

Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und
Psychotherapie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H. Beckmann

**Mutationsanalyse der Gene Connexin 36 (CX36)
und Tyrosinkinase 3 (TYRO3)
als Kandidatengene für periodische Katatonie**

**Inaugural - Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität
zu Würzburg
vorgelegt von Marion Mai
aus
Münster**

Münster, Juli 2005

Referent: Professor Dr. K.P. Lesch

Koreferent: Professor Dr. rer. nat. C. R. Müller - Reible

Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 30.05.2006

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Verschiedene Konzepte der Schizophrenie als Krankheitsbild	1
1.2. Stand der Forschung	3
1.3. Techniken zur Aufklärung komplexer Erkrankungen	5
1.4. Connexin 36 als Kandidatengen	6
1.5. Tyrosinkinase 3 als Kandidatengen	8
1.6. Tyrosinkinase Pseudogen	9
1.7. Ziel der Arbeit	10
2. MATERIAL UND METHODEN	12
2.1. Material	12
2.1.1. Enzyme	12
2.1.2. Oligonukleotide	12
2.1.2. Molekularbiologische Kits	15
2.1.3. Reagenzien und Chemikalien	15
2.1.4. Geräte	16
2.1.5. Lösungen und Puffer	17
2.2. Methoden	17
2.2.1. Extraktion genomischer DNA	17
2.2.2. PCR-Optimierung und Herstellung der PCR Produkte	18
2.2.3. DNA Gelelektrophorese	19
2.2.4. Isolierung der PCR Produkte	19
2.2.5. Sequenzierung der PCR Produkte	20
2.2.6. Aufarbeitung der Sequenzierreaktion für den ABI 310 Sequencer	21
2.2.7. Die Probenanalyse	21
2.2.8. Alignment der DNA Sequenzen	22
2.2.9. Oligonukleotidsuche mittels Primer 3 Input	22
2.2.10. Expand High Fidelity PCR System	22
3. ERGEBNISSE	23
3.1. Exon – Intron Übergänge	23

3.2. Polymorphismen des CX36-Gens	27
3.3. Polymorphismen des <i>TYRO3</i> Gens	32
3.4. Promotoranalyse	34
3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse	38
4. DISKUSSION	39
5. ZUSAMMENFASSUNG	46
6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	48
7. TABELLENVERZEICHNIS	49
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	50
9. LITERATURVERZEICHNIS	51

1. Einleitung

1.1. Verschiedene Konzepte der Schizophrenie als Krankheitsbild

Der Name Schizophrenie wurde 1911 von Eugen Bleuler geprägt. Er stellte das Konzept der „Dementia praecox“ von Emil Kraepelin in Frage und beschränkte sich aufgrund seiner klinischen Erfahrungen unter der Vielzahl der Symptome auf ein wesentliches Merkmal. Dieses definierte er als das Grundsymptom der Erkrankung: die Spaltung im Geist der Kranken.

Die schizophrene Psychose gehört zu der Hauptgruppe der endogenen Psychosen und ist mit einer Erkrankungshäufigkeit von 1 % der Bevölkerung eine der wichtigsten und kostenintensivsten Erkrankungen der Psychiatrie. Die Suizidrate von Patienten mit Schizophrenie liegt bei 10 % und im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ist die Mortalitätsrate um das siebenfache erhöht (Jablensky et al. 1995).

Die Erkrankung manifestiert sich häufig im jungen Erwachsenenalter und ist durch eine Vielzahl von Symptomen wie Störungen im Denken, der Wahrnehmung, der Affektivität und im Ich-Erleben (sogenannte Grundsymptome) charakterisiert. Als akzessorische Symptome können Wahnideen und Halluzinationen hinzu kommen.

Nicht alle dieser Symptome sind für die Diagnose einer Schizophrenie nötig, es wird jedoch mindestens ein eindeutiges oder, falls die Symptome weniger eindeutig sind, ein zusätzliches Symptom gefordert. Sollten Anhaltspunkte für eine Hirnerkrankung oder Drogenintoxikation vorliegen, darf die Diagnose einer Schizophrenie nach ICD-10 nicht gestellt werden.

Das DSM IV verlangt für die Diagnose der Schizophrenie ein Bestehen der schizophrenen Störung über einen Zeitraum von mindestens sechs Monaten und eine aktive Phase, die über einen Monat hinweg andauert. Es müssen in dieser Phase mindestens zwei der nachfolgenden Symptome vorhanden sein:

- Wahnvorstellungen
- Halluzinationen
- Desorganisierte Sprache

- Katatonies oder grob desorganisiertes Verhalten,
- Negativsymptome (d.h. Affektverflachung, Sprachverarmung und Willensschwäche)

Karl Leonhard (Leonhard 1942) teilte die endogenen Psychosen anhand der klinischen Symptome und dem Krankheitsverlauf in die Gruppen der zykliden Psychosen, der systematischen und der unsystematischen Schizophrenie ein. Der Verlauf der unsystematischen Schizophrenien ist, nach der Leonhard Klassifikation, nicht schleichend progredient wie bei der systematischen, sondern phasenhaft, es kommt zu spontanen Remissionen.

Die systematischen Schizophrenien beinhalten nach Karl Leonhard die systematische Paraphrenie, die systematische Katatonie und die Hebephrenie. Zu den unsystematischen Schizophrenien gehört die affektvolle Paraphrenie, Kataphasie und die periodische Katatonie, wobei hier nur auf die letzte näher eingegangen werden soll.

Die periodische Katatonie beginnt in der Regel akut und zeigt einen schubweisen Verlauf mit Phasen, die man als akinetische und hyperkinetische Zustände bezeichnet. Der hyperkinetische Pol zeichnet sich durch Unruhe, stereotype Wiederholungen von Wörtern oder Bewegungen (sogenannte Iterationen), oft begleitet von Aggressivität aus. Der akinetische Pol ist durch Stupor, also eine Starrheit oder Regungslosigkeit, und das Einnehmen bizarrer Körperhaltungen gekennzeichnet. Oft findet sich eine Mischung beider Pole, so daß man hyperkinetische Unruhe einer Körperhälfte bei gleichzeitiger Akinese der anderen beobachten kann. Dieses Symptom wird als Parakinese bezeichnet.

Nach einem akuten Krankheitsschub kommt es zu einer Remission, die besonders aus einer akinetischen Phase heraus mit bleibenden Defekten einhergeht. Die Defekte werden mit zunehmender Zahl der Krankheitsschübe ausgeprägter und äußern sich in gesteigerter Reizbarkeit und einer generellen Antriebsminderung im Endzustand.

1.2. Stand der Forschung

Bereits 1953 wurde anhand einer klinischen Studie von J. A. Böök die Theorie einer autosomal dominant vererbten Ursache der Schizophrenie aufgestellt. Dazu untersuchte er circa 9000 vorwiegend an Schizophrenie leidende Patienten in einer schwedischen Population über einen Zeitraum von 47 Jahren. Böök konstatierte folgende, sich mit der Leonhardschen Klassifikation deckende Beobachtung: „*The schizophrenic psychoses observed in this population displayed a rather uniform clinical picture, interpreted as predominantly catatonic with a marked tendency to periodicity.*“ Er schlußfolgerte, der Erkrankung müsse eine Neumutation im Genom mit einer sehr hohen Mutationsrate zu Grunde liegen (Böök 1953).

Neben der Theorie der monogenen Vererbung nimmt man für den Großteil der Fälle an, die Ursache liege in einem Zusammenspiel einer Reihe von exogenen und genetischen Risikofaktoren. Man rechnet die Schizophrenie deswegen zu den sogenannten komplexen Erkrankungen, die nicht durch einen einzelnen Gendefekt hervorgerufen werden. Als exogene Faktoren werden z. B. Infektionen in der Schwangerschaft oder der Geburtstermin in den Wintermonaten angenommen. Letzteres wird kontrovers diskutiert und hat nur einen geringfügigen Einfluss. Als gesichert gilt die familiäre Häufung der Schizophrenie (Plomin et al. 1994; McGuffin et al. 1995; Riley et al. 2000; Stöber et al. 2000, 2001).

Die genetische Ursache der Erkrankung wird durch Zwillings- und Adoptionsstudien gefestigt, bei denen sich für eineiige Zwillinge eine deutlich höhere Konkordanz (bis zu 78 % je nach Studiendesign) ergaben als für zweieiige. Die Adoptionsstudien zeigten, daß auch Kinder schizophrener Eltern, die nach der Geburt zur Adoption gegeben wurden, eine höhere Erkrankungsrate hatten, als Kinder einer Vergleichsgruppe nicht schizophrener Eltern (OMIM #181500 Schizophrenia; SCZD; Mc Guffin et al. 1995; Propping 1989).

Für die periodische Katatonie besteht die Hypothese eines monogen vererbten Defektes. Bereits Karl Leonhard stellte eine deutliche familiäre Häufung der

periodischen Katatonie fest und nahm einen dominanten Erbgang an. Neuere klinische Studien mit einer großen Anzahl untersuchter Familien in denen Mitglieder an der periodischen Katatonie leiden, ergab für die Nachkommen erkrankter Eltern ein signifikant höheres Krankheitsrisiko. Bei Erkrankung des Vaters beträgt die Morbiditätsrate 15,4 %, ist die Mutter erkrankt steigt die Rate auf 33,7 %. Mit zunehmender Entfernung des Grades der Verwandtschaft von einem schizophrenen Indexfall beobachtet man eine Abnahme des Risikos für die Erkrankung (Leonhard 1942; Lesch et al. 1994; Stöber et al. 1995; Beckmann et al. 1996; Stöber et al. 2001).

Aufgrund der Ergebnisse der Familienstudien wurden von der Würzburger Arbeitsgruppe 12 von katatoner Schizophrenie betroffene Familien mit insgesamt 135 Probanden, von denen 57 an der Erkrankung leiden, untersucht. Es wurde eine Kopplungsanalyse mit insgesamt 356 Markern zur Typisierung durchgeführt. Diese Studie ergab Hinweise für einen Genort auf den Chromosomen 15q15 (LOD score = 3.57) und 22q13 (LOD score = 2.92) (Stöber et al. 2000).

Durch anschließende Feinkartierung konnte der Genort auf Chromosom 15 zwischen den Markern D15S144 und D15S132 für Familie 11 bestätigt und eingengt werden (Meyer et al. 2002). Dadurch wurde es möglich, das in der Region gelegene *CHRNA7* Gen als krankheitsverursachend auszuschließen, und die bereits von der Arbeitsgruppe Freedman mittels Linkage Disequilibrium Test untersuchte Region noch weiter einzugrenzen (Freedman et al. 2001).

Auch die Arbeitsgruppe Riley fand in Studien an südafrikanischen Bantu-Familien Hinweise für einen Genort für hereditäre Schizophrenie auf Chromosom 15 (Riley et al. 2000). Untersuchungen an Patienten mit manisch depressiver Erkrankung und Ansprechen auf Lithiumtherapie zeigten Koppelung des Markers ACTC mit der Erkrankung. Dieser Marker liegt ebenfalls auf Chromosom 15 in der Nähe des *CHRNA7* Gens (Turecki et al. 2001).

1.3. Techniken zur Aufklärung komplexer Erkrankungen

Um verantwortliche Gene für vererbte Erkrankungen zu identifizieren, stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Eine davon ist die Kopplungsanalyse, die für monogen vererbte Erkrankungen anwendbar ist. Hierfür werden große Stammbäume von einer Erkrankung betroffener Familien herangezogen. Die Grundlage der Methode ist, daß in der Prophase der Meiose I, in der die Paarung der homologen Chromosomenpaare erfolgt, ein Austausch von Genmaterial durch Crossing over stattfinden kann. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit für nahe benachbarte Gene, durch Crossing over getrennt zu werden, geringer als für weiter entfernt liegende. Die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination während der Meiose für direkt benachbarte Gene geht damit gegen Null. Das macht es möglich, in Kopplungsanalysen Marker zu finden, deren chromosomale Lokalisationen bekannt sind und die überzufällig häufig gemeinsam mit der Erkrankung vererbt werden.

Die zu diesem Zweck am häufigsten benutzten Marker werden als Mikrosatelliten bezeichnet. Sie enthalten repetitive DNA Sequenzen, die in gewissen Abständen über das gesamte Genom verteilt sind. Die Anzahl der repetitiven Stellen variieren, das heißt sie sind polymorph, was sie zu geeigneten Markern für Kopplungsanalysen macht.

Als Einheit für die Kopplungsstärke wird der Lod score benutzt, er berechnet sich prinzipiell als Logarithmus der „odds ratio“ (Wahrscheinlichkeit für Kopplung, gegenüber Wahrscheinlichkeit der Nichtkopplung). Beträgt der Lod score 3, so ist die Wahrscheinlichkeit für Kopplung 1000 : 1. Ist der Lod score kleiner 0, so kann die Kopplung ausgeschlossen werden.

Eine andere Methode ist die Fall- Kontroll- Assoziationsstudie, bei der eine Gruppe von Patienten, die an einer Krankheit leiden, mit einer gesunden Kontrollgruppe im Hinblick auf ein mit dieser Erkrankung assoziiertes genetisches Merkmal verglichen wird. Dazu wird die DNA der Patienten genotypisiert und mit der Kontrollgruppe verglichen. Findet man bei den erkrankten Personen eine Häufung eines Merkmals, so vermutet man eine Assoziation dieses Merkmals mit der Erkrankung. Daraus kann abgeleitet

werden, um wieviel häufiger die Erkrankung bei Trägern des Merkmales im Gegensatz zu Personen, die das Merkmal nicht tragen vorkommt.

Für den *linkage disequilibrium* Test (TDT) werden Familien mit nur einem betroffenen Nachkommen gesucht und die DNA der Eltern, sowie der Kinder analysiert. Die Diagnose der Eltern ist für diesen Test nicht relevant. Relevant ist nur, welches Allel des Elternteils an die Nachkommen weitergegeben wird. Nachfolgend wird dieses mit dem nicht vererbten Allel verglichen, woraus abgeleitet werden kann, welches Allel bevorzugt bei den erkrankten Nachkommen zu finden ist.

Die „affected sib pair“ Methode analysiert Kernfamilien mit mindestens zwei betroffenen Kindern. Für diese Studien wird ein großes Kollektiv von Familien untersucht um einen statistisch signifikanten Marker für die Erkrankung zu finden. Erkrankte Eltern vererben den genetischen Marker zusammen mit dem Krankheitsgen (Faraone et al. 1999, Plomin et al. 1990, Propping et al. 1994, van Camp, G. 1999).

1.4. Connexin 36 als Kandidatengen

Das Connexin 36 Gen (Cx36) kodiert für ein Kanalprotein, das am Aufbau von Zell-Zell Verbindungen (Gap-junctions) beteiligt ist. Die Connexin Proteine bestehen aus einem transmembranen Anteil, einem kurzen extrazellulären Carboxy Anteil und einer langen cytoplasmatischen Schleife. Eine Gap junction setzt sich aus 2 Hemikanälen zusammen, die in der Zellmembran der beteiligten Zellen gelegen sind und die wiederum aus Hexameren der Connexin Proteine bestehen (Bennett et al. 1997). Durch Gap junctions wird im ZNS der Austausch von Ionen und kleinen Molekülen zwischen den Zellen möglich und damit eine metabolische und elektrische Koppelung (Teubner et al., 2000, Güldenagel et al., 2001).

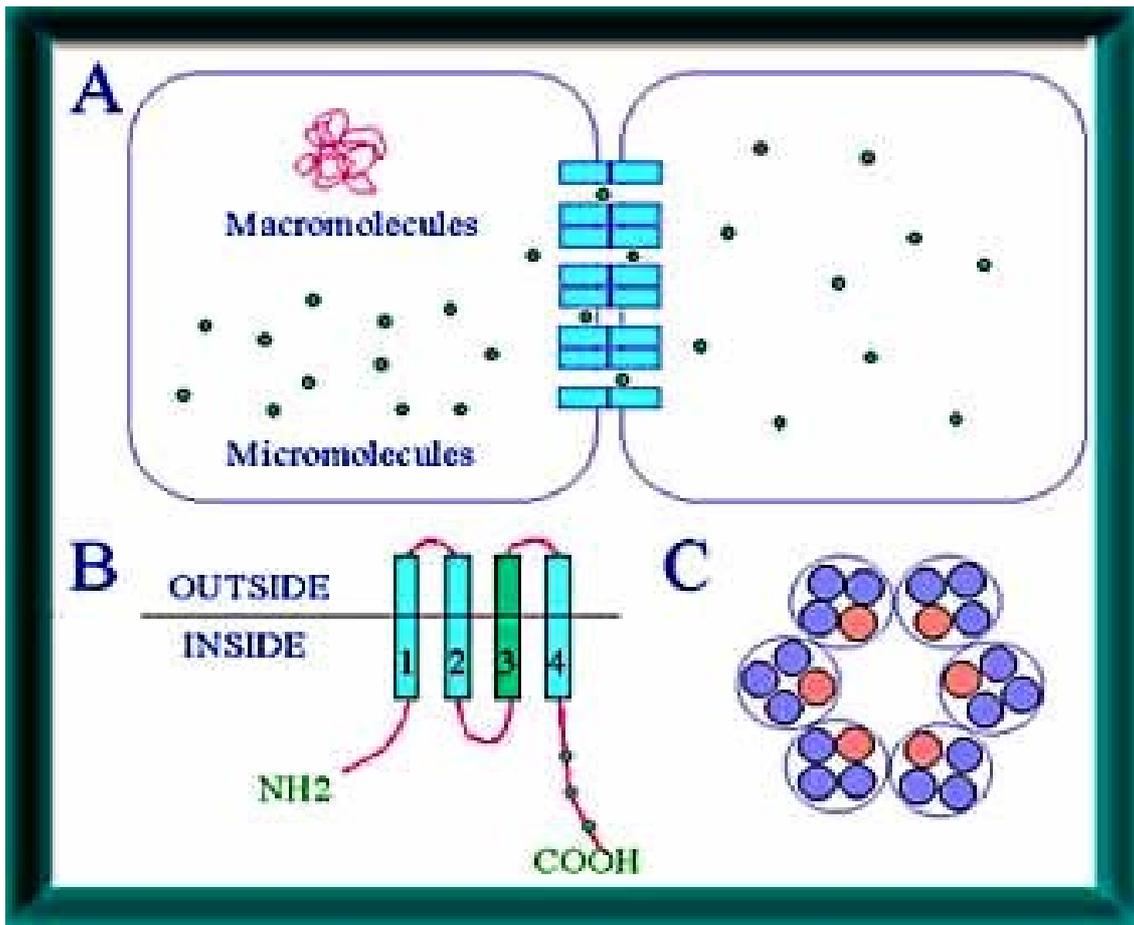


Abbildung 1: Aufbau von Connexin36

Das Cx36 Gen wird im ZNS als Teil der Zell-Zellverbindungen zwischen Neuronen und Gliazellen gefunden. Sowohl bei Ratten als auch im menschlichen Nervensystem ist das Gen in Zellen des Hippocampus, der Olive, im Kleinhirn sowie des Bulbus olfactorius aktiv. Deans et al. untersuchten die Rolle des murinen Cx36 bei der Aktivität von Synapsen inhibitorischer Interneurone, sie fanden Zusammenhänge zwischen der synchronen inhibitorischen Aktivität der Synapsen und Cx36. Die chromosomale Lokalisation des humanen Cx36 Gens wurde von der Arbeitsgruppe Belluardo untersucht und in der Region 15q14 kartiert (Belluardo et al. 1999, Condorelli et al. 2000, Deans et al. 2001, Rash et al. 2000, 2001).

Das Gen ist benachbart zu Marker D15S971, der Kopplung mit dem rezessiv vererbten Andermann Syndrom, einer peripheren Neuropathie mit oder ohne Agenesie des Corpus callosum, (Casaubon et al. 1996, MIM 218000) zeigt. Eine X-chromosomal dominante Mutation in einer anderen Connexin Familie,

Cx32, führt zu Charcot-Marie-Tooth Syndrom. Die Erkrankung führt über periphere Demyelinisierung zu symmetrischen Lähmungen der Extremitätenmuskulatur, Parästhesien und Sensibilitätsstörungen (Poek 2001; Omori et al. 1996). Menichella et al. zeigte an Mäusen, die neben einem Defekt im Cx32 auch einen Cx47 Defekt haben, dass diese nicht lebensfähig sind und innerhalb von 6 Wochen nach der Geburt aufgrund insuffizienter Myelinisierung im ZNS sterben. Cx47 kommt ausschließlich in Oligodendrozyten vor (Menichella et al. 2003).

Postmortale DNA Analysen an Gehirnen von Patienten mit Schizophrenie zeigten interessanterweise verminderte Transkription von mehreren an der Myelinisierung von Axonen beteiligten Genen, während andere eine vermehrte Transkription aufwiesen (Hakak et al. 2001; Tkachev et al. 2003).

1.5. Tyrosinkinase 3 als Kandidatengen

Die Tyrosinkinase 3 (*Tyro3*, syn. *Sky*) gehört zu einer Familie von Rezeptor-Protein-Tyrosinkinasen, die sie zusammen mit *Axl* (auch *Tyro7*) und *Mer* (*Tyro12*) bildet. Sie liegen in Form von Transmembranrezeptoren vor, bestehend aus einem extrazellulären Rezeptorprotein, ähnlich der Bindungsregion von Immunglobulinen. Diese ist über eine Transmembrandomäne mit der intrazellulär gelegenen Tyrosinkinase verbunden.

Die Tyrosinkinase wird aktiviert, wenn ein Ligand an die extrazelluläre Domäne bindet. Ligand kann z.B. *Gas6* (Growth arrest specific gene-6) sein, der eine Steroidhormon ähnliche Sequenz aufweist und hohe Aktivität im ZNS zeigt (Prieto et al. 1999; Funakoshi et al. 2002). Ein weiterer Ligand ist das Protein S, das im Blut als Antikoagulanzen vorkommt und strukturelle Verwandtschaft zu *Gas6* besitzt. Die Bindung des Liganden hat eine Autophosphorylierung des zytoplasmatischen Anteils der Kinase sowie nachfolgender zytoplasmatischer Proteine zur Folge. Einige der Proteine sind für die Signaltransduktion zuständig, womit den Tyrosinkinasen eine maßgebliche Rolle in Zellstoffwechsel, -wachstum und Differenzierung zukommt.

Untersuchungen an Ratten und Mäusen ergaben eine hohe Aktivität des *TYRO3* Gens während der Synaptogenese sowie im adulten zentralen Nervensystem. In der Embryonalzeit und den ersten Tagen nach der Geburt ist sie nur gering und steigt dann kontinuierlich an, wobei die meiste Aktivität im Gewebe des Kleinhirns und Neocortex gefunden wurde. Dort kommt der Tyrosinkinase3 eine wesentliche Aufgabe für Zelldifferenzierung, Migration und Axonwachstum zu. *TYRO3* wird auch in Lymphgewebe, Gefäßen und Zellen der Fortpflanzungsorgane gefunden. Mäuse die keinen der Rezeptoren aus der *TYRO3* Familie besitzen, sind nicht fähig, adulte Spermien zu produzieren. Aufgrund ihrer Rolle beim Zellwachstum kann durch Mutation oder übermäßige Aktivität der Kinasen in der Zelle eine Karzinomentstehung begünstigt werden. So gelang der Arbeitsgruppe um Polvi aus menschlichen Karzinom- und Knochenmarkszellen die Klonierung und Sequenzierung des *TYRO3* Gens sowie des Pseudogens (*TYRO3P*). Beim Vergleich der humanen cDNA mit den Sequenzen der Maus fand sie eine hohe Übereinstimmung. Durch weitere Analysen wurde für die beiden Gene die Lokalisation auf Chromosom 15q14-q25 und 15q22-q25 gefunden (Lai et al. 1991,1994; Lewin et al. 1998; Polvi et al. 1993; Prieto et al. 1999, 2000; Qingxiam et al. 1999).

1.6. Tyrosinkinase Pseudogen

Wie oben bereits erwähnt, wurde ein Pseudogen der Tyrosinkinase3 (*TYRO3P*) auf Chromosom 15q14 lokalisiert (Polvi et al. 1993).

Pseudogene besitzen verwandte Sequenzen mit funktionsfähigen Genen, können aber nicht in ein funktionsfähiges Protein übersetzt werden. Die Gene entstehen durch reverse Transkription von m-RNA, die dann in das Genom integriert wird (Lewin et al. 1998, Hennig 2001).

Eigenschaften von Pseudogenen sind:

- das Fehlen von Introns.
- Besitz einer Poly(A) Sequenz am 3`Ende.
- häufiges Fehlen eines 5`Endes.

Für das Tyrosinkinase3 Pseudogen wurden Punktmutationen, Deletion und Insertion von Basen gefunden. Wichtige Voraussetzung für die richtige Sequenzierung des *TYRO3* Gens war, daß *TYRO3P* keine Intronsequenzen enthält (Polvi et al. 1993). So konnten die Oligonukleotide für die Herstellung der PCR Produkte in die Intron- Sequenz des *TYRO3* Gens platziert werden. Damit konnte eine unerwünschte Vervielfältigung der Sequenz des Pseudogenes ausgeschlossen werden.

1.7. Ziel der Arbeit

Das humane Chromosom 15 wurde bereits im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen wie dem Marfan Syndrom und der Tay Sachs Erkrankung erwähnt. Für deren Genese wurden auf dem Chromosom gelegene Gene verantwortlich gemacht (Richard et al. 1994). Aufbauend auf den Vorarbeiten der Würzburger Arbeitsgruppe (Stöber et al. 2000, 2002; Meyer et al. 2002) wurden auf Chromosom 15 anhand der Lokalisation, der Funktion und dem Vorhandensein im Zentralnervensystem die Gene *Cx36* und *TYRO3* für die Mutationsanalyse ausgewählt, um sie nach der Methode von Sanger (Sanger et al. 1977) zu sequenzieren. Sowohl *Cx36* als auch *TYRO3* spielen eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Zellinteraktion im ZNS.

Es wäre denkbar, daß ein Defekt während der Synaptogenese im ZNS an der Krankheitsentstehung beteiligt ist, ebenso wie eine unzureichende Ausbildung von Gap junctions, an denen *Cx36* maßgeblich beteiligt ist. Die Patienten-DNA wurde aus Blutproben von Probanden mit periodischer Katatonie gewonnen. Diese wurden aus der Familie 11 der bereits erwähnten Studie rekrutiert, die in drei Generationen von der Erkrankung betroffen ist und zehn gesunde, sowie 7 kranke Mitglieder zählt.

Die Proben wurden zusammen mit solchen von gesunden Kontrollpersonen vergleichend sequenziert und auf Übereinstimmung mit den Einträgen der GenBank überprüft mit dem Ziel, Mutationen zu finden, die zu einem Defekt im Protein führen und zur Ausprägung der Krankheit beitragen, bzw. die Gene als Kandidaten auszuschließen.

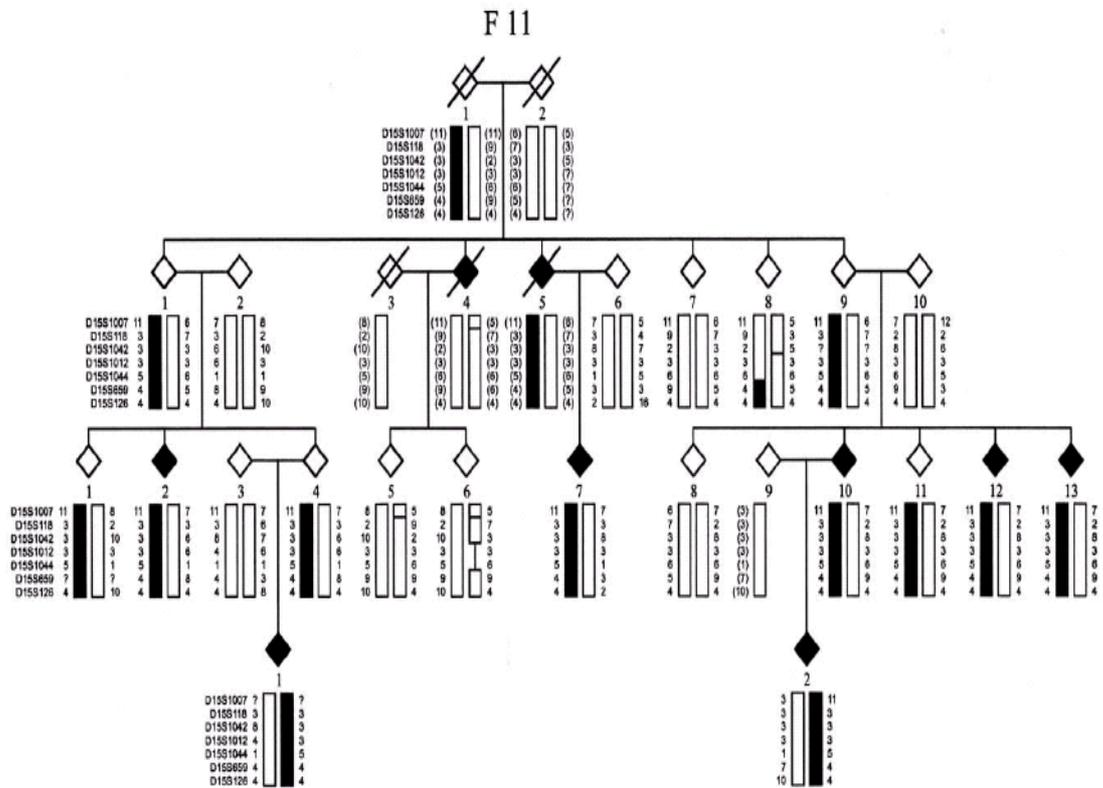


Abbildung 2: Stammbaum der Familie 11, die in 4 Generationen von periodischer Katatonie betroffen ist. Erkrankte Mitglieder sind als schwarze Raute und bereits verstorbene Mitglieder durchgestrichen dargestellt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Enzyme

Taq DNA Polymerase Herstellung nach Protokoll von Engelke, D.R. (1990)

2.1.2. Oligonukleotide

Oligo-nukleotid	Sequenz 5'→3'	Annealing-Temperatur	PCR-Produktgröße
PromF	tgc ctc cca att aaa gaa gc	57,0°C	332 bp
PromR	cgc tga agt agc agg aac ag		
Ex1-F	cca ggt gtg aga agg gac tc	64,1°C	352 bp
Ex1-R	cat cgg tcg gga cgc gct tg		
Ex2-1F	gta gag tag cgg cgt tct cg	57,6°C	325 bp
Ex2-1R	cag ggg ttt cct gtc agt g		
Ex2-2F	gac ctg atg ggt gtg gag tc	61,8°C	277 bp
Ex2-2R	ccc agt ctt tgc ttc atc ac		
Ex2-3F	agt tgg ccg gga cac ata ac	58,5°C	302 bp
Ex2-3R	cta ttg tga atg ggg tgc tg		
Ex2-4F	att ggg aac act gac cct tg	58,4°C	256 bp
Ex2-4R	tgt ccc agg gtt gta tga gtg		
Ex2-5F	tga tat gtg aaa atg ggt cca c	59,2°C	291 bp
Ex2-5R	gct cag gcc aag aga aag tc		
Ex2-6F	ctg agc agt cat ctg cct tg	58,1°C	249 bp
Ex2-6R	aag tgg cat ctg tgt tgt gc		

Tabelle 1: Darstellung der für CX36 verwendeten Oligonukleotide mit Sequenz, verwendeter Annealing Temperatur und resultierender PCR-Produktgröße.

Oligo-nukleotid	Sequenz 5'→3'	Annealing-Temperatur	PCR-Produktgröße
Ex1-F	ccg aga aga aca tga atc agc	58,9°C	663 bp
Ex1-R	tga cca cac agc cca cac		
Ex1-Fnest	tcg cct cag cac cgc cc	64,5°C	390 bp
Ex1-Rnest	gag cct cgg cct tcg gct c		
Ex2-F	gtc cct ctc aag gct gac ac	58,8 °C	291 bp
Ex2-R	tcc cca agg aaa gag cat ag		
Ex2-FII	tga ctt tgg ctg aga aag agc	58,1°C	407 bp
Ex2-RII	acc tct ggg cat cag gag gag ag		
Ex3-F	ggc agg ctg aac tca tca ag	59,2°C	243 bp
Ex3-R	tag tca cca gca gac agc ac		
Ex4-F	aca gta gga agc caa gag gtg	59,9°C	273 bp
Ex4-R	gga ccc agc tcc ttc tcc		
Ex4-FII	tct gcg tgg agg act tca g	58,7°C	353 bp
Ex4-RII	agc tca gtg gct gaa act gc		
Ex5-F	agc ctg agt att ccc ctt tcc	59,2°C	260 bp
Ex5-R	ggg agc tgg aac aca gaa tg		
Ex6-F	tga ctc cca tgc ctc ctg	57,7°C	249 bp
Ex6-R	tcc ctg tca aca aag tgc tg		
Ex7-F	cca tct ctc aca ggc tct cc	61,2°C	304 bp
Ex7-R	ttc aga act cca gcc aac ac		
Ex8-F	gat tcc aaa ggt ctg cat gg	57,2°C	320 bp
Ex8-R	agg ccc acc aaa gac aat c		
Ex8-Rnest	acc tgg gtt cca ttg tct tg	57,3°C	223 bp
Ex9-F	gct gga cct ttt tct gtc ctc	58,6°C	278 bp
Ex9-R	aaa acc ttg atc ccc tga gc		
Ex10-F	gtt ctg aag gga cct cat gg	59,3°C	249 bp

Ex10-R	ggt cag ctc caa ggt ctt tc		
Ex11-F	ggg aga ggc agg taa tga tg	59,3°C	217 bp
Ex11-R	cag atg ggg cac aag aca g		
Ex11-RII	atg cag atg ggg cac aag	58,1°C	430 bp
Ex12-F	cag ccg tgg gag acc taa g	60,2°C	297bp
Ex12-R	cac agc ctc aaa gtg aca gg		
Ex13-F	gct ctt gct ttg gct act gg	60,2°C	299 bp
Ex13-R	gcc tgc ttc agg gtc agt c		
Ex14-F	gga cat ctg aag gac aag acc	57,4°C	257 bp
Ex14-R	agg ctg cca tct cat att gg		
Ex15-F	gga ctt atg cag aca cct ga	57,4°C	264 bp
Ex15-R	ggg tct cta tgc ctt tcc ag		
Ex15-FII	agc agg tgg gga ctt atg c	61,4°C	281 bp
Ex15-RII	ctc tgc cag ggt ctc tat gc		
Ex16-F	tcc agt gat tct ggg gac ag	60,5°C	308bp
Ex16-R	gat act gtc cca ggc agg ag		
Ex17-F	aga tgt cct ggc tct t gt gg	60,4°C	319 bp
Ex17-R	cag aga gca gac ttg gct agg		
Ex18-F	cca ggt tgt gct tgt ctc ag	58,3°C	356 bp
Ex18-R	tgc agc ctt cca act aca ag		
Ex19-1F	tcc tgg gct caa ata ata ccc	59,3°C	335 bp
Ex19-1R	agt ggg ctc ctc agc tct c		
Ex19-2F	ctt gtc tgc gaa tgg aac tg	59,3°C	312 bp
Ex19-2R	ctg tgt ggc agt agc cct tg		
Ex19-3F	aga gca cca gcc aga gag tc	60,2°C	216 bp
Ex19-3R	gca cag ctt ggg agg act ac		
Gap1-F	gac ttc aaa cca gcc tga cc		unbekannt
Gap1-R	gcc cct gtg tac cta aat gg		ca. 1600 bp

Gap2-F	tgt ggt cct tgg ctt ctc ac	unbekannt
Gap2-R	gta tca ggg tgg cct ttg g	ca. 1600 bp

Tabelle 2: Darstellung der für TYRO3 verwendeten Oligonukleotide mit Sequenz, verwendeter Annealing Temperatur und resultierender PCR-Produktgröße.

2.1.2. Molekularbiologische Kits

DNA Sequencing KIT:

Big Dye™ Terminator Cycle

Sequencing Ready Reaction

Fa. ABI - PRISM – Applied Biosystems
Foster City, USA

Expand High Fidelity PCR System

Fa. Roche Pharma AG, Grenzach
Wyhlen

Gel Extraction Kit, QIAquick®

Fa. Qiagen GmbH, Hilden

PCR Purification Kit, QIAquick®:

Fa. Qiagen GmbH, Hilden

QIAmp® DNA Mini Kit:

Fa. Qiagen GmbH, Hilden

2.1.3. Reagenzien und Chemikalien

Agarose: Seakem® LE Agarose

Fa. Biozym, Biozym, Rockland, USA

BSA (N₂O – Bis – acetamid)

Fa. Applichen, Darmstadt

Bromphenolblau

Fa. Merck, Darmstadt

DMSO

Fa. Roth, Karlsruhe

Ethanol:

Fa. Baker, Deventer, Holland

Ethidiumbromid

Fa. Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

Fa. Sigma Aldrich Chemie, Steinheim

Isopropanol

Fa. Merck, Darmstadt

Kaliumchlorid

Fa. Applichem, Darmstadt

Magnesiumchlorid

Fa. Applichem, Darmstadt

Natrium Acetat

Fa. Applichem, Darmstadt

Nukleotide	Fa. Genecraft, Münster
Oligonukleotide	Fa. MWG-Biotech AG, Ebersberg
100bp DNA Ladder:	Fa. MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Roth
Sequenziergel Konzentrat	Fa. Roth, Karlsruhe
Sequenziergel Verdünner	Fa. Roth, Karlsruhe
Tween 20	Fa. Applichem, Darmstadt
Wasser	Fa. Merck, Darmstadt

2.1.4. Geräte

Autoklav	3850 ELV	Fa. Systec, Wettenberg
Feinwaage	Toledo	Fa. Mettler, Gießen
	PM 300	Fa. Mettler, Gießen
Filterspitzen		Fa. Greiner Labortechnik, Deutschland
Fotopapier	Polaroid-Film 667	Fa. Polaroid, Offenbach
Magnetrührer		GLW (Gesellschaft für Laborbedarf mbH Würzburg)
Gelkammern, Kämmen:		Fa. Peqlab, Erlangen
Kamera:		Fa. Polaroid, Offenbach
Pipetten:		Fa. Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße:		
PCR Softtubes 0,2 ml		Fa. Biozym, Oldendorf
Safe Lock 1,5 ml		Fa. Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße zum Sequenzieren:		
Genetic Analyzer, 0,5 Sample Tubes		Fa. Applied Biosystems, Foster City, USA
Sequenziergerät:		ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer
		Fa. Perkin Elmer- Applied Biosystems
Spannungsgerät: Power Suply		LKB, Bromma, Schweden
Thermocycler:		
Typ T1,		Fa. Biometra, Göttingen
Typ Uno II,		Fa. Biometra, Göttingen

Typ T-Gradient		Fa. Biometra, Göttingen
Ultraviolett Transilluminator		Fa. UVP, Upland, Kanada
Vakuumtrockner:		Fa. Biotec Fischer GmbH, Reiskirchen
Vortex (Reagenzglasmixer):		Scientific Industries, Inc. USA
Wasserbad		GLF (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Zentrifugen	Mikroliter	Fa. Hettich, Tuttlingen
	Rotanta 96RS	Fa. Hettich, Tuttlingen

2.1.5. Lösungen und Puffer

Ladepuffer	0,025%	Bromphenolblau
	0,025%	Xylen Cyanol FF
	30 %	Glycerol in Wasser
10 xGoldstar PCR Puffer	750 mM	Tris-HCL (pH 9)
	200 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0,1%	Tween 20
1xTAE Puffer:	40 mM	Tris-Acetat
	1 mM	EDTA (pH 8,0)
PCR-Puffer:	500 mM	KCl
	100 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
	0,25% (V/V)	Tween 20
	0,25 mg/ml	BSA
	7,5 mM	MgCl ₂
oder	10 mM	MgCl ₂

2.2. Methoden

2.2.1. Extraktion genomischer DNA

Die Gewinnung der genomischen DNA aus Zelllinien erfolgte mittels QIAamp[®] DNA Mini Kit, gemäß den Angaben des Herstellers. Dabei werden die Zellen gewaschen, mit Protease und Lysepuffer inkubiert. Durch Applikation der Lösung auf eine Säule und anschließende Zentrifugation wird die DNA

gebunden, danach mit Puffer eluiert und kann so bei minus 20°C gelagert werden.

2.2.2. PCR-Optimierung und Herstellung der PCR Produkte

Für die Herstellung der DNA Fragmente wurde die PCR Amplifizierung mit der Taq DNA Polymerase durchgeführt, eine extrem hitzestabile DNA abhängige Polymerase, die erstmals aus *Thermus aquaticus* isoliert wurde (Chien et al. 1976). Die Sequenz und Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide ist unten stehend aufgeführt. Für die Optimierung der PCR wurden verschiedene Ansätze mit unterschiedlicher Schmelztemperatur und unterschiedlichen Konzentrationen (7,5 oder 10 mM) des eingesetzten Magnesiumchlorids zusammengestellt, um dann den Ansatz mit dem besten Ergebnis für die Sequenzierung auszuwählen.

Ein typischer Ansatz für die PCR ist:

- 2,5 µl 10x PCR Puffer
(Endkonzentration MgCl₂ 7,5 mM oder 10 mM)
- 1 µl Nukleotidmix (je 2,5 mM)
- 2 µl Oligonukleotid 10pmol/µl (je 1µl forward und 1µl reverse)
- 1 µl Taq DNA Polymerase
- 1 µl genomische DNA (Konzentration 40-60 ng)
- add 25 µl ddH₂O

Die Reaktion wurde im Thermocycler wie folgt amplifiziert wobei Schritt 2 bis 4 in 35 Zyklen wiederholt wurde:

1. 95°C 3 Min.
2. 95°C 45 Sec.
Annealing Temperatur variabel
je nach Oligonukleotid (siehe Tabelle 1) 45 Sec.
4. 72°C 45 Sec.
5. 72°C 3 Min.

2.2.3. DNA Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA Fragmente nach der Größe erfolgt mittels Agarose – Gelelektrophorese. Durch Aufkochen der Agarose in 1x TAE Puffer in einer Konzentration von 2% wird diese gelöst. Nach kurzem Abkühlen wird Ethidiumbromid in einer Konzentration von 1% zugegeben und gemischt. Anschließend gießt man die noch flüssige Agarose in Horizontal–Gelkammern und läßt sie erkalten. Das PCR Produkt wird mit circa 1/5 Ladepuffer versetzt und aufgetragen. Für die Trennung der DNA Fragmente erfolgt der Lauf bei 80-120 Volt in 1x TAE Laufpuffer. Danach kann die DNA aufgrund des eingelagerten Ethidiumbromids mittels UV Licht sichtbar gemacht, fotografiert und anschließend das benötigte Fragment ausgeschnitten werden.

2.2.4. Isolierung der PCR Produkte

Nach der Trennung der DNA-Fragmente durch ein präparatives Agarosegel wird das DNA-Fragment unter UV-Licht mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Entsprechend der Anleitung des QIAquick® Gel Extraction Kit wird dieses dann in einem Reaktionsgefäß mit Puffer versetzt und bei 50°C 10 Min. inkubiert. Die hohe Salzkonzentration des Puffers sorgt für die Auflösung der Agarose Polymere und Dissoziation der DNA Fragmente. Nach Applikation auf eine Säule kann die DNA an die Membran der Säule binden, während überschüssige Reste aus dem PCR Ansatz nicht binden und nach der Zentrifugation verworfen werden. Die gebundene DNA wird anschließend mit einem speziellem Waschpuffer gereinigt und mittels ddH₂O eluiert.

Einige Proben wurden für die Sequenzierung nicht erst über ein präparatives Gel aufgearbeitet, sondern die PCR Produkte direkt über die Säule gereinigt. Dies konnte bei Proben mit wenig Überschuss von Oligonukleotid und sehr guter vorheriger Optimierung durchgeführt werden. Die Durchführung der Reinigung unterscheidet sich lediglich im ersten Schritt, da die Lösung des Agarosegels nicht erfolgen muss.

2.2.5. Sequenzierung der PCR Produkte

Das zur Sequenzierung von DNA verwendete "Big Dye™ Terminator Ready Reaction Kit" basiert auf der Methode nach Sanger (Sanger et al. 1977). Dabei wird die DNA vom Oligonukleotid ausgehend amplifiziert. Durch den Einbau von Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Didesoxynukleotiden (ddNTPs), denen eine Hydroxylgruppe an Position 3 der Deoxyribose fehlt kann keine Phosphodiester Bindung zustande kommen, was zu Kettenabbrüchen nach Einbau eines ddNTP's führt. Eine Verlängerung des wachsenden DNA Fragmentes ist nicht mehr möglich und es resultiert somit ein Mix aus unterschiedlich langen DNA Fragmenten. Das ursprüngliche Protokoll nach Sanger sah die Reaktion mit vier verschiedenen Ansätzen mit jeweils nur einem ddNTP (A,C,G,oder T) vor. Durch das verwendete Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit in Kombination mit dem ABI Sequencer ist es heute möglich alle vier ddNTPs in einer Reaktion zu verwenden.

Ein typischer Reaktionsansatz besteht aus:

4µl	Premix (ddNTPs, dNTPs, Puffer, und AmpliTaq DNA-Polymerase)
4µl	DNA (Konz. 100-200ng)
3µl	Oligonukleotid (2,5 pmol/µl)
10µl	ddH ₂ O

Die Reaktion im Thermocycler wurde mit

96°C 10 Sec.

56°C 5 Sec.

60°C 4 Min. und 25 Zyklen amplifiziert.

Für manche Proben wurde es nötig den PCR Ansatz zu variieren, da nicht jede Sequenzierung optimal verlief. So wurde für Proben die nicht vollständig bis zum 3`Ende sequenziert werden konnten mehr Oligonukleotid eingesetzt. Eine weitere Optimierung gelang durch die Annäherung der Schmelztemperatur des

Amplifikationszyklus der Sequenzierreaktion an die für die Herstellung der PCR Produkte verwendeten Temperaturen. Für einige Exons war es nötig *nested Primer* einzusetzen um den Sequenzstart lesen zu können. Dazu wurde ein größeres DNA Segment hergestellt, und anschließend für die Sequenzierreaktion der *nested Primer* eingesetzt, so konnte die Anfangssequenz optimal gelesen werden.

2.2.6. Aufarbeitung der Sequenzierreaktion für den ABI 310 Sequencer

Der Reaktionsansatz wird zunächst im Verhältnis 1:5 mit ddH₂O versetzt und gemischt. Dazu gibt man 10µl NaAcetat (3M, pH 4,6) und mischt erneut. Nach Zugabe des 2,5 fachen Volumens Ethanol (96%) wird 10 Min. in der Tischzentrifuge zentrifugiert und anschließend der Überstand dekantiert. Dies wird nochmals mit 70% Ethanol wiederholt und danach das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das getrocknete Pellet wird in Merck H₂O resuspendiert und in Sequenziercaps überführt. Durch die Aufarbeitung der Proben werden überschüssige ddNTPs abgetrennt, die sonst bei der Sequenzierung stören könnten.

2.2.7. Die Probenanalyse

Die Sequenzierungsprodukte werden im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer Sequencer analysiert. Dabei erfolgt eine Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mittels Argonlasers, sobald diese die Detektionseinheit passieren, die Sekundärstrahlung wird über einen Filter und einen Photomultiplier aufgezeichnet. Mittels der Analysesoftware wird daraus ein Chromatogramm erstellt, aus dem sich die Sequenzabfolge der analysierten DNA ablesen lässt.

2.2.8. Alignment der DNA Sequenzen

Die mit dem Sequenzierprogramm ermittelte Buchstabensequenz der DNA kann über den Internetzugriff auf die folgende Seite: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

mit der Referenzsequenz des *Human Genome Project* (2001) der GenBank verglichen werden. Das Programm ermittelt die Übereinstimmung sowie Zahl und Lokalisation von nicht übereinstimmenden Basen. Diese Stellen wurden dann anhand des Chromatogrammes nochmals durchgesehen und verglichen. Außerdem wurde jedes Chromatogramm auf Doppelgipfel geprüft, um vom Programm übersehene Polymorphismen zu finden.

2.2.9. Oligonukleotidsuche mittels Primer 3 Input

Für die Oligonukleotidsuche wurde die Annotation der zu untersuchenden Gene zu Grunde gelegt, die auf Grundlage der Ergebnisse des *Human Genome Projects* (2001) im Internet zur Verfügung steht. Um die geeigneten Oligonukleotide für die Herstellung der PCR Produkte und die Sequenzierung zu finden wurde das Programm *Primer 3 Input* benutzt (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3>).

Eingegeben wird die Sequenz der zu vervielfältigenden Region und der von den Oligonukleotiden zu erfassende Abschnitt markiert. Das Programm sucht diejenige Oligonukleotidsequenz mit den optimalen Eigenschaften für die Produktgröße, Nukleotidsequenz und Schmelztemperatur. Die Oligonukleotide wurden sämtlich von der Firma MWG-Biotech AG Deutschland bezogen.

2.2.10. Expand High Fidelity PCR System

Das System ist geeignet um DNA Fragmente einer Länge zwischen 5 und 12 Kilobasen zu vervielfältigen. Es wurde verwendet, um eine Lücke in der Sequenz des *TYRO3* Gens zu schließen, die zu Beginn dieser Arbeit noch nicht von den Arbeitsgruppen des *Human Genome Projekts* sequenziert war. Das Kit

enthält einen Enzymmix aus thermostabiler Taq DNA Polymerase und einer *Proofreading* Polymerase, PCR Puffer sowie MgCl₂ Stock Lösung.

Ein Ansatz besteht aus:

Mastermix 1:

8 µl	Nukleotidmix (je 2,5 mM)
6 µl	Oligonukleotid 10 pmol/µl (je 3µl forward und 3 reverse)
6 µl	genomische DNA (Konzentration 100 pmol/µl)
	add 50 µl ddH ₂ O

Mastermix 2:

10 µl	10x Expand PCR Puffer mit 15 mM MgCl ₂
0,75 µl	Expand High Fidelity Enzym Mix (2.6 Units)
	add 50 µl ddH ₂ O

Die Ansätze werden getrennt voneinander pipettiert und anschließend in ein gemeinsames Reaktionsgefäß überführt. Damit wird die vorzeitige Reaktion der Enzyme mit Oligonukleotiden oder DNA vor Zugabe der dNTPs verhindert, die möglicherweise zu einer Degeneration der DNA oder der Oligonukleotide führen könnte.

Die Reaktion wurde im Thermocycler wie folgt amplifiziert wobei Schritt 2 bis 4 in 30 Zyklen wiederholt wurde:

1. 94°C 33 Min.
2. 94°C 15 Sec.
3. 59°C 30 Sec.
4. 68°C 6 Min.
5. 68°C 2 Min.

3. Ergebnisse

3.1. Exon – Intron Übergänge

Voraussetzung für den Beginn der Arbeit stellte die Annotation der Gene *Cx36* und *TYRO3* auf der Grundlage der cDNA Sequenzen des *International Human*

Genome Sequence Consortiums dar. Für Cx36 lag die vollständige Sequenz der beiden Exons zum Zeitpunkt des Beginnes der Arbeit vor. Die Exon-Intron Übergänge sowie die Exonsequenz wurden wie unter 2.2.5 bis 2.2.7 beschrieben mittels eines ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer Sequencer sequenziert und ausgewertet. Die verwendete DNA wurde von zwei Patienten der Familie 11, sowie drei nicht an periodischer Katatonie leidender Kontrollpersonen gewonnen und die Ergebnisse mit den Einträgen des *International Human Genome Project* (UCSC GenomeBrowser: <http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?position=chr15>) verglichen.

Durch meine Untersuchungen konnten die Exon-Intron Übergänge mit den *Splice acceptor* sowie *Splice donor* Sequenzen für das Cx36-Gen bestätigt werden, diese sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Nr.	Exon-Sequenz	Splice donor	Splice acceptor	Nr.	Exon-Sequenz
			ggatgcacagcg	1	ATGGGGGAATGG..
1	...TATGATCGGGAG	gtaagg	tcctccgttcag	2	GATCCTGTTGAC...
2	...GCCTATGTGTGA				

Tabelle 3: Aufgeführt sind die Exon-Intron Übergänge für Cx36, gemäß den Referenz-Einträgen des UCSC Genome Browsers, Golden Path August 2001, Freeze.

Zu Beginn der Arbeit am *TYRO3*-Gen ergab sich die Schwierigkeit, dass die der Mutationsanalyse zu Grunde liegende cDNA NM_006293, Version 1, fehlerhaft war: So fand sich bei der Annotation der Sequenzabschnitt 1 bis 593 dieser cDNA-Version auf Chromosom 13, und erst die Nukleotidpositionen ab 756 auf Chromosom 15! Die Positionen 594 bis 755 ließen sich keinem Chromosom zuordnen. Die fehlerhafte cDNA-Version wurde inzwischen aus der GenBank

entfernt; der hier durchgeführten Mutationsanalyse liegt daher die Version 2 zu Grunde.

Eine weitere Schwierigkeit, insbesondere bei der Auswahl der Primer, ergab sich daraus, dass in der Version der Sequenz des Humangenoms vom 1. August 2001 (UCSC Genome Browser Golden Path, Freeze) das erste Exon wegen einer Sequenzlücke („gap“) zum Zeitpunkt des Beginns der Mutationsanalyse noch nicht annotiert war. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher versucht, diese Lücke mittels Long Range PCR zu schließen. Die PCR führte nicht zum Erfolg; wie sich später zeigte, lag dies an einem fehlerhaften Assembly der genomischen Klone in der Version des Genoms vom 1. August 2001. In späteren Aktualisierungen wurde der Fehler vom *International Human Genome Sequencing Consortium* (Lander et al., 2001) berichtigt, so dass schliesslich auch das erste Exon von *TYRO3* annotiert werden konnte.

Für die Mutationsanalyse wurde der Transkriptionsstartpunkt für das erste Exon mit Hilfe der mittels des BLAST-Programms gefundenen und am weitesten 5' lokalisierten cDNA-Klone aus den Datenbanken festgelegt (EST-Klone des Image-Konsortiums, Image 5264020 und Image 5815127, Genbank Accession Numbers BI551393 und BG701568; Abb. 5).

Die Tabelle 4 zeigt die vollständigen und korrigierten Exon-Intron Übergänge für das *TYRO3*-Gen.

Nr.	Exon-Sequenz	Splice donor	Splice acceptor	Nr	Exon-Sequenz
			gcgtcgccgccg	1	ATGGCGCTGAG...
1	...CGCCGCCGCAG	gtaggg	cccaccctcag	2	GTCTGAAGCTC...
2	...CGGCTTCCTCAG	gtgcag	ctgtttccacag	3	CCTGAAGTCAG...
3	...TCACGGTAGAAG	gtgagg	cttctctcctag	4	GTGTGCCATTT...
4	...TAAATGTAACAG	gtgagc	ttctggccccag	5	GGGTGACCCAG..
5	...TTCACCTTCAAG	gtagga	ccccgtccacag	6	CACTGCCTGCA..
6	...TGTACAGTTCAG	gtaggc	gcttttctgtag	7	GTGACACAGGC..

7	...CCAAGGGTCTAG	gtaagg	ttggctgcag	8	CCCCAGCCAGC..
8	...AATGGAACCCAG	gtaaga	tcctggctgcag	9	GATGAGCTGAC..
9	...ATGACCGTGCAG	gtgagg	tccctcccacag	10	GCCAGCAGGGC..
10	...GACGCGGTTTGG	gtaagg	gtttccttag	11	GCAAGCCTTTG...
11	...TCGAGGCCACAT	gtgagt	cttccccacag	12	TGGACAGCTTG...
12	...TGTTGGGCAAAG	gtatgt	attggtcctag	13	GAGAGTTTGGT...
13	...AGATGCTGAAAG	gtgagt	cccttctcctag	14	CTGACATCATT...
14	...CCAAACTTGTTG	gtgagc	ccctgtcccag	15	GGGTAAGCCTC...
15	...GAGAACCCTTT	gtgagt	tctgtccactag	16	AACCTACCCCT...
16	...TCGGAATTGCAT	gtacga	tgccccttag	17	GCTGGCAGAGA..
17	...CAGAGTGACGTG	gtgagc	ttctgtcccag	18	TGGGCGTTCGG..
18	...TATGGAGGACGT	gtgagt	tctccaccccag	19	GTATGATCTCA...
19	...AGTAGCTGTTAG				

Tabelle 4: Die Exon-Intron Übergänge für TYRO3 sind aufgeführt gemäß den Referenz-Einträgen des UCSC Genome Browsers, Golden Path Juli 2003, Freeze.

Auch für TYRO3 wurden die Exon-Intron-Übergänge wie beschrieben sequenziert und ausgewertet. Es zeigte sich, wie in Tabelle 6 (unter 3.3) aufgeführt, innerhalb der *splice acceptor* Sequenz von Exon 6 (IVS5+748) ein G/A Polymorphismus bei Patient 737 und Kontrolle A94. Zusätzlich wurde ein G/A Polymorphismus des *splice acceptors* von Exon 8 (IVS7+512), bei allen Patienten und Kontrollen nachgewiesen. Aufgrund der Tatsache, dass die Varianten Patienten und Kontrollen gleichermaßen betreffen, erscheint deren Beteiligung an der Krankheitsgenese wenig wahrscheinlich. Die Exon-Intron Übergänge der verbleibenden siebzehn Exons von TYRO3 konnten bestätigt werden.

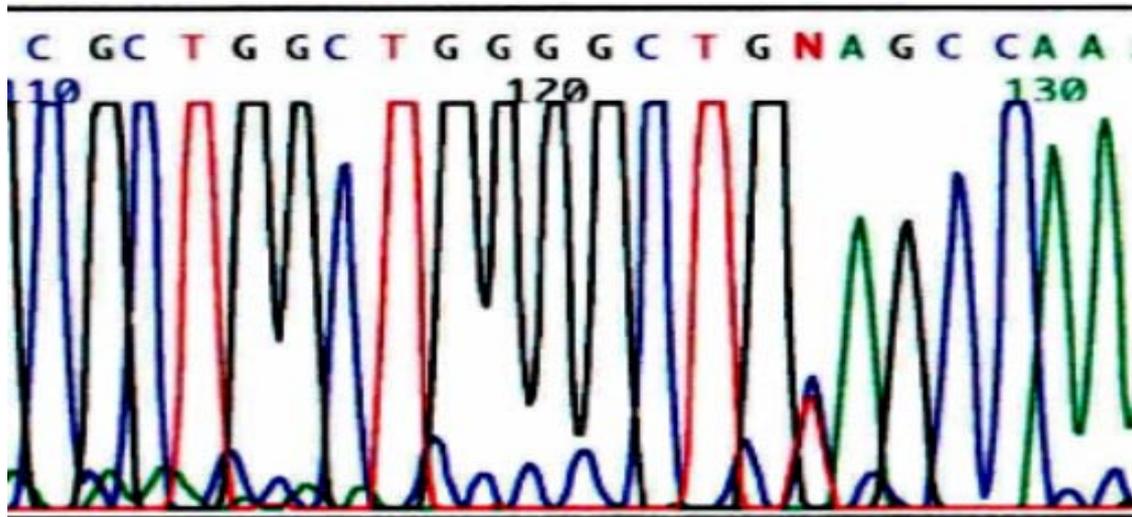


Abbildung 3: C/T-Polymorphismus des Splice acceptors von TYRO3 (IVS7) des Patienten 732.

3.2. Polymorphismen des CX36-Gens

SNP	Position, Typ	SNP rs. Nummer	Proband
tttt t/a aaaaa	5`regulatorische Region nt 3276272	—	Kontrolle A92 (A/T) Kontrolle A93 (T/T) Kontrolle A94 (T/T) Patient 737 (A/T) Patient 732 (A/T)
GGC ATC TCC/TCT CGC TTC 196Ser	Exon 2 nt 32761113 kodierend, synonym	rs3743123	Kontrolle A92 (T/C) Kontrolle A93 (T/C) Kontrolle A94 (C/C) Patient 737 (T/C) Patient 732 (C/C)
ATC TAT GAG/GAA ATT CGT 296Glu	Exon2 nt 32760813 kodierend synonym	—	Kontrolle A92 (G/G) Kontrolle A93 (G/A) Kontrolle A94 (G/G) Patient 737 (G/G) Patient 732 (G/G)

Tabelle 5: Polymorphismen und flankierende Sequenz von Cx36. Kodierende SNPs sind als Triplets dargestellt. Positionen gemäß UCSC Genome Browser,

Golden Path Juli 2003, Freeze. Aminosäureposition gemäß GenBank Accession Nummer XM_007605.

Aus DNA von zwei betroffenen Patienten der Familie 11, sowie drei Kontrollpersonen wurden der Promotor sowie die zwei Exons und Exon-Intron Übergänge vollständig wie bereits beschrieben sequenziert. Dafür wurden insgesamt 8 verschiedene Oligonukleotid-Paare verwendet (siehe Tab.1). Die Tabelle 5 zeigt die im kodierenden Bereich von Cx36 gefundenen Varianten mit zugehörigem Codon und Nukleotidposition. Codon 196 enthält den bei 2 Kontrollen und einem Patienten gefundenen Polymorphismus C/T. Ein weiterer SNP (G/A) im Codon 296 tritt bei einer der untersuchten Kontrollpersonen auf. Aufgrund der sogenannten Degeneration des genetischen Codes führt diese Änderung der Basensequenz nicht zu einem Austausch der Aminosäure im Protein. Mehrere Tripletvarianten können für den Einbau der gleichen Aminosäure in das Protein stehen, so werden die 20 Aminosäuren humaner Proteine nicht nur durch 20, sondern durch 61 Triplets kodiert. Es handelt sich daher bei den oben genannten Varianten um einen kodierenden synonymen Polymorphismus.

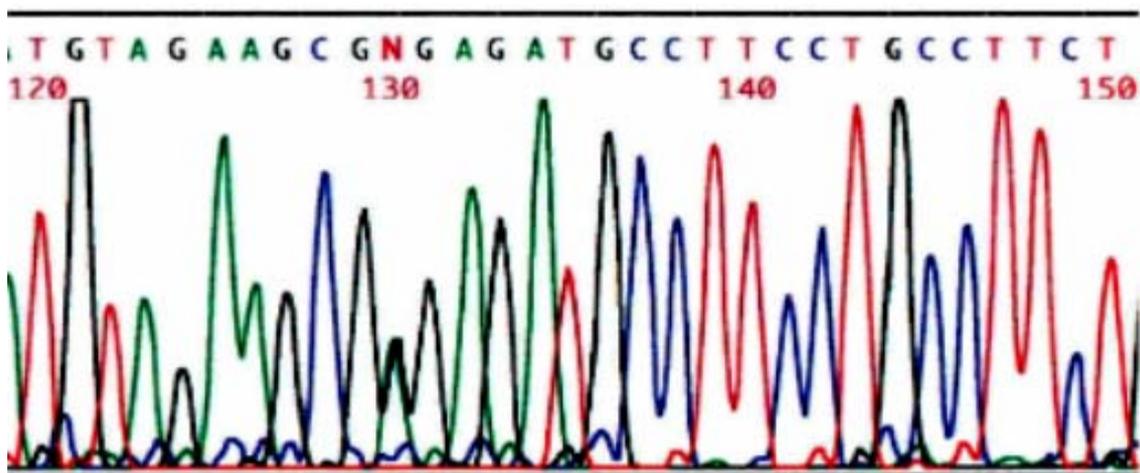


Abbildung 4: A/G-Polymorphismus im Exon 2 des Cx36-Gens bei Patient 737.

Im Bereich des mit der PROSCAN Software vorhergesagten Promotors (<http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/proscan>) siehe Abb. 4 unter 3.4. konnte ebenfalls ein Polymorphismus bei beiden Patienten sowie einer Kontrollperson festgestellt werden. Dieser A/T Polymorphismus liegt 127 Nukleotide in 5`Richtung vor dem Translationsstartpunkt (ATG Codon).

Keiner der Polymorphismen von Cx36 tritt ausschließlich bei den untersuchten Patienten auf, was die Beteiligung des Gens an der Genese der periodischen Katatonie wenig wahrscheinlich erscheinen läßt. Die nach Abschluß dieser Arbeit veröffentlichten Ergebnisse einer neuen Kopplungsanalyse (Stöber et al. 2002) ergab eine weitere Eingrenzung der zuvor zwischen den Markern D15S144 und D15S132 gelegenen Krankheitsregion auf Chromosom 15. Für eine der drei untersuchten Familien (Familie 9, Abb. 3) zeigten sich Rekombinationsereignisse zwischen den Markern D15S1042 und D15S1012, sowie D15S1044 und D15S659. Damit beschränkte sich die zu untersuchende Region jetzt auf 11 cM zwischen den Markern D15S1042 und D15S659. Durch eine weitere Studie innerhalb der Familie 9, die besagte Krankheitsregion zwischen den Markern D15S1042 und D15S182 unterstützt, konnte diese Region nochmals um 3.3 cM auf 7.7 cM verkleinert werden (Meyer et al. 2003). Nachdem Cx36 (zusammen mit weiteren Genen wie *KCC3*, *NOLA3*, *KIAA0855* etc., siehe Abbildung 4 unten) außerhalb dieses begrenzten Bereiches auf Chromosom 15 liegt, wurde das Gen durch die neuesten Ergebnisse dieser Kopplungsanalysen nun auch genetisch als krankheitsverursachend ausgeschlossen. Das zweite im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchte Gen, das für die Tyrosinkinase3 kodiert (*TYRO3*), liegt zwischen den Markern D15S1042 und D15S182, deshalb bleibt es auch nach den Ergebnissen der neuesten Kopplungsanalysen noch ein interessantes Kandidatengen.

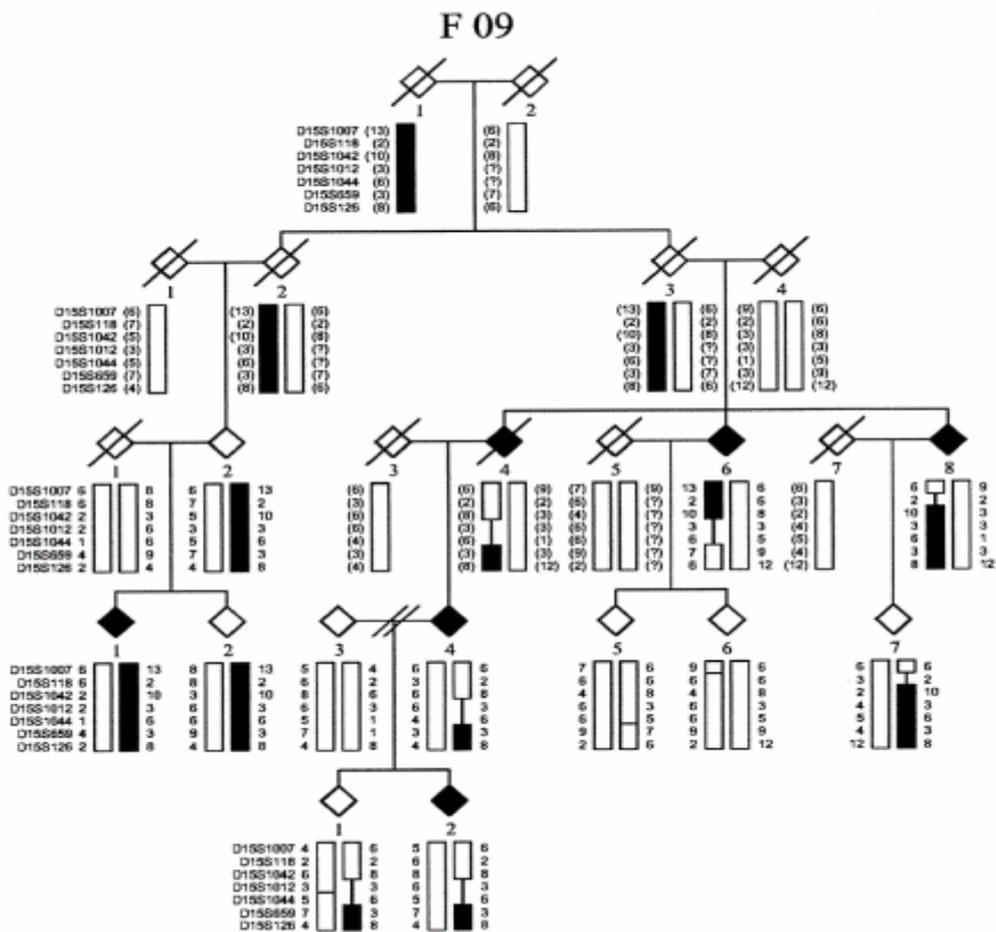


Abbildung 5: Stammbaum der Familie 09, die in 5 Generationen von periodischer Katatonie betroffen ist. Erkrankte Mitglieder sind als schwarze Raute und bereits verstorbene durchgestrichen dargestellt.

Chromosom 15

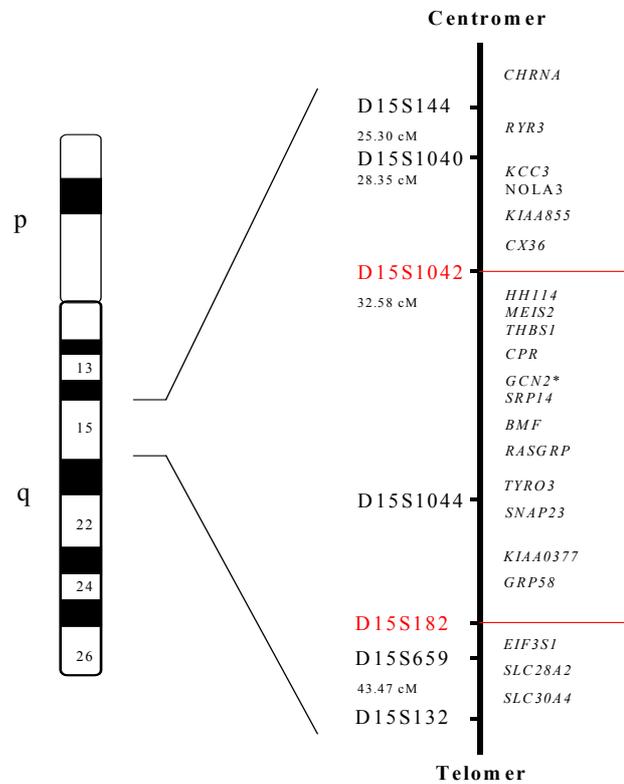


Abbildung 6: Schema des Chromosoms 15, mit einem genaueren Überblick über die innerhalb der Region 15q15 gelegenen Gene (kursiv) sowie der Marker (keine vollständige Darstellung der Gene und Marker). Der rot umrandete Bereich stellt die verbleibende Krankheitsregion nach den im Text erwähnten Kopplungsanalysen dar.

3.3. Polymorphismen des TYRO3 Gens

SNP	Position, Typ	SNP rs. Nummer	Proband	
CCA GGT	Exon6	—	Kontrolle A92	(C/T)
GCT/GCC	nt 39573358		Kontrolle A93	(C/T)
GAT GGC	kodierend,		Kontrolle A94	(T/T)
241 Ala	synonym		Patient 737	(T/T)
			Patient 732	(T/T)
GAA GTG	Exon8	—	Kontrolle A92	(T/T)
ATC/AAC	nt 39576546		Kontrolle A93	(T/T)
CCC GAG	kodierend,		Kontrolle A94	(T/A)
Ile 338 Asn	nicht synonym		Patient 737	(T/A)
			Patient 732	(T/T)
AGT GTC	Exon11	—	Kontrolle A92	(A/A)
ATG/GTG	nt 39578513		Kontrolle A93	(A/A)
GCC CGG	kodierend,		Kontrolle A94	(A/G)
Met 460 Val	nicht synonym		Patient 737	(A/A)
			Patient 732	(A/A)
cccc	IVS5+748	—	Kontrolle A92	(G/G)
g/a	nt 39573272		Kontrolle A93	(G/G)
tccacag	splice		Kontrolle A94	(G/A)
	acceptor		Patient 737	(G/A)
			Patient 732	(G/G)
cttggct	IVS7+512	—	Kontrolle A92	(G/A)
g/a	nt 39576567		Kontrolle A93	(G/A)
cag	splice		Kontrolle A94	(G/A)
	acceptor		Patient 737	(G/A)
			Patient 732	(G/A)
aag	IVS12+288	—	Kontrolle A92	(G/G)
g/a	nt 39579237		Kontrolle A93	(G/G)
ttgg			Kontrolle A94	(G/A)
			Patient 737	(G/A)
			Patient 732	(G/G)
ctc	IVS16+196	Rs2246444	Kontrolle A92	(C/T)
c/t	nt 39581544		Kontrolle A93	(C/T)
ctca			Kontrolle A94	(C/T)
			Patient 737	(C/T)
			Patient 732	(C/C)

Tabelle 6: Polymorphismen und flankierende Sequenz von *TYRO3*. Kodierende SNPs sind als Triplets dargestellt. Nucleotide (nt) und Intervening Sequenz (IVS, Intron) Positionen gemäß UCSC Genome Browser, Golden Path Juli 2003, Freeze. Aminosäureposition laut GenBan

Nachdem die anfänglichen Schwierigkeiten, die sich durch den fehlenden Sequenzabschnitt im Bereich des Exons 1 und der Promotorregion ergaben (siehe unter 3.1.), aus dem Wege geräumt waren, sollten alle Exons wie bereits beschrieben vergleichend sequenziert und ausgewertet werden. Die mittlerweile bekannte Sequenz des Exons 1 stellt einen hoch repetitiven, GC-reichen Abschnitt dar. Dies stellte die folgende Mutationsanalyse vor weitere Probleme, da zwar das entsprechende Segment mittels PCR amplifiziert werden konnte, es aber nicht gelang, diese zu sequenzieren. Als letzter Versuch wurden die gereinigten PCR-Produkte an die Firma MWG zur Sequenzierung in Auftrag gegeben. Da auch dies nicht zum Erfolg führte, liegt im Rahmen dieser Doktorarbeit keine Mutationsanalyse dieser offenkundig schwer zu sequenzierenden Region vor.

Die Exons zwei bis neunzehn sowie die Exon- Intron Übergänge von *TYRO3* konnten aus DNA von zwei betroffenen Patienten der Familie 11 (Abb. 2), sowie drei Kontrollpersonen vollständig sequenziert werden. Dafür wurden insgesamt 48 verschiedene Oligonukleotide benutzt.

Innerhalb der kodierenden Sequenz der Exons zwei bis neunzehn von *TYRO3* wurden zwei Polymorphismen gefunden (Exon 8: T/C und Exon 11: A/G), die nach Translation zu einem Austausch einer Aminosäure führen. Die Thymidin/Cytosin Variante innerhalb des Exons 8, die zu einem Einbau von Asparagin statt Isoleucin in das Protein führt, wurde bei einem Patienten sowie einer Kontrollperson festgestellt. Von dem Adenosin/Guanosin Polymorphismus und damit dem Austausch von Methionin gegen Valin im Exon 11 ist lediglich eine der gesunden Kontrollpersonen betroffen. Die bei zwei Kontrollen gefundene Variation Thymidin/Cytosin in Exon 6 führt nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins, es handelt sich dabei wiederum um einen kodierenden synonymen Polymorphismus. Es wurden weiterhin Varianten

der Intronsequenzen 12 (IVS12+288, nt 39579237) und 16 (IVS16+196, nt 39581544) festgestellt, bei denen es sich um Adenosin/Guanosin (IVS12) bzw. Thymin/Cytosin (IVS16) Polymorphismen handelt. Die Variante A/G wurde bei einer Kontrolle, sowie einem der untersuchten Patienten gefunden. Von der C/T Variante sind alle Kontrollen und ein Patient betroffen. Von den Varianten des *TYRO3*-Gens sind nie ausschließlich Patienten der Familie mit periodischer Katatonie betroffen. Dies läßt es unwahrscheinlich erscheinen, dass *TYRO3* an der Genese der periodischen Katatonie maßgeblich beteiligt ist. Aufgrund der Tatsache allerdings, dass ein Exon und der vorhergesagte Promotor nicht sequenziert werden konnten, bleibt die Möglichkeit offen, dass der krankheitsauslösende Defekt innerhalb einer der beiden Regionen liegt und nicht aufgedeckt wurde.

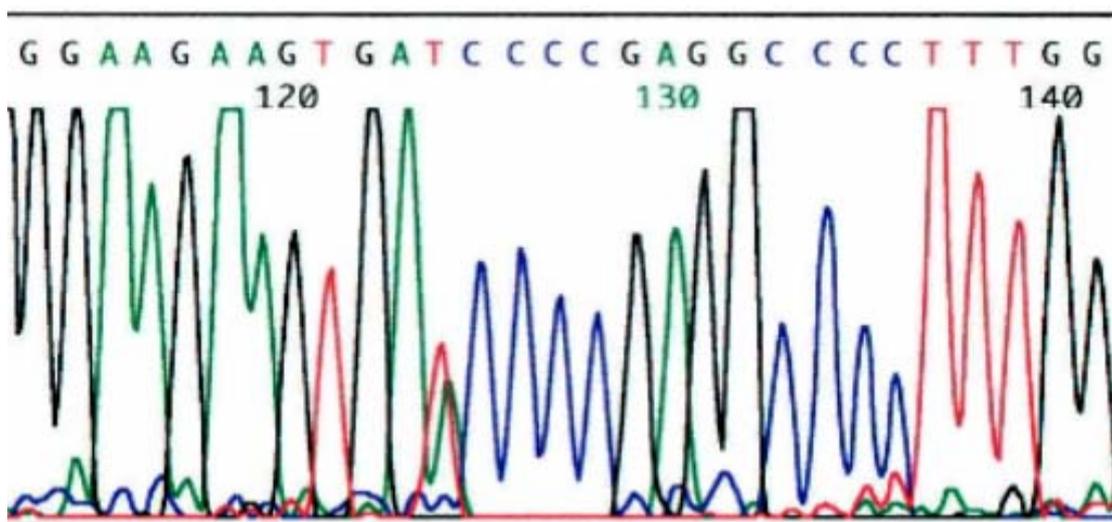


Abbildung 7: T/A Polymorphismus im Exon 8 des *TYRO3*-Gens bei Patient 737.

3.4. Promotoranalyse

Die Regulation der Genaktivität wird durch den Promotor gesteuert, der in 5'-Richtung vor dem Gen gelegen ist. In dieser Region existieren verschiedene Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, durch die eine Steuerung der Transkription möglich wird. Die Verteilung ist für jeden Promotor unterschiedlich

und einzigartig. Es wurden inzwischen mehrere hundert verschiedene Transkriptionsfaktoren beschrieben, wobei an dieser Stelle nur auf einige wenige eingegangen werden soll.

- Die TATA-Box (Consensussequenz TATAAAA, auch als Pribnow-Box bezeichnet) stellt eine AT-reiche Stelle dar und liegt etwa 25–30 Basenpaare in 5'-Richtung vor dem Transkriptionsstart. Die TATA-Box ist Bestandteil vieler eukaryotischer Promotoren und ist für die Aktivierung der RNA-Polymerase-II als sogenannter Initiationskomplex wichtig (Knippers 2001; Prestridge 1995; Roeder 1996; Rosenthal 1994).
- Die CAAT-Box (Consensussequenz GGCCAATCT) ist mit einem variablen Abstand von etwa 75 Nukleotiden vom Transkriptionsstart entfernt und kann als eine oder mehrere Kopien vorliegen (Knippers 2001; Dynan et al. 1985; Bucher et al. 1986).
- Das *large-T-antigen* (T-Ag) ist ein von Papovavirus SV40 kodiertes regulatorisches Phosphoprotein des viralen Zellzyklus. Bindungsstellen für das Protein werden auch in eukaryotischen Zellen gefunden. (Swenson et al. 1995)
- Die Bindungsstelle für das *specific protein 1* (SP-1, Consensussequenz GGGCGG), stellt eine GC-Box dar, an die das SP-1 Zink Finger Protein binden kann. SP-1 dient als Aktivator der Transkription. Die Sp-1 Bindungsstelle wird bei Promotoren verschiedener eukaryotischer Zellen mit oder ohne TATA box gefunden (Dynan et al. 1985, Briggs et al. 1986).
- Auch das *activation protein 2* (AP-2) bindet an GC-reiche Erkennungsstellen. Durch Bindung an palindromische DNA Sequenzen kommt es zur Dimerisierung des AP-2 Proteins. Die Konzentration von AP-2 ist in verschiedenen Entwicklungsstadien unterschiedlich und wird durch Retinolsäure reguliert (Williams et al. 1991)

Um Aussagen für die mögliche Promotorsequenz eines Gens zu machen kann auf den „Web Promotor Scan Service“ im Internet zugegriffen werden, der unter der Adresse:

<http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/proscan> verfügbar ist (Prestridge et al. 1995).

Die von diesem Programm gefundenen Promotoren und Signale für Cx36 und TYRO3 sind unten aufgeführt.

Für Cx36 vorhergesagter Promotor:

	Start ATG
1	agatcgtcggagaggttctaccaggtaagggg gtag cgacacgtaggcct
51	ccgtcgactgtttctgaccgctcgtggcccgtgcaagggcgagg accggg
	AP-2
101	<u>gaggggcccggcg</u> tgaacctctaccctcacttaacggagggttaattc
151	ttcgtaaaaaatttttaggagcttagggggaaaggaaaataacatgaa
	T-Ag
201	<u>tttctcttcttaccctttctttaggttcg</u> cgagggctggct <u>acccc</u>
251	<u>gtcaaccg</u> cgccagatctctctcccgtgcttgagcccgcggcaggcccc
	T-Ag, Sp1
301	aagcccagacctagggcgccctgcggccctgct <u>ccccgc</u> ccccaccg
351	tcggacgtccaggaggtcgcgagcgggcggtcctcttcagatcgcggc

Abbildung 8: Der für Cx36 vorhergesagte Promotor ist blau dargestellt, sowie schwarz die flankierenden Sequenzen. Die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen. Cx36 wird am Minus-Strang abgelesen, angegeben ist hier der Plus-Strang.

Für TYRO3 vorhergesagter Promotor:

```
1  tgggagtgtctagggggttgagggtgctctaagtcctgagaggggggatgc
                                     T-Ag
51  tggattctgggatcagagtcggaacaagagttgggggtgtggtgggggctg
101 acagcgggggtttgaggggaaggctctggagggctggggttagaaaagatgc
                                     Sp-1,T-Ag
151 cggagcggggttagggaaaggaggggcgtggccggggagcccatcctgga
                                     Sp-1
201 ggccaagccggatcctcaggttggccagggggcggctggggccggcgtg
      Sp-1, GCF           UCE.2
251 ccggcggggcgccggcggggccgcgggggttgcggcgctggctgggatt
                                     SDR_RS, Sp-1
301 cgcgctccgagccagtcgccggggctccgcggggggggcgggtgcgagctcg
351 ggctgcgggcgggcccgggaggaggcggcggctccgagaagaacatgaatc
401 agcggcggcgacggcggcgacggcagtggaaggagcgcggtggcgcggga
451 gcggccccggggaccccgcgctgctgacggcggcgaccgcggccggaggc
501 gggcgcgggtctcggaggcggctgcctcagcaccgccccacgggcggccc
551 cagcccctcccgcagccctcctccctcccgcctccctcccgcggcctcct
      Start ATG
601 gtcgccgccgatggcgctgaggcggagcatggggcggccggggctcccgc
```

Abbildung 9: Der für TYRO3 vorhergesagte Promotor ist blau dargestellt, sowie schwarz die flankierenden Sequenzen. Die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen.

3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Für das *Cx36*-Gen liegt eine vollständige Mutationsanalyse der zwei Exons sowie der Exon-Intron-Übergänge und des Promotors vor. Es wurden drei Polymorphismen innerhalb der Sequenzen gefunden, die nicht ausschließlich bei erkrankten Personen auftreten, sondern auch bei gesunden Kontrollen. Damit ist es wenig wahrscheinlich, dass Varianten des *Cx36*-Gens zur Krankheitsgenese der familiären, Chromosom 15-gebundenen Schizophrenie beitragen.

TYRO3 konnte nicht vollständig sequenziert werden und kann somit als Kandidatengen für die Krankheitsentstehung bisher nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es wurden innerhalb der Exon-Intron Übergänge sowie der kodierenden Region Polymorphismen gefunden, die unter anderem auch zum Austausch von Aminosäuren führen. Allerdings treten diese Varianten wiederum nicht ausschließlich bei Patienten auf und es ist anzunehmen, dass diese nicht zur Pathogenese der Erkrankung beitragen.

4. Diskussion

Die Aufklärung der Mechanismen, die zur Entstehung der Schizophrenie führen, ist trotz intensiver Forschung bislang nicht vollständig gelungen. Die 1953 von Böök aufgestellte Hypothese einer genetischen Ursache wurde inzwischen durch zahlreiche Familien- und Zwillingsstudien bestätigt. (Plomin et al. 1994; McGuffin et al. 1995; Riley et al. 2000). Aus der Gruppe der Schizophrenien wurde für die periodische Katatonie von Karl Leonhard postuliert, dass hier ein monogener Erbgang anzunehmen ist (Leonhard 1942). Ausgangspunkt für diese Doktorarbeit sind die Arbeiten der Gruppe Beckmann mit einer Familienstudie, in der die periodische und systematische Katatonie nach Leonhard im Hinblick auf deren Kumulation innerhalb betroffener Familien verglichen wurde. Es kristallisierte sich eine signifikante familiäre Häufung in der Gruppe der periodischen Katatonie heraus, was die Grundlage für die weiterhin folgende Kopplungsanalyse mit 12 untersuchten Familien war, deren Ergebnis Hinweise für Kopplung der periodischen Katatonie mit dem Genort auf Chromosom 15q15 lieferte (Beckmann et al. 1996; Stöber et al. 2000).

Auch von anderen Arbeitsgruppen wurde das Chromosom 15 im Zusammenhang mit komplexen Erkrankungen beschrieben, so von Turecki und Mitarbeitern, die ein unterschiedliches Ansprechen auf Lithium bei Patienten mit bipolarer Störung als Grundlage für genetische Untersuchungen verwendete. Als Hypothese nahm er für die beiden Gruppen: *Lithium responder* und *non responder*, eine Zugehörigkeit zu einer genetisch ähnlichen Gruppe an. Die genetische Analyse zeigte positive Kopplung mit dem Marker ACTC auf Chromosom 15q14 bei den *respondern*, nicht aber in der Gruppe der *non-responder* (Turecki et al. 2001). Auch einige Formen der schizophrenen Psychosen, wie z.B. der katatone Typus der Schizophrenien, werden nach DSM IV als bipolares Krankheitsbild beschrieben, das sich durch Positivsymptome wie Wahnphänomene und Halluzinationen, als auch Negativsymptome wie Affektverflachung und Alogie definiert. Die in dieser Arbeit betrachtete periodische Katatonie stellt nach Karl Leonhard eine Erkrankung mit zwei unterschiedlichen Polen dar, die er als akinetische und

hyperkinetische Pole bezeichnete und für die eine dem oben genannten Genort (15q14) benachbarte Krankheitsregion (15q15) nachgewiesen wurde. (Leonhard 1942; DSMIV 1996; Stöber et al. 2000).

In der Literatur sind weiterhin verschiedenste Studien im Zusammenhang mit Genen auf Chromosom 15 und deren mögliche Beteiligung an der Krankheitsgenese der Schizophrenie nachzulesen. So fanden Freedman und Mitarbeiter bei Schizophreniepatienten Kopplung eines Defektes der Antwort auf auditorische Stimuli mit dem Marker D15S1360, in der Nachbarschaft des *CHRNA7* Gens. Dieses liegt in unmittelbarer Nähe zu den in dieser Arbeit untersuchten Genen *Cx36* und *TYRO3*. Bestätigung dieses Ergebnisses brachte eine weitere Kopplungsanalyse mit zusätzlich untersuchten Familien (Freedman et al. 1997, 2001). Brien Riley betrachtete südafrikanische Bantu-Familien im Hinblick auf Kopplung des *CHRNA7* Markers mit der Schizophrenie-Erkrankung der Familienmitglieder und berichtete ebenfalls über positive Ergebnisse (Riley et al. 2000). Untersuchungen von Tsuang und Mitarbeitern an insgesamt 166 Familien mit unterschiedlicher Abstammung zeigten ebenfalls Hinweise für einen Genort auf Chromosom 15q14 innerhalb der Gruppe von Probanden mit europäisch-amerikanischer Abstammung, nicht aber derer mit afrikanisch-amerikanischer Herkunft (Tsuang et al. 2001). Der Ausschluß von *CHRNA7* erfolgte für die in Würzburg untersuchten Familien mit periodischer Katatonie im Rahmen einer weiteren Kopplungsanalyse, durch ein Rekombinationsereignis distal des Markers D15S144. Die nun verbleibende Region umfaßt nun noch einen Bereich von 20,3cM in dem etwa 60 Gene lokalisiert sind, unter anderem die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *Cx36* und *TYRO3* (Meyer et al. 2002).

Das *Cx36*-Gen ist in aktiver Form im menschlichen Gehirn zu finden und liegt innerhalb der oben genannten Region, distal des Markers D15S144 auf Chromosom 15. Die Gruppe der Connexine ist an der Myelinisierung von Axonen beteiligt. Wie schon in der Einleitung (unter 1.4.) erwähnt wurde, belegen Studien verschiedener Arbeitsgruppen den Zusammenhang von Dysregulation der Myelinisierung und Schizophrenie. Dies wurde sowohl postmortal durch immunologische Untersuchungen an Patientenmaterial

gezeigt als auch in vivo mittels Magnet Resonanz Tomographie im Vergleich zu gesunden Probanden (Flynn et al. 2003). Zu diesen Studien passend sind die Ergebnisse der Arbeitsgruppe Tkachev, die Aktivitäten von Genen in Oligodendrozyten oder den an der Myelinisierung beteiligten Genen untersuchten. Tkachev fand bei Patienten mit Schizophrenie sowie bipolarer Erkrankung verminderte Aktivität dieser Gene. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits von Hakak und Mitarbeitern veröffentlicht, der von Dysregulation myelinisierender Gene in Oligodendrozyten des präfrontalen Kortex sprach. Dort wies er verminderte Aktivität dieser Gene bei Schizophreniepatienten nach, im Gegensatz zu Proben von Gesunden, bei denen vermehrte Aktivität der gleichen Gene vorlag (Hakak et al. 2001; Tkachev et al. 2003).

Ein weiteres Gen, das im Rahmen von Demyelinisierungserkrankungen erwähnt wurde ist *MLC1* (*WKL1*, *KIAA0022*). Dieses Gen kodiert für ein membranständiges Protein mit hoher Aktivität im Gehirn, welches wahrscheinlich am Aufbau eines Kationenkanals beteiligt ist. Bei Patienten mit megaloenzephalischer Leukoenzephalopathie, einer Erkrankung, die mit subkortikalen Zysten einhergeht, wurden Mutationen dieses Gens gefunden. Diese Erkrankung ist durch Makrozephalie, schwere motorische Störungen wie Ataxie und Spastik, sowie geistigen Verfall gekennzeichnet. Das Gehirn weist innerhalb der weißen Substanz Vakuolenbildung zwischen den äußeren Schichten der Myelinlamellen auf (Leegwater et al. 2001; van der Knaap et al. 1995). Eine L309M Mutation des auf dem Chromosom 22q13.33 gelegenen *WKL1* wurde bei Patienten mit periodischer Katatonie innerhalb einer großen Familie nachgewiesen und als mögliche Ursache diskutiert. Dies ist vor dem Hintergrund der Ergebnisse des ersten *Genome Scans*, der als Resultat Hinweise für mögliche Kopplung auf dem Chromosom 22 zeigte, besonders interessant (Stöber et al. 2000; Meyer et al. 2001).

Die Hypothese, dass das hier untersuchte *Cx36* für die Krankheitsgenese der periodischen Katatonie verantwortlich sein kann, erscheint aufgrund der gerade genannten Untersuchungen als naheliegend. Es gehört der Connexin-Familie an, die an Myelinisierungsvorgängen beteiligt ist, welche nachweislich im Zusammenhang mit psychotischen Erkrankungen sowie motorischen Störungen

stehen. Daher sollte es durch die Mutationsanalyse bei Patienten mit periodischer Katatonie für die Krankheitsgenese bestätigt oder ausgeschlossen werden (Hakak et al. 2001; Tkachev et al. 2003; Menichella et al. 2003; Omori et al. 1996).

Mittels der durchgeführten Mutationsanalyse an Patienten- und Kontroll-DNA, konnte Cx36 allerdings als krankheitsverursachend ausgeschlossen werden, da wie im Ergebnisteil ausgeführt (unter 3.2. Polymorphismen im Cx36-Gen), keine relevanten Varianten des Gens ausschließlich innerhalb der Patienten DNA gefunden wurden. Dieses Ergebnis der Arbeit wurde nach Abschluss der praktischen Arbeit insofern bestätigt, als dass durch eine neue Kopplungsanalyse der genetische Ausschluß des Gens für die periodische Katatonie erfolgte (Stöber et al. 2002). Für die vier untersuchten Familien konnte Kopplung der periodischen Katatonie mit dem Genort auf Chromosom 15 bestätigt werden. Darüber hinaus zeigte sich für eine Familie (Familie 9), die über 5 Generationen hinweg 6 betroffene Mitglieder zählt, ein Rekombinationsereignis zwischen den Markern D15S1042 und D15S1012, sowie D15S1044 und D15S659. Damit beschränkte sich jetzt die zu untersuchende Region auf 11 cM zwischen den Markern D15S1042 und D15S659. Durch einen zusätzlich eingefügten Marker im Rahmen einer Kopplungsanalyse von Meyer und Mitarbeitern konnte diese Region allerdings noch weiter eingeschränkt werden, und zwar durch den weiter distal gelegenen Marker D15S182. Beide genannten Studien führen zum genetischen Ausschluss von Cx36, da dieses zwischen Marker D15S144 und D15S1042 lokalisiert ist. Weitere in dieser Region gelegene und im Gehirn aktive Gene wie *RYR3*, *KCC3* und *NOLA3* konnten durch diese Ergebnisse ebenfalls ausgeschlossen werden (Meyer et al. 2002, 2003).

Eine Kombination von Veränderungen der weißen Substanz mit Demenz und psychotischen Symptomen ist auch bei der polycystisch lipomembranösen Osteodysplasie mit sklerosierender Leukoencephalopathie (PLOS) zu finden. Interessant ist, dass eine „*loss of function Mutation*“ in einem Gen für das Tyrosinkinase-Bindungsprotein TYROBP zu der Erkrankung führt, das auf Chromosom 19q13.1 liegt. Bei erkrankten Patienten konnte die Deletion einer

Base gefunden werden, die zu einer Verschiebung des Leserasters führt (Paloneva et al. 2000; Meyer et al. 2002). PLOSL als sogenannte Myelinerkrankung ist also durch einen Gendefekt auf Chromosom 19 verursacht. Nun stellt sich die Frage, ob es eventuell ein verwandtes Gen auf Chromosom 15 gibt, das durch Mutation so verändert ist, dass es für die periodische Katatonie verantwortlich sein kann. Naheliegend ist hier eine Tyrosinkinase, wie die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte Tyrosinkinase3, als möglicher Bindungspartner für TYROBP. Das kodierende Gen liegt innerhalb der bereits erwähnten Region auf Chromosom 15, zwischen den Markern D15S1042 und D15S182, die nach den neuesten Kopplungsanalysen mit der Erkrankung assoziiert ist.

Allerdings konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Mutationsanalyse des *TYRO3*-Gens keine relevante Variante in der Sequenz aufgedeckt werden. Wie anhand der Tabelle 6 in Kapitel 3.3. zu sehen ist, wurden verschiedene Polymorphismen gefunden, die wie im Fall der Varianten im Exon 11 und 8 auch zu einem Austausch der Aminosäure im Protein führen. Diese wurden jedoch nicht ausschließlich in der untersuchten Patienten-DNA gefunden, sondern betreffen auch gesunde Kontrollpersonen, und die Wahrscheinlichkeit ihrer Beteiligung an der Pathogenese der periodischen Katatonie ist gering.

Andererseits ist *TYRO3* auch nach der hier durchgeführten Mutationsanalyse nicht vollständig als krankheitsverursachend ausgeschlossen, da ein Teil des Gens, Exon 1 und der Promotor, nicht sequenzierbar waren. Bevor das Gen also vollständig als nicht für die Pathogenese relevant angesehen werden kann ist es nötig, diese Region noch auf eventuelle Mutationen z.B. durch andere Versuchsansätze wie Klonierung und anschließende Sequenzierung zu untersuchen.

Bisher konnte durch Familienstudien und Kopplungsanalysen immer wieder die genetische Komponente der Erkrankung bestätigt werden, allerdings gelang es noch nicht ein verantwortliches Gen zu finden. Aufgrund des Fehlens eines nachgewiesenen Krankheitsgens stellen weitere denkbare

Pathogenesemechanismen für die periodische Katatonie eine Diskussionsgrundlage dar, mit daraus folgenden Untersuchungsansätzen.

Zum einen ist da die sogenannte Epigenetik zu erwähnen, womit Mechanismen die unmittelbaren Einfluß auf die Funktion von Genen haben bezeichnet werden. Einfluß hat z.B. Methylierung von DNA und damit einhergehend die Inaktivierung von Genen. Dieser Vorgang wird auch als *genomic imprinting* bezeichnet. Methyliert werden Cytosin Bausteine des Genoms, bevorzugt in GC-reichen Abschnitten (sog. *CpG Inseln*). Diese Regionen sind meist stromaufwärts von Genen gelegen, wie z.B. innerhalb der Promotorsequenz. Liegt Methylierung vor, so ist das entsprechende Gen inaktiv und umgekehrt. *KCC3*, ein im Gehirn aktives Gen, das für einen Kalium-Chlorid-Kotransporter kodiert, wurde ebenfalls im Rahmen einer Mutationsanalyse für Patienten mit periodischer Katatonie untersucht. Dabei zeigte sich innerhalb einer Familie eine DNA-Variante des Promotors, die einen Methylierungsvorgang möglich macht. Dieser Polymorphismus wird im Moment auf das Vorkommen bei erkrankten Personen weiter untersucht (Moser et al., in Vorbereitung). Nachdem bisher keine vollständige Analyse des im Rahmen dieser Arbeit betrachteten *TYRO3* vorliegt, besteht auch hier noch die Möglichkeit, dass eine Variante in den besagten GC-reichen Abschnitten des Gens, Methylierung und damit *Imprinting* möglich macht und somit für die Krankheitsgenese verantwortlich ist.

Chromosomales Imprinting wurde z.B. für die Entstehung von Erkrankungen wie dem Prader-Willi-Syndrom (MIM 176270) nachgewiesen, das neben einer ausgeprägten Muskelhypotonie mit zunehmender psychomotorischer Erntwicklungsverzögerung einhergeht. Auch das Angelmann-Syndrom, mit geistiger und motorischer Retardierung (MIM 105830), ist durch die fehlerhafte Gen Expression auf dem Chromosom 15 verursacht (Clayton-Smith 2003; Horsthemke et al. 1997). Methylierungsmechanismen sind auch an der Pathogenese des Rett-Syndroms beteiligt. Es tritt ausschließlich bei Mädchen auf und geht im ersten Lebensjahr mit einer Störung der Entwicklung bis hin zu schwerer geistiger Behinderung einher. Verantwortlich für die Erkrankung ist eine Mutation des auf dem X-Chromosom gelegenen Gens für das Methyl-CpG-

Bindeprotein2 (MeCP2), welches bei Ratten als auch Menschen ubiquitär, sowie in großen Mengen in Neuronen des Gehirns auftritt. Das Protein kann methylierte DNA binden und somit die Transkription beeinflussen. Bei Patienten mit Rett-Syndrom findet sich die Mutation meist in CpG Regionen (Skirmantas et al. 2003).

Schließlich sei noch erwähnt, dass die periodische Katatonie durch fehlerhaftes *splicing* bedingt sein könnte. Dies würde bedeuten, dass es durch solch einen Fehler zu der Verschiebung des DNA-Leserasters für die Translation kommen kann und damit zur Produktion eines fehlerhaften, nicht funktionstüchtigen Proteins. Ein bekanntes Beispiel einer unter anderem durch *splice*-Mutationen verursachte Erkrankung ist die Cystische Fibrose (syn. Mukoviszidose), bei der das für einen membranständigen Chloridkanal kodierende CFTR-Gen verschiedene Mutationen aufweist. Die Mutationen können entweder zur Bildung von eingeschränkt funktionsfähigen Chlorid-Kanälen, oder völligem Fehlen dieser Kanäle führen (MIM 219700; Kerem et al. 1997; Rosenstein et al. 1998). Auch innerhalb des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *TYRO3*-Gens wurden Varianten des *splice-acceptors* gefunden, die möglicherweise durch Beeinflussung des *splicing*-Mechanismus eine Bedeutung für die Pathogenese der periodischen Katatonie haben könnten. Als Einwand kann an dieser Stelle angebracht werden, dass beide *splice-acceptor*-Varianten von IVS12 und IVS16 sowohl bei Kontrollen, als auch Patienten gefunden wurden. Dem kann ein anderer Denkansatz, aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, entgegengesetzt werden. Dabei wäre von Interesse, ob eine der Varianten als Bestandteil einer Kopplungsgruppe überdurchschnittlich häufig zusammen mit der Erkrankung vererbt wird. Dieser als *linkage disequilibrium* bezeichnete Vorgang kann durch weitere Tests nachgewiesen werden. Das würde bedeuten, betroffene Familien im Hinblick auf die Bevorzugung eines der Allele bei erkrankten Nachkommen zu betrachten. Dies gilt sowohl für die Varianten des *splice acceptors*, als auch für die Patienten und Kontrollen gleichermaßen betreffenden SNPs der kodierenden Sequenzen von *TYRO3*. Für Patienten mit chronischer Schizophrenie (nach DSM-III-R) wurde inzwischen ein seltener Polymorphismus des *Synapsin III*, der in der Deletion einer

Phosphorylierungsstelle resultiert, gefunden. Im Rahmen einer Assoziationsstudie trat er häufiger bei Schizophreniepatienten als bei gesunden Probanden auf. *Synapsin III* spielt wie *TYRO3* eine Rolle in der neuronalen Entwicklung (Porton et al. 2004). Auch Assoziationsstudien als einfach durchzuführende Tests können weitere Informationen über die mittels der vorliegenden Mutationsanalyse gefundenen Polymorphismen erbringen, vor allem darüber, ob diese bei Patienten mit periodischer Katatonie häufiger zu finden sind.

5. Zusammenfassung

Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit waren klinische Studien der Arbeitsgruppe Beckmann, in der große Familien untersucht wurden, in denen über Generationen Mitglieder an Schizophrenie erkrankt sind. Für die von Karl Leonhard klassifizierte Form der periodischen Katatonie konnte eine signifikante familiäre Häufung bestätigt werden, die auch schon von Leonhard beobachtet wurde. Darauf aufbauende Kopplungsanalysen zeigten eindeutige Hinweise für die Assoziation der Erkrankung mit Genorten auf Chromosom 15 und 22. Mittels Feinkartierung durch polymorphe Marker konnte eine Eingrenzung der mit der Erkrankung assoziierten Region auf Chromosom 15q15 vorerst auf ca. 20 cM erfolgen. Aufgrund der zugrunde gelegten Hypothese eines monogenen Erbganges für die periodische Katatonie sollte der verursachende Gendefekt mittels Mutationsanalyse von in dieser Region gelegenen Genen auf Chromosom 15 aufgedeckt werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei im Gehirn aktive Gene untersucht, die innerhalb dieser genannten Region liegen. Das erste untersuchte Gen, *Cx36*, ist für die Kodierung eines Kanalproteins von Zell-Zell Verbindungen verantwortlich. Durch diese Arbeit konnte *Cx36* mittels Mutationsanalyse als krankheitsverursachend ausgeschlossen werden. Dieses Ergebniss der Arbeit konnte durch neue Kopplungsanalysen bestätigt werden, die zum genetischen Ausschluss von *Cx36* führten. Für das zweite untersuchte Gen (*TYRO3*), das für eine Rezeptor-Protein-Tyrosinkinase kodiert, konnte noch kein vollständiger Ausschluss durch

Mutatationsanalyse erfolgen, da ein Teil des Gens, Exon 1 und der Promotor, nicht sequenzierbar waren. Zum vollständigen Ausschluss von *TYRO3* sind weitere Versuche nötig. Auch wurde es im Gegensatz zu *Cx36* nicht durch Kopplungsanalysen genetisch ausgeschlossen, sondern liegt innerhalb der für die periodische Katatonie angenommenen Krankheitsregion. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit könnten die innerhalb der Sequenz des *TYRO3*-Gens gefundenen Polymorphismen durch Untersuchung eines größeren Patienten- und Kontrollkollektivs im Hinblick auf eine Überrepräsentation dieser Varianten bei Patienten mit periodischer Katatonie näher betrachtet werden.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau von Connexin36	7
Abbildung 2: Stammbaum der Familie 11, die in 4 Generationen von periodischer Katatonie betroffen ist. Erkrankte Mitglieder sind als schwarze Raute und bereits verstorbene Mitglieder durchgestrichen dargestellt.....	11
Abbildung 3: C/T-Polymorphismus des Splice acceptors von TYRO3 (IVS7) des Patienten 732.	27
Abbildung 4: A/G-Polymorphismus im Exon 2 des Cx36-Gens bei Patient 737.	28
Abbildung 5: Stammbaum der Familie 09, die in 5 Generationen von periodischer Katatonie betroffen ist. Erkrankte Mitglieder sind als schwarze Raute und bereits verstorbene durchgestrichen dargestellt.	30
Abbildung 6: Schema des Chromosoms 15, mit einem genaueren Überblick über die, innerhalb der Region 15q15 gelegenen Gene (kursiv), sowie der Marker (keine vollständige Darstellung der Gene und Marker). Der rot umrandete Bereich stellt die verbleibende Krankheitsregion nach den im Text erwähnten Kopplungsanalysen dar.	31
Abbildung 7: T/A Polymorphismus im Exon 8 des TYRO3-Gens bei Patient 737.	34
Abbildung 8: Der für Cx36 vorhergesagte Promotor ist blau dargestellt, sowie schwarz die flankierenden Sequenzen. Die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen. Cx36 wird am Minus-Strang abgelesen, angegeben ist hier der Plus-Strang.....	36
Abbildung 9: Der für TYRO3 vorhergesagte Promotor ist blau dargestellt, sowie schwarz die flankierenden Sequenzen. Die Bindungsstellen der Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen.....	37

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Darstellung der für CX36 verwendeten Oligonukleotide mit Sequenz, verwendeter Annealing Temperatur und resultierender PCR-Produktgröße. ... 12

Tabelle 2: Darstellung der für TYRO3 verwendeten Oligonukleotide mit Sequenz, verwendeter Annealing Temperatur und resultierender PCR-Produktgröße..... 15

Tabelle 3: Aufgeführt sind die Exon-Intron Übergänge für Cx36, gemäß den Referenz-Einträgen des UCSC Genome Browsers, Golden Path August 2001, Freeze. 24

Tabelle 4: Die Exon-Intron Übergänge für TYRO3 sind aufgeführt gemäß den Referenz-Einträgen des UCSC Genome Browsers, Golden Path Juli 2003, Freeze. 26

Tabelle 5: Polymorphismen und flankierende Sequenz von Cx36. Kodierende SNPs sind als Triplets dargestellt. Positionen gemäß UCSC Genome Browser, Golden Path Juli 2003, Freeze. Aminosäureposition gemäß GenBank Accession Nummer XM_007605. 27

Tabelle 6: Polymorphismen und flankierende Sequenz von TYRO3. Kodierende SNPs sind als Triplets dargestellt. Nucleotide (nt) und Intervening Sequenz (IVS, Intron) Positionen gemäß UCSC Genome Browser, Golden Path Juli 2003, Freeze. Aminosäureposition laut GenBan 33

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cM	centiMorgan
Cx36	Connexin 36
DSM	Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen
G	Guanosin
ICD	International Classification of Diseases
IVS	Intervening Sequence
PCR	Polymerase Chain Reaction
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
T	Thymidin
TYRO3	Tyrosinkinase 3

9. Literaturverzeichnis

Bassett A.S., Chow E.W.C, Weksberg, R.:

Chromosomal abnormalities and schizophrenia

Am. J. Med. Genet. 97: 45-51, (2000).

Beckmann H., Franzeck E.; Stöber, G. :

Genetic heterogeneity in catatonic schizophrenia: a family study.

Am. J. Med. Genet. 67: 289-300, (1996).

Belluardo N., Trovato-Salinaro A., Mudo G., Hurd Y.L., Condorelli D.F.:

Structure, Chromosomal Localization, and Brain Expression of Human Cx36 Gene

J. of Neurosci. Res. 57: 40-752 (1999).

Bennett M., :

Gap junctions as electrical synapses

J. of Neurocytology 26:349-366 (1997).

Bleuler, E.:

Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien

Handbuch der Psychiatrie, Spez. Teil 4. Deuticke Leipzig (1911)

Böök, J. A. :

Schizophrenia as a gene mutation.

Acta Genet. Vol.IV, No.2/3: 133-139 (1953).

Böök, J. A. :

A Genetic and neuropsychiatric investigation of a North – Swedish Population – with special regard to schizophrenia and mental deficiency

Acta Genet. Vol. IV. No.4. (1953).

Briggs M.R., Kadonaga J.T., Bell S.P., Tjian R.:

Purification and Biochemical Characterization of the Promotor Specific Transcription Factor Sp1

Science Vol. 234: 47-52 (1986)

Bucher P., Trifonov E.N.:

Compilation and analysis of eukaryotic POL II promoter sequences

Nuc. Acids Res. 14 (24): 10009-10026 (1986)

Casaubon, L.K., Melanson M., Lope-Cendes I., Marineau C., Andermann E., Andermann F., Weissenbach J., Prevost C., Bouchard J.P., Mathieu J., Rouleau G.A.:

The gene responsible for a severe form of peripheral neuropathy and agenesis of the Corpus callosum maps to chromosome 15q

Am J. Hum. Genet. 58: 28-34 (1996)

Chien A., Edgar D.B. Trela J.M.:

Deoxyribonucleic acid polymerase from the extremethermophile *Thermus aquaticus*.

J. of Bacteriology 127: 1550 (1976)

Clayton-Smith J.:

Genomic imprinting as a cause of disease.

Brit. Med. Journal 327: 1121-1122 (2003)

Condorelli D.F., Belluardo N., Trovato-Salinaro A., Mudo G., :

Expression of Cx36 in mammalian neurons

Brain Res. Rev 32: 72-85 (2000).

Deans M.R., Gibson J.R., Sellito C., Connors B.W., Paul D.L.:

Synchronous activity of inhibitory networks in neocortex requires electrical synapses containing connexin36

Neuron 16: 477-485 (2001)

Dilling H., Mombour W., Schmidt MH.:

Internationale Klassifikation psychischer Störungen (ICD 10 Kapitel V)

Klinisch- diagnostische Leitlinien

Hans Huber Verlag: 4. Auflage

Dynan W.S., Tjian R.:

Control of eukaryotic messenger RNA synthesis by sequence – specific DNA – binding proteins

Nature Vol. 316: 774 – 778 (1985)

Engelke D.R., Krikos A., Bruck M.E., Ginsburg D.:

Purification of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase Expressed in *Escherichia coli*

Analytical Biochemistry 191: 396-400 (1990)

Faraone S.V., Tsuang M.T., Tsuang D.W.:

Genetics of mental disorders. A Guide for Students, Clinicians and Researchers

The Guilford Press NY (1999)

Flynn S.W., Lang D.J., Mackay A.L., Goghari V., Vavasour I.M., Whittall K.P., Smith G.N., Arango V., Mann J.J., Dwork A.J., Falkai P., Honer W.G.:

Abnormalities of myelination in schizophrenia detected in vivo with MRI, and post mortem with analysis of oligodendrocyte proteins

Mol. Psych. 8 : 811-820 (2003)

Freedman R., Coon H., Worsley M.M., Orr-Urtreger A., Olincy A., Davis A., Polymeropoulos M., Holik J., Hopkins J., Hoff M., Rosenthal J., Waldo M.C., Reimherr F., Wender P., Yaw J., Young D.A., Breese C.R., Adams C., Patterson D., Adler L.E., Kruglyak L., Leonard S., Byerley W:

Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 587-592 (1997)

Freedman R., Leonard S., Gault J.M., Hopkins J., Cloninger C.R., Kaufmann C.A., Tsuang M.T., Farone S.V., Malaspina D., Svarikc D.M., Sanders A., Gejman P.:

Linkage Disequilibrium for Schizophrenia at the Chromosome 15q13-14 Locus of the α 7-Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Gene (*CHRNA7*)

Am. J. of Med. Gen. 105: 20-22 (2001)

Funakoshi H., Yonemasu T., Nakano T., Matumoto K., Nakamura T.:

Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons.

J. Neurosci. Res. 68(2): 150-60

Güldenagel M., Ammermiller J., Feigenspan A., Teubner B., Degen J., Söhl G., Willecke K., Weiler R.,

Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin 36.

J. of Neuroscience 21: 6036-6044 (2001)

Hakak Y., Walker J.R., Li C., Wong W.H., Davis K.L., Buxbaum J.D., Haroutinian V., Fienberg A.A.:

Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination – related genes in chronic schizophrenia.

Proc. Natl. Acad. Sci. 98: 4746-4751 (2001)

Hendrich B., Bickmore W.:

Human diseases with underlying defects in chromatin structure and modification.

Hum. Mol. Genetics 10: 22-2242 (2001)

Hennig W.:

Genetik

Springer Verlag 2. Auflage (1998)

Horsthemke B., Dittrich B., Buiting K.:

Imprinting Mutations on Human Chromosome 15

Hum. Mut. 10: 329-337 (1997)

Jablensky A.:

Schizophrenia: the epidemiological horizon

Schizophrenia: Blackwell science London (1999)

Kerem E., Rave Harel N., Augarten A., Madgar I., Nissim-Rafinia M., Yahav Y., Goshen R., Bentur L., Rivlin J., Aviram M., Genem A., Chiba-Falek O., Kraemer M.R., Simon A., Branski D., Kerem B.:

A cystic fibrosis transmembrane conductance regulator splice variant with partial penetrance associated with variable cystic fibrosis presentations

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 155 (6): 1914-1920 (1997).

Knippers R.:

Molekulare Genetik

Thieme Verlag 8. Auflage (2001)

Lai C.; Gore M., Lemke G.:

Structure, expression, and activity of Tyro 3, a neural adhesion-related receptor tyrosine kinase

Oncogene 9: 2567-2578 (1994)

Lai C., Lemke G.:

An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system

Neuron 6(5): 691-704 (1991)

Lander E.S.:

Initial sequencing and analysis of the human genome

Nature 409: 860-921 (2001)

Leegwater P.A.J., Quiang B., van der Stehen J., Mulders J., Könst A.M., Boor I., Mejaski-Bosnjak V., van der Maarel S.M., Frants R.R., Cees B.M., Oudejans B.M., Schutgens R., Pronk J.C., van der Knaap M.S.:

Mutations of *MLC1* (*KIAA0027*), encoding a putative membrane protein cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts

Am. J. Hum. Genetics 68: 831-838 (2001)

Leonhard, K.:

Classification of Endogenous Psychoses and their Differentiated Etiology.

New York: Springer-Verlag (2nd ed.) (1999)

Lesch KP., Stöber G., Balling U., Franzek E., Li SH., Ross CA., Newman M., Beckmann H., Riederer P.:

Triplet repeats in clinical subtypes of schizophrenia: variation at the DRPLA (B37 CAG repeat) locus is not associated with periodic catatonia

J. Neural Transmission 98 (Genetic Section): 153-157(1994)

Lewin B.:

Molekularbiologie der Gene

Spektrum Akad Verlag 6. Auflage (1998)

Maier W., Lichtermann D., Rietschel M., Held T., Falkai P., Wagner M., Schwab S.,

Genetik schizophrener Störungen – Neuere Konzepte und Befunde

Nervenarzt 70: 955 – 969 (1999).

Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.:

Molecular cloning – A laboratory manual

Cold Spring Harbor Laboratory Press 2nd edition (1989)

McGuffin P., Owen M.J., Farmer A.E.:

Genetic basis of schizophrenia

The Lancet 346: 678- 682 (1995)

Menichella D.M., Goodenough D.A., Sirkowski E., Scherer S.S., Paul D.L.:

Connexins are critical for normal myelination in the CNS

J. Neurosci. 13: 5963- 5973 (2003)

Meyer J., Huberth A., Ortega G., Syagailo Y.V., Jatzke S., Mössner R., Strom T.M., Ulzheimer-Teuber I., Stöber G., Schmitt A., Lesch KP.:

A missense mutation in a novel gene encoding a putative cation channel is associated with catatonic schizophrenia in a large pedigree

Molecular Psychiatry 6: 302-306 (2001)

Meyer J., Ortega G., Schraut K., Nürnberg G., Rüschenndorf F., Saar K., Mössner R., Wienker TF., Reis A., Stöber G., Lesch KP.:

Exclusion of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene as a candidate for catatonic schizophrenia in a large family supporting the chromosome 15q13-22 locus

Molecular Psychiatry 7: 220-223 (2002)

Meyer J., Schraut K., Johannssen K., Ortega G., Reif A., Lesch KP.:

Positional cloning of schizophrenia-related genes on chromosome 15q14-15

American Journal of medical Genetics 114: 860 (2002)

Meyer J., Rüschenndorf F., Lesch KP.:

A second large family with catatonic schizophrenia supports the region distally of CHRNA7 on chromosome 15q14-15

Molecular Psychiatry 8: 259-260 (2003)

Meyer J., Mai M., Ortega G., Mössner R., Lesch K.P.:

Mutational analysis of the connexin 36 gene (CX 36) and exclusion of the coding sequence as a candidate region for catatonic schizophrenia in a large pedigree.

Schizophrenia Research 58 (1): 87-91 (2002)

Meyer J., Scherer S.J., Mössner R., Lesch K.P.:

Reply concerning KIAA0027 (WKL1, MLC1) and psychosis: white matters

Molecular Psychiatry 7: 1037-1038 (2002)

Neves-Pereira M., Basset A.S., Honer W.G., Lang D., King N.A., Kennedy J.L.:

No Evidence for Linkage of the CHRNA7 Gene Region in Canadian Schizophrenia Families

Am. J. Med. Gen. (Neuropsych. Gen.) 81: 361-363 (1998)

Omori Y., Mesnil M., Yamasaki H.:

Charcot Marie Tooth disease patients: functional defects and dominant negative effects.

Molec. Biol. Cell 7: 907-916n (1996)

Paloneva J., Kestilä M., Wu J., Salminen A., Böhling T., Ruotsalainen V., Hakola P., Bakker A.B.H., Phillips J.H., Pekkarinen P., Lainer L.L., Timonen T., Peltonen L.:

Loss of function mutations in *TYROBP (DAP12)* result in a presenile dementia with bone cysts.

Nature Genetics 25: 357-361 (2000)

Pfuhmann, P.; Stöber, G.:

The different conceptions of catatonia: historical overview and critical discussion

Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 251:Suppl. I/4-I/7 (2001)

Plomin R., DeFries J.C., McClearn G.E.:

Behavioral Genetics. A Primer

W.H. Freeman and Company N.Y. 2nd Edition (1990)

Plomin R., Owen J., McGuffin P.:

The genetic basis of complex human behaviors

Science 264: 1733- 1739 (1994)

Poek K., Hacke W.:

Neurologie

Springer Verlag 11. Auflage (2001)

Polvi, A.; Armstrong, E.; Lai, C.; Lemke, G.; Huebner, K.; Spritz, R. A.; Guida, L. C.; Nicholls, R. D.; Alitalo, K. :

The human TYRO3 gene and pseudogene are located in chromosome 15q14-q25.

Gene 134: 289-293 (1993)

Porton B., Ferreira A., DeLisi L.E., Kao H-T.:

A rare polymorphism affects a mitogen-activated protein kinase site in Synapsin III: Possible relationship to Schizophrenia

Biol. Psychiatry 55: 118-125 (2004)

Prestridge D.S.:

Predicting Pol II Promotor Sequences using Transcription Factor Binding Sites

J. of Molecular Biology 249: 923 – 932 (1995)

Prieto, A.;Weber, J.L. ; Tracy, S.; Heeb, M.J.; Lai, C. :

Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system

Brain Research 816: 646-661 (1999).

Prieto, A.;Weber, J.L.;Lai, C. :

Expression of the Receptor Protein-Tyrosine Kinases Tyro-3 Axl, and Mer in the developing rat central nervous system

The Journal of Comparative Neurology 425: 295-314(2000).

Propping P.:

Psychiatrische Genetik – Befunde und Konzepte

Springer Verlag (1989)

Propping P., Nöthen M.M., Körner J., Rietschel M., Maier W.,

Assoziationsuntersuchungen bei psychiatrischen Erkrankungen

Nervenarzt 65: 725 – 740 (1994)

Qingxian L., Gore M., Qing Z., Camenisch T., Boast S., Casagrande F., Lai C., Skinner M.K., Klein R., Marsushima G.K., Earp H.S., Goff S.P. Lemke G.:

Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis

Nature 298: 723 – 728 (1999)

Rash, J.E., Yamsumura, T., Dudeck, F.E., Nagy, J.I. :

Cell-Specific Expression of Connexins and Evidence of Restricted Gap Junctional Coupling between Glial Cells and between Neurons

The J. of Neurosc. 21(6): 1983-2000 (2001).

Rash, J.E., Staines, W.A., Yamsumura, T., Patel, D., Furman C.S., Stelmack G.L., Nagy, J.I. :

Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin 36 but not connexin 32 or connexin 43

Proc. Natl. Acad. Sci. 20: 7573-8 (2000)

Richard, I.; Broux, O.; Chiannikulchai, N.; Fougerousse, F.; Allamand, V.; Bourg, N.; Brenguier, L.; Devaud, C.; Pasturaud, P.; Roudaut, C.; Lorenzo, F.; Sebastiani-Kabatchis, C.; Schultz, R. A.; Polymeropoulos, M. H.; Gyapay, G.; Auffray, C.; Beckmann, J. S. :

Regional localization of human chromosome 15 loci.

Genomics 23: 619-627, 1994.

Riley B.P., Makoff A., Mogudi-Carter M., Jenkins T., Williamson R., Collier D., Murray R.:

Haplotype transmission disequilibrium and evidence for linkage of the *CHRNA7* gene region to schizophrenia in Southern African Bantu families.

Am. J. Med. Genet. 96: 196-201 (2000)

Riley B.P., McGuffin R.:

Linkage and Associated Studies of Schizophrenia

Am. J. Med. Genet. 97: 23-44 (2000)

Roeder R.G.:

The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II

Trends in Biochem. Sci. 21: 327-335 (1996)

Rosenstein B.J., Zeitlin P.L.:

Cystic fibrosis

Lancet 351: 277-282 (1998)

Rosenthal N.:

Regulation of gene expression

N. Engl. J. of Medicine 331(4): 931-933 (1994)

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.:

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors

Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 5463 (1977)

Saß H., Wittchen H.U., Zudig M.,

DSMIV – Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen

Hogrefe Verlag (1996)

Skirmantas., Bird A.:

DNA Methylation and Rett Syndrome

Hum. Mol. Gen. 12 (Suppl. 2): 221-227 (2003)

Stöber, G.; Franzek, E.; Lesch, K. P.; Beckmann, H. :

Periodic catatonia: a schizophrenic subtype with major gene effect and anticipation.

Eur. Arch. Psychiat. Clin. Neurosci. 245: 135-141, 1995

Stöber, G.; Saar, K.; Rüschen-dorf, F.; Meyer, J.; Nürnberg, G.; Jatzke, S.; Franzek, E.; Reis, A.; Lesch, K.-P.; Wienker, T. F.; Beckmann, H. :

Splitting schizophrenia: periodic catatonia-susceptibility locus on chromosome 15q15.

Am. J. Hum. Genet. 67: 1201-1207, 2000.

Stöber, G.; Meyer, J.; Indrajit, N., Wienker, T. F.; Saar, K.; Jatzke, S.; Schmid, M.; Lesch, K.-P.; Beckmann, H. :

hKCNN3 which maps to chromosome 1q21 is not the causative gene in periodic catatonia, a familial subtype of schizophrenia.

Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 250: 163-168, 2000

Stöber G.:

Genetic predisposition and environmental causes in periodic and systematic catatonia

Eur.Arch. Psychiatry Clin.Neurosci. 251: Suppl.1, I/21-I/24 (2001)

Stöber G., Sellow D., Rüschemdorf F., Ekici A., Beckmann H., Reis A.:

Periodic catatonia: confirmation of linkage to chromosome 15 and further evidence for genetic heterogeneity

Hum. Genet. 111: 323-330 (2002)

Swenson J.J., Frisque R.J.

Biochemical Characterization and Localization of JC Virus Large T Antigen Phosphorylation Domains

Virology Vol. 212: 437-446 (1979)

Teubner B., Degen J., Söhl G., Güldenagel M., Bukauskas F.F., Trexler E.B., Verselis V.K., De zeeuw C.I., Lee C.G., Kozak C.A., Petrasch-Parwez E., Dermietzel R., Willecke K.:

Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for neuron-specific gap junctional protein

J. Membr. Biol. 176: 249-262 (2000)

Tkachev D., Mimmack M:L., Ryan M.M., Wayland M., Freeman T., Jones P.B., Starkey M., Webster M.J., Yolken R.H., Bahn S.:

Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder

The Lancet 362: 798-805 (2003)

Tsuang D.W., Skol A.D., Faraone S.V., Bingham S., Young K.A., Prabhudesai S., Haverstock S.L. Mena F., Menon A.S., Bisset D., Papple J., Sauter F., Balswin C., Weiss D., Collins J., Boehnke M., Schellenberg G.D., Tsuang M.T.:
Examination of Genetic Linkage of Chromosome 15 to Schizophrenia in a Large Veterans Affairs. Cooperative Study Sample
Am. J. Med. Genet. 105: 662-668 (2001)

Turecki G., Grof P., Grof E., D'Souza V., Lebuis L., Cavazzoni P., Duffy A., Bétard C., Zvolsky P., Robertson C., Brewer C., Hudson T.J., Rouleau G.A., Alda M.:
Mapping susceptibility genes for bipolar disorder: a pharmacogenetic approach based on excellent response to lithium
Mol. Psychiatry 6: 670-578 (2001)

van der Knaap, M. S.; Barth, P. G.; Stroink, H.; van Nieuwenhuizen, O.; Arts, W. F. M.; Hoogenraad, F.; Valk, J. :
Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children.
Ann. Neurol. 37: 324-334 (1995)

Williams T., Tijan R.:
Characterization of a Dimerization Motif in AP-2 and its Function in heterologous DNA-Binding proteins
Science Vol. 251: 1067-1071 (1991)

Williams T., Tijan R.:
Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2
Genes & Development 5: 670-682 (1991)

Danksagung

Danke an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Professor Lesch, vor allem an Gabriela Ortega für die Unterstützung bei allen Fragen im Labor. Ebenfalls Prof. Dr. Jobst Meyer und Prof. Dr. Lesch für die Betreuung, sowohl während des experimentellen Teils, als auch bei der Niederschrift dieser Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums bedanken.

Lebenslauf

Name: Marion Mai

Geburtsdatum: 04.02.1970

Geburtsort: Werneck

Gegenwärtige Tätigkeit: seit 09/2004 Assistentin an der Frauenklinik der Universität Münster

Studium: Studium der Humanmedizin
Julius-Maximilians-Universität
Würzburg
SS 1998 – WS 2003/04

Promotion: 05/2001 – 05/2002 Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
Universität Würzburg

Berufstätigkeit: 05/1992 – 02/1998
als medizinisch technische Assistentin
Universität Würzburg

Ausbildung: 11/1989 – 10/1991
Staatliche Berufsfachschule für Assistenten in der Medizin / Erlangen

Schulbildung: 09/1980 - 07/1989
Olympia-Morata-Gymnasium
in Schweinfurt
09/1976 – 07/ 1980
Grundschule Üchtelhausen

Münster, den 01.07.2005