1984.
22. SAMBROOK J, FRITSCH E, MANIATIS T: *Molecular Cloning*. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
23. SARKAR G, KAPELNER S, GRANDY D, MARCHIONI M, CIVELLI O, SOBELL J, HESTON L, SOMMER S: Direct sequencing of the dopamine D2 receptor (DRD2) in schizophrenics reveals three polymorphisms but no structural change in the receptor. *Genomics*, 11:8-14, 1991.
24. SEEMAN P, LEE T, CHAU-WONG M, WONG K: Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature*, 261:717-719, 1976.
25. SHERRINGTON R, BRYNJOLFSSON J, PETURSSON H, POTTER M, DUDLESTON K, BARRACLOUGH B, WASMUTH J, DOBBS M, GURLING H: Localization of a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 5. *Nature*, 336:164-167, 1988.
26. SIBLEY D, MONSMA F: Molecular biology of dopamine receptors. *TIPS Review USA*, 13:61-69, 1992.
27. SNYDER S: Amphetamine psychosis: A "model" schizophrenia mediated by catecholamines. *Am J Psychiatry*, 130:61-66, 1973.
28. SNYDER S: The dopamine hypothesis in schizophrenia: Focus on the dopamine receptor. *Am. J. Psychiatry*, 133:197-202, 1976.
29. VALLAR L, MELDOLESI J: Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor. *TIPS USA*, 10:74-77, 1989.
30. VANTOL H, BUNZOW J, GUAN H, SUNAHARA R, SEEMAN P, NIZNIK H, CIVELLI O: Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350(6319):610-614, 1991.
31. WEBER J, MAY P: Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet*, 44:388-396, 1989.
32. WEINER D, BRANN M: The distribution of a dopamine D2 receptor mRNA in rat brain. *FEBS (letters)*, 253(1,2):207-213, 1989.