

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

**Mutationsanalyse der Gene  
KIAA0027/MLC1 und KIAA0767/DIP  
als Kandidatengene  
für die periodische Katatonie**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Bernd Kohlmann  
aus Neumarkt i. d. OPf.**

**Würzburg, Dezember 2008**

**Referent: Professor Dr. med. Gerald Stöber**

**Koreferent: Professor Dr. med. Andreas Warnke**

**Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 20. März 2009**

**Der Promovend ist Arzt**

## Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	1
1.1. Konzepte der „Schizophrenie“ in der Entwicklung	1
1.2. Entwicklung einer differenzierten Diagnostik bei Wernicke, Kleist und Leonhard	3
1.3. Übersicht über die differenzierte Diagnostik der endogenen Psychosen bei Leonhard	4
1.4. Katatonie in internationaler Sichtweise	5
1.5. Die periodische Katatonie als Unterform der unsystematischen Schizophrenien	7
1.6. Familiengenetische Befunde zur periodischen Katatonie	8
1.7. Molekulargenetische Befunde zur periodischen Katatonie	9
1.8. Chromosom 22q und schizophrene Psychosen	12
1.9. Das Kandidatengen KIAA0027/MLC1	13
1.10. Megalenzephalale Leukoenzephalopathie	15
1.11. Das Kandidatengen KIAA0767/DIP	16
2. Ziel der Arbeit	18
3. Patienten und Methodik	19
3.1. Patienten mit Megalenzephalaler Leukoenzephalopathie	19
3.2. Patienten mit periodischer Katatonie	19
3.3. Blutspendekontrollen	20
3.4. Methoden	20
3.4.1. Exon-Intron-Strukturen von KIAA0027/MLC1 und KIAA0767/DIP	20
3.4.2. Primererstellung	21
3.4.3. Polymerase-Ketten-Reaktion	21
3.4.4. Gelelektrophorese	22

3.4.5.	Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie	22
3.4.6.	Automatisierte Sequenzierung	25
3.4.6.1.	Cycle Sequencing	25
3.4.6.2.	Sequenzlesevorgang	25
3.4.7.	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse	26
4.	Ergebnisse	28
4.1.	KIAA0027/MLC1: Mutationen bei Patienten mit Megalenzephaler Leukoenzephalopathie	28
4.2.	KIAA0027/MLC1: Sequenzvariationen bei Patienten mit periodischer Katatonie	29
4.2.1.	Detektion	29
4.2.2.	Art der allelischen Varianten	30
4.2.3.	Frequenz	30
4.3.	KIAA0767/DIP: SNPs bei drei Familien mit periodischer Katatonie	32
5.	Diskussion	36
5.1.	Allelische Heterogenität bei Megalenzephaler Leukoenzephalopathie	36
5.2.	Bewertung der KIAA0027/MLC1-Sequenzvariationen bei periodischer Katatonie	38
5.3.	Genetische Varianten von KIAA0767/DIP bei den drei Familien mit periodischer Katatonie	42
6.	Zusammenfassung	44
7.	Anhang	45
7.1.	Exon-Intron-Strukturen von KIAA0027/MLC1 und KIAA0767/DIP	45

7.2. Material	47
7.2.1 Tabellen mit Primern	47
7.2.2. Enzyme und molekularbiologische Kits	49
7.2.3. Reagenzien und Chemikalien	49
7.2.4. Apparate	50
7.2.5. PC-Programme	51
7.2.6. Lösungen und Puffer	52
7.3. Abkürzungsverzeichnis	53
7.4. Literaturverzeichnis	56

## 1. Einleitung

### 1.1. Konzepte der „Schizophrenie“ in der Entwicklung

Unsere heutige naturwissenschaftliche Psychiatrie mit ihrem Krankheitskonzept auf der Grundlage einer pathologisch veränderten Physiologie des zerebralen Stoffwechsels stellt in der Geschichte der Medizin ein relativ neues Fachgebiet dar.

Mit dem Phänomen, dass psychische Erkrankungen in manchen Familien gehäuft und über mehrere Generationen hinweg auftraten, beschäftigte sich der französische Psychiater Benedict Augustin Morel (1809-1873). Er übte auf die Psychiatrie seiner Zeit mit seiner auch religiös geprägten These, psychische und somatische Pathologien seien Degenerationen bzw. Entartungen, welche sich über die Generationen vererben und verstärken würden, großen Einfluss aus (Morel 1857).

Valentin Magnan (1835-1912) verknüpfte die Lehre Darwins mit der Degenerationsthese und klammerte religiöse Vorstellungen aus. Seine Erkenntnisse begründeten sich auf Forschungen bei Alkoholkranken (Magnan 1871).

Als einer der Begründer der modernen naturwissenschaftlichen Psychiatrie gilt der deutsche Psychiater Wilhelm Griesinger (1817-1868), der den Begriff der „Einheitspsychose“ verwendete - er sah die verschiedenen Symptome psychischer Erkrankungen als Ausdruck unterschiedlicher Stadien einer „Einheitspsychose“ - und seelische Erkrankungen als Gehirnerkrankungen bezeichnete (Griesinger 1845).

Karl Ludwig Kahlbaum (1828-1899) beobachtete, dass gleichartige klinische Krankheitsbilder nicht notwendigerweise auch die gleiche Ätiologie und den gleichen Krankheitsverlauf aufzeigen, und unterschied als erster zwischen organischen und nicht-organischen Ursachen. Er stellte Überlegungen zur nosologischen Ordnung und zu syndromalen Beschreibungen psychiatrischer Erkrankungen an und prägte Begriffe wie Paraphrenie, Dysthymie, Cyclothymie, Hebephrenie und Katatonie, die bis heute verwendet werden (Kahlbaum 1863, Bräunig et Krüger 1999).

Auf Kahlbaums Forschungen bezieht sich auch Emil Kraepelin (1856-1926). Als sich in klinischen Untersuchungen Griesingers Theorie einer Einheitspsychose nicht bestätigen ließ, beschrieb er seine Theorie der Krankheitseinheiten, welchen nicht eindeutige Symptome und Syndrome zuzuordnen seien. Er stellte anhand hunderter Krankengeschichten Verlaufsbeobachtungen an mit dem Ziel, charakteristische Symptome zu finden, und entwickelte sein bipolares Modell der endogenen Psychosen, wobei er zwischen der Dementia praecox - hiermit bezeichnete er eine zunehmende ungleichmäßige und sprunghafte Verschlechterung von Geistesfunktionen - und dem manisch-depressiven Irresein unterschied (Kraepelin 1893). Damit zog er erstmals eine Trennlinie zwischen den Störungen aus dem schizophrenen und dem affektiven Formenkreis. Insgesamt hatte Kraepelin also den Längsverlauf psychiatrischer Erkrankungen im Fokus seiner Studien und beschrieb mit der Dementia praecox sehr treffend das zunehmende Residualsyndrom chronischer schizophrener Psychosen.

Der Schweizer Psychiater Eugen Bleuler (1857-1939) betrachtete unter dem Einfluss der Psychoanalyse „Psychose“ als Ausdruck der Spaltung der psychischen Funktionen. Er konzentrierte sich im Gegensatz zu Kraepelin in seinen Forschungen auf das Querschnittsbild psychiatrischer Erkrankungen und sprach aufgrund der klinischen Beobachtung von großen Unterschieden in der Symptomatik der individuellen Erkrankungen und Erscheinungsbilder seiner Patienten von der „Gruppe der Schizophrenien“, für die er Grundsymptome und akzessorische Symptome sowie Primär- und Sekundärsymptome definierte (Bleuler 1911).

Kurt Schneider (1887-1967) unterschied bei der „Schizophrenie“ zwischen Symptomen ersten Ranges, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Diagnose Schizophrenie führen, und Symptomen zweiten Ranges, welche bei Schizophrenie vorkommen können, aber für die Diagnose eine geringere Bedeutung haben (Schneider 2007).

Im Vergleich der Studien von Kraepelin, Bleuler und Schneider lässt sich feststellen, dass Kraepelin sich in seinen Forschungen intensiv mit dem Längsverlauf psychischer Erkrankungen beschäftigte, während Bleuler und Schneider anhand von Querschnittsbildern ihre Einteilung psychischer

Erkrankungen entwarfen. Schneider vertrat hierbei die These von einem einheitlichen Krankheitsbild der Schizophrenie, während Kraepelin und Bleuler stets von einer „Gruppe“ sprachen.

Heutzutage finden international vor allem zwei Klassifikationssysteme für psychische Erkrankungen Anwendung, das von der Weltgesundheitsorganisation WHO 2006 in vierter Auflage herausgegebene ICD-10 (International Classification of Diseases and Related Health Problems, 10. Revision) und das von der American Psychiatric Association 1996 herausgegebene DSM-IV (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders). Letzteres lässt folgende multiaxiale Diagnostik zu:

- Achse I: Klinische Störungen und andere klinisch relevante Probleme
- Achse II: Persönlichkeitsstörungen und geistige Behinderungen
- Achse III: Medizinische Krankheitsfaktoren
- Achse IV: Psychosoziale und umgebungsbedingte Probleme
- Achse V: Globale Beurteilung des Funktionsniveaus

Beide Systeme teilen die psychischen Störungen nicht anhand ihrer Nosologie ein, sondern beschränken sich auf typische Symptome und Verläufe. Sie erlauben eine gute internationale Vergleichbarkeit unter epidemiologischen Gesichtspunkten, lassen aber keine klare Aussage zur Ätiopathogenese oder zur gerade für psychische Erkrankungen so wichtigen Prognose zu.

## 1.2. Entwicklung einer differenzierten Diagnostik bei Wernicke, Kleist und Leonhard

Eine andere Herangehensweise an die Vielfalt psychischer Erkrankungen geht auf Carl Wernicke und Karl Kleist zurück und wurde von Karl Leonhard weiterentwickelt (Leonhard 2003).

Carl Wernicke (1848-1905) postulierte hirnorganische Veränderungen als Ursache für psychische Krankheiten und arbeitete an einer differenzierten Psychopathologie. Darauf basierend entwickelte er die Sejunktionstheorie,



welche besagt, dass eine Unterbrechung der Verbindungen neuraler Systeme entweder zu einem Funktionsverlust, einer Funktionssteigerung oder einer Funktionsstörung führt (Franzek 1990). Er beschrieb aus der Vielzahl endogener Psychosen heraus unterschiedliche und klinisch unterscheidbare Syndrome, so z. B. die Motilitätspsychose (Wernicke 1900).

Sein Schüler Karl Kleist (1879-1960) arbeitete an einer Vereinigung von Wernickes differenzierten psychopathologischen Beschreibungen mit der ätiologisch-prognostisch orientierten Sicht Kraepelins. Er beschrieb klinische Syndrome mit einheitlichem Krankheitsverlauf, so z. B. die zykliden Psychosen und Unterformen der Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis (Kleist 1957).

Diese Forschungen bildeten den Grundstein, auf den Karl Leonhard (1904-1988) sein Konzept der Klassifikation der endogenen Psychosen mit ihrer differenzierten Ätiologie aufbaute. Er beschrieb detailliert die Symptome psychischer Erkrankungen bei einer Vielzahl von Erkrankten und auf klinischen Syndromen aufbauend lange Krankheitsverläufe. Durch diese Forschungen benannte er neben den bipolaren affektiven Psychosen auch die monopolen, also die Euphorien oder Depressionen. Aus der großen Gruppe der Schizophrenien konnte er drei eigenständige Krankheitsgruppen herausarbeiten (Leonhard 2003).

### 1.3. Übersicht über die differenzierte Diagnostik der endogenen Psychosen bei Leonhard

Leonhard grenzte in seinem Werk „Aufteilung der endogenen Psychosen und ihre differenzierte Ätiologie“ den Formenbestand der phasischen Psychosen mit der manisch-depressiven Krankheit, rein melancholischen und manischen sowie rein depressiven und euphorischen Symptombeständen von den zykliden Psychosen ab. Letztere heilen ohne Residualsymptomatik aus und lassen sich unterteilen in die Angst-Glücks-Psychose, bei welcher in erster Linie der Affekt betroffen ist, in die erregt-gehemmte Verwirrtheitspsychose, bei welcher Denkstörungen bestehen, und die hyperkinetisch-akinetische

Motilitätspsychose mit einer quantitativen Störung der Psychomotorik.

Weiterhin unterschied er den Formenbestand der systematischen Schizophrenien von den unsystematischen Schizophrenien. Systematische Schizophrenien zeichnen sich durch scharf ausgestanzte Syndrome aus, die einen chronischen, schleichenden Krankheitsverlauf mit bleibenden, oft schweren Defekten nehmen. Sie lassen sich in einfach-systematische Schizophrenien mit den Unterformen der Hebephrenien (primär Affektstörung), Paraphrenien (primär Denkstörung) und Katatonien (primär qualitative Psychomotorikstörung) und kombiniert-systematische Schizophrenien unterteilen. Leonhard nahm außerdem an, dass den systematischen Schizophrenien psychische Systemerkrankungen zugrunde liegen. Unsystematische Schizophrenien hingegen weisen charakteristischerweise eine geringere Symptomschärfe auf und zeichnen sich durch eine polymorphe Symptomgestaltung mit einem inhärenten bipolaren Verlauf aus. Leonhard sah die unsystematischen Schizophrenien nicht als Systemerkrankungen an, sondern als Störung einzelner Funktionsgebiete. Eine enge Relation besteht zu den zykliden Psychosen, weshalb die Abgrenzung von diesen im Beginn gelegentlich nicht einfach ist. Entsprechend den zykliden Psychosen unterteilte Leonhard die unsystematischen Schizophrenien in die affektvolle Paraphrenie, die Kataphasie und die periodische Katatonie. Insgesamt lässt diese Einteilung von der beobachtbaren Symptomatik auf den weiteren Verlauf schließen und führt daher auch zu einer prognostischen Aussage (Leonhard 2003).

#### 1.4. Katatonie in internationaler Sichtweise

Einen Subtyp unter den unsystematischen Schizophrenien stellt die periodische Katatonie dar. Der Begriff der Katatonie geht auf Kahlbaum zurück, der 1874 als Katatonie oder „Spannungsirresein“ eine klinische Krankheitseinheit mit typischen klinischen Symptomen und einem charakteristischen Verlauf bezeichnete. Nach Kahlbaum durchläuft die Krankheit zyklisch Phasen von Melancholie, Manie, Stupor, Verwirrung und endet – im ungünstigen Fall – mit

„Demenz“. Zusätzlich bestehen motorische Auffälligkeiten in Form von Anspannungen der Muskulatur und psychomotorische Symptome wie Stereotypien und Echophänomene (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Diagnosekriterien für Katatonie (nach Kahlbaum bzw. ICD-10)

A	Bewegungslosigkeit, Mutismus oder Stupor von wenigstens einer Stunde Dauer in Verbindung mit mindestens einem der folgenden Symptome: Katalepsie, Befehlsautomatie, Posieren, beobachtet oder induziert bei zwei oder mehr Gelegenheiten
B	In Abwesenheit von Bewegungslosigkeit, Mutismus oder Stupor mindestens zwei der folgenden Symptome, welche bei zwei oder mehr Gelegenheiten beobachtet oder induziert werden: Stereotypien, Echophänomene, Katalepsie, Befehlsautomatie, Posieren, Negativismus, Gegenhalten, Ambitendenz

Der norwegische Psychiater Rolv Gjessing (1887-1959) konzentrierte sich auf eine Form der Katatonie mit periodischer Ausprägung der Symptomatik und legte sein Augenmerk auf biochemische und metabolische Veränderungen. Er sah die Ursache dafür in einem zyklischen Nitrogen-Ungleichgewicht und beschrieb einen Zusammenhang zwischen katatonen Symptomen und toxischen Effekten einer Nitrogen-Retention. Daraus entwickelte er eine spezielle Behandlung, welche sich aus einer Niedrigproteindiät und der Einnahme von Thyroxin zusammensetzte (Gjessing 1938).

Im heute gebräuchlichen Klassifikationssystem ICD-10 findet sich die Diagnose „Katatone Schizophrenie“, welche gekennzeichnet ist von „im Vordergrund stehenden psychomotorischen Störungen“, „die zwischen Extremen wie Erregung und Stupor sowie Befehlsautomatismus und Negativismus alternieren können.“

## 1.5. Die periodische Katatonie als Unterform der unsystematischen Schizophrenien

Die periodische Katatonie nach Leonhard gehört zu den unsystematischen Schizophrenien und weist in der Regel einen prognostisch ungünstigen Verlauf auf. Sie zeichnet sich nach einem meist akuten Beginn durch einen schubweisen Verlauf, der bipolar angelegt ist, aus, welcher durch hyperkinetische und akinetische Episoden mit qualitativen Veränderungen der Psychomotorik gekennzeichnet ist. Hyperkinetische Episoden beinhalten motorische Unruhe und Iterationen, d. h. sich wiederholende stereotype Bewegungen, oder Perseverationen im sprachlichen Bereich. Gelegentlich kann es auch zu impulsiv-aggressivem Verhalten kommen. Die Bewegungen sind oft steif und ruckartig und verlieren ihre natürliche Harmonie. In akinetischen Episoden werden bizarre Körperhaltungen bis hin zum Stupor beobachtet. Hyperkinetische und akinetische Anteile können gleichzeitig auftreten. Wenn das Bewegungsspiel und die Ausdrucksbewegungen steif, abgehakt und verzerrt anmuten, spricht man von Parakinese.

Mit zunehmender Frequenz der Schübe verstärken sich die Residualsymptome. Im Defektstadium können Vermischungen von Akinesien und Hyperkinesien, Antriebsverminderung, Impulsvermehrung und erhöhte Reizbarkeit auftreten. Bleibende Ausfallserscheinungen sind allerdings sogar nach vielen Schüben oft nicht schwergradig, aber auch unter suffizienter neuroleptischer Behandlung beobachtbar. Hyperkinetische Zustände haben eine bessere Prognose in Bezug auf ihre Rückbildung als Akinesen, welche schneller zu Defekten führen können.

Die diagnostische Einordnung einer Symptomatik ins Krankheitsbild periodische Katatonie lässt also Aussagen über den weiteren, nämlich schubweisen, bipolaren Verlauf zu (Leonhard 2003).

## 1.6. Familiengenetische Befunde zur periodischen Katatonie

Betrachtet man die Genetik der periodischen Katatonie und im Vergleich dazu beispielsweise die der systematischen Katatonien, entdeckt man große Unterschiede. Eltern und Geschwister von Indexpatienten mit periodischer Katatonie und systematischen Katatonien wurden im Hinblick auf ihr Erkrankungsrisiko systematisch untersucht. Bei den Angehörigen (insgesamt 543 Personen) von 83 Patienten mit periodischer Katatonie und 56 Patienten mit systematischer Katatonie wurde ein Erkrankungsrisiko von 26,9 % für Verwandte ersten Grades bei periodischer Katatonie gefunden. Demgegenüber stand ein Erkrankungsrisiko von 4,6 % bei systematischer Katatonie (Stöber et al. 1995; Beckmann et al. 1996). Die diagnostische Reliabilität war mit einem Kappa-Koeffizienten von 0,93 hoch und die Stabilität in Katamnesen erreichte 97%.

Auf der Suche nach nicht-genetischen Ursachen für die Entstehung von systematischen Katatonien wurden einhergehend mit der Hypothese, dass pränatale Störungen der neuronalen Entwicklung einen Prädispositionsfaktor darstellen können, die Mütter nach schweren Infektionen im mittleren Drittel der Schwangerschaft befragt. Dabei ergab sich hingegen eine signifikante Häufung bei Patienten mit systematischer Katatonie (31 %) gegenüber Patienten mit periodischer Katatonie (6 %) (Stöber et al. 2002). Die Häufigkeit solcher Infektionen in der Normalbevölkerung beträgt 4 %. Franzek und Beckmann berichteten 1996 ähnliche Ergebnisse im Hinblick auf den Einfluss von mütterlichen Infektionen während der Schwangerschaft bei nichtfamiliären Schizophrenien. Diese Ergebnisse untermauerten die Hypothese einer Störung der neuronalen Migration im zweiten Schwangerschaftsdrittel, welche bei postmortalen Untersuchungen im Gehirn an Schizophrenie Erkrankter festgestellt wurde (Jakob und Beckmann 1994, Arnold et al. 1997).

In Bezug auf die periodische Katatonie zeigte sich eine familiäre Häufung bei 59 % der Familien, bei 10 % sogar über drei Generationen. Diese hohe Rate, die unlineare vertikale Transmission und das hohe Morbiditätsrisiko bei Verwandten ersten Grades scheinen die These eines Hauptgeneffekts zu bestätigen (Stöber et al. 1995, Beckmann et al. 1996). In der Gesamt-

bevölkerung liegt die geschätzte Lebenszeitprävalenz der periodischen Katatonie bei etwa 0,001 (Stöber et al. 2000).

Weitere Befunde aus dem Familienkollektiv sprachen anhand der Analyse der 83 Patienten mit periodischer Katatonie mit 26 betroffenen Geschwistern, welche sich auf 23 Familien verteilten, gegen eine geschlechtsgekoppelte Transmission (Franzek et al. 1995). Dagegen fand sich ein Zusammenhang zwischen einem frühen Beginn der Erkrankung und einem erhöhten Erkrankungsrisiko für die Verwandten ersten Grades von 24,1 % verglichen mit 17,8 % bei Probanden mit einem späten Erkrankungsbeginn (Stöber et al. 1998).

### 1.7. Molekulargenetische Befunde zur periodischen Katatonie

Aufbauend auf die beschriebenen genetischen Erkenntnisse zur periodischen Katatonie wurden genomweite Kopplungsstudien durchgeführt. Die erste (Studie I) schloss zwölf Mehrgenerationenfamilien ein (Stöber et al. 2000), gefolgt von einer zweiten (Studie II) mit vier Familien (Stöber et al. 2002). Probanden wurden als erkrankt eingestuft, wenn sie die Kriterien der periodischen Katatonie nach Leonhard erfüllten (Leonhard 2003).

In Studie I wurden 135 Probanden (61 davon männlich, insgesamt 57 von periodischer Katatonie betroffen) mittels 356 Markern untersucht. Auf der Grundlage der nichtparametrischen Mehrpunkt-Kopplungsanalyse ergab sich eine signifikante Evidenz für die Kopplung auf Chromosom 15q15 mit einem  $Z_{lr}$  Score von 4,05 und einem LOD Score von 3,57 sowie eine wahrscheinliche Evidenz für die Kopplung auf Chromosom 22q13 mit einem  $Z_{lr}$  Score von 2,92 und einem LOD Score von 1,85.

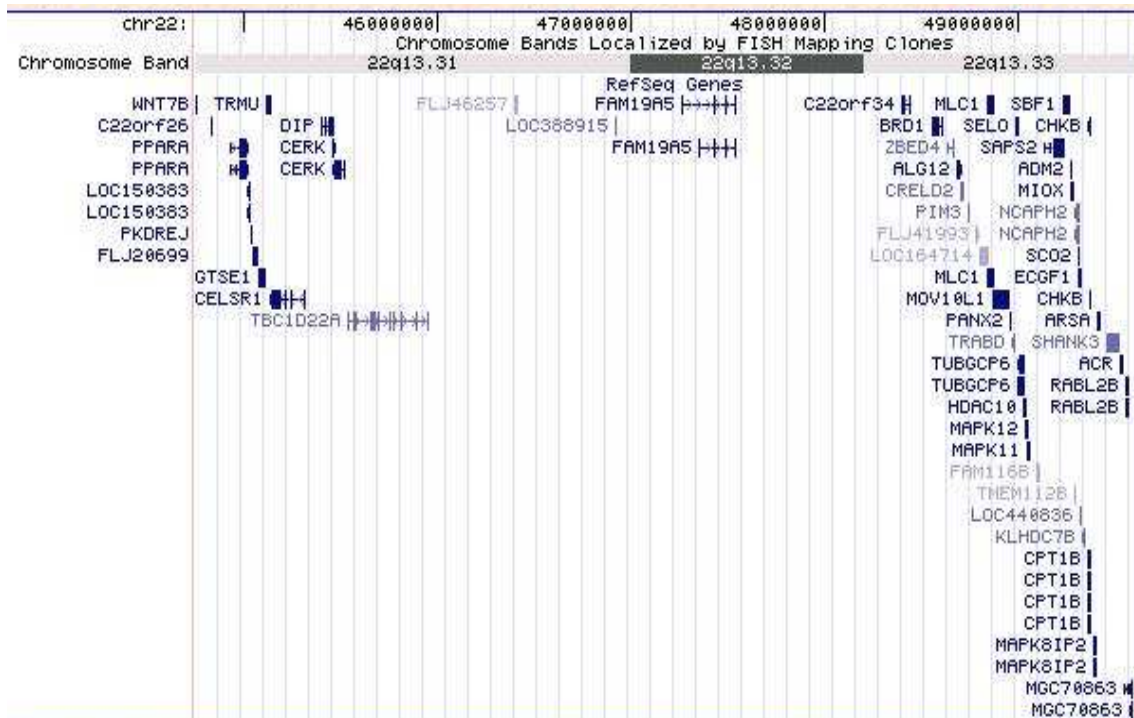
Studie II schloss 48 Probanden (25 davon männlich, insgesamt 21 von periodischer Katatonie betroffen) ein, welche mit 383 Markern untersucht wurden. Hier wurde der Befund auf Chromosom 15 bestätigt mit einem  $Z_{lr}$  Score von 2,77 und einem maximalen HLOD Score von 1,65.

In Bezug auf den Befund auf Chromosom 15q15 trugen alle erkrankten und auch mehrere nicht an periodischer Katatonie erkrankte Mitglieder der

betroffenen Mehrgenerationenfamilien einen gemeinsamen Haplotyp, was auf eine reduzierte Penetranz schließen lässt. Alle Erkrankten wiesen den assoziierten Haplotyp auf, somit liegen keine Phänokopien vor. Die Hypothese einer autosomal dominanten Übertragung mit verminderter Penetranz wurde durch diese Befunde untermauert. Auf einen Gründereffekt in den verschiedenen untersuchten Familien gab es keine Hinweise.

Der Befund auf Chromosom 22q13 basiert im Wesentlichen auf einer großen Vier-Generationenfamilie (F21) mit insgesamt 30 Individuen, von denen zum Zeitpunkt der Studie sieben an periodischer Katatonie erkrankt waren. Die Untersuchung dieser Kandidatenregion durch eine Vierpunkt LOD Score Analyse separat in F21 lieferte einen  $Z_{max}$  von 2,59 bei D22S1169. Die Kandidatenregion (Abbildung 1) wird begrenzt durch den polymorphen Marker D22S1160 (22q13.31, Position des PCR-Produkts auf Chromosom 22: 44807826 – 44808054 bp) und das telomere Ende. Sie beinhaltet die Banden Chr22q13.31-33, umspannt insgesamt knapp 5 Mbp und beherbergt über 50 bekannte proteinkodierende Gene (USCS Genome Browser, letztes Update: März 2006). Diese Kandidatenregion wurde zwar in Studie II nicht bestätigt, da keine der hier untersuchten vier Familien eine Kopplung auf Chromosom 22q13 aufwies, dies könnte aber durchaus an der genetischen Heterogenität, welche bereits in Studie I aufgezeigt wurde, in Verbindung mit dem kleineren Familienkollektiv in Studie II liegen.

**Abbildung 1:** Darstellung der telomeren Region von Chromosom 22q13, in welche F21 koppelt, mit Auflistung der Kandidatengene DIP und MLC1 (<http://genome.ucsc.edu>)



Die Chromosom22q13-Region war also durch meiotische Bruchpunkte in der bereits erwähnte Familie F21 gut kartiert.

In Bezug auf Chromosom15q15 konnten Stöber und Kollegen 2002 die Kandidatenregion auf einen 11 cM großen Bereich zwischen den polymorphen Markern D15S1042 und D15S659 eingrenzen.

Daraufhin wurden einzelne im Gehirn exprimierte Kandidatengene auf Mutationen hin untersucht.

Ein Beispiel dafür stellt das Zink-Transporter-Gen SLC30A4 auf Chromosom 15 dar, bei dem in einer Post-Mortem-Untersuchung im Gehirn an Schizophrenie erkrankter Patienten alternierende Expressionsmuster gefunden worden waren (Kornhuber et al. 1994). Hier konnten in einer Studie jedoch keine Mutationen im kodierenden Bereich und der Promotorregion entdeckt werden (Küry et al. 2003).

Auch das Connexin 36 Gen (CX36) auf Chromosom 15 wurde mit einem



negativen Ergebnis für eine Assoziation mit Schizophrenie untersucht (Meyer et al. 2002).

Bei dem Cadherin Gen CELSR1 auf Chromosom 22 wurden Polymorphismen, jedoch keine krankheitsverursachenden Mutationen entdeckt (Groß et al. 2001).

### 1.8. Chromosom 22q und schizophrene Psychosen

Da in dieser Arbeit Gene in der Region auf Chromosom 22q11-13 untersucht werden, soll zunächst der Forschungsstand über den Zusammenhang von Mutationen in dieser Region mit schizophrenen Psychosen aufgezeigt werden. Bereits ausführlich beschrieben wurde die von Stöber und Kollegen 2000 durchgeführte genomweite Kopplungsstudie.

Badner und Gershon veröffentlichten 2002 eine Metaanalyse von 18 genomweiten Kopplungsstudien über Schizophrenie und beschrieben deutliche Hinweise für eine Kandidatenregion bezüglich Schizophrenie auf Chromosom 22q mit einer Single Analysis Multiple Scan Probability (MSP) von  $3 \times 10^{-5}$  (Replication MSP = 0.006) und einer Best Analysis MSP von  $1 \times 10^{-5}$  (Replication MSP = 0.003). Lewis und Kollegen fanden 2003 in einer anderen Metaanalyse von 20 Schizophrenie Genome Scans ebenfalls Hinweise auf die Chromosom22q-Region. Takahashi und Kollegen führten 2005 einen genomweiten Scan bezüglich schizophrener Psychosen mit Familienkollektiven durch, die Ergebnisse resultierten in einem MLOD von 1.85 und einem MHLOD von 1.97 beim Marker D22S1169 auf Chromosom 22q13.32 bei der Annahme eines rezessiven parametrischen Modells. In einer weiteren genomweiten Kopplungsstudie bei Familien mit bipolarer Erkrankung und schizophrener Psychose wurden ebenfalls Hinweise auf Chromosom 22q11 mit einem LOD von 1,96 gefunden (Hamshere et al. 2005).

Auch wenn in den in diesem Kapitel erwähnten Studien nicht zwischen unterschiedlichen Formen schizophrener Psychosen unterschieden wurde, so bleibt doch festzustellen, dass sich in mehreren voneinander unabhängigen Kopplungsstudien mit unterschiedlichen Familienkollektiven Hinweise auf die Chromosom 22q11-13 Region ergaben.

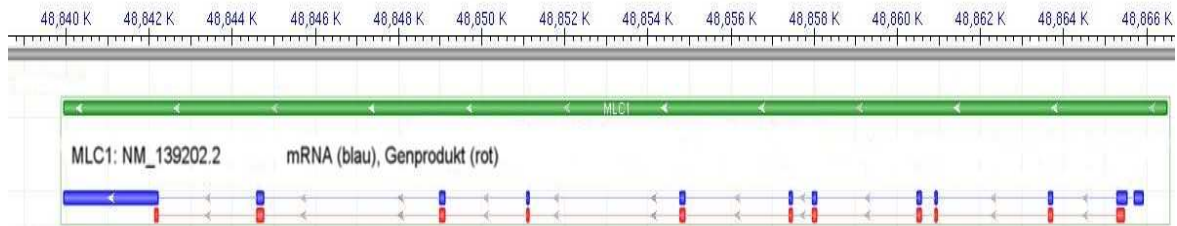
## 1.9. Das Kandidatengen KIAA0027/MLC1

2001 berichteten Meyer und Kollegen, mit KIAA0027 ein Gen gefunden zu haben, welches mit periodischer Katatonie einhergehe. KIAA0027 liegt in der Kandidatenregion auf Chromosom 22q13, eine Northern Analyse ergab durch eine Lokalisation der mRNA eine Genexpression im menschlichen Gehirn, vor allem in der Amygdala, im Nucleus caudatus, im Thalamus und im Hippocampus (Meyer et al. 2001). Die entdeckte Mutation c.1040C>A, welche einen Austausch von Leucin zu Methionin an der 309. Stelle der Aminosäuresequenz von KIAA0027 verursacht, segregierte in der Familie mit dem Haplotyp, der zum positiven Kopplungsbefund geführt hatte. Der positive Befund basierte auf der vorläufigen Analyse einer einzigen Mehrgenerationenfamilie, die eine Kopplung auf Chromosom 22 mit einem LOD-Score von 1,85 aufwies. Es wurde angenommen, dass diese Variante der periodischen Katatonie ursächlich zugrunde liegen könne. Eine aussagekräftige Fall-Kontroll-Assoziations-Studie und die systematische Mutationsanalyse des Gens in einem repräsentativen Kollektiv von Patienten mit periodischer Katatonie war leider unterblieben.

Kurz zuvor waren Mutationen in KIAA0027 als ursächlich für die seltene autosomal rezessiv vererbte Megalenzephalie Leukoenzephalopathie (MLC) beschrieben worden (Leegwater et al. 2001). Man entdeckte verschiedene homozygote Mutationen, welche zu einem Funktionsverlust des Genproduktes führten, und benannte KIAA0027 in MLC1 um.

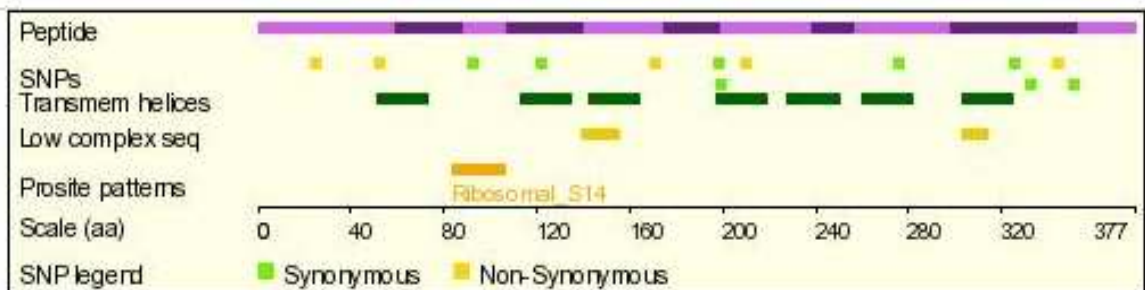
KIAA0027/MLC1 liegt auf Chromosom 22q13.33 (48839947 – 48865908 bp) und umspannt 25962 bp. Die mRNA (RefSeq: NM\_139202.2) wird aus zwölf Exonen mit insgesamt 3599 bp translatiert (Abbildung 2).

**Abbildung 2:** Genstruktur von MLC1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)



MLC1 kodiert für ein Protein (NP\_631941) mit einer Länge von 377 Aminosäuren. Das Protein beinhaltet sieben Transmembranhelices, zwei Low-Complexity Regionen und das Sequenzmotiv ribosomal\_s14 (Abbildung 3). Die Funktion des Proteins ist unbekannt, Homologien zu anderen Proteinen lassen die Vermutung zu, dass es sich um einen in der Zellmembran lokalisierten Transporter handeln könnte (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Abbildung 3:** Ensembl Protein Report mit Eigenschaften von MLC1 (<http://www.ensembl.org>)



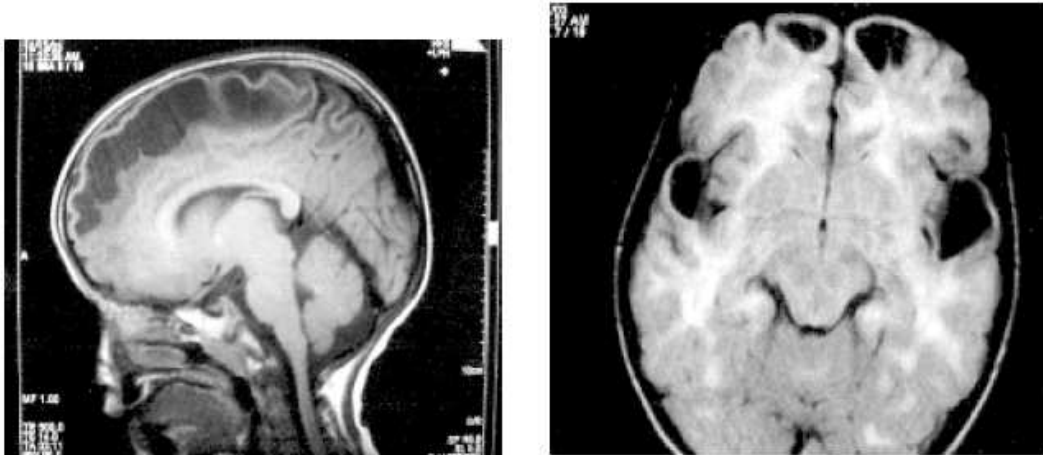
Die Histopathologie mit Demyelinisierung und myeliner Vakuolisierung bei Megalenzephaler Leukoenzephalopathie hängt mit der Annahme zusammen, dass MLC1 ein Membranprotein mit spezifischer Transporterfunktion für ein noch unbekanntes Substrat ist (Leegwater et al. 2001). Das Expressionsmuster von MLC1 gibt starke Hinweise auf eine bevorzugte Expression im Gehirn sowie in anderen Organsystemen, vor allem den peripheren weißen Blutkörperchen ([www.kazusa.or.jp/huge/](http://www.kazusa.or.jp/huge/)). Obwohl MLC1 eine geringe Homologie mit menschlichen spannungsgesteuerten Kalium-Kanälen teilt

(<20% Aminosäurenübereinstimmung), fehlt die hochkonservative Poren-Region der Kalium-Kanal-Gen-Klasse (Durell et al. 1998). Alternativ existiert eine geringe Ähnlichkeit mit den Glykosid-Pentosid-Hexuronid:Kation-Symporter-Familien, den Genfamilien der ABC2-Transportersystem-membran-integrierten Proteinen sowie einem neuen Protein, Chandra, exprimiert in Typ1-Helferlymphozyten (Venkataraman et al. 2000, Rubie et al. 2002).

#### 1.10. Megalenzepale Leukoenzephalopathie (MLC)

Die Megalenzepale Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten wurde zuerst 1995 von van der Knaap und Kollegen beschrieben. MLC ist ein Subtyp aus der Gruppe der kindlichen spongiformen Leukodystrophien. Sie ist charakterisiert durch einen Beginn in der frühen Kindheit, Makrozephalie und fortschreitende motorische Probleme mit Ataxie und spastischen Tetraparesen. Nach einer anfangs normalen kognitiven Entwicklung resultiert zudem im Verlauf eine fortschreitende Demenz. Das morphologische Korrelat bildet eine Degeneration der weißen Substanz. Mittels Magnetresonanztomographie lassen sich Veränderungen der Signalintensität erkennen sowie eine Schwellung der weißen Substanz der Hemisphären mit subkortikalen zystischen Vakuolen frontoparietal und anteriortemporal. Diese eindrücklichen strukturellen Veränderungen (Abbildung 4) stehen im Kontrast zu den erst langsam fortschreitenden neurologischen Symptomen mit Ataxie und Spastik und den spät im Krankheitsverlauf eintretenden kognitiven Abbauprozessen.

**Abbildung 4:** Das MRT zeigt links in der sagittalen Ansicht die subkortikalen zystischen Veränderungen und ein Aussparen der zentralen weißen Substanz. Im rechten Bild ist die bilaterale Lokalisation der Zysten frontal und anterotemporal zu erkennen (aus Hari Krishnan et al. 2005).

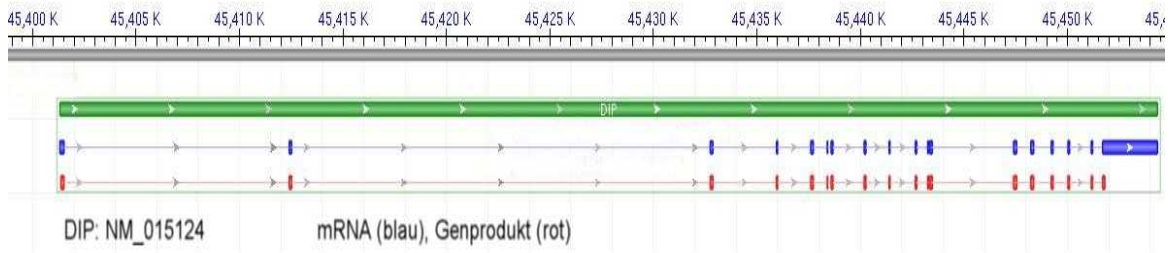


#### 1.11. Das Kandidatengen KIAA0767/DIP

2005 berichteten Stanelle und Kollegen, dass KIAA0767 für ein Protein kodiert, das ein p53-unabhängiges Ziel des Transkriptionsfaktors E2F1 darstellt. E2F1 hat einen starken proapoptotischen Effekt, so dass KIAA0767 eine große Rolle im Apoptosesystem spielen dürfte und aus diesem Grund in DIP (death inducing protein) umbenannt wurde. DIP wurde in mitochondrialen Strukturen lokalisiert.

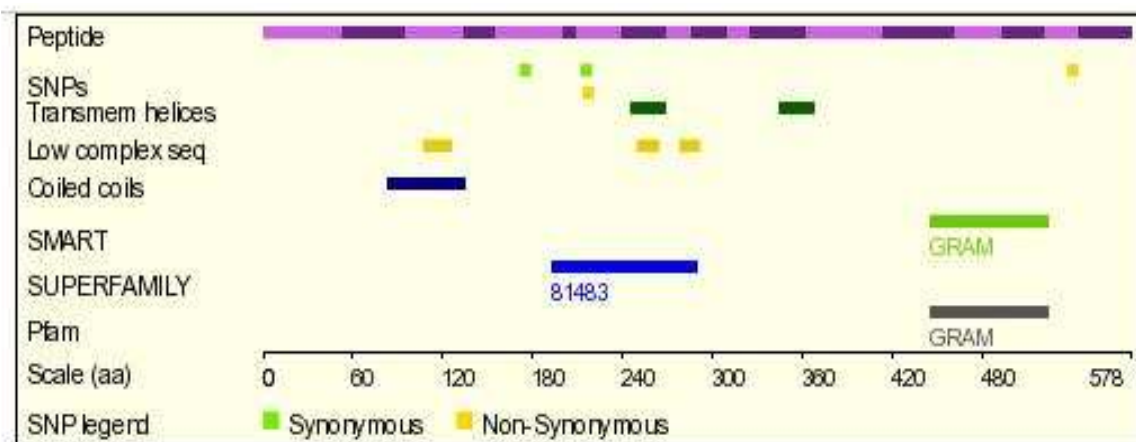
KIAA0767/DIP wird im Gehirn exprimiert und befindet sich in der beschriebenen Kandidatenregion auf Chromosom 22q13.31 (45401322 – 45454351 bp). Es umfasst 53030 bp und besteht aus 18 Exonen mit insgesamt 4316 bp (RefSeq: NM\_015124, Abbildung 5).

**Abbildung 5:** Genstruktur von DIP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)



Das resultierende Protein (NP\_055939) besteht aus 578 Aminosäuren. Es beinhaltet zwei Transmembranhelices, drei Low-Complexity Regionen, ein Coiled-Coil Motiv und eine GRAM-Domäne, die in Glukosyltransferasen, Myotubularinen und anderen membran-assoziierten Proteinen gefunden wird (Abbildung 6).

**Abbildung 6:** Ensembl Protein Report mit Eigenschaften von DIP (<http://www.ensembl.org>)



## 2. Ziel der Arbeit

Diese Arbeit knüpft an die Beschreibung der für die periodische Katatonie entdeckten Kandidatenregion auf Chromosom 22q13 an und gliedert sich im Wesentlichen in zwei Teile.

Im ersten Teil erfolgt eine systematische Analyse des Kandidatengens KIAA0027/MLC1 in einem Kollektiv von 140 Indexpatienten mit periodischer Katatonie und zusätzlich fünf Patienten mit Megalenzephaler Leukoenzephalopathie auf Mutationen in KIAA0027/MLC1. Ein besonderes Augenmerk liegt hier auf der Variante c.1040C>A. Die kodierenden sowie die angrenzenden intronischen Bereiche werden zunächst mit geeigneten Primern amplifiziert und anschließend mittels der Methode der Denaturierenden Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC) untersucht. Entdeckte Varianten werden dann mittels automatischer direkter DNA-Sequenzierung verifiziert und analysiert. Anschließend werden die gefundenen Varianten in Bezug auf ihre Häufigkeit mit gesunden Blutspendekontrollen verglichen.

Im zweiten Teil wird in der bereits beschriebenen Kandidatenregion das im Gehirn exprimierte Gen KIAA0767 bei insgesamt vier kranken Individuen und zwei gesunden Familienmitgliedern, die nicht den Risikohaplotyp tragen, der in diese Region koppelnden Familie mittels der automatischen direkten DNA-Sequenzierung auf Veränderungen der Basenabfolge untersucht und kodierende Varianten in Fall-Kontroll-Analysen weiter überprüft.

Ziel der Arbeit ist es, beide Kandidatengene auf Sequenzvarianten zu untersuchen und durch den Vergleich der Häufigkeiten zwischen kranken Individuen und gesunden Kontrollen die Wertigkeit einer genetischen Assoziation zur periodischen Katatonie aufzuzeigen.

### 3. Patienten und Methodik

#### 3.1. Patienten mit Megalenzephaler Leukoenzephalopathie

In einem systematischen Mutations-Screening wurden fünf nichtverwandte Indexfälle mit Megalenzephaler Leukoenzephalopathie untersucht (Rubie et al. 2002). Deren DNA-Aliquote wurden freundlicherweise durch die Pädiatrische Neurologie, Istituto Nazionale Neurologico Carlo Besta, Mailand (Dr. Graziella Uziel), die Pädiatrie der Universität Düsseldorf (Dr. Jutta Gärtner), und die Pädiatrie der Universität Hamburg (Dr. Alfried Kohlschütter) zur Verfügung gestellt. Drei der Patienten stammten aus Italien, je einer aus Deutschland und aus der Türkei. Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses betrug ihr Alter im Mittel 9,5 Jahre (4,4 – 15,4 Jahre). Motorische Probleme wurden bei zwei Patienten im Alter von einem Jahr beobachtet, epileptische Ereignisse ebenfalls bei zwei Patienten. Alle waren zur Diagnosestellung ausführlich neurologisch, bildgebend, biochemisch und enzymatisch untersucht worden, wodurch andere bekannte Ursachen von Leukodystrophien ausgeschlossen werden konnten. Dies beinhaltete in allen Fällen ein craniales MRT mit Nachweis der MLC-typischen zerebralen Anomalien.

#### 3.2. Patienten mit periodischer Katatonie

Die 140 (78 davon männlich) nichtverwandten Indexpatienten mit periodischer Katatonie stammten aus einer früheren Familienstudie (Stöber et al. 1995; Beckmann et al. 1996) bzw. wurden an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg rekrutiert. Die Diagnose periodische Katatonie stellte in allen Fällen Prof. Stöber in persönlicher Untersuchung, die von PD Dr. Jabs und PD Dr. Pfuhlmann jeweils überprüft wurde. Ebenso erfüllten alle Patienten die Diagnosekriterien für „Schizophrenie“ entsprechend DSM IV und ICD 10 (American Psychiatric Association 1996, World Health Organization 2006). Die Patienten waren zum Zeitpunkt ihres



ersten Klinikaufenthaltes im Schnitt 25,4 Jahre alt (Standardabweichung  $\pm 10,4$  Jahre), das Alter zum Zeitpunkt der Rekrutierung für die Studie betrug 44,2 Jahre (Standardabweichung  $\pm 15,3$  Jahre) (Rubie et al. 2002).

Für die Mutationsanalyse von KIAA0767 sowie die anschließende Assoziationsstudie wurden Individuen aus den drei nichtverwandten Familien (F15, F17, F21), welche in den bereits erwähnten genomweiten Kopplungsstudien (Stöber et al. 2000; Stöber et al. 2002) mit einer Kopplung auf Chromosom 22q13 kompatibel waren, analysiert.

### 3.3. Blutspendekontrollen

Insgesamt 270 Blutspender (148 davon männlich), die im Blutspendezentrum der Universität Würzburg rekrutiert wurden, dienten als Kontrollpersonen. Sie alle waren nicht miteinander verwandt und von deutsch-kaukasischer Abstammung. Die Studienprotokolle hatten dem Ethik-Komitee der Universität mit positivem Bescheid vorgelegen. Alle Teilnehmer gaben nach ausführlicher Aufklärung ihr Einverständnis, bei den Patienten mit Megalenzephaler Leukoenzephalopathie erklärten sich zusätzlich die Eltern einverstanden (Rubie et al. 2002).

### 3.4. Methoden

#### 3.4.1. Exon-Intron-Strukturen von KIAA0027/MLC1 und KIAA0767/DIP

Mit Hilfe der online verfügbaren Datenbank von UCSC Genome Bioinformatics (<http://genome.ucsc.edu>) konnten die Strukturen von KIAA0027/MLC1 und KIAA0767/DIP erfasst und die Position sowie die Basenabfolge der zu untersuchenden translatierten DNA für die Primergenerierung bestimmt werden.

### 3.4.2. Primererstellung

Basierend auf den Exon-Intron-Grenzen innerhalb der genomischen DNA wurden Primer für eine Polymerasekettenreaktion zur Vervielfältigung der Exonsequenzen konstruiert. Mit dem Programm Primer.exe (Version 0.5, Copyright 1991 by Whitehead Institute for Biomedical Research) wurden die Primer so gewählt, dass die Exon-Intron-Grenzen mit 30-50 bp überlappend miteinbezogen wurden, um auch Splice-Varianten zu erfassen.

### 3.4.3. Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Vervielfältigung der DNA-Abschnitte wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) angewandt.

Die PCR fand jeweils in einem Reaktionsvolumen von 50  $\mu\text{l}$  statt, welches sich aus 4  $\mu\text{l}$  DNA in einer Konzentration von 50 ng/ $\mu\text{l}$ , 5  $\mu\text{l}$  DNA-Puffer in zehnfacher Konzentration, 4  $\mu\text{l}$  dNTPs (20  $\mu\text{mol}$ ), 0,5  $\mu\text{l}$  des Forward-Primers (20  $\mu\text{mol}$ ), 0,5  $\mu\text{l}$  des Reverse-Primers (20  $\mu\text{mol}$ ), 0,5  $\mu\text{l}$  Taq-Polymerase (2 U/ $\mu\text{l}$ ) sowie 35,5  $\mu\text{l}$  HPLC- $\text{H}_2\text{O}$  zusammensetzte.

Die PCR-Amplifikation besteht aus drei Schritten, der initialen Denaturierung, der zyklischen Amplifikation sowie der abschließenden Extension. Zunächst erfolgte für 300 Sekunden die initiale Denaturierung bei einer Temperatur von 95°C. Sodann folgten 35 Zyklen, welche aus der Denaturierungsphase von 30 Sekunden Dauer bei 95°C, der Anlagerungsphase von 30 Sekunden Dauer mit der jeweiligen Anlagerungstemperatur (zwischen 55 und 62°C) sowie der Extensionsphase (45 Sekunden bei 72°C) bestanden. Das Standardverfahren endete mit einer abschließenden Extension, welche 300 Sekunden bei 72°C dauerte.

Für die Amplifizierung einiger DNA-Abschnitte wurde eine Touchdown-PCR verwendet. Die Anlagerungstemperatur des ersten Zyklus wurde um 4°C über der Schmelztemperatur ( $T_m$ ) gewählt, um eine hochspezifische Vervielfachung zu erhalten. Die Temperatur wurde dann in den beiden folgenden Zyklen auf  $T_m$  plus 2,5°C gesenkt, die drei folgenden Zyklen fanden bei  $T_m$  plus 1°C statt, vier

weitere bei  $0,5^{\circ}\text{C}$  unter  $T_m$ , fünf weitere bei  $T_m$  minus  $2^{\circ}\text{C}$ , sechs weitere bei  $T_m$  minus  $4^{\circ}\text{C}$  und abschließend 24 Zyklen bei  $6^{\circ}\text{C}$  unter  $T_m$ .

#### 3.4.4. Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Spezifität des PCR-Resultats wurde das PCR-Produkt auf einem Agarosegel aufgetrennt. Die lineare, doppelsträngige, negativ geladene DNA wandert in einem elektrischen Feld in Richtung Kathode mit einer zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare umgekehrten Geschwindigkeit. Abhängig ist die Geschwindigkeit außerdem noch von der Pufferkonzentration, der Agarosekonzentration und der Höhe der angelegten Spannung.

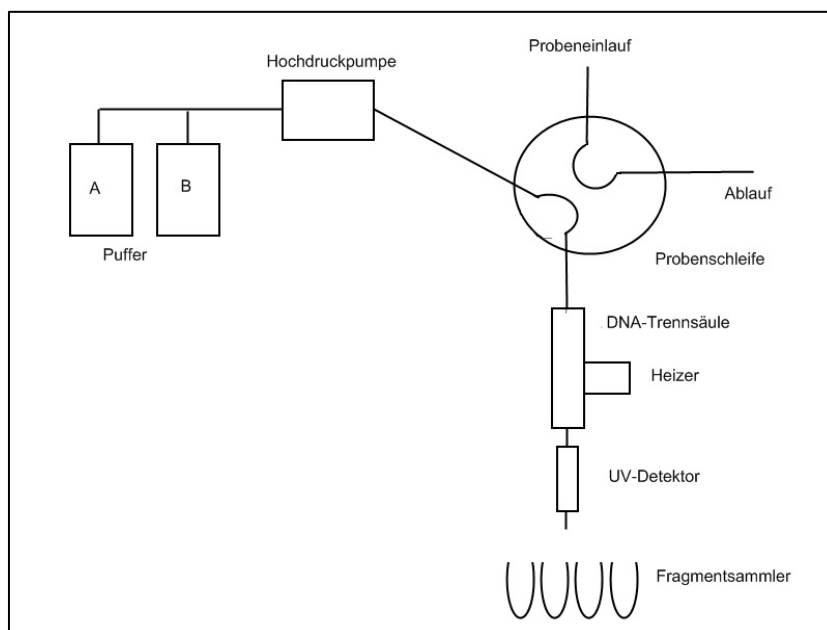
In dieser Arbeit wird ein zweiprozentiges Agarosegel verwendet, zu dem Ethidiumbromid gegeben wird, wodurch die DNA unter UV-Licht sichtbar wird. Nach der Gelierung wird das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer übertragen, die Geltaschen werden mit einem Gemisch aus PCR-Produkt und Blaupuffer gefüllt, wobei man in die seitlichen Geltaschen zur Größenbestimmung eine Basenpaarleiter aufträgt.

Unter einer Spannung von 140 Volt erfolgt die kontinuierliche Auftrennung der DNA. Zum Schluss wird das Gel auf einem UV-Transilluminator abgeleuchtet. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und fluoresziert unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 245 nm. Somit können die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden.

#### 3.4.5. Denaturierende Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Das WAVE System (Abbildung 7) ist eine Hochdurchsatzmethode und ermöglicht eine schnelle, automatische Suche nach unbekanntem und nicht lokalisierten Mutationen in DNA-Fragmenten, die eine Länge bis zu 600 bp aufweisen können, basierend auf der Methode der denaturierenden Hochdruckflüssigkeitschromatographie (DHPLC) (Taylor et. al. 1998).

**Abbildung 7:** Schematische Darstellung des WAVE Systems (erstellt mit Paint.NET v3.10)



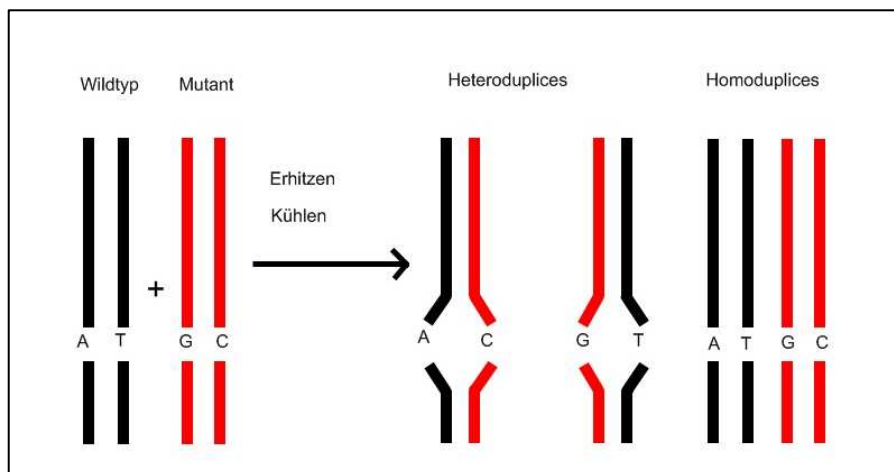
In den Puffer-Reservoirs A und B befinden sich die beiden entscheidenden Bestandteile der mobilen (flüssigen) Phase, 0,1 M Triethylammoniumacetat (TEAA) und 0,1 M TEAA/25% Acetonitril. Die Hochdruckpumpe sorgt für den schnellen Ablauf der Analyse. Die DNA-Proben werden in der Probenschleife automatisch in das System eingespeist. Die wichtigste Komponente bildet jedoch die DNA-Trennsäule. Sie enthält die stationäre Phase, bestehend aus 2 µm großen nichtporösen alkylierten Poly-Styrene-Divinylbenzenen. Um die DNA mit ihren negativ geladenen Phosphatgruppen von der mobilen Phase auf die hydrophobe, neutrale stationäre Phase zu übertragen, bedarf es TEAA-Kationen als Brückenmoleküle. Die Trennung der DNA-Fragmente von der Matrix und ihre Elution werden durch eine kontinuierlich steigende Acetonitrilkonzentration erreicht. Die optimalen Elutionsbedingungen (geeigneter Acetonitrilgradient) für die einzelnen PCR-Produkte werden durch das Programm WaveMaker 4.0 der Firma Transgenomic anhand der Nukleotidabfolge ermittelt.

Der nachgeschaltete UV-Detektor registriert die weitergeleiteten DNA-Fragmente. Die Darstellung des Ergebnisses erfolgt dann als Chromatogramm,

wobei die DNA-Fragmente als charakteristische Peaks erscheinen.

Um systematisch PCR-Produkte auf Polymorphismen hin zu untersuchen, werden je 10 µl davon durch Erhitzung auf 95°C für 3 Minuten und eine langsame Abkühlung über 30 Minuten auf 65°C denaturiert. Es entstehen beim Wildtyp Homoduplices und bei einer heterozygoten Mutante bzw. einem Gemisch aus Wildtyp und homozygoter Mutante zwei Paare von Homoduplices und Heteroduplices (Abbildung 8).

**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Heteroduplex-Formation durch Hybridisierung (erstellt mit Paint.NET v3.10)



Die Analyse erfolgt nach individueller Etablierung des jeweiligen PCR-Produktes. Bei einer nicht-denaturierenden Temperatur (50°C) in der DNA-Trennsäule können nur Fragmente unterschiedlicher Länge – dies ist hier nicht der Fall – voneinander getrennt werden. Erhöht man die Temperatur, erhält man zwischen ca. 55 und 68°C einen Bereich kurz vor der Schmelztemperatur, in dem die teilweise denaturierten Heteroduplices vor den Homoduplices die stationäre Phase verlassen und eluieren. Wird die Temperatur weiter erhöht, denaturieren die DNA-Fragmente völlig zu Einzelsträngen und man erhält wiederum nur einen Peak.

Die optimalen Temperaturen dafür liefert die Software WaveMaker 4.0, welche das charakteristische Schmelzmuster eines PCR-Produktes bei

unterschiedlichen Temperaturen errechnet.

Anhand der unterschiedlichen Chromatogramme lassen sich Wildtyp und verschiedene Mutanten voneinander unterscheiden. Die Analyse erfolgte in einer 96er-Mikrotiterplatte.

### 3.4.6. Automatisierte Sequenzierung

#### 3.4.6.1. Cycle-Sequencing

Das Cyclesquencing erfolgt auf dem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer nach der von Sanger 1980 entwickelten Methode mit Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) und Didesoxynukleotiden (ddNTPs). Letztere sind durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch den Einbau von ddNTPs kommt es zu einem Kettenabbruch. Je nachdem, an welcher Stelle der Kettenabbruch erfolgt, erhält man unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Sanger verwendete für die vier unterschiedlichen Didesoxynukleotide jeweils einen eigenen Ansatz. Für diese Arbeit wird das Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Applied Biosystems benutzt, wodurch die Reaktion in einem einzigen Ansatz mit allen vier Didesoxynukleotiden stattfinden kann.

#### 3.4.6.2. Sequenzlesevorgang

Der Sequenzlesevorgang beruht auf dem Prinzip der Elektrophorese. Die nach dem Cycle-Sequencing unterschiedlich großen DNA-Fragmente wandern in einer mit Polyacrylamid-Gel gefüllten Glaskapillare in einem elektrischen Feld. Ein Laserstrahl regt die vier verschiedenen Fluoreszenzen an, die entstehenden Lichtsignale werden von einem Detektor aufgenommen und durch den Computer analysiert. Als Ergebnis erhält man eine Folge von Fluoreszenzpeaks, die anhand ihres Spektrums einzelnen Nukleotiden zugeordnet werden können. Der verwendete ABI Hitachi 3100 Genetic Analyzer

besitzt 16 parallel angeordnet Kapillaren.

Für die Probenvorbereitung gibt man in eine 96er-Platte jeweils 25 µl der DNA-Suspension. Es werden immer zwei Reihen zu je acht Slots gleichzeitig sequenziert. Zur Vorbereitung der Sequenzierung werden 25 ml Sequenzierpuffer angesetzt und Puffer und Wasser ausgewechselt. Anschließend kann man den Sequenziervorgang programmieren und starten. Die Auswertung erfolgt computergestützt mit manueller Kontrolle auffälliger Peaks durch zwei voneinander unabhängige Operatoren.

#### 3.4.7. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse

Um einen durch Sequenzierung entdeckten Polymorphismus in der DNA-Sequenz in Kontrolluntersuchungen an weiteren DNA-Proben zu überprüfen, wird die Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Methode verwendet.

Voraussetzung dafür ist eine enzyspezifische Erkennungssequenz, in welcher der Polymorphismus entweder in der Wildtyp- oder in der Mutantenform enthalten ist. Die zu untersuchende Sequenz wird in das browserbasierte Onlineprogramm Webcutter 2.0 eingegeben, worauf man eine Übersicht über die geeigneten Restriktionsenzyme sowie die resultierenden Fragmentgrößen enthält.

Das Restriktionsenzym Mbol erkennt die Sequenz /GATC und schneidet den Wildtyp von Exon 5 des Gens KIAA0767 in zwei Fragmente von 69 bzw. 319 bp Länge. Durch den Basenaustausch bei der Mutantenform entsteht eine zweite Erkennungssequenz, wodurch drei Fragmente mit einer Länge von 69, 70 und 249 bp entstehen.

Die Enzymdigestion findet in einem Gesamtvolumen von 15 µl statt, bestehend aus dem PCR-Produkt der zu untersuchenden DNA, dem Enzym Mbol (New England Biolabs), dem von der Firma vorgegebenen 10X Puffer, und H<sub>2</sub>O. Die Tubes mit dem Ansatz werden für ca. 3 Stunden bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss daran wird die enzymatisch verdaute DNA auf ein Agarosegel aufgetragen, und - wie im Kapitel Gelelektrophorese beschrieben - werden die

unterschiedlich langen DNA-Fragmente der Länge nach aufgetrennt und zuletzt durch UV-Licht analysiert und dokumentiert.



## 4. Ergebnisse

### 4.1. KIAA0027/MLC1: Mutationen bei Patienten mit Megalenzephaler Leukoenzephalopathie

Mittels direkter automatischer Sequenzierung der kodierenden Region und der angrenzenden Exon-Intron-Grenzen von MLC1 identifizierten wir bei den fünf untersuchten MLC-Patienten insgesamt vier Allele, welche Veränderungen in der Basenabfolge aufwiesen (Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Veränderungen im MLC1-Gen in Referenz zur cDNA-Sequenz D25217 bei den untersuchten MLC-Patienten.

Patient	DNA Level	Mutation	Position auf AL022327	Codon	Effekt	Status
1	Intron 5	c.IVS5+1G>A	92626	-	abweichendes Splicing von Exon 5	kombiniert heterozygot
	Exon 11	c.1025_1030del	76887-76892	p.Leu304_Leu305del	rastererhaltende Deletion	kombiniert heterozygot
2	Exon 11	c.1023_1033 delinsGCA	76885-76895	p.Val303Xfs	Rasterverschiebung	homozygot
3	Exon 6	c.585C>A	90165	p.Ala157Glu	nicht-konservativer Aminosäureaustausch	heterozygot

Ein Patient erwies sich als kombiniert heterozygot für eine Deletion von sechs Basenpaaren in Exon 11, welche zu einer rastererhaltenden p.Leu304\_Leu305 Deletion führt, und einer Mutation in der Spleiss-Donor-GT-Sequenz von Exon 5, wodurch sich eine AT-Transition ergibt (c.IVS5+1G>A). Diese Mutation wurde unabhängig davon bereits in früheren Studien bei MLC-Patienten beobachtet (Leegwater et al. 2001, Leegwater et al. 2002). Die nächste prognostizierte Spleiss-Donor-Stelle in der DNA-Sequenz wurde 91-bp strangabwärts der Mutation lokalisiert. Die DNA-Sequenz von Intron 5 beinhaltet ein rastererhaltendes Stop-Codon, die Mutation führt hier vermutlich

zu einem verkürzten MLC1-Genprodukt mit 141 Aminosäuren und zusätzlich einer weiteren damit nicht zusammenhängenden zehn Aminosäuren umfassenden Sequenz am C-terminalen Ende. Die beiden Mutationen befinden sich auf unterschiedlichen elterlichen Chromosomen und werden rezessiv vererbt.

Bei einem weiteren MLC-Patienten türkischer Herkunft fand sich die homozygote Mutation c.1023\_1033delinsGCA, welche das zweite Poly-leucin-Motiv von MLC1 betrifft und in einer Rasterverschiebung nahe des 5'- Endes von Exon 11 resultiert. Dadurch entsteht ein verlängertes Genprodukt mit veränderter Aminosäuresequenz.

Ein anderer Patient stellte sich heterozygot in Bezug auf eine nichtkonservative p.Ala157Glu-Substitution dar. Diese Variante fand sich nicht in 400 Kontrollchromosomen kaukasischer Herkunft.

Bei den verbleibenden beiden MLC-Patienten konnten im Untersuchungsbereich keine krankheitsverursachenden Mutationen gefunden werden, die Promotorregionen und die Intronbereiche waren nicht untersucht worden.

## 4.2. KIAA0027/MLC1: Sequenzvariationen bei Patienten mit periodischer Katatonie

### 4.2.1. Detektion

Das Gesamtkollektiv der 140 Indexpatienten mit periodischer Katatonie wurde in der kodierenden Region mit den angrenzenden Exon-Intron-Übergängen mittels eines systematischen Mutations-Scans unter Verwendung der Denaturierenden Hochdruckflüssigkeitschromatographie und nachfolgender direkter automatischer Sequenzanalyse der Produkte, die Heteroduplexmuster zeigten, untersucht.

#### 4.2.2. Art der allelischen Varianten

13 verschiedene Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs), also der Austausch jeweils eines Nukleotids, und der von McQuillin und Kollegen 2002 beschriebene 33-bp Insertions-Deletionspolymorphismus in Exon 11 wurden entdeckt (Tabelle 2). Von den SNPs lagen fünf im Exonbereich, sieben in den exonnahen intronischen Sequenzen und einer in der untranslatierten 5'-Region. Zwei der exonischen SNPs hatten keine Veränderung in den Aminosäuren zur Folge, bei dreien zeigte sich ein Aminosäureaustausch (p.Cys171Phe, p.Asn218Lys, p.Leu309Met).

#### 4.2.3. Frequenz

Die Variante p.Cys171Phe war mit einer Häufigkeit von 10,7% unter den Indexfällen mit periodischer Katatonie und 10% unter den Kontrollen vorhanden, bei Kontrollen einmal homozygot. p.Asn218Lys wurde bei zwei Indexpatienten gefunden und in drei von 270 Kontrollen (Allelfrequenz 0,7% zu 0,6%). p.Leu309Met fand sich bei zwei Indexpatienten und keiner Kontrolle. Ein Indexpatient stammt aus einer Familie (F21), die mit einer Kopplung auf Chromosom 22q13 kompatibel ist, der andere aus einer Familie (F20), die nicht auf Chromosom 22q13 koppelt. Ein gemeinsamer Chromosom 22qtel-Haplotyp der beiden Familien konnte in einer Überprüfung anhand drei telomerer Marker nicht gefunden werden.

Häufige Varianten mit einer minor allele frequency von über 30% waren c.IVS8+28A (48,2%) und c.IVS9-110G (31,8%). Seltene Varianten mit einer minor allele frequency unter 30% waren c.-549T (1%), c.268A (0%), c.IVS4+50C (6,4%), c.627T (10%), c.IVS6+22T (11,8%), c.709T (15,5%), c.769A (0,6%), c.IVS9+59A (10%), c.IVS9+61C (10%), c.1040A (0%) und c.IVS11+16A (0,9%) (Tabelle 2).

**Tabelle 2:** Polymorphismen des MLC1-Gens bezogen auf die cDNA-Sequenz D25217 und Assoziationsstudie in 140 Indexfällen mit periodischer Katatonie und Blutspendekontrollen. <sup>a</sup>270 Individuen getestet; <sup>b</sup>55 Individuen getestet; <sup>c</sup>100 Individuen getestet (Rubie et al. 2002)

DNA-Level	Nukleotid-Austausch	Position auf AL022327	Codon	Selteneres Allel	Frequenz des heterozygoten Genotyps		
					Periodische Katatonie (n=140)	Blutspendekontrollen	P-Value
5'-UTR	c.-549C>T	98160	-	c.-549T	2 (1,4%)	2 (2,0%) <sup>c</sup>	0,87
Exon 2	c.268G>A	97459	p.Thr52	c.268A	1 (0,7%)	0 (0,0%) <sup>c</sup>	0,87
Intron 4	c.IVS4 +50C>T	93003	-	c.IVS4 +50C	21 (15,0%)	7 (12,7%) <sup>b</sup>	0,86
Exon 6	c.627G>T	90123	p.Cys171 Phe	c.627T	30 (21,4%)	18 (18,0%) <sup>c</sup>	0,62
Intron 6	c.IVS6 +22C>T	90088	-	c.IVS6 +22T	47 (33,6%)	13 (23,6%) <sup>b</sup>	0,24
Exon 7	c.709C>T	89553	p.Tyr199	c.709T	30 (21,4%)	29 (29,0%) <sup>c</sup>	0,23
Exon 8	c.769C>A	86985	p.Asn218 Lys	c.769A	2 (1,4%)	3 (1,1%) <sup>b</sup>	0,84
Intron 8	c.IVS8 +28G>A	86897	-	c.IVS8 +28A	62 (44,3%)	31 (56,4%) <sup>b</sup>	0,17
Intron 9	c.IVS9 +59C>A	83177	-	c.IVS9 +59A	36 (25,7%)	11 (20,0%) <sup>b</sup>	0,22
Intron 9	c.IVS9 +61T>C	83175	-	c.IVS9 +61C	36 (25,7%)	11 (20,0%) <sup>b</sup>	0,22
Intron 9	c.IVS9 -110A>G	81374	-	c.IVS9 -110G	42 (30,0%)	23 (41,8%) <sup>b</sup>	0,16
Exon 11	c.1040C>A	76877	p.Leu309 Met	c.1040A	2 (1,4%)	0 (0,0%) <sup>a</sup>	0,22
Exon 11	c.1165_1166 ins33bp	76751	-	c.1165_1166 ins33bp	31 (22,1%)	23 (23,0%) <sup>c</sup>	0,87
Intron 11	c.IVS11 +16G>A	76727	-	c.IVS11 +16A	3 (2,1%)	1 (1,8%) <sup>b</sup>	0,68

Es ergaben sich keine Hinweise, dass eine allelische oder genotypische Assoziation zwischen den einzelnen SNPs und periodischer Katatonie vorliegt. Der von McQuillin und Kollegen 2002 veröffentlichte Insertions-Deletionspolymorphismus c.1165\_1166ins33bp wurde ähnlich häufig bei Patienten mit periodischer Katatonie und Kontrollen gefunden. Die Allel-Frequenz von c.1165\_1166ins33bp betrug 11,1% (n=31) bei Patienten mit periodischer Katatonie und 15% bei Kontrollen (n=31; p=0,15), eine genotypische

Assoziation mit periodischer Katatonie lag nicht vor. Der Polymorphismus wurde bei Patienten mit Megalenzephaler Leukoenzephalopathie mit einer Frequenz von 10% entdeckt. Wie früher beschrieben (McQuillin et al. 2002) beobachteten wir vier weitere Polymorphismen (c.1093C>T, c.1111T>C, c.1146A>G [p.Asn344Ser] und c.IVS11-27A>G, die Positionsangaben beziehen sich auf die cDNA-Sequenz D25217) in kompletten Kopplungsungleichgewicht mit c.1165\_1166ins33bp in allen sequenzierten PCR-Strängen, welche die Insertion trugen (insgesamt 31 bei den Indexpatienten mit periodischer Katatonie). Da diese Polymorphismen stets gekoppelt vorlagen, wurde keine weitere systematische Genotypisierung dieser Varianten vorgenommen.

#### 4.3. KIAA0767/DIP: SNPs bei drei Familien mit periodischer Katatonie

Zunächst wurden zwei betroffene Individuen aus verschiedenen Zweigen der Familie 21 ausgewählt sowie zwei Patienten mit periodischer Katatonie aus den kleineren Familien F15 und F17, welche mit einer Kopplung auf Chromosom 22q13 kompatibel waren. In der Assoziationsstudie wurden 115 nichtverwandte Fälle mit periodischer Katatonie (66 männlich; Alter bei erster Hospitalisation 26,2 Jahre, Standardabweichung 10,5 Jahre; Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung 44,6 Jahre, Standardabweichung 17,1 Jahre) und 110 Blutspendekontrollen (60 davon männlich; Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung 29,5 Jahre, Standardabweichung 9,4 Jahre) eingeschlossen.

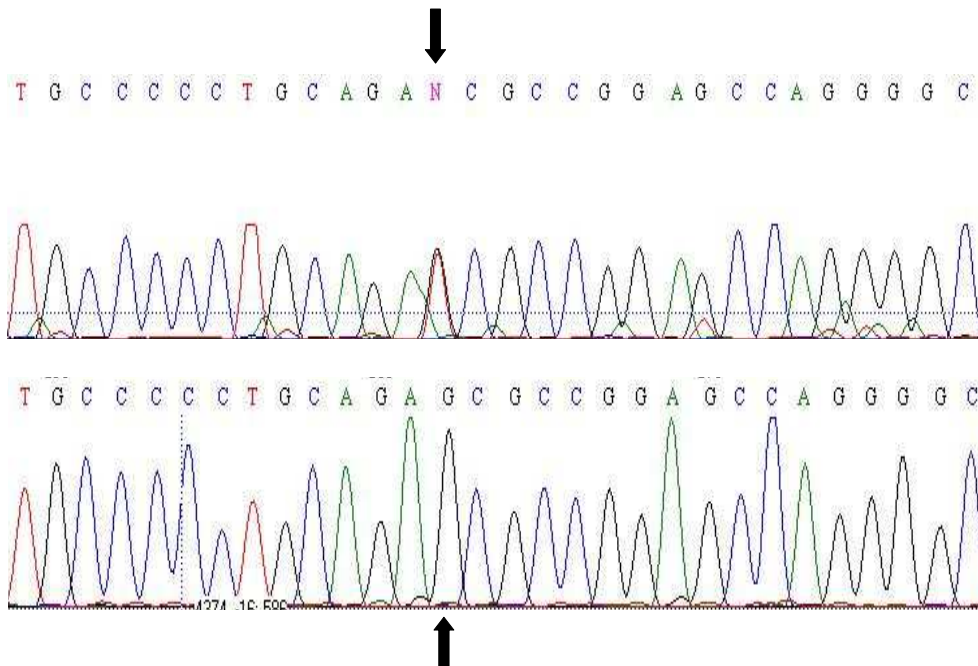
Als Untersuchungsmethode wurde die direkte automatische Sequenzierung der kodierenden Exone von KIAA0767 inklusive der Exon-Intron-Grenzen ausgewählt, wobei jeweils mindestens 40 bp vor und nach dem Exonbereich mitsequenziert wurden.

In den untersuchten Proben wurden sieben SNPs im Bereich von KIAA0767 entdeckt, sechs davon befanden sich in nicht kodierenden intronischen Regionen (Tabelle 3). c.507G>T hingegen war in Exon 5 lokalisiert (Abbildung 9) und verursachte den Austausch von Glutaminsäure zu Asparaginsäure (p.Glu156Asn). Wir identifizierten den Patienten 857 als heterozygoten Träger.

**Tabelle 3:** Polymorphismen des KIAA0767/DIP-Gens bezogen auf die mRNA-Sequenz NM\_015124

DNA Level	Nukleotidaustausch	Position auf AL096766	Codon	Effekt	SNP-Datenbank
Intron3	c.IVS3 +2995C>T	13168	-	-	rs2076708
Exon5	c.507G>T	14909	p.Glu156Asn	AA-Austausch	-
Intron11	c.IVS11 +36C>T	20636	-	-	rs9616088
Intron12	c.IVS12 +37A>C	20808	-	-	rs2076711
Intron16	c.IVS16 +18C>T	27437	-	-	rs55828234
Intron16	c.IVS16 +82T>C	27502	-	-	rs2073276
Intron16	c.IVS16 +1031G>A	28448	-	-	rs2236028

**Abbildung 9:** Sequenzvariante c.507G>T bei einem Patienten mit periodischer Katatonie, im Vergleich dazu eine Kontrolle. Die Pfeile markieren im oberen Bild den heterozygoten Polymorphismus G/T, im unteren Bild hingegen den normalen homozygoten Wildtyp G/G.



Anschließend wurde eine RFLP-Analyse in den kompletten Familien F15, F17 und F21 zur Analyse einer möglichen Segregation der Variante in diesen Familien durchgeführt. Das PCR-Produkt von Exon 5 mit den angrenzenden intronischen Bereichen umfasst 388 bp. Mbo1 schneidet die Wildtyp-PCR-Produkte an einer Stelle, es resultieren daraus Fragmente von 69 und 319 bp. Die PCR-Produkte mit der Sequenzvariante c.507G>T werden zweimal geschnitten, die Fragmente sind 69, 70 und 249 bp groß. Die Variante kosegregierte jedoch nicht mit der Erkrankung in den untersuchten Familien. Der SNP wurde durch ein nichterkranktes Individuum, welches in die Familie einheiratete, eingebracht.

Zudem konnten wir p.Glu156Asn in einer Probe aus 450 Chromosomen (115 Indexfälle mit periodischer Katatonie und 110 Kontrollen) kein weiteres Mal finden (Abbildung 10). Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass p.Glu156Asn eine sehr seltene Variante darstellt (Allelfrequenz < 1%), welche nicht mit der Erkrankung assoziiert ist (Stöber et al. 2005).

**Abbildung 10:** RFLP-Analyse von Exon 5 (KIAA0767/DIP) nach enzymatischen Verdau mit Mbo1.

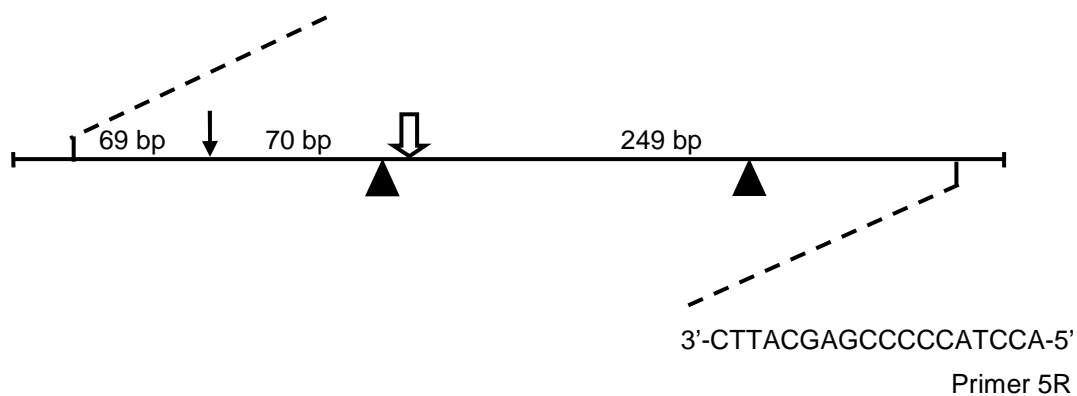
**a:** Schematisches Diagramm des durch die Primer 5F und 5R generierten PCR-Produkts, das die konstante (↓) und die polymorphe (⇓) Enzymschnittstelle zeigt sowie die Exongrenzen (▲).

**b:** In Spalte 1 befindet sich die bp-Leiter, die Spalten 2-6 beinhalten gesunde Blutspende-kontrollen, die Spalten 7-13 Individuen aus dem Kollektiv mit periodischer Katatonie. Die Variante p.Asn156Glu findet sich bei einem Indexpatienten (Spalte 11) sowie dessen gesundem Elternteil (Spalte 8).

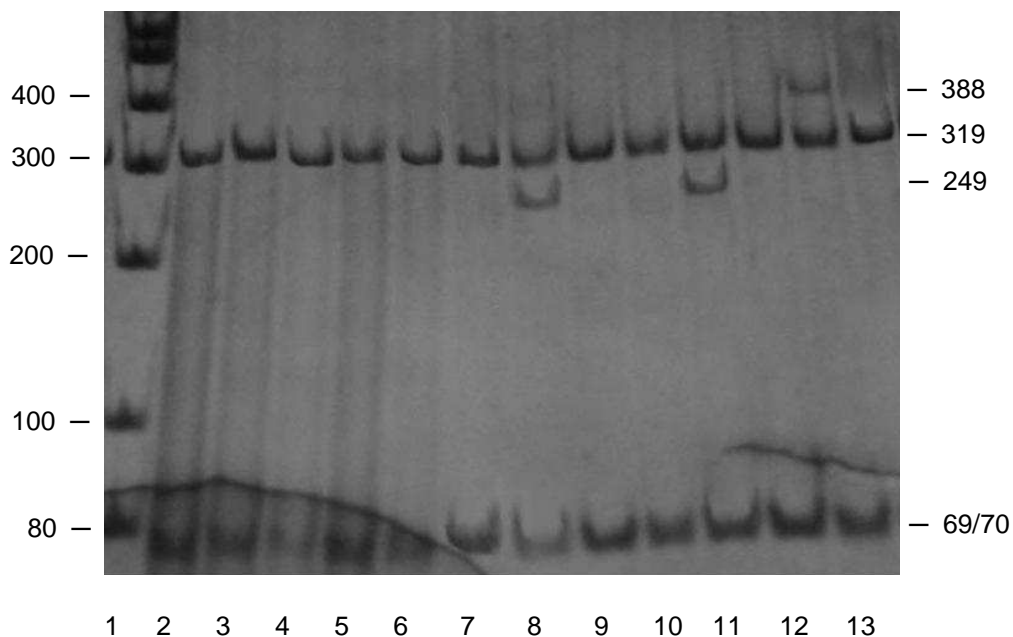
a

Primer 5F

5'-ACCTACCCCCGAGCATTC-3'



b





## 5. Diskussion

### 5.1. Allelische Heterogenität bei Megalenzephaler Leukoenzephalopathie

In dieser Studie weisen drei der fünf Individuen insgesamt vier verschiedene Mutationen im untersuchten kodierenden Bereich sowie den Exon-Intron-Grenzen auf. Bei den beiden anderen Individuen waren im untersuchten Bereich keine Mutationen nachweisbar.

In Übereinstimmung mit dem Modell einer autosomal rezessiven Vererbung von Megalenzephaler Leukoenzephalopathie wurde bei einem Patienten ein kombinierter Heterozygotenstatus entdeckt mit einer 6-bp Deletion, welche zu einer rastererhaltenden p.Leu304\_Leu305 Deletion führt, und einem aberranten Splicing. Ein Patient zeigte sich homozygot bezüglich einer rasterverschiebenden Mutation. Ein weiterer Patient war heterozygot für eine nichtkonservative p.Ala157Glu-Substitution, welche vermutlich eine Unterbrechung einer vorhergesagten transmembranen Domäne verursacht.

Diese Ergebnisse unterstreichen die hohe Sequenzdiversität von KIAA0027/MLC1 bei Patienten mit Megalenzephaler Leukoenzephalopathie und decken sich mit vorangegangenen und späteren Studien (Tabelle 4).

**Tabelle 4:** Überblick über Veröffentlichungen von Mutationen in MLC1 bei Patienten mit Megalenzephaler Leukoenzephalopathie.

Veröffentlichung	Befunde
Leegwater et al. 2001	In elf von MLC betroffenen Familien zwölf verschiedene Mutationen in MLC1. Eine Familie weist keine Kopplung nach Chr22qtel auf. Untersucht wurden die Exone und angrenzende Intronbereiche.
Leegwater et al. 2002	Bei 18 MLC-Patienten 14 neue Mutationen in MLC1. Untersucht wurden die Exone und angrenzende Intronbereiche.
Patrono et al. 2003	Bei 18 MLC-Patienten aus 15 Familien 13 Mutationen in MLC1. Fünf Patienten zeigen keine Auffälligkeiten in MLC1. Untersucht wurden die Exone und angrenzende Intronbereiche.
Ilja Boor et al. 2006	Update der bekannten MLC1-Mutationen sowie 13 neue Mutationen. Insgesamt 50 bekannte Mutationen in MLC1. Ca. 20% der MLC-Patienten zeigen keine Auffälligkeiten in MLC1. Einige Familien koppeln nicht nach Chr22qtel. Untersucht wurden die Exone und angrenzende Intronbereiche.
Montagna et al. 2006	Bei neun MLC-Patienten zwölf Mutationen, davon neun bisher unbekannt. Ein Patient zeigt keine Auffälligkeiten in MLC1. Untersucht wurden die Exone und angrenzende Intronbereiche.

Außerdem liefern sie einen weiteren Beleg dafür, dass dieser Phänotyp mit Mutationen im MLC1-Gen assoziiert ist. Bei zwei Patienten, bei denen klinische und bildgebende Diagnostik für die Diagnose Megalenzephaler Leukoenzephalopathie sprachen, konnten keine krankheitsverursachenden Mutationen entdeckt werden.

Dies könnte dadurch bedingt sein, dass nur die kodierenden Bereiche des MLC1-Genes mit den angrenzenden intronischen Bereichen untersucht wurden, und so Mutationen in Regulationsdomänen, die die Genexpression beeinflussen könnten, nicht detektiert wurden. Auch in anderen Untersuchungen (Patrono et al. 2003, Montagna et al. 2006) zeigten einige Patienten mit MLC keine Auffälligkeiten in MLC1, so dass bei untersuchten Individuen ohne Mutationen in MLC1 die Möglichkeit eines weiteren MLC-verursachenden Genlokus in Betracht gezogen werden muss.

Im Rahmen dieser Studie wurden keine Kopplungsanalysen durchgeführt.

Weitere Studien ergaben, dass nicht alle von MLC betroffenen Familien eine Kopplung nach Chromosom22qtel aufweisen (Leegwater et al. 2001, Ilja Boor et al. 2006).

Insgesamt zeigen also sämtliche bislang durchgeführten Untersuchungen, dass bei der Megalenzephalen Leukoenzephalopathie eine große genetische Heterogenität besteht.

## 5.2. Bewertung der KIAA0027/MLC1-Sequenzvariationen bei periodischer Katatonie

Um die ätiologische Rolle von MLC1 bei periodischer Katatonie zu beleuchten, wurde in dieser Arbeit ein systematischer Mutations-Scan bei 140 Indexfällen mit periodischer Katatonie durchgeführt. Dieser Phänotyp koppelt in einer genomweiten Kopplungsstudie (Stöber et al. 2000) in einer Familie, in welcher Meyer und Kollegen 2001 eine Assoziation einer genetischen Variante von MLC1 mit Schizophrenie publiziert hatten, auf Chromosom 22q13.

Insgesamt wurden 13 SNPs entdeckt (vgl. Tabelle 2). Sieben Varianten waren in intronischen Sequenzen lokalisiert und betrafen keine bekannten Splice-Stellen, diese SNPs kamen auch in gesunden Blutspendekontrollen vor. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Häufigkeit dieser SNPs in den gesunden Blutspendekontrollen und der Häufigkeit bei den Indexpatienten. Die c.-549C>T Variante betrifft weder Transkriptionsbindungsstellen noch die Promotor-Region. Zwei weitere Varianten (c.268G>A und c.709C>T) lagen zwar im Exonbereich, waren aber synonyme Kodon-Mutationen, welche ebenfalls keine abweichenden Schnittstellen schufen.

Die c.627G>T Variante führt zum in einer internalen Helix liegenden nichtkonservativen Aminosäureaustausch p.Cys171Phe, betrifft keine bekannten biologisch signifikanten Stellen, Muster oder Profile und liegt bei jeweils einem Fünftel sowohl der Indexpatienten als auch der Kontrollen vor. Zudem schließt die Homozygotität für p.Cys171Phe in einer Häufigkeit von 1% in der Allgemeinbevölkerung den Aminosäureaustausch als eine prädisponierende Variante für die seltene Megalenzephale Leuko-

enzephalopathie aus.

Desweiteren wurde ein komplizierter Polymorphismus c.1165\_1166ins33bp (McQuillin et al. 2002) in Exon 11 gefunden, mit gleicher Häufigkeit bei Schizophrenie-Patienten und Kontrollen, die Allel-Häufigkeit von c.1165\_1166ins33bp war vergleichbar in verschiedenen kaukasischen Populationen, welche an Schizophrenie leiden. Zusätzlich segregiert 1165ins33bp nicht in F21, welche eine Kosegregation von p.309Leu>Met gezeigt hat.

Die seltene c.769C>A Variante mit dem Aminosäureaustausch p.Asn218Lys kann als möglicher Risikofaktor für Megalenzephalie Leukoenzephalopathie aufgrund der geringen Häufigkeit mit einer geschätzten Homozygotenfrequenz von 1:40.000 hingegen nicht völlig ausgeschlossen werden. p.Asn218Lys liegt ebenso wie p.Leu309Met in einer vorhergesagten Transmembrandomäne ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Ihre funktionelle Signifikanz ist noch ungeklärt.

Bezüglich der Tatsache, dass p.Leu309Met bei zwei Indexpatienten mit periodischer Katatonie, nicht jedoch bei den Blutspendekontrollen entdeckt wurde, können verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen werden. Erstens könnte die Variante als autosomal dominant mit verminderter Penetranz fungieren. In diesem Fall könnte das nichterkrankte Elternteil, welches in die entsprechende Familie einheiratete, andere Risikogene oder -faktoren miteingebracht haben. Jedoch gab es keinen Hinweis auf einen Fall von endogener Psychose in diesem Familienzweig. Es müsste dann gefordert werden, dass die Erkrankung dieses betroffenen Elternteils und die weiterer Familienmitglieder entweder als Phänokopie besteht oder durch ein anderes Krankheitsgen verursacht wird, welches unabhängig in diesem Familienteil segregiert, da eine der beiden Familien (F20) keine Kopplung zur Kandidatenregion Chromosom 22q13 aufweist. Zweitens könnten beide elterliche Zweige der Familien F21 und F20, welche die p.Leu309Met-Variante tragen, entfernt miteinander verwandt sein. Mit Hilfe von drei telomeren Markern fand sich aber kein Beweis dafür, dass F20 und F21 einen gemeinsamen Chromosom 22qtel-Haplotyp besitzen. Basierend auf dem polymorphen Marker D22S1744 und dem intragenetischen MLC1-Haplotyp konnte jedoch nicht

ausgeschlossen werden, dass das unbetroffene Elternteil in F20 und Mitglieder von F21 ein gemeinsames Segment distal der beschriebenen Variante teilen. Demzufolge wäre ein gemeinsamer Vorfahr mit p.Leu309Met in den beiden Familien möglich.

Eine andere alternative Annahme besteht darin, dass die p.Leu309Met-Variante über eine oligogene Verteilung zu dem Phänotyp führt. Ergebnisse der genomweiten Kopplungsanalyse bezüglich der periodischen Katatonie sind jedoch vorwiegend kompatibel mit einem Hauptgenmodell. Mittels nichtparametrischer Analyse (Genehunter) ergab der Stammbaum von F21 einen NPL-Score von 15,63 bei D22S1169 ( $p=0,0019$ ), und alle anderen Chromosomen zeigten keinen Hinweis auf eine Kopplung. Zusätzlich erbrachte die parametrische Analyse der Betroffenen mit Zugrundelegung eines autosomal dominanten Modells einen maximalen Multipoint-LOD-Score von 2,59 bei der Rekombinationsfraktion 0,0 bei D22S1169, und alle betroffenen Individuen zeigten perfekte Kosegregation des telomeren Chromosom 22q13 Segments (Rubie et al. 2002).

In der Zusammenschau dieser Überlegungen scheint p.Leu309Met eine seltene, aber nicht schizophrenieassoziierte Variante des MLC1-Genes zu sein. Sie segregiert zwar im koppelnden Haplotyp in F21, kommt aber auch in der Allgemeinbevölkerung vor, was sich durch ihre Anwesenheit in einem nichtbetroffenen Individuum, welches in F20 einheiratete, zeigen lässt.

Megalenzephalie Leukoenzephalopathie und periodische Katatonie weisen weder klinische Überlappung auf, noch koinzidieren oder kosegregieren die beiden Erkrankungen. Die Megalenzephalie Leukoenzephalopathie beginnt im frühen Kindesalter und zeichnet sich durch einen progredienten Verlauf mit neurologischen Symptomen wie Ataxie und Spastik sowie im Folgenden auch einen kognitiven Abbauprozess nach zunächst normaler geistiger Entwicklung aus. Dagegen liegt der Krankheitsbeginn der periodischen Katatonie typischerweise im Erwachsenenalter. Die psychomotorischen, katatonen Symptome dieser Patienten mit hyperkinetischen und akinetischen Anteilen und der bipolare schubförmige Verlaufen lassen zusätzlich eine klare klinische

Abgrenzung dieser beiden Krankheitsbilder voneinander zu. Abgesehen von den klinischen Unterschieden zwischen Megalenzephaler Leukoenzephalopathie und Schizophrenie ist die unterschiedliche Neuropathologie der beiden Erkrankungen von spezifischer Signifikanz. Megalenzephaler Leukoenzephalopathie gehört zu den vakuolisierenden Myelinopathien mit normaler Struktur der Pyramiden- und Nichtpyramidenzellen, intensiver fibrillärer Astroglie und dem Vorkommen von unzähligen Vakuolen in der subkortikalen weißen Substanz (van der Knaap et al. 1996). Die Hauptpathologie bei schizophrenen Psychosen ist subtiler und zeigt eine abnorme Zellarchitektur und abnormale Zellanordnungen im Hippocampus, sowie einen entorhinalen und cingulären Cortex mit betroffenen Pyramidenzellen und Interneuronen (Bogerts 1993, Beckmann 2001).

Auch auf molekulargenetischer Ebene ergaben sich im systematischen Mutationsscan bei 140 Probanden mit periodischer Katatonie und fünf Probanden mit Megalenzephaler Leukoenzephalopathie keine Hinweise dafür, dass MLC1-Mutationen mit periodischer Katatonie assoziiert sein könnten, während der Zusammenhang zwischen MLC1-Mutationen und Megalenzephaler Leukoenzephalopathie untermauert wurde. Dies deckt sich mit vorangegangenen und späteren Studien (Leegwater et al. 2001, Leegwater et al. 2002, Bettecken et al. 2002, Rubie et al. 2002, Patrono et al. 2003, Ilja Boor et al. 2006, Montagna et al. 2006).

Trotz dieser klaren Resultate bezüglich MLC1 veröffentlichten Verma und Kollegen 2005 Ergebnisse, welche in einer Fall-Kontroll-Studie einen Zusammenhang zwischen zwei SNPs (rs2235349, rs2076137) im Bereich dieses Gens bei südindischen Patienten mit Schizophrenie nahe legten, bei zwei weiteren SNPs (ss16339163, ss16339182) mit bipolarer Störung. rs2235349 ist in Intron 6 und rs2076137 in Intron 7 lokalisiert. Es sind also keine kodierenden Sequenzen betroffen. Die p.Leu309Met-Variante konnte in dieser Studie nicht gefunden werden. Bereits im Vorfeld hatten mehrere Autoren auf mögliche Zusammenhänge in der Genetik der Schizophrenie und der bipolaren Störung hingewiesen (Bramon und Sham 2001, Berrettini 2003, Berrettini 2004). Als Gründe dafür wurden epidemiologische Charakteristiken

und Resultate aus Familienstudien mit gemeinsamen Kopplungsbefunden in diversen Genregionen genannt. Allerdings unterschieden diese Studien nicht zwischen den klar unterscheidbaren Formen der schizophrenen Erkrankungen nach Leonhard. Desweiteren gibt es Faktoren, welche für die Entstehung einer Vielzahl von psychischen Erkrankungen, unabhängig von der genetischen Ätiologie, eine Rolle spielen. Somnath und Kollegen fanden 2002 zwar ein erhöhtes Risiko für die Angehörigen von Patienten mit einer Schizophrenie oder einer bipolaren Störung, an der jeweils anderen Erkrankung zu leiden, jedoch ergaben sich keine Hinweise auf eine Koaggregation. Sie schlussfolgerten daher, dass Schizophrenie und bipolare Störung familiär unabhängig sind, jedoch möglicherweise genetische Gemeinsamkeiten bezüglich der Prädisposition für die beiden Erkrankungen bestehen könnten.

In einer weiteren Studie wurden 212 Probanden mit Schizophrenie (davon 56 mit periodischer Katatonie) sowie 106 Probanden mit bipolarer Störung nach ICD-10 untersucht (Selch et al. 2007). Die beiden von Verma und Kollegen 2005 mit Schizophrenie in Zusammenhang gebrachten SNPs (rs2235349, rs2076137) zeigten eine signifikante Assoziation zur periodischen Katatonie, eine Assoziation mit anderen Formen der Schizophrenie oder mit einer bipolaren Störung ließ sich hingegen nicht bestätigen.

Im Hinblick zur statistischen Aussagefähigkeit der eigenen Studie scheinen dies jedoch Zufallsbefunde bei niedriger Fallzahl zu sein. Zudem befinden sich die beiden SNPs nicht im exonischen Bereich. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass beide SNPs gekoppelt mit krankheitsverursachenden Mutationen vererbt werden.

### 5.3. Genetische Varianten von KIAA0767/DIP bei den drei Familien mit periodischer Katatonie

In einem systematischen Mutationsscan von KIAA0767, das in der Chromosom22qtel-Kandidatenregion für periodische Katatonie liegt, wurden etwa 1700 bp kodierender Sequenz mit den angrenzenden Intronbereichen einschließlich Spleiss-Donor-Stellen und zusätzliche Teile des 5'-UTR und des

3'-UTR untersucht. Der Mutationsscan erbrachte sieben Sequenzvarianten, wovon sechs in intronischen Bereichen lokalisiert waren (rs2076708, rs9616088, rs2076711, rs55828234, rs2073276, rs2236028) und die andere eine seltene Kodonvariante (p.Glu156Asn) darstellte. Jedoch kosegregierte diese weder mit der Erkrankung in den untersuchten Stammbäumen, noch wurde sie in einer signifikanten Frequenz bei Patienten mit periodischer Katatonie gefunden.

DIP zeigt mindestens zwei Transmembrandomänen und mehrere vermutete Phosphorylations- und Glykolisations-Stellen. Die Variante p.Glu156Asn beeinträchtigt keine der verschiedenen beschriebenen funktionellen KIAA0767/DIP Proteindomänen.

Startend vom Kopplungssignal auf Chromosom 22qtel bei periodischer Katatonie wurde ein im Gehirn exprimiertes Kandidatengen (KIAA0767/DIP) auf genetische Variation untersucht. Diese Studie schließt Varianten in der kodierenden Sequenz und den vermuteten Promotorregionen als krankheitsverursachende Faktoren für periodische Katatonie aus, nicht jedoch den Einfluss anderer regulierender Elemente in intronischen Bereichen, den nicht translatierten Bereichen am 3'- und 5'-Ende oder in erweiterten Promotorregionen. Obwohl von negativem Ergebnis schränkt diese Studie die vermutete Verdachtsregion ein und unterstützt eine systematische SNP-Generierung für kommende LD-Studien (Stöber et al. 2005).



## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die systematische Suche nach krankheitsassoziierten Genen bei periodischer Katatonie fortgeführt. Für diese Erkrankung war die klinische Abgrenzbarkeit und die familiäre Häufung signifikant und ließ aufgrund der vertikalen Transmission und dem Auftreten über mehrere Generationen und hinweg auf einen Hauptgeneffekt schließen. Nach der Durchführung von Kopplungs-Analysen kristallisierten sich zwei koppelnde Regionen auf den Chromosomen 15 und 22 heraus. Mittels Haplotypanalyse konnte der Genort auf Chromosom 22q13 auf einen knapp 5 Mbp großen Bereich eingeschränkt werden. Im kodierenden Bereich des MLC1-Genes segregierte im mit periodischer Katatonie assoziierten Haplotyp eine Variante (p.Leu309Met).

Da Mutationen im MLC1-Gen bereits im Zusammenhang mit Megalenzephaler Leukoenzephalopathie beschrieben worden waren, wurden in dieser Arbeit zunächst fünf Patienten mit dieser Erkrankung auf Mutationen in kodierenden Bereichen von MLC1 systematisch untersucht. Daran schloss sich eine Analyse dieses Gens bei 140 Patienten mit periodischer Katatonie an. Ein Zusammenhang zwischen Mutationen in MLC1 und dem Auftreten von Megalenzephaler Leukoenzephalopathie wurde untermauert, wohingegen die Ergebnisse eindeutig gegen eine Assoziation mit periodischer Katatonie sprachen.

Ein weiteres im Gehirn exprimiertes Kandidatengen (KIAA0767/DIP) wurde in dieser Arbeit untersucht. Dabei wurden sechs SNPs im exonnahen intronischen Bereich entdeckt sowie eine Variante im Exonbereich (p.Glu156Asn). Dies ist eine seltene Normvariante, eine Assoziation zur periodischen Katatonie wurde in einer Fall-Kontroll-Studie ausgeschlossen.

Insgesamt wurde durch die systematische Mutationsanalyse die Kandidatenregion auf Chromosom 22q13.3 weiter eingengt. Gegen einen Zusammenhang zwischen MLC1 und periodischer Katatonie sprechen die vorgestellten validen Ergebnisse.

## 7. Anhang

### 7.1. Exon-Intron-Strukturen von KIAA0027/MLC1 und KIAA0767/DIP

**Tabelle 5:** Exonstruktur KIAA0027/MLC1 (UCSC Genome Browser)

KIAA0027/MLC1					
Exon Nr.	mRNA Start [bp]	mRNA Ende [bp]	Länge [bp]	Chr22 Start [bp]	Chr22 Ende [bp]
Exon 1	1	214	214	48865908	48865695
Exon 2	215	450	236	48865517	48865282
Exon 3	451	540	90	48863729	48863640
Exon 4	541	594	54	48860953	48860900
Exon 5	595	696	102	48860575	48860474
Exon 6	697	798	102	48858058	48857957
Exon 7	799	870	72	48857468	48857397
Exon 8	871	987	117	48854888	48854772
Exon 9	988	1044	57	48851139	48851083
Exon 10	1045	1167	123	48849111	48848989
Exon 11	1168	1332	165	48844754	48844590
Exon 12	1333	1407	75	48842213	48842139
3'-UTR	1408	3599	2192	48842138	48839947

**Tabelle 6:** Exonstruktur KIAA0767/DIP (UCSC Genome Browser)

KIAA0767/DIP					
Exon Nr.	mRNA Start [bp]	mRNA Ende [bp]	Länge [bp]	Chr22 Start [bp]	Chr22 Ende [bp]
Exon 1	1	201	201	45401322	45401522
Exon 2	202	322	121	45412401	45412521
Exon 3	323	443	121	45432748	45432868
Exon 4	444	505	62	45435942	45436003
Exon 5	506	638	133	45437601	45437733
Exon 6	639	664	26	45438399	45438424
Exon 7	665	756	92	45438587	45438678
Exon 8	757	848	92	45440176	45440267
Exon 9	849	897	49	45441386	45441434
Exon 10	898	969	72	45442657	45442728
Exon 11	970	1013	44	45443250	45443293
Exon 12	1014	1123	110	45443360	45443469
Exon 13	1124	1278	155	45447404	45447558
Exon 14	1279	1423	145	45448231	45448375
Exon 15	1424	1517	94	45449218	45449311
Exon 16	1518	1602	85	45450029	45450113
Exon 17	1603	1671	69	45451161	45451229
Exon 18	1672	1776	105	45451708	45451812
3'-UTR	1777	4315	2539	45451813	45454351

## 7.2. Material

### 7.2.1 Tabellen mit Primern

**Tabelle 7:** Darstellung der für KIAA0027 verwendeten Oligonukleotide mit Name, Sequenz, Produktlänge und erfassten Exonen.

Tabelle: Primer KIAA0027			
Name	Oligonukleotid-Sequenz	Produktlänge [bp]	erfasste Exone
1F	5'-CAAAACATGCCTCTACTCAACG-3'	236	Exon 1
1R	5'- AGTGGTTTACACAACCAACACG -3'		
2F	5'-AGGGACCAGATGCTCGTG-3'	329	Exon 2
2R	5'- AGTTTCCTCAGAGTGGCCAA -3'		
3F	5'-GAACAAAGAAACCAGAGCACG-3'	233	Exon 3
3R	5'- GCAGAAGTTGAAGGGTCAGG -3'		
4F	5'-GTGCCACAACGTCTGTGC-3'	210	Exon 4
4R	5'- AGTTGCTCAGGTGAGCGG -3'		
5F	5'-TGACACCATTCTGTTGGAGT-3'	250	Exon 5
5R	5'- GAATGGCCTGAAGTGTGGTT -3'		
6F	5'-GAGACCCACCTCGCTCAC-3'	279	Exon 6
6R	5'- CTGAGAGTCCTGCGCAGC -3'		
7F	5'-ACGTGACGTTTAATCCAGCC-3'	200	Exon 7
7R	5'- GTGCTGAGTCCCTGTGCC -3'		
8F	5'-TGAATGCACCAAGACTGAGC-3'	277	Exon 8
8R	5'- AGTGCATTCTGGGAATCTGG -3'		
9F	5'-TGGTCACATGGCACCAAG-3'	214	Exon 9
9R	5'- AGGGCACATGTTTGGAATTC -3'		
10F	5'-CAACACGCAGAGCACCAC-3'	332	Exon 10
10R	5'- AAAAGGCAGAGGTTTCAGCA -3'		
11F	5'-CCCACAGGCTTCTCACCTC-3'	496	Exon 11
11R	5'-TGGCTCGGTCACTTTTATTCC-3'		
12F	5'-TGTGCGTTTCCATGCTTG-3'	244	Exon 12
12R	5'- GAAAATTCTGAACGCTGGC -3'		

**Tabelle 8:** Darstellung der für KIAA0767 verwendeten Oligonukleotide mit Name, Sequenz, Produktlänge und erfassten Exonen.

Tabelle: Primer KIAA0767			
Name	Oligonukleotid-Sequenz	Produktlänge [bp]	erfasste Exone
1F	5'-CTCTCTTGCAGGGAACCC-3'	366	Exon 1
1R	5'-AGCAGGTGAGACAGAGAGTCA-3'		
2F	5'-AACTGCAGCTGCTGGTCC-3'	325	Exon 2
2R	5'-CGACATCCCCCATCTCAG-3'		
3F	5'-CTGAGTCAGGCACCCCTG-3'	296	Exon 3
3R	5'-TATGGGTGCAGCAGAGGAC-3'		
4F	5'-ACCTCTCCTGTGCAGTACACG-3'	263	Exon 4
4R	5'-TCTGCTCCATTGTTAACCTGG-3'		
5F	5'-ACCTACCCCGAGCATTG-3'	388	Exon 5
5R	5'-CAGCCTCACAGACAGCTTTG-3'		
6F	5'-TGTTGAGACGTCCTCCCTG-3'	250	Exon 6
6R	5'-TTAACCACGTCTCCCTGGAG-3'		
7F	5'-CTCCAGGGAGACGTGGTTAA-3'	299	Exon 7
7R	5'-AGAAATGAGCATGTCCCTGG-3'		
8F	5'-GGGAGGGATGTGCCTTGTG-3'	237	Exon 8
8R	5'-CACGGTTGTGAGACGCAG-3'		
9F	5'-GAAGGACCTAGAAGGGCCC-3'	234	Exon 9
9R	5'-CCTACAGGCTGTGAGGCCT-3'		
10F	5'-GGGGACAGCAGAGTCCCT-3'	250	Exon 10
10R	5'-GCGTAGACACACCCCTGG-3'		
11-12F	5'-GGTGTGACTGACAGCCCAG-3'	350	Exon 11 + 12
11-12R	5'-CAGACACTGGTGGCATGC-3'		
13F	5'-CAGCTGGACTCTCACATCCA-3'	387	Exon 13
13R	5'-TAAATGAGCCGGAGGTGAAC-3'		
14F	5'-ATCCCAGCTTTTGGGGAG-3'	377	Exon 14
14R	5'-GTGGGATGTGAATGCCATC-3'		
15F	5'-AGTCAGGCTCCTGGGTCC-3'	247	Exon 15
15R	5'-ATCCCAGGGCCTAGGCAG-3'		
16F	5'-TCTGTGTCTGCTGGGAAGG-3'	369	Exon 16
16R	5'-AGTCAAGGAAACGGACCATG-3'		
17F	5'-GTGTGCCAGTGGAGGAG-3'	237	Exon 17
17R	5'-CCCAGGGTTGCTCAGAGTC-3'		
18F	5'-GCTGTGCCATGCTCACTG-3'	254	Exon 18
18R	5'-TGCAAAGCTCATGAGGATG-3'		

### 7.2.2. Enzyme und molekularbiologische Kits

Taq-DNA-Polymerase	Metabion International AG, Planegg-Martinsried
Mbo I	New England Biolabs GmbH, USA
PCR Purification Kit, QIAquick®	Qiagen GmbH, Hilden
Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction	Applied Biosystems, Foster City, USA

### 7.2.3. Reagenzien und Chemikalien

Nukleotide	Metabion International AG, Planegg-Martinsried
Oligonukleotide	MWG Biotech AG, Ebersberg
HPLC-H <sub>2</sub> O	Merck KgaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
TBE	Merck KgaA, Darmstadt
100bp-DNA-Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
EtOH (Ethanol)	Merck KgaA, Darmstadt
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ficoll	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
KCl (Kaliumchlorid)	Merck KgaA, Darmstadt
TrisHCl	Merck KgaA, Darmstadt

MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumdichlorid)	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Gelatine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

#### 7.2.4. Apparate

MJ Research PTC-225 Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Gelkammer: Bio-Rad Sub-Cell R GT	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Gelkämme	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
UV Transilluminator Herolab UVT-40 M	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch
Kamera Herolab E.A.S.Y. 429 K	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch
Zentrifuge Mikro 20	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Rotanta 46 RS	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Gilson Pipetman 20, 200, 1000	Gilson International B. V., Bad Camberg
Transferpipette R-8 20-200µl, 0,5-10µl	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Pipettenspitzen Gilson Diamond D200, D1000 Tower Pack™	Gilson International B. V., Bad Camberg
Vortex Mixer	Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch
Collection Tubes 2 ml	Qiagen GmbH, Hilden

Applied Biosystems Hitachi 3100 Genetic Analyzer

Applied Biosystems, Foster City, USA

Transgenomic WAVE 3500 DNA Fragment Analysis System

Transgenomic Inc., Omaha, USA

#### 7.2.5. PC-Programme

Programm zur Primererstellung:  
Primer Version 0.5

Whitehead Institute for Biomedical Research, Copyright 1991

Programm zur Photodokumentation:  
E.A.S.Y. Win32

Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch

Programm zur Auswertung der Resultate der DHPLC: WAVEmaker 4.0

Transgenomic Inc., Omaha, USA

Programm zur Analyse der DNA-Sequenz: BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 5.0.1

Department of Mikrobiologie, North Carolina State University

Programm zur Suche nach Restriktions-Enzymen für die RFLP-Analyse:  
Webcutter 2.0

Max Heiman, Copyright 1997

Programm zur Erstellung der Grafiken:  
Paint.NET v3.10

Rick Brewster, Tom Jackson, and contributors, Copyright 2007





### 7.3. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
A	Adenin
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	complementary desoxyribonucleid acid
CELSR1	Cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 1
cm	Zentimeter
cM	centi-Morgan
Coiled Coil Motiv	zwei oder mehr umeinander gewundene Alpha-Helices, „Spirale einer Spirale“, eine Proteininteraktionsdomäne
COMT	Catechol-O-methyl transferase
CX36	Connexin 36 Gen
DGCR6	DiGeorge syndrom critical region gene 6
d. h.	das heißt
DHPLC	denaturing high pressure liquid chromatography, denaturierende Hochdrucksflüssigkeitschromatographie
DIP	death inducing protein
DNA	desoxyribonucleid acid, Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleotid
dNTP	Nukleotidtriphosphat
Dr.	Doktor
E2F1	E2F transscription factor 1
G	Guanin
HLOD	heterogeneity logarithmic odds ratio
HUGE	Human Unidentified Gene-Encoded

Kappa-Koeffizient	Maß für den Zusammenhang zweier nominaler Merkmale (Werte zwischen 0 und 1)
LD	Kopplungsungleichgewicht
LOD	logarithmic odds ratio, Maß für die Wahrscheinlichkeit einer Genkopplung
Low Complexity Region	Region in einer DNA- oder Proteinsequenz, die aus einer oder wenigen sich wiederholenden Basen bzw. Aminosäuren aufgebaut ist
M	molare Masse
Mbp	Mega-Basenpaar, 1.000.000 bp
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
MLC	Megalenzepale Leukoenzephalopathie
MLC1	megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1
MHLOD	Maximum Heterogeneity LOD
MLOD	Maximum LOD
mRNA	messenger ribonucleid acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MSP	Multiple Scan Probability
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPL	non parametric linkage
NPL-score	non parametric LOD-score
p53	Tumorsuppressorprotein p53
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PD	Privatdozent
PK	periodische Katatonie
PRODH2	Prolin-Dehydrogenase-Gen 2
Prof.	Professor

Rekombinationsfraktion	Eine Rekombinationsfraktion von 0,01 bedeutet, dass es in 1% der Meiosen zur Rekombination kommt (entspricht 1 centi-Morgan)
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
SLC30A4	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 4
SNP	single nucleotid polymorphism, Einzelnukleotidpolymorphismus
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TEAA	Triethylammoniumacetat
$T_m$	Schmelztemperatur
U	Unit
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
z. B.	zum Beispiel
$Z_{lr}$ Score	maximum likelihood ratio Z score
$Z_{max}$	maximal LOD Score

#### 7.4. Literaturverzeichnis

American Psychiatric Association. DSM IV – diagnostisches und statistisches Manual Psychischer Störungen. Hogrefe Verlag 1996

Arnold SE, Ruschinsky DD, Han LY. Further evidence of abnormal cytoarchitecture of entorhinal cortex in schizophrenia using spatial point pattern analyses. *Biol Psychiatry* 1997; 42: 639-647

Badner JA, Gershon ES. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 405-411

Beckmann H, Franzek E, Stöber G. Genetic heterogeneity in catatonic schizophrenia: a family study. *Am J Med Genet* 1996; 67: 289-300

Beckmann H. Neuropathology of the endogenous psychoses. In: Henn F, Sartorius N, Helmchen H, Lauter H (Hrsg). *Contemporary psychiatry*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York Tokyo 2001; 3: 81- 100

Berrettini W. Evidence for shared susceptibility in bipolar disorder and schizophrenia. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2003; 15: 59-64

Berrettini W. Bipolar disorder and schizophrenia: convergent molecular data. *Neuromolecular Med* 2004; 5: 109-117

Bettecken T, Rubie C, Lichtner P, Siekiera M, Meitinger T, Stöber G. Reduced amplification efficiency of KIAA0027/MLC1 alleles: implications for the molecular diagnosis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Molecular and Cellular Probes* 2002; 16: 379-384

Bleuler E. Dementia praecox oder die Gruppe der Schizophrenien. In: Aschaffenburg G (Hrsg). *Handbuch der Psychiatrie*. Deuticke, Leipzig, Wien 1911

Blouin JL, Dombroski BA, Nath SK, Lasseter VK, Wolynec PS, Nestadt G, Thornquist M, Ullrich G, McGrath J, Kasch L, Lamacz M, Thomas MG, Gehrig C, Radhakrishna U, Snyder SE, Balk KG, Neufeld K, Swartz KL, DeMarchi N, Papadimitriou GN, Dikeos DG, Stefanis CN, Chakravarti A, Childs B, Housman DE, Kazazian HH, Antonarakis S, Pulver AE. Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21. *Nat Genet* 1998; 20: 70-73

Bogerts B. Recent advances in the neuropathology of schizophrenia. *Schizophrenia Bull* 1993; 19: 431-445

Bräunig P, Krüger S. Images in psychiatry. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 7

Bramon E, Sham P. The common genetic liability between schizophrenia and bipolar disorder: a review. *Current Psychiatry Reports* 2001; 3:332-337

Durell SR, Hao Y, Guy HR. Structural models of the transmembrane region of voltage-gated and other K<sup>+</sup> channels in open, closed, and inactivated conformations. *J Struct Biol* 1998; 121: 263-284

Franzek E. Influence of Carl Wernicke on Karl Leonhard's nosology. *Psychopathology* 1990; 23: 277-281

Franzek E, Schmidtke A, Beckmann H, Stöber G. Evidence against unusual sex concordance and pseudoautosomal inheritance in the catatonic subtype of schizophrenia. *Psychiatry Res* 1995; 59: 17-24

Franzek E, Beckmann H. Gene-environment interaction in schizophrenia: season-of-birth effect reveals etiologically different subgroups. *Psychopathology* 1996; 29: 14-26

Franzek E, Ungvari GS. Recent advances in Leonhardian nosology I. Würzburg 1997

Franzek E, Beckmann H. Different genetic background of schizophrenia spectrum psychosis: a twin study. *Am J Psychiatry* 1998; 155: 76–83

Gjessing RR. Disturbances of somatic functions in catatonia with a periodic course and their compensation. *J Ment Sci* 1938; 84: 608-621

Griesinger W. *Die Pathologie und Therapie der psychischen Krankheiten*. Stuttgart, A. Krabbe, 1845

Groß J, Grimm O, Ortega G, Teuber I, Lesch KP, Meyer J. Mutational analysis of the neuronal cadherin gene CELSR1 and exclusion as a candidate for catatonic schizophrenia in a large family. *Psychiatr Genet* 2001; 11: 197-200

Hamshere ML, Bennett P, Williams N, Segurado R, Cardno A, Norton N, Lambert D, Williams H, Kirov G, Corvin A, Holmans P, Jones L, Jones I, Gill M, O'Donovan MC, Owen MJ, Craddock N. Genomewide linkage scan in schizoaffective disorder: significant evidence for linkage at 1q42 close to DISC1, and suggestive evidence at 22q11 and 19p13. *Arch Gen Psychiatry* 2005; 62: 1081-1088

Hari Krishnan K, Leema Pauline C, Kumaresan G, Vasantha Mallika TK. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Indian Pediatrics* 2005; 42: 60-63

Hennig W. *Genetik*. Springer Verlag: 2. Auflage 1998

Ilja Boor PK, de Groot K, Mejaski-Bosnjak V, Brenner C, van der Knaap MS, Scheper GC, Pronk JC. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: an update and extended mutation analysis of MLC1. *Hum Mutat.* 2006; 27: 505-512

Jakob H, Beckmann H. Circumscribed malformation and nerve cell alterations in the entorhinal cortex of schizophrenics. Pathogenetic and clinical aspects. J Neural Transm 1994; 98: 83-106

Kahlbaum KL. Die Gruppierung der psychischen Krankheiten und die Einteilung der Seelenstörungen. Kafemann, Danzig 1863.

Kahlbaum KL. Die Katatonie oder das Spannungsirresein. Eine klinische Form psychischer Krankheit. A. Hirschwald, Berlin 1874

Kleist K. Die Symptomatik der Schizophrenien im Lichte der Gehirnpathologie. Congress Report of the IInd International Congress for Psychiatry. Synopses. Zürich 1957

van der Knaap MS, Barth PG, Stroink H, van Nieuwenhuizen O, Arts WF, Hoogenraad F, Valk J. Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. Ann Neurol. 1995; 37: 324-334

Knippers R. Molekulare Genetik. Thieme Verlag: 8. Auflage 2001

Kornhuber J, Lange KW, Kruzik P, Rausch WD, Gabriel E, Jellinger K, Riederer P. Iron, copper, zinc, magnesium, and calcium in postmortem brain tissue from schizophrenic patients. Biol Psychiatry 1994; 36: 31-34

Kraepelin E. Psychiatrie. 4. Auflage. Abel (Meixner), Leipzig 1893

Küry S, Rubie C, Moisan JP, Stöber G. Mutation analysis of the zinc transporter gene SLC30A4 reveals no association with periodic catatonia on chromosome 15q15. J Neural Transm 2003; 11: 1329-1322



Leegwater PAJ, Yuan BQ, van der Steen J, Mulders J, Könst AAM, Boor PKI, Mejaski-Bosnjak V, van der Maarel SM, Frants RR, Oudejans CBM, Schutgens RBH, Pronk JC, van der Knaap MS. Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leucoencephalopathy with subcortical cysts. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 831-838

Leegwater PAJ, Boor PKI, Pronk JC, van der Knaap MS. Association of WLK1/MLC1 with catatonic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 1037

Leegwater PAJ, Boor PKI, Yuan BQ, van der Steen J, Visser A, Konst AAM, Oudejans CBM, Schutgens RBH, Pronk JC, van der Knaap MS. Identification of novel mutations in MLC1 responsible for megalencephalic leucoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum Genet* 2002; 110: 279-283

Leonhard K. Aufteilung der endogenen Psychosen und ihre differenzierte Ätiologie. 8. Auflage. Thieme, Stuttgart 2003

Lewin B. Molekularbiologie der Gene. 6. Auflage. Spektrum Akad Verlag 1998

Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, Brzustowicz LM, Kaufmann CA, Garver DL, Gurling HM, Lindholm E, Coon H, Moises HW, Byerley W, Shaw SH, Mesen A, Sherrington R, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS, Ekelund J, Paunio T, Lonqvist J, Peltonen L, O'Donovan MC, Owen MJ, Wildenauer DB, Maier W, Nestadt G, Blouin JL, Antonarakis SE, Mowry BJ, Silverman JM, Crowe RR, Cloninger CR, Tsuang MT, Malaspina D, Harkavy-Friedman JM, Svrakic DM, Bassett AS, Holcomb J, Kalsi G, McQuillin A, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petursson H, Jazin E, Zoega T, Helgason T. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 34-48.

Magnan V. Étude expérimentale et clinique sur l'alcoolisme – alcool et absinthe, épilepsie absinthique. Paris 1871

Meyer J, Huberth A, Ortega G, Syagailo YV, Jatzke S, Mössner R, Strom TM, 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. *Mol Psychiatry* 2001; 6: 304-308

Meyer J, Mai M, Ortega G, Mossner R, Lesch KP. Mutational analysis of the connexin 36 gene (CX36) and exclusion of the coding sequence as a candidate region for catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Schizophr Res* 2002; 58: 87-91

Montagna G, Teijido O, Eymard-Pierre E, Muraki K, Cohen B, Loizzo A, Grosso P, Tedeschi G, Palacin M, Boespflug-Tanguy O, Bertini E, Santorelli FM, Estevez R. Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: functional studies of novel variants in MLC1. *Hum Mutat* 2006; 27: 292

Morel BA. *Traité des Dégénérescences physiques, intellectuelles et morales de l'espèce humaine et des causes qui produisent ces variétés malades*. Paris 1857

Patrono C, Di Giacinto G, Eymard-Pierre E, Santorelli FM, Rodriguez D, De Stefano N, Federico A, Gatti R, Benigno V, Megarbane A, Tabarki B, Boespflug-Tanguy O, Bertini E. Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology* 2003; 61: 534-537

Pfuhmann P, Stöber G. The different conceptions of catatonia: historical overview and critical discussion. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2001; 251: Suppl. I/4-I/7

McQuillin A, Kalsi G, Moorey H, Lamb G, Mayet S, Quedsted D, Baker P, Curtis D, Gurling HM. A novel polymorphism in exon 11 of the WKL1 gene, shows no association with schizophrenia. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 491–494

Rubie C, Lichtner P, Gärtner J, Siekiera M, Uziel G, Kohlmann B, Kohlschütter A, Meitinger T, Stöber G, Bettecken T. Sequence diversity of KIAA0027/MLC1: are schizophrenia and megalencephalic leukoencephalopathy allelic disorders? *Hum Mutat* 2002; 21: 45-52

Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. Nobel Lecture, 8 December 1980. *Biosci Rep* 1981; 1:3-18

Schneider K. *Klinische Psychopathologie*. 14. Auflage. Thieme, Stuttgart, 2007

Selch S, Strobel A, Haderlein J, Meyer J, Jacob CP, Schmitt A, Lesch KP, Reif A. MLC1 Polymorphisms are specifically associated with periodic catatonia, a subgroup of chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2007; 61: 1211-1214

Somnath CP, Janardhan Reddy YC, Jain S. Is there a familial overlap between schizophrenia and bipolar disorder? *J Affect Disord* 2002; 72: 243-247

Stanelle J, Tu-Rapp H, Pützer BM. A novel mitochondrial protein DIP mediates E2F1-induced apoptosis independently of p53. *Cell Death and Differentiation* 2005;12: 347-357

Stöber G, Franzek E, Lesch KP, Beckmann H. Periodic catatonia. A schizophrenic subtype with major gene effect and anticipation. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 1995; 245: 135-141

Stöber G, Franzek E, Haubitz I, Pfuhlmann B, Beckmann H. Gender differences and age of onset in the catatonic subtypes of schizophrenia. *Psychopathology* 1998; 31: 307-312

Stöber G, Saar K, Rüschenhoff F, Meyer J, Nürnberg G, Jatzke S, Franzek E, Reis A, Lesch KP, Wienker TF, Beckmann H. Splitting schizophrenia: periodic catatonia susceptibility locus on chromosome 15q15. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 1201-1207

Stöber G. Genetic predisposition and environmental causes in periodic and systemic catatonia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001; 251: Suppl 1, I/21-I/24

Stöber G, Franzek E, Beckmann H, Schmidtke A. Exposure to prenatal infections, genetics, and the risk of systematic and periodic catatonia. *J Neural Transm* 2002; 109: 921-929

Stöber G, Seelow D, Rüschemdorf F, Ekici A, Beckmann H, Reis A. Periodic catatonia: confirmation of linkage to chromosome 15 and delineation of a putative familial haplotype. *Hum Genet* 2002; 111: 232-330

Stöber G: Genetics. In *Catatonia. From psychopathology to neurobiology*. Hrsg: Caroff SN, Mann SC, Francis A, Fricchione GL. Washington DC, London: American Psychiatric Press 2004: 173-187

Stöber G, Kohlmann B, Siekiera M, Rubie C, Gawlik M, Möller-Ehrlich K, Meitinger T, Bettecken T. Systematic mutation analysis of KIAA0767 and KIAA1646 in chromosome 22q-linked periodic catatonia. *BMC Psychiatry* 2005; 5: 36

Takahashi S, Faraone SV, Lasky-Su J, Tsuang MT. Genome-wide scan of homogeneous subtypes of NIMH genetics initiative schizophrenia families. *Psychiatry Res* 2005;133: 111-122

Taylor MA, Fink M. Catatonia: a home of its own. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 1233–1241

Taylor P, Munson K, Gjerde D. Detection of Mutations and Polymorphisms on the WAVE<sup>®</sup> Nucleic Acid Fragment Analysis System. Transgenomic Inc (Omaha) 1998; Application Note 101

Venkataraman C, Schaefer G, Schindler U. Chandra, a novel four-transmembrane domain protein differentially expressed in helper type 1 lymphocytes, J Immunol 2000; 15: 632-636

Verma R, Mukerji M, Grover D, B-Rao C, Das SK, Kubendran S, Jain S, Brahmachari SK. MLC1 gene is associated with schizophrenia and bipolar disorder in Southern India. Biol Psychiatry 2005; 58: 16-22

Weltgesundheitsorganisation. Internationale Klassifikation psychischer Störungen (ICD 10 Kapitel V) Klinisch-diagnostische Leitlinien. Hans Huber Verlag 2006: 4. Auflage

Wernicke C. Grundriß der Psychiatrie in klinischen Vorlesungen. Thieme (Leipzig) 1900

#### Verwendete Datenbanken:

National Center for Biotechnology Information (NCBI)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Sanger Centre

<http://www.sanger.ac.uk/hgp/genes>

HUGE protein database

<http://www.kazusa.or.jp/huge>

UCSC (University of California Santa Cruz) Genome Browser

<http://genome.ucsc.edu>

Ensembl Genome Browser

<http://www.ensembl.org>

## **Danksagung:**

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gerald Stöber für die tatkräftige Betreuung während der experimentiellen Tätigkeiten im Labor und der Niederschrift dieser Arbeit, insbesondere Prof. Dr. Gerald Stöber selbst für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, die Unterstützung während meiner experimentiellen Arbeiten im Labor und die konstruktive Kritik und Geduld während der Niederschrift meiner Arbeit sowie Dr. Claudia Rubie für die vielen Ratschläge und Hilfen bei den Labortätigkeiten.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern im Institut für Humangenetik des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (GSF München) für den Rat und die Anleitung während der experimentiellen Arbeit dort, in erster Linie Prof. Dr. Thomas Meitinger, Dr. Thomas Bettecken und Dr. Peter Lichtner.

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Andreas Warnke für die Ausbildung und Förderung während meiner Zeit als Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Würzburg sowie für die Begutachtung meiner Dissertation.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinen Freunden für die Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion bedanken.

## **Lebenslauf:**

**Name:** Bernd Kohlmann  
**Geburtsdatum:** 23.05.1977  
**Geburtsort:** Neumarkt i. d. OPf.

**Aktuelle Tätigkeit:** seit Januar 2009 Weiterbildungsassistent in der Praxis für Kinder- und Jugendmedizin Dr. med. Harald Lodes und Dr. med. Elke Düll-Schiller in Neumarkt/OPf.

**Beruflicher Werdegang:** August 2004 – Dezember 2008 Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Würzburg

**Promotion:** September 1999 – Dezember 2008 in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychotherapie und Psychotherapie der Universität Würzburg sowie im GSF München

**Studium:** Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
WS 1997/1998 – SS 2004

**Zivildienst:** Bayerisches Rotes Kreuz in Neumarkt im Bereich individuelle Schwerstbehindertenbetreuung  
September 1996 – September 1997

**Schulbildung:** Ostendorfer Gymnasium in Neumarkt  
September 1987 – Juni 1996  
Grundschule an der Bräugasse in Neumarkt  
September 1984 – August 1987  
Grundschule Bahnhof in Neumarkt  
September 1983 – August 1984

**Neumarkt, 20.03.2009**