

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jürgen Deckert

Systematische Mutationsanalyse der Kandidatengene MLC1/KIAA0027 und  
CERK1/KIAA1646 auf Chromosom 22q13.33 bei periodischer Katatonie

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Markus Siekiera  
aus Stettin (Szczecin)

Würzburg, Februar 2009

Referent: Professor Dr. med. Gerald Stöber  
Koreferent: Professor Dr. med. Andreas J. Fallgatter  
Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 9. September 2009

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis	Seite
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Genetik schizophrener Psychosen auf Chromosom 22q .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Das Kandidatengen MLC1/KIAA0027 .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3. MLC1 und periodische Katatonie .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4. KIAA1646/CERK1 - Ceramidkinase auf Chromosom 22q13 .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Ziel der Arbeit .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Methodik .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Untersuchte Kollektive .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Primerauswahl .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. DNA-Extraktion aus EDTA-Blut .....</b>	<b>15</b>
<b>3.4. Polymerasenkettenreaktion .....</b>	<b>16</b>
<b>3.5. PCR-Produktanalyse .....</b>	<b>17</b>
<b>3.6. Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismusanalyse .....</b>	<b>18</b>
<b>3.7. Automatisierte Gensequenzierung .....</b>	<b>19</b>
<b>3.7.1. Produktreinigung .....</b>	<b>19</b>
<b>3.7.2. Sequenzierreaktion und Analyse .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1. Analyse der genetischen Struktur von Exon 11 des MLC1/KIAA0027 ...</b>	<b>22</b>
<b>4.2. Polymorphismen im Gen CERK1/KIAA1646 .....</b>	<b>26</b>
<b>4.3. Analyse der kodierenden Variante V338G in CERK1 .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4. Amplifikationsdefizite von CERK1 .....</b>	<b>30</b>
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>32</b>
<b>5.1. Auswahl der Methodik .....</b>	<b>32</b>
<b>5.2. Befunde zu MLC1/KIAA0027 und periodischer Katatonie .....</b>	<b>34</b>
<b>5.3. Befunde zu CERK1/KIAA1646 und periodischer Katatonie .....</b>	<b>37</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>42</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>44</b>
<b>8. Appendix .....</b>	<b>46</b>
<b>8.1. Geräte .....</b>	<b>46</b>
<b>8.2. Material .....</b>	<b>47</b>
<b>8.3. Primer .....</b>	<b>48</b>

8.4.	Enzyme, Lösungen, Puffer, PCR-Reagenzien.....	50
8.5.	Übersichtstabelle Polymorphismen im CERK1 .....	53
8.6.	Chemikalien .....	57
8.7.	Software.....	58
9.	Abkürzungen.....	58
9.1.	Internationale Abkürzungen für Aminosäuren.....	60
10.	Literaturverzeichnis .....	61

## 1. Einleitung

Schizophrene Psychosen sind häufige Erkrankungen, die circa 1 % der Bevölkerung betreffen. Sie gehören zu den kostenintensivsten Leiden in der Medizin und sind verbunden mit gravierenden Folgen für die Patienten (Knapp 1997). Ihre genetische Verankerung ist in zahlreichen Familien- und Zwillingsstudien dargestellt worden (Gottesmann 1991, Kendler und Diehl 1993). Seit Emil Kraepelin (1856-1926), der den Begriff der Dementia praecox prägte, haben sich die Bemühungen um eine nosologische Klassifikation und Benennung dieser Erkrankungen bis in die heutige Zeit fortgesetzt. Neben nosologischen, symptomorientierten Einteilungen nach DSM (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) und ICD (International Classification of Diseases) erlangt hier die Klassifikation nach Karl Leonhard einen besonderen Stellenwert, die klinischen Phänotypen eine bestimmte Prognose und eigenständige Ätiologie zuordnet.

Karl Leonhard (1904-1988) setzte die Bemühungen seiner Vorgänger Wernicke und Kleist fort (Wernicke 1900, Kleist 1908, Kleist 1909) und erarbeitete eine Unterscheidung der klinischen Krankheitsbilder psychomotorischer Störungen, der Motilitätspsychosen, periodischer und systematischer Katatonien (Kleist, Leonhard, Schwab 1939). Er verwies auf die Heterogenität der Erkrankungen und erarbeitete so eine klinische und nosologische Differenzierung.

Karl Leonhards Aufteilung unterscheidet zunächst zwischen den systematischen und unsystematischen Schizophrenien. Die periodische Katatonie, die aufgrund ihrer genetischen Verankerung das zentrale Thema dieser Arbeit ist, wird den unsystematischen Schizophrenien zugeordnet (Leonhard 1991). Die periodische Katatonie ist charakterisiert durch einen bipolar angelegten, schubhaften Verlauf mit psychomotorischen, katatonen Symptomen. Es kommt zu verzerrten Ausdrucks- und Reaktivbewegungen, den so genannten Parakinesen. Exzitation und Inhibition treten charakteristischerweise nebeneinander auf. Gleichzeitig zu iterativen Bewegungen und Stereotypen einer Extremität kann eine Bewegungslosigkeit der anderen auftreten. Qualitative psychomotorische Defizite fehlen auch im Residualsyndrom nicht. Die Patienten bewegen sich eckig und unnatürlich. Der harmonische Bewegungsablauf geht

verloren. Es finden sich Parakinesen, grimassierende Gesichtsbewegungen und stereotype Bewegungsabfolgen. Oft herrscht eine mimische und gestische Verarmung mit steifem leblosem Gesichtsausdruck vor. Zu den psychomotorischen Symptomen können affektive Veränderungen, am häufigsten im Sinne einer Gereiztheit, hinzukommen, aber auch Halluzinationen und extrem selten Beziehungsideen. Eine Teilremission oder ein Stillstand der Erkrankung sind nach dem ersten Krankheitsschub die Regel. Die Krankheit mündet im Verlauf dann in ein Residualsyndrom aus, das nach akinetischen Krankheitsschüben schneller als nach hyperkinetischen eintritt. Meist verarmt neben der Initiative die affektive Regsamkeit der Patienten. Die periodische Katatonie manifestiert sich häufig im dritten Lebensjahrzehnt und setzt oft mit akutem Schub ein. Der Residualzustand am Ende der Erkrankung kann unterschiedliche Schweregrade aufweisen. Die Erkrankung schreitet nur selten zu den schweren Endzuständen fort, meist verbleibt sie in der einfachen psychomotorischen Erlahmung.

Die hohe familiäre Belastung dieser Erkrankung ist bereits von Karl Leonhard beobachtet worden. Er fand die Gruppe der unsystematischen, zu der auch die periodische Katatonie zählt, genetisch stärker belastet als die der systematischen Schizophrenien und zykliden Psychosen. Diese Erkenntnisse wurden später durch weitere Studien bestätigt, die höhere positive Familienbelastung bei katatonen Schizophrenien, gegenüber nicht-katatonen Schizophrenien belegten (Beckmann et al. 1996, Mimica et al. 2001). Franzek und Beckmann zeigten in unterschiedlichen Studien einen signifikanten Überschuss an Frühjahrs- und Wintergeburten bei den systematischen Katatonien (Franzek et al. 1993). Es konnte eine erhöhte Frequenz von 34% der Infektionserkrankungen der Mutter während der Schwangerschaft bei Patienten mit systematischen Katatonien (Franzek, Beckmann 1998), gegenüber von nur 8% bei denjenigen mit periodischer Katatonie aufgezeigt werden (Stöber et al. 2002). Dies betont den pathogenetischen Unterschied der Erkrankungen und zeigt dass es sich um heterogene Erkrankungen handelt (Mowry et al. 2004). Die systematischen Schizophrenien sollten folgerichtig streng von der periodischen Katatonie in genetischen und nosologischen Untersuchungen getrennt werden (Franzek, Beckmann 1998).

Karl Leonhards Untersuchungen der schizophrenen Erkrankungsformen in Familien und Zwillingsstudien zeigen, dass eine eindeutige Penetranz genetischer Faktoren bei der periodischen Katatonie gegenüber den systematischen Schizophrenien besteht. Es findet sich ein sehr niedriges Morbiditätsrisiko für Verwandte an systematischer Katatonie Erkrankter von <3,5% und dem gegenüber ein Risiko von 22% für Eltern bzw. 21,3% für Geschwister in periodischer Katatonie. Mehrfach betroffene Familien fanden sich bei Indexfällen der periodischen Katatonie zu 59%, im Gegensatz der 11% von systematischen Schizophrenen. Geschlechterunterschiede im Erkrankungsalter fand er nicht (Leonhard 1956-1997). Leonhard hat bei periodischer Katatonie einen autosomal dominanten Erbgang postuliert (Leonhard 1999).

In einer Familienstudie bei chronischen Katatonien wurden 323 Personen aus betroffenen Familien mit periodischer Katatonie mit 83 Indexfällen sowie 220 Personen aus Familien mit systematischer Katatonie mit 56 Indexfällen untersucht und Leonhards Befunde mit einer sehr hohen diagnostischen Reabilität von 97% bestätigt (Stöber et al. 1995, Beckmann et al. 1996). Ein Morbiditätsrisiko von fast 27 % bei den Verwandten ersten Grades der periodischen Katatonie weist auf einen Hauptgendefekt hin, ist aber auch mit einer autosomal dominanten Transmission mit reduzierter Penetranz vereinbar (Stöber et al. 1995). In Übereinstimmung zu Leonhards Daten fanden sich keine Geschlechterunterschiede in Bezug auf das Erkrankungsalter (Leonhard 1997), jedoch Hinweise auf genetische Antizipation vom Indexfall zum Elternteil (Stöber et al. 1995).

Darauf aufbauende genomweite Kopplungsstudien schlossen im ersten Teil zwölf (Stöber et al. 2000) und in der Replikationsstudie vier Mehrgenerationenfamilien ein (Stöber et al. 2002). Als erkrankt wurden Probanden eingestuft, wenn sie die Kriterien der periodischen Katatonie nach Leonhard erfüllten (Leonhard 1997). In der ersten Studie wurden 135 Probanden (61 davon männlich, insgesamt 57 von periodischer Katatonie betroffen) untersucht, die zweite Studie schloss 48 Probanden (25 davon männlich, insgesamt 21 mit periodischer Katatonie) ein. Diese genomweiten Kopplungsanalysen in Multiplexfamilien mit periodischer Katatonie mit modellfreien und nichtparametrischen sowie parametrischen Methoden, zeigten Kopplung auf Chromosom 15q15 und 22q13 (Stöber et al. 2001). Sie erfüllten die Kriterien eines

signifikanten Locus auf Chromosom 15q15 in Position 35,3 cM nach Lander und Kruglyak (Stöber et al. 2000, Lander et Kruglyak 1995). 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. Phänotypien im Sinne von erkrankten Personen ohne segregierenden Haplotyp fanden sich nicht. Es gibt bisher keinen Hinweis auf einen Gründereffekt in den verschiedenen untersuchten Familien. Jedoch wird die Hypothese einer autosomal dominanten Übertragung mit verminderter Penetranz durch diese Befunde untermauert. Darüber hinaus fanden sich Hinweise auf einen zweiten unabhängigen Locus auf dem Chromosom 22q13, der durch eine einzelne Multiplexfamilie generiert wurde (Stöber et al. 2001, Abbildung 1).

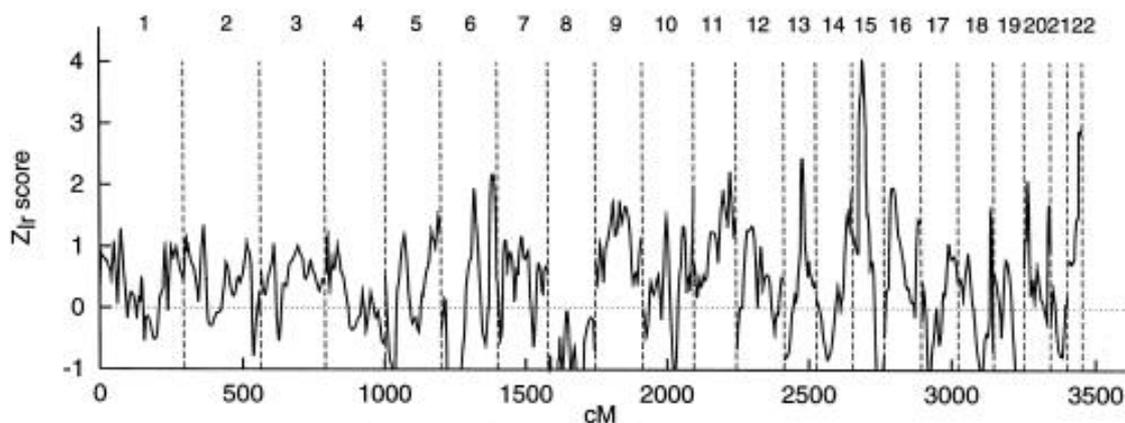


Abb. 1: Genomweite Kopplungsanalyse (GH-PLUS) bei Familien mit periodischer Katatonie: Die X-Achse zeigt die 22 Autosomen in cM, Y-Achse zeigt den Zlr score. „Evidence for linkage“ wird auf Chromosom 15q15 (Zlr = 4.05 (P=2.6×10<sup>3</sup>×10<sup>2</sup>)) erreicht, ein weiterer Susceptibility-Locus befindet sich auf Chromosom 22q13 (Zlr=2.92; P=1.8×10<sup>3</sup>), (Stöber et al. 2000).

Bei dem verwendeten Marker D22S1169 erreichte der LOD-Score 2,59 (Zlr Score 2,92) und zeigte eine mögliche Kopplung bei 38 % der betroffenen Familien (Stöber et al. 2000).

Weiterführende Haplotypanalysen auf Chromosom 22q13 in den koppelnden Familien zeigten einen durch meiotische Bruchpunkte begrenzten chromosomalen Bereich der telomeren Region von ca. 3cM. Kandidatengene dieser Region wurden nach ihrer Funktion und spezifischem Hirnexpressionsmuster für diese Arbeit aus bestehenden Datenbanken vorselektiert. Zur Mutationsanalyse wurden Gene telomer zu Marker

D22S1169 ausgewählt. Es umspannt insgesamt knapp 5 Mbp und beherbergt über 50 bekannte proteinkodierende Gene (USCS Genome Browser, Stand: 2006).

### **1.1. Genetik schizophrener Psychosen auf Chromosom 22q**

Der lange Arm des Chromosoms 22q ist als Genregion mehrerer neurodegenerativer Erkrankungen beschrieben worden: metachromatische Leukodystrophie (Synonym: familiäre juvenile diffuse Sklerose), fatale infantile Kardioenzephalopathie und myoneurogastrointestinale Enzephalopathie (Gieselmann et al. 1994, Papadopoulou et al. 1999, Nishino et al. 1999).

Eine Reihe von unabhängigen genetischen Studien (Coon et al. 1994, Pulver et al. 1994) und Metaanalysen (Badner et al. 2002) verweist auf eine bis mehrere Genregionen auf Chromosom 22q bei schizophrenen Psychosen.

Auch die Beobachtung vermehrt auftretender schizophreniformer Psychosen beim velokardiofacialen Syndrom (Syn.: DiGeorge-Syndrom), für das Mikrodeletionen auf eng umschriebener Region des Chromosoms 22q11 verantwortlich sind (Gothelf et al. 1997), unterstützt diese Hypothese.

Die als telomere Region Chromosom 22q13.3 wurde neben den Kopplungsanalysen von Stöber (2001) auch bei Metaanalysen von Bander und Gershon (2002) sowie Lewis und seiner Kollegen (2005) als Kandidatengenregion für schizophrene Psychosen angesehen.

Für den Phänotyp der periodischen Katatonie wurden mögliche Kandidatengene auf Chromosom 22q am Marker D22S1169 eingegrenzt (Abbildung 2), die mit der Erkrankung korrelieren und hohe Expression im Hirngewebe zeigen [<http://www.kazusa.or.jp/huge/>]. So wurde das Kandidatengen CERK1/KIAA1646 (45.45-45.51Mb) zur Mutationsanalyse ausgewählt und systematisch untersucht [<http://www.genome.ucsc.edu>]. Das Kandidatengen MLC1/KIAA0027 (48.83-48.86Mb), bei dem eine Mutation in der Familie F21 mit der Erkrankung segregierte (Meyer et al. 2001), wurde in einer Assoziationsstudie untersucht.

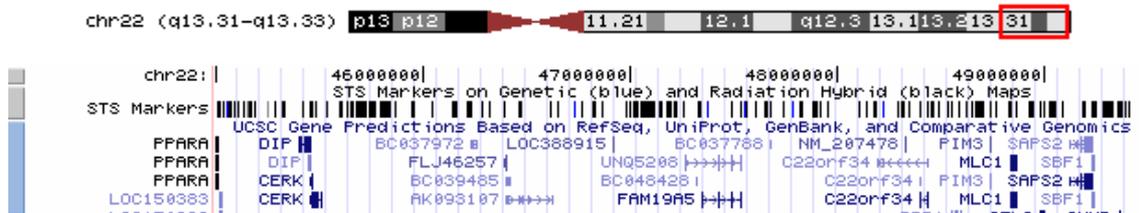


Abb. 2: Chromosom 22q und die Positionen der Kandidatengene MLC1 und CERK [<http://genome.ucsc.edu>]

## 1.2. Das Kandidatengen MLC1/KIAA0027

Auf der Suche nach hirnexprimierten Proteinen bzw. Genen identifizierten Nomura und Mitarbeiter 1994 40 neue Gene, darunter KIAA0027/MLC1. Leegwater konnte einen Zusammenhang zwischen Mutationen in KIAA0027 und dem Auftreten von megalenzephaler Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC) belegen (Leegwater et al. 2001) und so erhielt das Gen den endgültigen Namen „MLC1“ (Kommittee der Human Genome Organisation).

MLC1 liegt auf Chromosom 22q13.33 (nt48800277 – 48826491) und umspannt 26530 Basen [<http://www.genome.ucsc.edu>]. Sein Protein Q15049 [<http://beta.uniprot.org>] mit einer Länge von 418 Aminosäuren und einem Gewicht von 41010 Da wird von 12 Exonen mit insgesamt 3629 Basenpaaren kodiert. Das erste Exon wird nicht translatiert und verkürzt so das Protein auf 377 Aminosäuren. Die Funktion des Proteins ist im Wesentlichen noch ungeklärt (Leegwater et al. 2001, 2008, Duarri et al. 2008). Homologien zu anderen Proteinen lassen die Vermutung zu, dass es sich um einen in der Zellmembran lokalisierten Transporter handelt [<http://www.ensembl.org>] das in astrogliale Prozesse eingebunden wird (Boor et al. 2005). Als Produkt wird im Gehirn ein 377 Aminosäuren Protein mit acht transmembranen Domänen exprimiert, dessen Aminosäuresequenz, Transmembranhelices und Lokalisation auf eine Transport- bzw. Kanalfunktion deuten (Nomura et al. 1994, Boor et al. 2006). Ein Zusammenhang zwischen dem Dystrophin-Glykoproteinkomplex (DGC), einem Proteinkomplex der eine Adhäsion von Astrozyten an extrazelluläre Matrix ermöglicht und MLC1 wurde nachgewiesen (Boor et al. 2007). Das MLC1 wird im menschlichen Gehirn überwiegend in Astrozyten und Ependymzellen membranassoziiert vorgefunden und ist

an zellulären Interaktionen sowie flüssiger Homöostase beteiligt (Ambrosini et al. 2007).

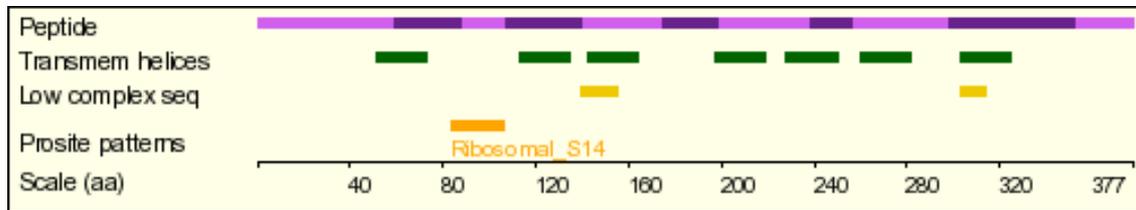


Abbildung 3: Ensembl Protein Report mit Eigenschaften von MLC1 [<http://www.ensembl.org>]: Dargestellt sind in Zeile 1: das Peptid aus 11 translatierten Exons (lila), Zeile 2: die Transmembranhelices nach TMHMM (grün) (Krogh et al. 2001), Zeile 3: Segmente geringer Komplexität (gelb) (Wootton et Federhen 1993) und Zeile 4: Domänen (orange) [[www.ebi.ac.uk/Tools/ppsearch](http://www.ebi.ac.uk/Tools/ppsearch)] nach ihrer Aminosäureposition auf einer Skala.

Seit 2001 ist bekannt, dass Mutationen im KIAA0027-Gen ursächlich für eine seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die megalenzephalale Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten, MLC sind (Leegwater et al. 2001). Seit der Erstbeschreibung mit vier krankheitsverursachenden Mutationen (Leegwater et al. 2000), sind bis heute über 50 Mutationen im MLC1 detektiert worden (Boor et al. 2006). Das Krankheitsbild der megalenzephalalen Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten, ist erstmals von Van der Knaap und Mitarbeitern 1995 beschrieben worden und nachfolgend von zahlreichen anderen Studien bestätigt (Goutieres et al. 1996, Singhal et al. 1996, Topçu et al. 1998, Ben-Zeev et al. 2001). Klinisch manifestiert sich die Erkrankung im Kindesalter. Die beginnende Leukodystrophie mit Makrozephalie, die von Geburt an besteht oder sich im ersten Lebensjahr entwickelt, ist mit Störungen der kognitiven Entwicklung verbunden. Hinzu kommen neurologische Symptome mit motorischen Funktionsverlusten, Spastik und Ataxie. Die Betroffenen entwickeln oft früh eine Epilepsie (Yalcinakaya 2003). Pathognomonisch stellt sich eine diffuse Schwellung der weißen Substanz bei erhaltener grauer Substanz und subkortikale Zysten in der Magnetresonanztomographie dar (Miles et al. 2008, Abb. 4).

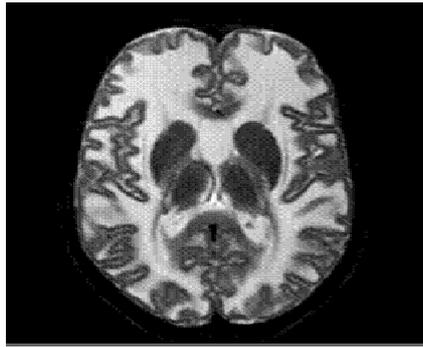


Figure 1A.

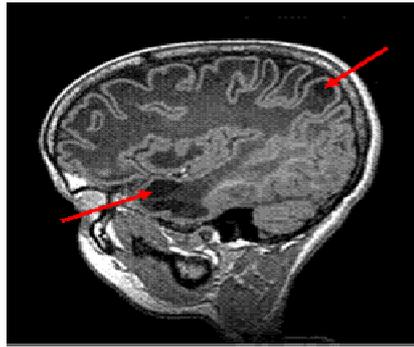


Figure 1B.

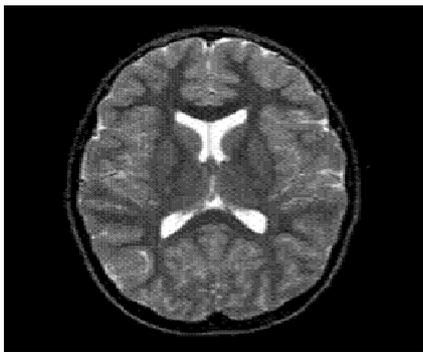


Figure 2A.

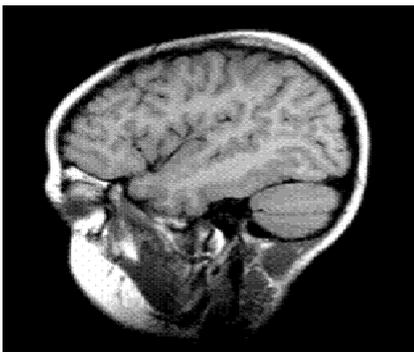


Figure 2B.

Abb. 4: Magnetresonanztomographie: Figure 1 A und B MLC-Patienten: Roter Pfeil Subkortikale anterior-temporalen Zysten Figure 2 A und B: gesunde Kontrollperson, Gene Reviews University of Washington [[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)]

Histopathologisch zeigt sich eine fibrilläre Astrogliosis der weißen Substanz, eine Vielzahl von Vakuolen in der subkortikalen weißen Substanz sowie membrangebundene Vakuolen zwischen den äußeren Myelinhüllen, also eine vakuolisierende Myelinopathie (siehe Abb. 5).

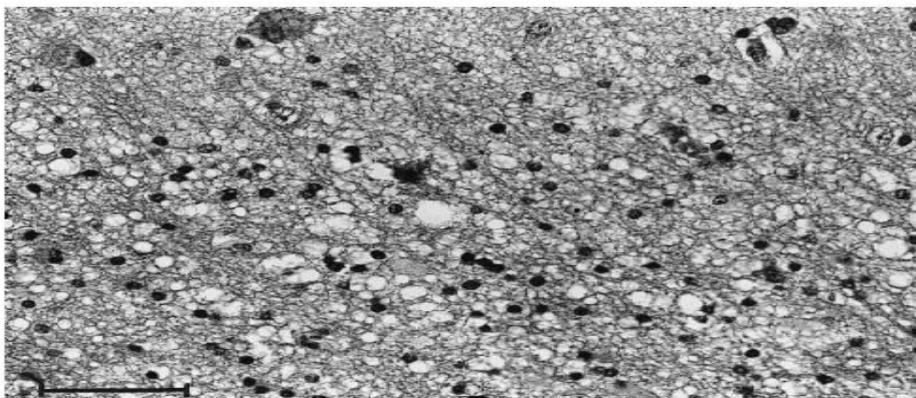


Abb. 5: Histopathologisches Präparat eines MLC-Patienten: vakuolisierende Myelinopathie Pascual-Costroviejo et al. (2005)

Bisher sind etwa 70 Fälle dieser seltenen Erkrankung in verschiedenen Populationen beschrieben worden. Geschlechterunterschiede finden sich nicht. Die Diagnose wird anhand der klinischen Symptomatik und des typischen bildmorphologischen Korrelats gestellt. Bei etwa 20% der Patienten mit einem typischen Krankheitsbild konnten keine Mutationen im MLC1 nachgewiesen werden (Ilja Boor et al. 2006).

### 1.3. MLC1 und periodische Katatonie

MLC1 wurde als mögliches Kandidatengen für periodische Katatonie diskutiert (Meyer et al. 2001). Eine seltene Variante L309M (1040C>A) im Exon 11 auf MLC1 segregierte mit dem krankheitsassoziierten Haploblock im untersuchten Stammbaum (F21). Dies führte zur der Annahme, dass diese Variante ursächlich für die periodische Katatonie wäre. Diese Variante wurde deshalb auf ihren Zusammenhang mit periodischer Katatonie in einer Assoziationsstudie in Familien F20 und F21 geprüft (Rubie et al. 2003, s. Abb. 6 und 7).

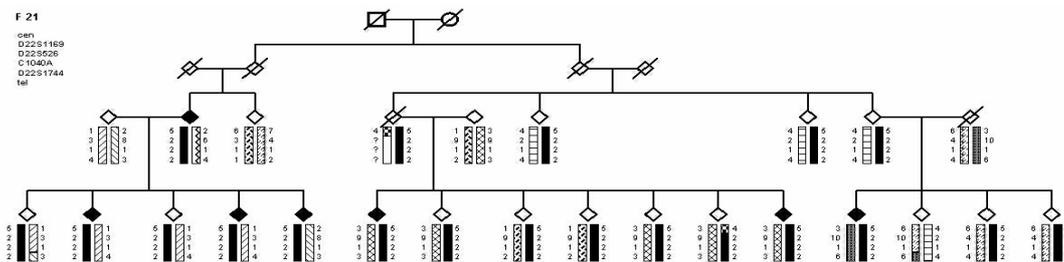


Abb. 6 Familienstammbaum F21 (Stöber et al. 2002, Bettecken et al. 2002): Chromosom 22qtel Haplotypanalyse von zwei informativen Familien (Abb. 6 und 7), die mehrfach von periodischer Katatonie betroffen sind und der L309M Variante auf KIAA0027/MLC1. Unter der Familienstammbaumnummer werden die verwendeten Marker gelistet. Bereits verstorbene Mitglieder sind durchgestrichelt dargestellt, von periodischer Katatonie betroffene Personen mit einer schwarz ausgefüllten Raute. Der Haplotyp wird als Balken dargestellt, in schwarz der krankheitsassoziierte Haplotyp. Die Allele sind nach Repeatlängen des Mikrosatelliten gelistet. Bei über 23 Familienmitgliedern von F21, davon 7 mit periodischer Katatonie und obligaten Trägern des Haplotyps, fand sich die 1040C>A (L309M) Variante unter 10 nicht erkrankten Familienmitgliedern.

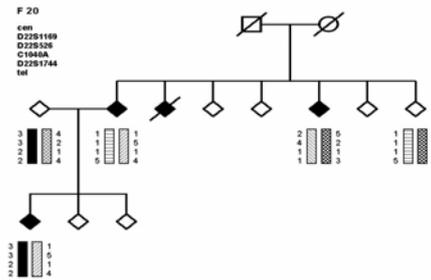


Abb. 7 Familienstammbaum F20 (Stöber et al. 2002, Bettecken et al. 2002): Die Analyse des Familienstammbaums F20 zeigte keine Kosegregation des 1040A Allels mit periodischer Katatonie und zeigte einen gesunden Elternteil, der den Polymorphismus trägt.

Für die megalenzephalie Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten Typ 1 (MLC1) bekannten Mutationen und Polymorphismen zum Untersuchungszeitpunkt sind in der Abbildung 8 veranschaulicht (Rubie et al. 2003).

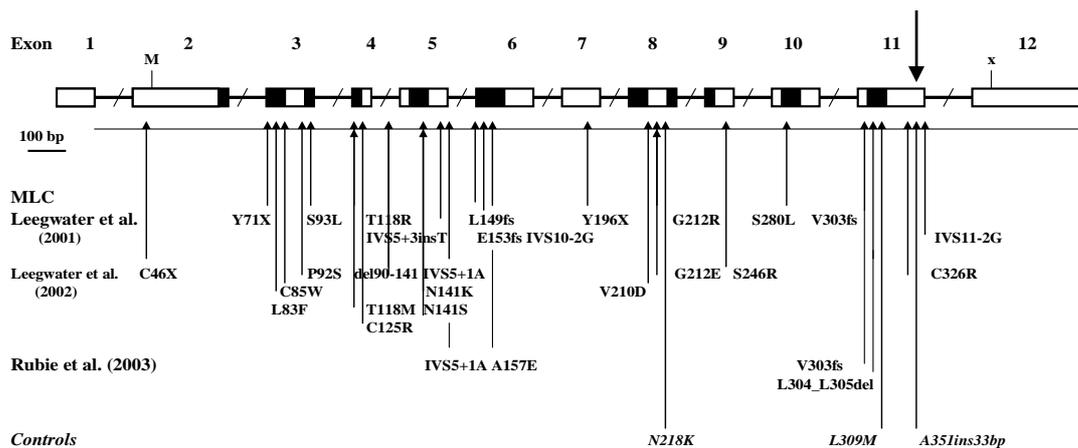


Abb. 8: Mutationen und Polymorphismen im Gen KIAA0027/MLC1 bei Patienten mit MLC Typ 1 und Kontrollpersonen. Markiert 33bp Insertions-Deletionspolymorphismus [Bettecken et al. 2002, Rubie et al. 2003]

Darüber hinaus ist eine im Exon 11 des MLC1 liegende 33bp Insertion bzw. Deletion überprüft worden. In dieser Arbeit wurde sie auf ihren Zusammenhang mit periodischer Katatonie und ihre Funktion untersucht, weil sie Amplifikationseffekte ausübt (Bettecken et al. 2002, Abb. 8). Es ist bereits bekannt, dass der 33bp-Insertions/Deletionspolymorphismus nicht die Aminosäuresequenz des Proteins verändert (Leegwater et al. 2002).

#### 1.4. KIAA1646/CERK1 - Ceramidkinase auf Chromosom 22q13

KIAA1646 (Synonym CERK1) auf Chromosom 22q13 kodiert eine Ceramidkinase (Sugiura et al. 2002). Es wurde als mögliches Kandidatengen systematisch auf Mutationen untersucht (Stöber et al. 2005).

Das Gen liegt auf Chromosom 22q13.3 (nt 45400827 – 45454671) erstreckt sich über eine Länge von ~50kb, mit 13 Exonen [<http://www.kazusa.or.jp/huge/>]. Das Produkt hat ein Gewicht von 59977Da [Q8TCT0 Protein, <http://www.genecards.org>]. Es wird vor allem im Gehirn, aber auch in der Herz-, Skelettmuskulatur, im Nieren- und Lebergewebe gebildet und kommt zytoplasmatisch und membrangebunden vor. Die Funktion sowie Vorgänge an den das Enzym katalytisch wirksam ist, sind noch nicht eindeutig geklärt [<http://www.expasy.org/uniprot/Q8TCT0>]. Es ist bekannt, dass das aus 537 Aminosäuren bestehende Protein, mit den Kofaktoren Magnesium und Kalzium seine katalytische Fähigkeit, Ceramid und Adenosintriphosphat zu Ceramid-1-Phosphat und Adenosindiphosphat zu phosphorylieren, unter einem pH-Optimum zwischen 6,0 und 7,5 entfaltet. Die Enzymspezifität lässt es nicht mit anderen Lipiden, wie den Sphingosinen, sphingoiden Basen, Diacylglycerol oder Phosphatidylinositol reagieren. Die Intron-Exon-Struktur des Proteins, seine katalytische Domäne und bekannte SNPs werden in der Abbildung 9 dargestellt.

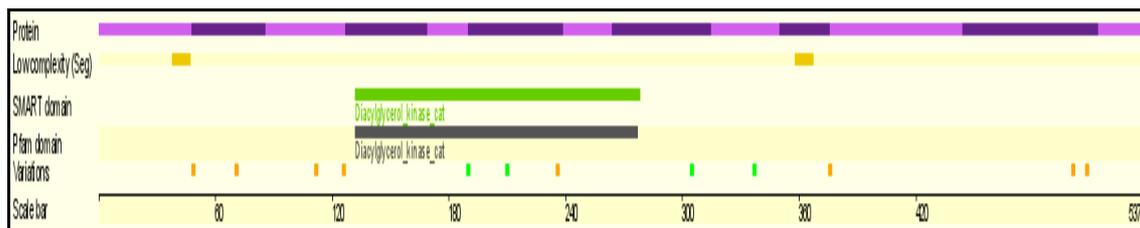


Abbildung 9.: Ensembl Protein Report mit Eigenschaften von CERK1 [<http://www.ensembl.org>]: Dargestellt sind in Zeile 1: das Peptid aus 13 translatierten Exons (lila), Zeile 2: Segmente geringer Komplexität (gelb) (Wootton et Federhen 1993), Zeile 3: die SMART- (grün) [<http://smart.embl.de>] (Letunic et al. 2006) und Pfam-Domäne PF00781 für Diacylglycerolkinase (grau) [PUBMED:11983067] (Bateman et al. 2004) [<http://pfam.wustl.edu>] sowie in Zeile 4: bekannte Varianten (von links nach rechts: rs12166204, rs61748565, rs9627541, rs9616101, rs16995615, rs9306515, rs61748564, rs13057352, rs36211081, rs36211083, rs35318967 und rs34110809) als Synonymcodon (orange), oder Aminosäurenänderung (grün) nach ihrer Aminosäurensposition auf einer Skala in Zeile 5.

CERK besitzt fünf konservierte Domänen (C1-5), die in abweichender Form bei den Sphingosinkinasen vorkommen. Die am Anfang des Proteins positionierte pH-Domäne

übernimmt eine regulierende Funktion im Zusammenspiel mit G-Proteinen und der Aktivität des Enzyms (Gibson et al. 1994, Lemmon et al. 1996, Touhara et al. 1994, Harlan et al. 1994, Kavanaugh et al. 1995, Carré et al. 2004). Neben einer Kalzium- und Magnesiumbindungsdomäne zeigt das Enzym eine Kalzium und Calmodulin abhängige Proteinkinaseaktivität, eine oben beschriebene Ceramidkinaseaktivität, sowie eine Diacylglycerol- und Transferaseaktivität. Es wirkt bei der Signaltransduktionskaskade von Protein C als „second messenger“ und ist ebenfalls an der Vesikelfusion in Synapsen beteiligt (Bajjalieh et al. 1989, Boor et al. 2007). Das Substrat Ceramid, ist selbst an regulatorisch apoptotischen Vorgängen in der Antwort auf Stressfaktoren beteiligt (Hannun 1996). Befunde im zur Genfamilie gehörenden CERKL auf Chromosom 2q31, bei dem Mutationen die autosomal rezessiv vererbte Retinitis pigmentosa zur Folge haben, deuten auf einen Zusammenhang der Ceramidkinasen mit retinalen Neurodegenerationen (Bornancin et al. 2005).

## 2. Ziel der Arbeit

Die periodische Katatonie wurde als genetisch verankerter Phänotyp der unsystematischen Katatonien auf Chromosom 15q15 kartiert. Als Zeichen der genetischen Heterogenität wurde darüber hinaus ein zweiter unabhängiger Locus auf dem Chromosom 22q13 entdeckt, der durch eine einzelne Mehrgenerationenfamilie generiert wurde. Diese Arbeit untersucht den Zusammenhang der Kandidatengene MLC1 und CERK1 mit der Erkrankung.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit einem 33-bp-Insertions/Deletions-Polymorphismus im Kandidatengen MLC1, der in einer Assoziationsstudie systematisch auf Mutationen bei Patienten mit periodischer Katatonie und megalenzephaler Leukoenzephalopathie analysiert wurde. Der Polymorphismus übt Amplifikationseffekte aus und ist dadurch in Routine-PCR-Verfahren schwer nachweisbar. In dieser Arbeit wurde er mittels Gelelektrophorese in einem repräsentativen Kollektiv auf seine Häufigkeit unter 100 gesunden Kontrollen und 140 Patienten mit periodischer Katatonie geprüft und die Besonderheiten seiner Amplifikationseffekte diskutiert.

Im zweiten Teil werden Resultate einer systematischen Sequenzanalyse des Kandidatengens CERK1 gezeigt. Zum Ziel wurde gesetzt, durch Sequenzanalyse von CERK1 in den Kandidatengenen Varianten aufzufinden und durch den Vergleich ihrer Häufigkeiten zwischen kranken Individuen und gesunden Kontrollen die Wertigkeit einer genetischen Assoziation zur periodischen Katatonie aufzuzeigen. Die systematische Mutationsanalyse von CERK1 wurde mit Probanden aus Familien, die eine Kopplung der periodischen Katatonie auf Chromosom 22q13 zeigten, sowie gesunden Kontrollen durchgeführt. Ein besonderes Augenmerk liegt auf der Variante V338G, deren Häufigkeit in 115 Patienten mit periodischer Katatonie und unter 110 gesunden Blutspendekontrollen mittels RFLP überprüft wurde.

### **3. Methodik**

#### **3.1. Untersuchte Kollektive**

Nach den Diagnosekriterien des DSM, ICD und Leonhard wurden in Rahmen von Vorstudien (Stöber et al. 1995, Beckmann et al. 1996) an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Würzburg seit 1994 144 nicht verwandte, an katatoner Schizophrenie erkrankte Indexfälle rekrutiert und für die Studie ausgewählt. Die Diagnose der periodischen Katatonie wurde von Prof. Stöber in persönlicher psychiatrischer Untersuchung gestellt und von Privatdozenten Dr. med. Jabs und Dr. med. Pfuhlmann überprüft. Alle Patienten erfüllten die Diagnosekriterien für Schizophrenie entsprechend DSM IV und ICD 10 (American Psychiatric Association 1991; World Health Organization 1991).

Das Patientenkollektiv bestand aus 78 Männern, das mittlere Manifestationsalter bei Ersthospitalisierung betrug 25,5 Jahre ( $\pm 10,4$  SD), bei Studieneinschluss betrug das Durchschnittsalter 44,2 Jahre ( $\pm 15,3$  SD). Das Kollektiv der Blutspendekontrollen stammt aus der Universitätsklinik Würzburg. Das Durchschnittsalter der 100 Kontrollpersonen (50 Männer und 50 Frauen) betrug 31 Jahre ( $\pm 11,2$  SD). Für die RFLP-Analyse wurde ein Kollektiv von 115 an periodischer Katatonie erkrankten Personen (66 Männer und 49 Frauen) mit Durchschnittsalter von 44,6 Jahren ( $\pm 17,1$  SD) und einem Alter von 26,2 Jahren ( $\pm 10,5$  SD) zum Zeitpunkt der Ersthospitalisierung mit den Blutspendekontrollen verglichen.

Für die Sequenzierung des CERK1-Region wurden vier Probanden aus drei nicht verwandten Familien, die in Vorstudien (Stöber et al. 2000 und 2002) kompatibel mit einer Kopplung auf Chromosom 22q13 waren, sowie Kontrollpersonen ausgewählt. Es handelte sich um zwei betroffene Mitglieder (Proband 933 und 1045) von verschiedenen Zweigen einer großen Vier-Generationen-Familie (F21) sowie zwei weitere Probanden (Codenummer 727 und 857) aus den Familien F15 und F17 (Abb. 10). Die Nukleotidsequenz von CERK1 wurde untersucht und mit gesunden Kontrollen verglichen.

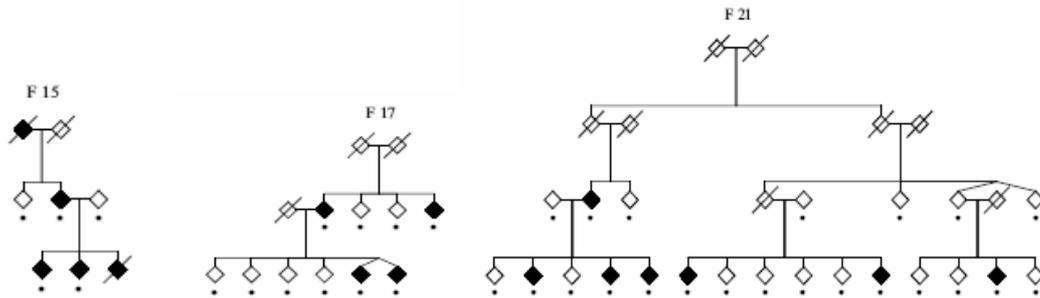


Abbildung 10:

Stammbäume drei untersuchter Familien mit Periodischer Katatonie, welche eine Kopplung auf Chr22qtel aufweisen. Aus Gründen der Datenanonymisierung sind Probanden aus den Familien mit Rautensymbol dargestellt. Bereits verstorbene Familienmitglieder sind durchgestrichen, von Periodischer Katatonie betroffene Mitglieder durch schwarze Rauten (Stöber 2001) abgebildet. Für die Sequenzanalyse ausgewählte Probanden sind aus Familie 15 Proband 857, Familie 17 Proband 727, Familie 21 Probanden 933 und 1045 aus verschiedenen Zweigen der Multiplexfamilie.

### 3.2. Primerauswahl

Die für die Amplifikation benötigten Primer wurden in den Intron-Exon-Grenzen mit einem Abstand von mindestens 30bp zum Exon ausgewählt und mit dem Programm primer.exe (Whitehead Institute for Biomedical Research 1991) konstruiert. So konnten alle kodierenden Sequenzen mit den dazugehörigen Spliceregionen amplifiziert und analysiert werden. Eine vollständige Liste der verwendeten Primer befindet sich im Appendix.

### 3.3. DNA-Extraktion aus EDTA-Blut

Das EDTA-Blut wurde aus Monovetten in 50ml-Röhrchen umgefüllt. Die 50ml-Röhrchen wurden auf 40ml mit Lysispuffer aufgefüllt und für 15 Minuten auf Eis gestellt, dann 15 Minuten bei 4° C und 1500 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pelett je Röhrchen in 10ml Kernlysispuffer, 60µl 10% SDS und 500µl Pronase E mit der Pasteurpipette gelöst und für 12 Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert sowie anschließend mit je 3,5ml 6M NaCl aufgefüllt. Danach wurden sie 20 Minuten bei 21°C (Raumtemperatur) und 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand wurde in neue 50ml-Röhrchen dekantiert. Die

50ml-Röhrchen wurden auf 25ml mit Isopropanol aufgefüllt und sanft gemischt bis zur Präzipitation der DNA. Die DNA wurde mit der Glaspipette ohne Isopropylalkohol in ein Nunc Cryo Tube umgefüllt und in 500µl TE-Puffer aufgelöst. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Photometer gemessen.

### 3.4. Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die Polymerasenkettenreaktion (Polymerase Chain Reaction; PCR) nach Kary Mullis (Mullis 1993) zur Vervielfältigung der DNA, beruht auf einem immer wiederkehrenden Zyklus aus drei Schritten: Initiale Denaturierung, Hybridisierung und Verlängerung. Durch die Wiederholung dieser drei Schritte vervielfältigt sich nach etwa 20 Zyklen ein einziger DNA-Doppelstrang auf etwa eine Million Kopien.

Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml Softstrips für die Maschinen Uno-Thermoblock (Biometra/Würzburg) und MJ Research PTC-225 Peltier Thermal Cycler (Biozym/München) durchgeführt. Für die Primer wurden folgende Annealingtemperaturen verwendet:

<u>Annealingtemperatur</u>	<u>Primer</u>
55°C	KIAA1646 Exon1 und 3
56°C	FLJ23239 Exon1 und 2
57°C	KIAA0027 Exon11 Gurling, sowie KIAA1646 Exon1a, 2, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12
60°C	KIAA1646 Exon5 und 6

Für PCR Maschinen UNO-Thermoblock wurde ein Reaktionsansatz von 25µl aus 2,5µl PCR-Puffer-Y, 4µl dNTP (je 1,25mM), je 1µl Forward- und Reverseprimer, 4µl DNA (20µg/mL), 0,5U Taq-Polymerase (0,5µl) und HPLC-Wasser gebildet. Im Cycling wurden nach initialer Denaturierung bei 95°C über 6 Minuten die Schritte der Denaturierung bei 95°C über 30 Sekunden, des Annealings über 45 Sekunden und Extension bei 72°C über 1 Minute, zweiunddreißig mal wiederholt. Am Ende folgte eine finale Extension bei 72°C über 7 Minuten und eine Abkühlungsphase bei 4°C.

Für MJ Research Peltier Thermal Cycler 225 wurde ein 25µl-Reaktionsansatz aus 2,5 µl 10 x PCR-Puffer, 1,5µl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2,5µl dNTPs (je 2mM), jeweils 4pmol Forward- und Reverseprimer (je 1 µl), 1µl DNA (50µg/ml), 0,5U Taq-Polymerase (1U/µl) und HPLC-Wasser gebildet. Das Cycling setzt nach initialer Denaturierung bei 95°C über 10 Minuten mit dreißig Wiederholungsschleifen eine Denaturierung bei 94°C über 1 Minute, einem Annealing über 45 Sekunden und einer Extension bei 72°C über 1 Minute an. Die finale Extension über 7 Minuten bei 72°C und Abkühlung bei 4°C schließt die Reaktion ab.

### **3.5. PCR-Produktnachweis und Analyse auf Agarosegel**

Doppelsträngige DNA wandert ihrer Länge nach im Agarosegel unter Spannung unterschiedlich schnell, was zu einer Auftrennung des PCR-Produktes im elektrischen Feld führt (Avisé 1994). In dieser Arbeit wurden 2% Agarosegele verwendet um die PCR-Produktlänge zu analysieren. Zur Herstellung eines 2% Agarosegels wurden 2g Agarose auf 100 ml mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt, aufgeköcht und mit 10 µl 0,1% Ethidiumbromid versetzt, sowie anschließend auf einen Gelschlitten gegossen. Nach Aushärtung der Gele und Herausnahme der für Laufaschen eingesetzten Kämmen wurden 5µl PCR-Produkt mit 5µl BPB-Puffer aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 45 Minuten unter der Spannung von 140V, wurden die PCR-Produkte unter dem UV-Transilluminator (Wellenlänge 245nm) nach Länge im Vergleich zur aufgetrageneren Referenz-Basenpaarleiter ausgewertet. Die Produktlängendifferenz von 33bp visualisiert mit Ethidiumbromid, erlaubte eine deutliche Differenzierung von homo- und heterozygoten Merkmalsträgern bei einer Produktlänge von 542 bzw. 575bp in der MLC1-Insertions/Deletionspolymorphismusanalyse (Mc Quillin et al. 2002).

### 3.6. Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismusanalyse

Restriktionsenzyme schneiden die DNA an enzymespezifischen Erkennungszonen mit einer bestimmten Basensequenz. Durch das spezifische Laufverhalten der PCR-Produkte im elektrischen Feld auf Polyacrylamidgelen können die Verdauungsprodukte nach ihrer Größe auf Polymorphismen analysiert werden. Hier wurde das PCR-Produkt der Primerpaare KIAA1646 Exon 9 forward und reverse aus Probanden- und Kontroll-DNA nach dem etablierten Prinzip der RFLP-Analyse mit einem enzymatischen Verdau mit *DraIII* genutzt (Dowling 1990). Hierzu wurden 5µl PCR-Produkts mit 1,5µl 10x NEB 3-Pufferlösung, 100x 0,15µl BSA und *Dra III*-Enzym 4U (0,2µl) ad. 10µl ddH<sub>2</sub>O pro Ansatz verdünnt und bei optimaler Temperatur von 37°C 4 Stunden inkubiert. Das *DraIII* Enzym (*Deinococcus radiophilus*) wurde nach dem vorliegenden Polymorphismus rs 36211081 ausgewählt:

5'-C A C N N N ▼ G T G-3' 3'-G T G ▲ N N N C A C-5' (New England Biolabs).

Zur Herstellung von Polyacrylamidgelen (PAA) wurden in vorbereitete Gelträger 10% PAA-Gellösung mit 10% APS gemischt und ausgehärtet. Die Gelplatten wurden in „multigel long“ Gelkammern in TBE Pufferlösung gespannt. In die durch eingesetzte Kämmen entstandenen Geltaschen wurden 5µl Enzymverdauprodukt mit 5µl BPB-Puffer aufgetragen. Zur Längenidentifizierung wurde zusätzlich eine standardisierte 100bp-Leiter aufgetragen. Die Verdauungsprodukte wurden zwei Stunden bei 120V Spannung (15V/cm) in der Gelelektrophorese standardisiert aufgetrennt.

Anschließend wurde das Gel vom Glasträger entfernt, und für 10 Min. in 300ml 10% Ethanol fixiert, dann die alkoholische Lösung in 1% Salpetersäure 5 Min. neutralisiert und in 300ml 0,05 % Silbernitrat sowie 300µl 37% Formaldehydlösung genau 20 Min. gefärbt. Nach Entfernung des Silbernitratüberschusses wurde das Gel mit je 300ml 3 % Natriumbicarbonatlösung mit Zusatz von 300µl 37% Formaldehydlösung geschwenkt bis ein sicherer Farbumschlag der mit Silbernitrat gefärbten DNA-Banden zu beobachten war. Die Reaktion wurde dann in 10% Essigsäure geblockt und anschließend das Gel auf Blottingpapier getrocknet. Die gefärbten DNA-Banden konnten anschließend ihrer Länge nach identifiziert, ausgewertet und archiviert werden.

### **3.7. Automatisierte Gensequenzierung**

Direktsequenzierung gilt als Goldstandard für die Mutationsanalyse kleiner Gene mit wenigen Exonen (Klein 2001). Die mittlerweile zu molekularen Standardmethoden gehörende Sequenzierung nach Sanger (1977) beruht auf dem Einbau markierter Didesoxynukleotiden in neu synthetisierte Komplementärstränge, was zum Kettenabbruch führt. Die verwendeten Markerdidesoxynukleotide können durch ihre Radioaktivität oder Farbfluoreszenz detektiert werden. In dieser Arbeit wurden verschiedenfarbige fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide verwendet (Prober 1987). Die automatischen Sequenziergeräte übernehmen die Detektion der Fluoreszenzsignale. Die Rohdaten aus dem Sequenzierer wurden computergestützt mit der Software von Bio Edit 5.0.1<sup>®</sup>, Chromas 1.62<sup>®</sup> und Staden Package 2000<sup>®</sup> aufbereitet und von zwei unabhängigen Untersuchern analysiert und verglichen.

#### **3.7.1. Produktreinigung**

Vorbereitend auf das Sequenzieren muss das PCR-Produkt gereinigt von Primern und anderen PCR-Reagenzien vorliegen. Hierzu ist das PCR-Produkt entweder direkt mit einem kommerziell erwerblichem Kit (Qiagen) gereinigt oder erst auf ein Agarosegel aufgetragen (z.B. bei Neben-PCR-Produkten), herausgeschnitten und dann mit dem Qiagenset aufgearbeitet worden. Zur direkten PCR-Reinigung wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers zum 25µl PCR-Produkt 100µl PB-Puffer gegeben, gemischt und in ein „Collection Tube“ umgefüllt sowie 1 Min. bei 13000rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jedes Mal verworfen, während das Collection Tube mit 0,75ml PE-Puffer über 1 Min. und dann erneut 1 Min. bei 13000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Die Säule wurde aus dem Collection Tube in ein 1,5ml Safeclip Eppendorfgefäß gesteckt und mit 30 µl HPLC-Wasser aufgefüllt, der Rest wurde verworfen. Nach einer Wartezeit von einer Minute wurde die Säule mit 13000 rpm bei Raumtemperatur 1 Minute zentrifugiert, die eluierte DNA sammelte sich im Eppendorfreaktionsgefäß.

Bei Produktreinigung aus dem Agarosegel wurde die Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten in ein steriles 2ml Safeclip-Eppendorfgefäß umgefüllt und gewogen. Zu einem 1mg Gelstück wurden 3µl QG-Puffer zugegeben. Das Gefäß wurde verschlossen und für 10 Minuten im Wasserbad bei 50°C inkubiert und gemischt. Nach vollständiger Auflösung des Agaroseblocks ist 300µl Isopropanol zugegeben und erneut gemischt worden, anschließend in ein Collection Tube umgefüllt und jeweils 1 Minute mit 13000 rpm Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jedes Mal verworfen. Am Ende wurde 500µl QG-Puffer auf die Säule gegeben und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Säule wurde mit 0,75ml PE-Puffer gefüllt und 1 Minute mit 13000rpm Raumtemperatur zentrifugiert. Die Säule wurde entsprechend der Direktreinigungsmethode in ein Eppendorfgefäß gesteckt und die DNA eluiert im HPLC-Wasser im Eppendorfgefäß gesammelt. Zur Kontrolle und Abschätzung der aufgereinigten DNA-Menge wurde die Konzentration auf Fluoreszenzintensität gemessen. Je nach Konzentration wurde bei der Sequenzierreaktion 1 bis 8µl DNA verwendet.

### **3.7.2. Sequenzierreaktion und Analyse**

Für die Reaktion wurden Ansätze von 10µl bestehend aus 0,2µl Sequenzierprimer (10pmol/µl), 1 bis 8µl DNA (je nach Konzentration) und 1,8µl BDT mit HPLC-Wasser aufgefüllt verwendet. Im MJ Research PTC-225 Peltier Thermal Cycler wurde folgendes Cycling 25-mal wiederholt: Denaturierung bei 94°C über 15 Sekunden, Annealing über 15 Sekunden (die Annealingtemperatur wurde aus der PCR übernommen, betrug jedoch höchstens 58°C), Extension bei 60°C über 4 Minuten. Zuletzt wurde das Produkt auf 4°C abgekühlt.

Die Cycle-Sequencing-Produkte wurden durch Fällung aufgereinigt, hierzu wurden 25µl 100% Ethanol zu jedem 10µl Sequenzierreaktionsprodukt gegeben, gemischt und 15 Minuten bei 12000rpm, in Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. 75µl 70% Ethanol wurde pro Ansatz zugegeben und erneut unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Nach Abpipettierung des Überstands

wurden die DNA-Peletts ca. 1 Stunde bei Raumtemperatur offen getrocknet. Danach wurde das Pelett in 50µl HPLC-Wasser aufgelöst. Von dieser Suspension wurden 25µl in die ABI 3100 Platte pipettiert, die im Sequencer analysiert wurde.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Analyse der genetischen Struktur von Exon 11 des MLC1/KIAA0027

Das Gen MLC1/KIAA0027 wurde systematisch bei Patienten mit periodischer Katatonie mit molekularbiologischen Methoden (PCR und Sequenzierung) analysiert. Eine Übersicht über Polymorphismen mit Häufigkeitsverteilung im MLC1/KIAA0027 aus Vor- und Assoziationsstudien wird in Tabelle 1 dargestellt.

Polymorphismen auf MLC1 bei periodischer Katatonie und Vergleichskollektiv							
DNA-Bereich	Nukleotidaustausch	Position <sup>b</sup>	Codon <sup>c</sup>	selteneres Allel	Frequenz des heterozygoten Genotyps		
					Periodische Katatonie (n = 140)	Kontrollen (n = 100)	P-Value
5'-UTR	-549C>T	98160		-549T	2 (1.4%)	2 (2.0%)	0.87
Exon 2	268G>A	97459	T52	268A	1 (0.7%)	0 (0.0%)	0.87
Intron 4	IVS4 +50C>T	93003		IVS4 +50C	21 (15.0%)	7 (12.7%)	0.86
Exon 6	627G>T	90123	C171F	627T	30 (21.4%)	18 (18.0%)	0.62
Intron 6	IVS6 +22C>T	90088		IVS6 +22T	47 (33.6%)	13 (23.6%)	0.24
Exon 7	709C>T	89553	Y199	709T	30 (21.4%)	29 (29.0%)	0.23
Exon 8	769C>A	86985	N218K	769A	2 (1.4%)	3 (1.1%)	0.84
Intron 8	IVS8 +28G>A	86897		IVS8 +28A	62 (44.3%)	31 (56.4%)	0.17
Intron 9	IVS9 +59C>A	83177		IVS9 +59A	36 (25.7%)	11 (20.0%)	0.22
	IVS9 +61T>C	83175		IVS9 +61C	36 (25.7%)	11 (20.0%)	0.22
	IVS9 -110A>G	81374		IVS9 -110G	42 (30.0%)	23 (41.8%)	0.16
Exon 11	1040C>A	76877	L309M	1040A	2 (1.4%)	0 (0.0%)	0.22
Exon 11	1165-1166ins33bp	76751		1165ins33bp	31 (22,1%)	23 (23%)	0.87
Intron 11	IVS11 +16G>A	76727		IVS11 +16A	3 (2.1%)	1 (1.8%)	0.68

Tabelle 1 Polymorphismen auf MLC1 und deren Vorkommen bei gesunden und an periodischer Katatonie erkrankten Personen. (Stöber et al. 2002):

Hervorgehoben der 33bp Insertion/Deletionspolymorphismus und seine Häufigkeit unter Kontrollen und erkrankten Personen

<sup>b</sup> Nukleotidposition von Varianten zur Referenz-cDNasequenz D25217 und zu genomischer Sequenz AL022327

<sup>c</sup> Aminosäureposition zu translatiertem MLC1, beginnend mit dem ersten ATG Codon in nt Position 116 zur cDNA-Sequenz.

Im Exon 11 von MLC1 ist die von McQuillin et al. 2002 beschriebene 33bp Insertion/Deletion in eigenen Stichproben analysiert worden. Der 33bp-Insertions/Deletions-Polymorphismus ist in der genauen Untersuchung der von Meyer beschriebenen L309M Variante durch eine reduzierte Amplifikationseffizienz des 33bp-tragenden Allels auf MLC1 Exon 11 aufgefallen und nachgewiesen worden. Er wird aufgrund seiner GT-Splice-Erkennungssequenz bei der Translation entfernt, sodass das Protein in seiner Länge unverändert bleibt (Abb. 11).

```

Exon 10          Intron 10          Exon 11          ↓L304_L305del
                gtagattgta cccgctgcag
1001 GCC ATA AAA          CCA TCC TAC GAT GTG CTG CTG CTG CTG CTG CTG CTA GTG CTC CTG CTG CAG GCC GGC CTC 1069
299  A  I  K  298          299  P  S  Y  N  V  L  L  L  L  L  L  L  L  V  L  L  L  Q  A  G  L  318

1070 AAC ACG GGC ACC GCC ATC CAG TGC GTG CGC TTC AAG GTC AGT GCA AGG CTG CAG GGT GCA TCC TGG GAC ACC CAG AAC GGC CCG
319  N  T  G  T  A  I  Q  C  V  R  F  K  V  S  A  N  L  Q  G  A  S  W  D  T  Q  N  G  P

                ↓33 bp-Insertion
                GT-Splice-Donor-Site
                ↓GCC GGG GAG ↓GTA AGT GGC GTC TGG GGT GGG GGT↓
1154 CAG GAG CGC CTG 1165          1166 GCT GGG GAG gtagtagcct          tcggtgcag GTG GCC AGG AGC CCC
347  Q  E  R  L  ↓A  G  E↓353          A  G  E  353          354  V  A  R  S  P

```

Abb. 11: Sequenz von MLC1 (Nukleotidposition in Referenz zu cDNA): Die Aminosäurenposition korrespondiert zu translatiertem MLC1, das mit dem Kodon ATG in Nukleotidposition 116 zur Referenzsequenz startet. Intronische Sequenzen sind klein geschrieben. Die Mutationen werden durch Pfeile hervorgehoben. Der 33bp-Insertions/Deletions (1023-1033delinsGCA)-Polymorphismus beeinflusst nicht die Aminosäuresequenz.

Die Untersuchung der L309M Variante im Exon 11 des MLC1 mittels DHPLC-, RFLP-Analysen und direkter Sequenzierung deckte auf, dass die von Meyer et al. 2001 als heterozygot beschriebene Variante bei gleichen Probanden, homozygot vorkam. Die genaue Untersuchung zeigte ein Amplifikationsdefizit. In der PCR wurde ein Allel vermindert repliziert, wenn ein 33bp-Polymorphismus auf ihm zu finden war. Das 33bp-längere PCR-Produkt wurde vermindert amplifiziert und führte so zu falschen Ergebnissen, was Auswirkungen auf Detektion aller Polymorphismen und Mutationen auf dem 33bp-Polymorphismus tragendem Allel hat (s. Abb. 12).

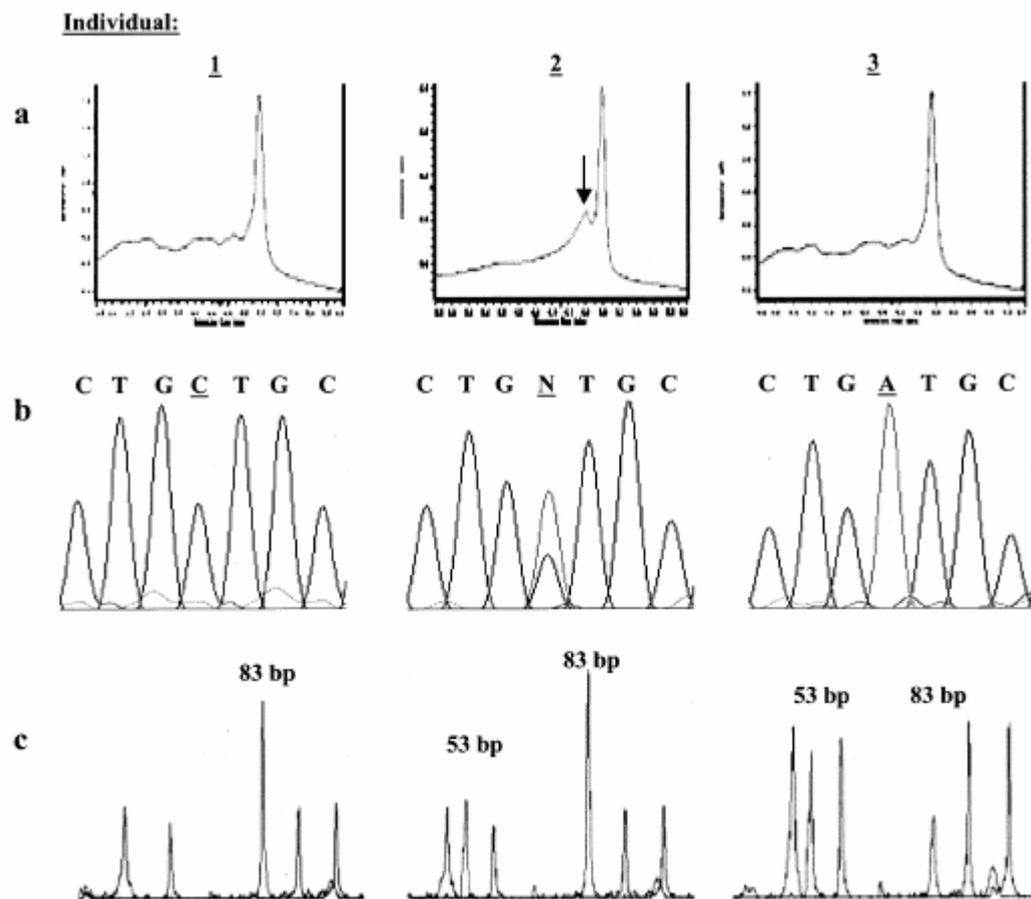


Abb. 12: Reduzierte Allel-amplifikationseffizienz von Exon 11 im MLC1 am Beispiel der 1040C>A Variantendektion. (a)DHPLC-Analyse, (b)Sequenzierung (c)*LweI*-RFLP-Analyse von MLC1-Exon-11-PCR-Produkten. Proben 1 bis 3 sind dem Stammbaumausschnitt von F21 in Abbildung 14 zugeordnet: (1) homozygoter Wildtypträger,(2) heterozygoter Träger des Polymorphismus 1040C>A,(3) homozygoter Polymorphismusträger, der von Meyer et al. 2001 als heterozygot beschrieben wurde (Bettecken et al. 2002).

Der 33bp längere DNA-Strang ist GC-Basen reich (72,7%), womit auch Auswirkungen auf eine verminderte Alleltranskription anzunehmen sind. Erst unter optimierten Reaktionsbedingungen und Primern, die direkt an der Insertion/Deletion greifen ist ein quantitativer Nachweis durch effiziente Allel-amplifikation erreichbar. Als 33bp-Insertionsnachweis wurden PCR-Produkte auf ein 2% Agarosegel aufgetragen und ihre Länge zu standardisierten Fragmentlängenmarkern verglichen. Homo- und heterozygote Insertionsträger sowie der Wildtyp unterscheiden sich durch eine PCR-Produktlängendifferenz von 542bp bzw. 575bp deutlich voneinander (Abb. 13).

### MLC1 Exon 11: 33-bp-Insertions/Deletions-Polymorphismus

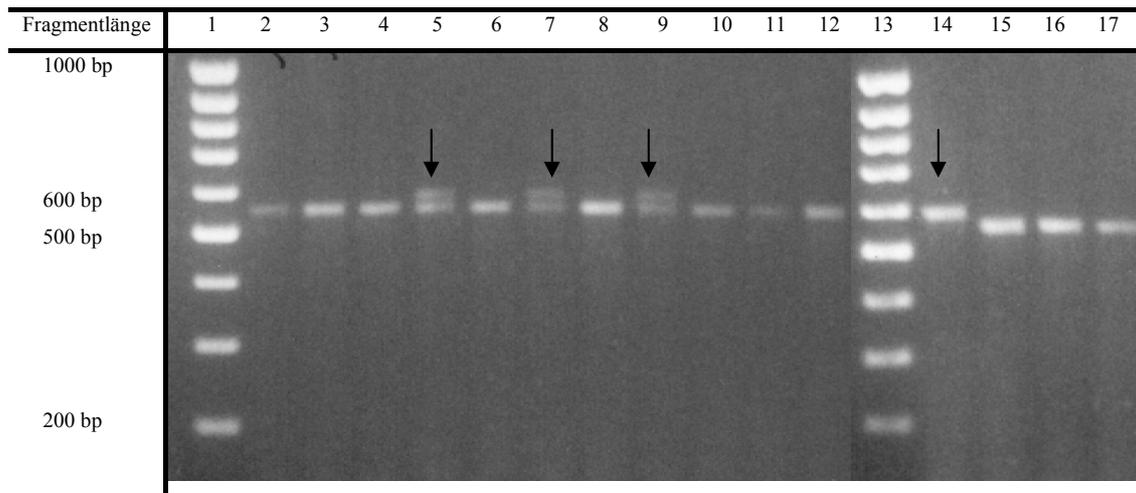


Abb.13: PCR-Produkt-Elektrophoreseaufreinigung nach Amplifikation mit den Primern KIAA0027 Gurling F/R auf 2% Agarosegel: Als Referenz aufgetragen die 100-bp-Längenstandartleiter (1. und 13. Bande), in Banden 2 bis 12 sowie 14 bis 17 Blutspendekontrollen. Die Längendifferenz (575bp und 542bp, 33bp-Insertion/Deletion) wird hervorgehoben (Heterozygotie: 5, 7 und 9, homozygoter Insertionsträger: 14).

Von 140 Patienten mit periodischer Katatonie sind 31 heterozygote Träger des 33bp-Polymorphismus (22,1%) entsprechend einer Allelfrequenz von 11,1%. In dieser Gruppe gab es keine homozygoten Polymorphismusträger. Von 100 untersuchten gesunden Kontrollpersonen tragen 4 homozygot und 23 heterozygot die Insertion/Deletion (23,0%) mit einer Allelfrequenz von 15%. Damit zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Erkrankten und Kontrollen ( $P=0,87$ , Tabelle 2).

<b>33-bp-Insertions/Deletions-Polymorphismus auf MLC1</b>					
	Genotypfrequenz			Allelfrequenz	
	WT/WT	WT/Insertion	Insertion/Insertion	WT	Insertion
Periodische Katatonie (n=140)	0,78	0,22	0	0,89	0,11
Kontrollen (n=100)	0,73	0,23	0,04	0,85	0,15

Tabelle 2: Genotyp und Allelfrequenz des 33bp-Insertions/Deletionspolymorphismus

Am Beispiel der Familie F21 konnte zudem die fehlende Segregation des 33bp Insertions/Deletionspolymorphismus und periodischer Katatonie dargestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die seltene L309M (1040C>A) Variante auf MLC1 im Exon 11 bei einem Patienten, der an periodischer Katatonie leidet nicht mit dem 33-bp-insertionstragendem Allel segregiert (Abb. 14).

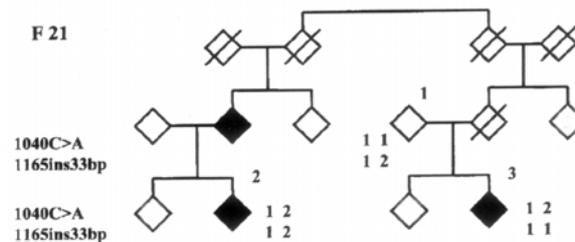


Abb. 14 Ausschnitt aus dem Familienstammbaum (F21):

Die polymorphen Positionen werden links gegenübergestellt. 1) Homozygoter Träger des Wildtyps 1040C ist heterozygot für den Insertions/Deletionspolymorphismus 1165ins33bp, 2) Heterozygoter Träger der Variante 1040C>A und des Insertions/Deletionspolymorphismus 1165ins33bp, 3) Heterozygoter Träger der Variante 1040C>A und des Wildtyps 1165ins33bp. An periodischer Katatonie erkrankte Familienmitglieder (schwarz markiert) zeigen keine Koinzidenz mit der Amplifikation des 33bp-Insert-Allels (Bettecken et al.2002).

#### 4.2. Polymorphismen im Gen CERK1/KIAA1646

Aus den Familien F15, F17 und F21, die in den genomweiten Kopplungsanalysen kompatibel mit Kopplung der periodischen Katatonie auf Chromosom 22q13 waren wurden 4 Probanden (727, 857, 933 und 1045) und gesunde Kontrollen zur Sequenzierung ausgewählt. Die Sequenzierung umfasste alle 13 Exonbereiche und die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des CERK1-Gens über einen Bereich von 45.40 bis 45.45Mb. Kodierende Regionen inklusive der anliegenden Exon-Intron-Übergänge wurden auf genetische Varianten überprüft. Es sind siebzehn verschiedene Polymorphismen in CERK1 bei den 4 Probanden und in gesunden Kontrollpersonen detektiert worden.

Von den gefundenen 17 Polymorphismen waren sieben in der NCBI-Datenbank noch nicht verzeichnet. Zusätzlich wurden ca. ~2kb der 3'-UTRegion von CERK1 analysiert,

weil in den Datenbanken dort ein putatives Gen FLJ23239 annotiert war. In diesem Bereich fanden sich acht Polymorphismen im Vergleich zum aus cDNA-Datenbank stammenden Klon 59H18 [<http://ncbi.nlm.nih.gov>]. Unter den SNPs fand sich eine Variante 47114A/C in Position nt45411662 (rs36211082), die zu einem Aminosäureaustausch an Position 338 führt [Klon 59H18, <http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP>]. Diese Variante wurde auf ihre Häufigkeit bei Patienten mit periodischer Katatonie und einem Kontrollkollektiv mittels RFLP-Analyse geprüft. Eine Übersicht über die analysierte Sequenz und darin gefundene Polymorphismen in CERK1 zeigt die Tabelle 3.

Sequenzanalyse von CERK1				
CERK1	Intronisch gelegene Nukleotidposition zu Sequenzanfang	Amplicon in bp kodierend		SNP/Exon
Exon 2	nt 45437557	272	87	1
Exon 3	nt 45436701	267	126	0
Exon 4	nt 45428621	275	126	0
Exon 5	nt 45427493	227	66	0
Exon 6	nt 45424406	269	147	0
Exon 7	nt 45418149	249	78	2
Exon 8	nt 45415951	288	156	1
Exon 9	nt 45411798	242	108	2
Exon 10	nt 45409977	273	78	1
Exon 11	nt 45408237	305	207	1
Exon 12	nt 45406618	293	210	1
Exon 13	nt 45403699	506	72	2
3'UTR	nt 45403270	945	Ø	6

Tabelle 3: Aufstellung der analysierten CERK1-Sequenz mit Exongröße und Anzahl der gefundenen SNPs. Beginn der analysierten Sequenz (3'-Ende des Reverseprimers) in nt-Position [<http://www.genome.ucsc.edu>] entsprechend dem kodierenden Minusstrang, Referenzklone: CTA-29F11 und 59H18 [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

Die gefundenen SNPs sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Im Exon 2, 11 und 12 wurden so genannte stumme Mutationen (Cys50, Asp377 und Asp502) gefunden, die keinen Aminosäureaustausch bedingen. Sie finden sich bei den Kandidaten wie auch den Kontrollen. Die Nummerierung der SNPs bezieht sich auf den Stand 2008.

Single-Nucleotid-Polymorphismen im CERK1 bei 4 Probanden und 1 Kontrolle						
Position im CERK-Gen	Nukleotid Austausch	Nukleotidposition	Kodon	SNP-Datenbank*	Allelfrequenz und Genotyp	
Exon 2	G>A	nt 45437424	C50	rs 12166204	G: 0.9 A: 0.1	933: GG, 1045: GA, 727: GG, 857: GG, Kontrolle: GG
Intron 7	C>T	nt 45418024	-	rs 16995595	C: 0.9 T: 0.1	933: CT, 1045: CC, 727: CC, 857: CC, Kontrolle: CC
Intron 7	C>G	nt 45415928	-	rs 6007953	C: 0.5 G: 0.5	933: CG, 1045: GG, 727: CG, 857: CC, Kontrolle: CG
Intron 8	C>G	nt 45415691	-	rs 5767329	C: 0.8 G: 0.2	933: CC, 1045: CC, 727: CG, 857: CG, Kontrolle: CC
Intron 8	G>A	nt 45411750	-	rs 9616098	G: 0.9 A: 0.1	933: GG, 1045: GG, 727: GG, 857: GG, Kontrolle: GA
Exon 9	A>C	nt 45411662	V338G	rs 36211081	A: 0.9 C: 0.1	933: AA, 1045: AA, 727: AA, 857: AA, Kontrolle: AC
Intron 10	G>A	nt 45409793	-	rs 36211082	G: 0.8 A: 0.2	933: GG, 1045: GG, 727: GA, 857: GA, Kontrolle: GG
Exon 11	G>A	nt 45408189	D377	rs 36211083	G: 0.8 A: 0.2	933: GA, 1045: GG, 727: GG, 857: GG, Kontrolle: GA
Exon 12	G>A	nt 45406443	D502	rs 35318967	G: 0.8 A: 0.2	933: GG, 1045: GG, 727: GA, 857: GA, Kontrolle: GG
3'-UTR	T>A	nt 45403531	-	rs 2748349	T: 0.5 A: 0.5	933: TA, 1045: TT, 727: TA, 857: TA, Kontrolle: AA
3'-UTR	T>C	nt 45403529	-	rs 2542014	T: 0.5 C: 0.5	933: TC, 1045: TT, 727: TC, 857: TC, Kontrolle: CC
3'-UTR	G>T	nt 45403096	-	rs 8143065	G: 0.8 T: 0.2	933: GG, 1045: GG, 727: GT, 857: GT, Kontrolle: GG
3'-UTR	C>T	nt 45402864	-	rs 801719	C: 0.7 T: 0.3	933: CC, 1045: CC, 727: CT, 857: CT, Kontrolle: CT
3'-UTR	C>A	nt 45402678	-	rs 801720	C: 0.6 A: 0.4	933: CC, 1045: CC, 727: CA, 857: CA, Kontrolle: AA
3'-UTR	G>A	nt 45402542	-	rs 3747258	G: 0.8 A: 0.2	933: GG, 1045: GG, 727: GA, 857: GA, Kontrolle: GG
3'-UTR	G>A	nt 45402502	-	rs 36211405	G: 0.8 A: 0.2	933: GG, 1045: GG, 727: GA, 857: GA, Kontrolle: GG
3'-UTR	A>G	nt 45402374	-	rs 2748348	A: 0.8 G: 0.2	933: AA, 1045: AA, 727: AG, 857: AG, Kontrolle: AA

Tabelle 4: Singlenucleotid-Polymorphismen in CERK1 [<http://www.genome.ucsc.edu>], [<http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP>]

### 4.3. Analyse der kodierenden Variante V338G in CERK1

Der SNP rs36211081 in Position nt45411662 wurde heterozygot vorliegend in der Sequenz der Kontrollperson auf CERK1 Exon 9 vorgefunden. Die Variante 47114A/C [Referenzklon 59H18, <http://ncbi.nlm.nih.gov>] führt über den Austausch der zweiten Base im kodierenden Triplet von Thymin zu Guanin zu einem Aminosäurenwechsel von Valin zu Glycin in der Position 338 des CERK1-Proteins (Abbildung 15 und 16). Die aus der Sequenzierung von Probanden sich ergebende Allelfrequenz ist: T: 0,9 und C: 0,1, die Genotypfrequenz ist: TT: 0,8 und TG: 0,2.

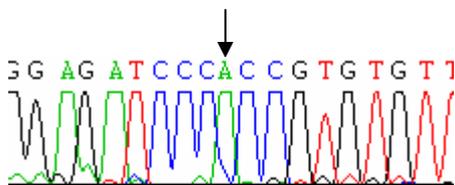


Abb. 15 Wildtyp: Proband 857 47114A/A

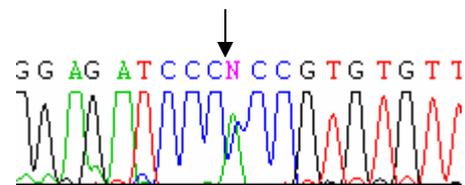


Abb. 16 Heterozygote Kontrolle 47114A/C

Abbildungen 14 und 15: Sequenzausschnitt auf MCL1 Exon 9 in Position des SNPs rs36211081 aus Sequencerdaten.

Die Häufigkeit dieser Variante wurde einem repräsentativen Kollektiv mit der RFLP-Analyse überprüft. Rs36211081 wurde bei 115 an periodischer Katatonie erkrankten Personen und 110 Blutspendekontrollen mit dem spezifischen Primer (KIAA1646 Exon 8 F/R) amplifiziert und anschließend das Produkt mit *DraIII* verdaut. Das Enzym spaltet die spezifisch das 242bp-Produkt in ein 110bp und 132bp Fragment, jedoch nicht die Variante (Abbildung 17). In dem Kollektiv von Indexfällen zeigte sich eine Frequenz des heterozygoten Genotyps von 2,2% (5 von 230 Allelen). Bei Kontrollen betrug die Heterozygotenfrequenz 0,9% (2 von 220 Allelen),  $p=0.45$  (Tabelle 5).

rs36211081-Polymorphismus auf CERK1					
	Genotyp			Allelfrequenz	
	WT/WT	WT/MT	MT/MT	WT	MT
Periodische Katatonie (n=115)	0,96	0,04	0	0,98	0,02
Kontrollen (n=110)	0,98	0,02	0	0,99	0,01

Tabelle 5: Genotyp und Allelfrequenz des SNPs rs36211081 im Kollektiv

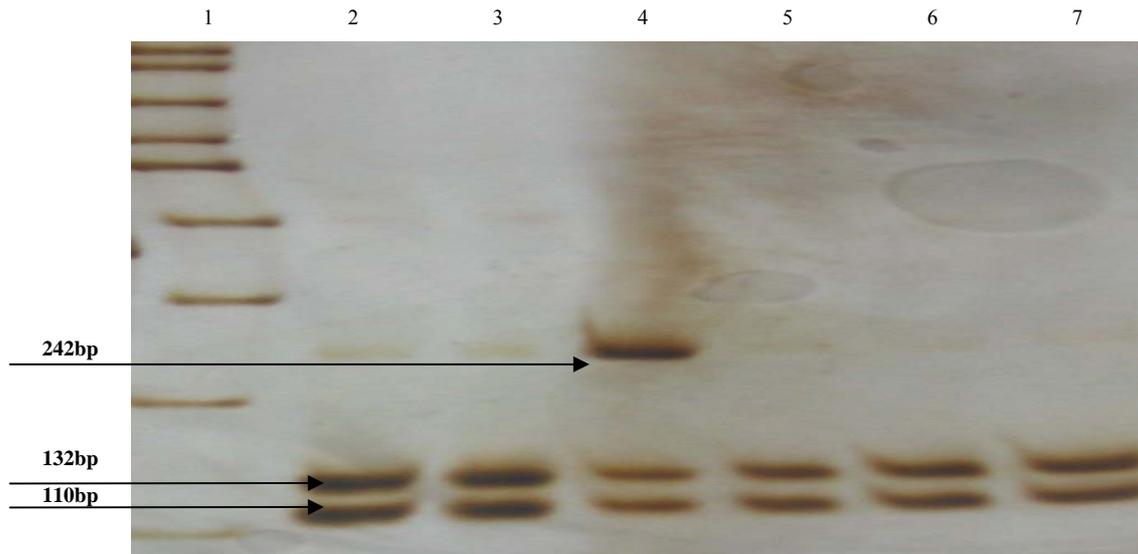


Abb. 17: RFLP-Analyse von rs36211081 (CERK1 Exon 9) mit dem Restriktionsenzym *DraIII*:

Obligate Schnittstellen markiert durch Keile: 5'-C A C N N N▼G T G-3' und 3'-G T G▲N N N C A C-5'. Die Banden von links nach rechts auf 10%-igem PAA-Gel zeigen: DNA-100-Basenpaarleiter (Reihe 1) und Blutspendekontrollen (Reihe 2 bis 7). In Reihe 4 ein heterozygoter re36211081-Polymorphismusträger, alle anderen Personen sind homozygote Wildtypträger.

#### 4.4. Amplifikationsdefizite von CERK1

Das am putativen Promotor gelegene Exon 1 des CERK1 konnte nicht erfolgreich amplifiziert werden. Auch mit verschiedenen Primerkombinationen, ist es nicht gelungen die dreidimensionale Struktur dauerhaft zu denaturieren, um diese sequenzieren zu können. Verantwortlich hierfür werden die dort gelegenen Tandemrepeats (Wiederholungssequenzen) angenommen, die dauerhafte und stabile Sekundär- und Tertiärstrukturverbindungen der DNA bewirken sowie ein sehr hoher GC-Gehalt von 79,1%. Die GC-Verbindungen finden sich in der Region vom Promotorbereich und Exon 1 zwischen nt45454350 und nt45454450 auf einer Länge von etwa 1000bp. Repeatsequenzen von 7bp (13 Kopien), 21bp (5 Kopien), 16bp und 18bp (jeweils 4 Kopien) verhinderten möglicherweise ein Auftrennen der DNA-Stränge in der PCR (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>). Primer die sich in unterschiedlichen Reaktionsbedingungen und Kombinationen (seminested und nested) als nicht effizient erwiesen haben sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Nukleotidposition <sup>a</sup>	Primer	Primersequenz
18976	1 Forward	5' CCG GCC TTA CCA CAG C 3'
19308	1 Reverse	5' ACT GCA GGG GCC GCT AAC 3'
18979	2 Forward	5' GCC TTA CCA CAG CCG CTC 3'
19559	2 Reverse	5' GGA GAA GAG AGG AGA GAA AGG 3'
19997	3 Forward	5' GCT CCC TGC ACC CGG TCC 3'
19421	3 Reverse	5' TAC CCA CGC CTC CTC C 3'
19044	4 Forward	5' CTC CCT GGC CAG GTC C 3'
19449	4 Reverse	5' CCC CGT CTC TCC CTG G 3'
18981	5 Forward	5' CTT ACC ACA GCC GCT C 3'
19361	5 Reverse	5' GTA CGG GGT GAC GCA G 3'
19411	6 Forward	5' AGG CGT GGG TAG AGG AGG 3'
20030	6 Reverse	5' TGG TGA TTC CTT CAG CTG TG 3'

Tabelle 6: Primerliste mit den keine Amplifikation von Exon1 und des Promoterbereichs von CERK1 gelang.

<sup>a</sup> Nukleotidposition am 5'Anfang des Primers zur Referenz-cDNASequenz CTA-29F11 und zu genomischer Sequenz AL118516.

## **5. Diskussion**

Neben dem Konzept einer Krankheitseinheit der Schizophrenie gewinnt die Auffassung immer mehr an Bedeutung, dass es sich bei den schizophrenen Psychosen um eine klinisch und ätiologisch heterogene Gruppe von Erkrankungen handelt (Bleuler 1911, Kleist 1956). Gerade die Klassifikation nach Karl Leonhard, die in ihrer Aufteilung umschriebenen Symptomenkomplexen eine eigenständige Ätiologie zuordnet, berücksichtigt neben prognostischen Aussagen potentielle ätiologische Faktoren (Leonhard 1991). Der klinische Phänotyp der periodischen Katatonie zeigt durch seine familiäre Häufung auf eine genetische Grundlage, weshalb genomweite Studien in Familien, in denen das Krankheitsbild segregierte, durchgeführt wurden. So konnten Kandidatengenregionen auf Chromosom 15q15 und 22q13 für die periodische Katatonie aufgezeigt werden. Von Chromosom-22q-Mutationen ist bekannt, dass sie mit erhöhten Raten von organischen Psychosen bei Erwachsenen einhergehen (Goldberg 1993, Bassett und Chow 1999, Riley und McGuffin 2000). Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Kandidatengene MLC1 und CERK1, die telomer zu Marker D22S1169 von Chromosom 22q13 lokalisiert sind. In dieser Position lag der maximale LOD-Score für periodische Katatonie auf Chromosom 22q (Stöber et al. 2000). Es wurden Gene analysiert, die hohe Expressionsraten im Gehirn zeigen.

Die Kandidatengene MLC1 und CERK1 wurden mittels Gelelektrophorese, systematischer Sequenzierung und nachfolgender RFLP-Analyse nach Mutationen durchsucht und auf ihren Zusammenhang mit periodischer Katatonie analysiert.

### **5.1. Auswahl der Methodik**

Studien mit dem heterogenen Krankheitsbild der Schizophrenie beherbergen auch bei großen Stichproben das Problem, dass strenge Kriterien für Signifikanz nicht eingehalten werden können, wenn die Signalstärke zu schwach ist (Mowry et al. 2004). Es kann sowohl beim unscharf definierten Phänotyp, als auch am Beispiel einer heterogenen Vererbung beobachtet werden, dass in einem großen Kollektiv mit Erkrankungen heterogener Genese viele schwache Signale auf mehrere Gene deuten,

die aber kaum von falsch positiven Ergebnissen unterschieden werden können. Reliabel diagnostizierbare Phänotypen erleichtern die Suche nach validen Ergebnissen (Chakravarti 1999). Daher wurden für diese Arbeit Probanden aus Familien ausgewählt, die in Vorstudien eines differenzierten Phänotyps (periodische Katatonie) mit einer Segregation auf dem Chromosom 22q kompatibel waren (Stöber et al. 2000, 2001, 2005). Die Methoden der positionellen Kandidatengenuntersuchung wurden hierbei über ein Mehrstufenstudiendesign optimiert und gegen falsch positive Ergebnisse geschützt, um eine solide Grundlage für weitere Untersuchungen zu bilden (van der Oord und Sullivan 2003). In die erste Studie wurden zwölf, in die zweite vier Mehrgenerationenfamilien eingeschlossen und 135 Probanden mit 356 Markern untersucht (Stöber et al. 2000, 2002). Nichtparametrische Mehrfachpunktanalysen und parametrische Kopplungsanalysen mit einem autosomal dominanten Modell haben eine Wahrscheinlichkeit von Kopplung bei periodischer Katatonie auf Chromosom 22q13 für eine Mehrgenerationenfamilie mit Hinweis auf genetische Heterogenität ergeben (Stöber et al. 2000). In weiteren Untersuchungen wurde die systematische Suche nach Mutationen in Kandidatengen auf Chromosom 22q13 distal zu Marker D22S1169 ausgewählt, der die Kriterien eines „suggestive evidence for linkage“ unter einem autosomal dominanten Modell erfüllt hat (Lander und Kruglyak 1995, Stöber et al. 2002). In dieser telomeren Region sind ca. 40 Gene in 4cM lokalisiert, zwei Kandidatengene dieser Region, MCL1 und CERK1, wurden in dieser Arbeit untersucht. Die Suche nach Mutationen konzentrierte sich auf kodierende sowie nicht translatierte 3'- und 5'-Regionen, inklusive Spliceregionen und Exon-Intron-Übergänge mit regulierenden Funktionen, um bei Probanden aus koppelnden Familien möglichst vollständig den Polymorphismusgehalt in der Sequenzanalyse zu erhalten. Variationen dieser Bereiche führen häufig zu funktionellen Veränderungen (King und Wilson 1975), wobei der Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) die häufigste Sequenzvariation mit einem Durchschnittsvorkommen von einem SNP auf 1000bp ist (Chakravarti 1999). Es wurden die etablierten Verfahren der automatisierten Sequenzierung genutzt, weil sie eine nahezu 100%-ige Detektionsfrequenz von genetischen Varianten erreichen (Nedelcheva et al. 2001). In größeren Kollektiven wurde zum Mutationsnachweis und zur Bestimmung der Allel- und Genotypfrequenz die RFLP-Analyse eingesetzt

(Dianzani et al. 1993, Schumm et al. 1988), da die Methode der TaqMan-Hochdurchsatzgenotypisierung zum Studienzeitpunkt noch nicht etabliert war.

Die untersuchten Probanden und Kontrollen stammen sämtlich aus dem süddeutschen Raum und waren deutscher Abstammung. Ethnischer Zugehörigkeit kommt in Hinsicht auf das Vorkommen und Häufigkeit von genetischen Varianten eine große Bedeutung zu (Cavalli-Sforza 1995). Beim uneinheitlichen Kollektiv mit ethnischen Unterschieden können nicht krankheitsassoziierte SNPs als solche fehlgedeutet werden und andere Ergebnisse überschatten (Vigilant et al. 1991).

## **5.2. Befunde zu MLC1/KIAA0027 und periodischer Katatonie**

Mutationen im MLC1 sind verantwortlich für die megalenzephalale Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (Leegwater et al. 2001, Duarri et al. 2008). MLC ist eine seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung mit Beginn im Kindesalter, die sich durch spongiforme Leukodystrophie verbunden mit Ataxie, Spastik und kognitiven Defiziten äußert. Klinisch treten neben motorischen, neurologische Symptome mit Epilepsien auf (Yalcinakaya et al. 2003). Charakteristisch ist eine zerebral diffus geschwollene weiße Substanz mit subkortikalen Zysten (van der Knaap et al. 1995, Topcu et al. 1998, Miles et al. 2008).

Das MLC1 Protein, das aus 377 Aminosäuren besteht, besitzt acht Transmembrandomänen. Es erfüllt möglicherweise spezifische Funktionen in der Membran als Transporter und wird im Gehirn exprimiert (Leegwater et al. 2001, Rubie et al. 2003). Das MLC1-Protein scheint seine Hauptfunktion neben dem Dystrophin-Glykoproteinkomplex in Astrozyten und Ependymzellen als Transporter zu übernehmen (Ambrosini et al. 2008, Boor et al. 2005, 2007).

Berichte über komplexe Pathogenese von MLC1-Dysfunktionen mit bipolaren Erkrankungen, Schizophrenie und MLC ließen auch die Vermutung zu, dass Mutationen des MLC1/KIAA0027 verantwortlich für die periodische Katatonie sind (Verma et al. 2005), insbesondere als die Variante L309M mit der Erkrankung in der auf Chromosom 22q13 koppelnden Multiplexfamilie F21 segregierte (Meyer et al. 2001). L309M wurde als für die periodische Katatonie krankheitsverursachende

Mutation diskutiert und in Assoziationsstudien mit der Methode der denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) und der automatisierten Sequenzierung MLC1 analysiert. Es wurden 13 SNPs detektiert. Die 1040C>A Variante (L309M) stellte sich als eine seltene, aber nicht schizophrenieassoziierte Variante des MLC1-Genes dar. Die Variante segregiert zwar im koppelnden Haplotyp in Familie F21, konnte aber auch in einem von der Erkrankung nicht betroffenen Individuum nachgewiesen werden (Rubie et al. 2003).

Bei der Analyse des MLC1 ist ein komplizierter 33-bp-Insertions/Deletions-Polymorphismus aufgefallen, der Amplifikationseffekte ausübt (Stöber et al. 2002, McQuillin et al. 2002). Der 33bp-Insertions/Deletions-Polymorphismus am 3'-Ende des Exon 11 von MLC1 beeinflusst nicht die Aminosäuresequenz des Proteins und zeigt eine verminderte Amplifikationseffizienz des Exons mit einem Wildtypallel (McQuillin et al. 2002, Bettecken et al. 2002). Er war Ausgangspunkt einer vertieften Analyse, da seine reduzierte Amplifikationseffizienz, eine vermutete „Hotspot“-Region für Mutationen darstellt (Leegwater et al. 2001). Darüber hinaus bereiten Amplifikationsdefizite Schwierigkeiten in der molekularen Diagnostik der megalenzephalischen Leukodystrophie für die in 20% der Fälle keine kausale Mutation gefunden werden kann (Boor et al. 2006). Für Mutationen, die zusammen mit der 33bp-Insertion am 3'Ende des MLC auftreten, stellen Amplifikationseffekte in Routinedetektionsverfahren ein Risiko dar, wenn sie nicht berücksichtigt werden. Wir konnten nachweisen, dass das längere Allel reduziert amplifiziert wird, wodurch Mutationen distal der Insertion evtl. nicht detektiert werden (Bettecken et al. 2002). Die Detektion des 33bp-Polymorphismus gelang nur mit Primern, deren Sequenz unmittelbar neben der Variante lag. Gründe dafür scheinen die verminderte Amplifikationseffizienz zu erklären und liegen in der Struktur dieses Abschnitts. Während im gesamten Gen ein GC-Anteil von etwa 55% enthalten ist, zeigte Exon 11 und Teile anliegender intronischer Regionen einen GC-Anteil von 67% bis 74%, was die Schmelztemperatur erhöht (McDowell et al. 1998). Hinzu kommen potentiell adhäsive Verbindungen zwischen den Basen, hervorgerufen durch inkomplette 33bp und 68bp lange Tandemwiederholungssequenzen. Die vermutliche Bildung einer stabilen Sekundärstruktur in Form eines Loops durch eine komplementäre intronische

9bp Sequenz, verstärken den Effekt (Sonnhammer und Durbin 1995, Benson 1999, SantaLucia 1998, Bettecken et al. 2002).

Der 33bp-Insertions/Deletions-Polymorphismus im Exon 11 des MLC1 wurde auf sein Vorkommen bei periodischer Katatonie und gesunden Probanden geprüft und zeigte statistisch keinen Unterschied zwischen seinem Vorkommen bei periodischer Katatonie und einem Kontrollkollektiv. Somit ergab sich kein Hinweis auf eine genetische Assoziation der periodischen Katatonie und der Insertion (Rubie 2003).

Neben den molekulargenetischen und klinischen Unterschieden von MLC und periodischer Katatonie divergieren auch die histopathologischen Bilder der MLC und der schizophrenen Psychosen. MLC ist charakterisiert durch eine vakuolisierende Myelinopathie, mit einer regelrechten Pyramidenstruktur, eine intensive Astrogliosis und die Präsenz von Vakuolen in der subkortikalen weißen Substanz (van der Knaap et al. 1996, Miles et al. 2008). Das Bild der schizophrenen Psychosen zeigt hingegen eine subtil gestörte abnorme zytoarchitektonische Struktur im Hippokampus, entorhinalem und cingulärem Kortex mit Beteiligung der Pyramidenzellen und Interneuronen (Bogerts 1993, Beckmann et al. 2001, Senitz 2008). Zusammenfassend konnte MLC1 als Genort für periodische Katatonie ausgeschlossen werden. Mutationen im MLC1 können die megalenzephalale Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten zu Folge haben, wobei bereits mehr als 50 ursächliche Mutationen detektiert wurden (Duarri et al. 2008, Miles et al. 2008).

### 5.3. Befunde zu CERK1/KIAA1646 und periodischer Katatonie

Beim Kandidatengen CERK1/KIAA1646, das im telomeren Bereich von Chromosom 22q13 liegt, wurde eine systematische Mutationsanalyse durchgeführt. CERK1 kodiert eine Ceramidkinase mit einer hochspezifischen (DGK) Diacylglycerolkinase ähnlichen Domäne, die Phosphorylierung von Ceramid zu Ceramid-1-Phosphat unter Verbrauch von ATP katalysiert. Sie reagiert nicht mit anderen Lipiden, wie den Sphingosinen, sphingoiden Basen, Diacylglycerol oder Phosphatidylinositol und stellt damit eine neue Klasse der Lipidkinasen dar.

Ceramide (Substrate von CERK) sind in die Regulierung der Apoptose sowie zahlreicher Proteinkinasen und Phosphatasen involviert und spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion, Mitogenese, Differenzierung und Migration (Kolesnick und Hannun 1999, Venkataraman und Futerman 2000, Zhang et al. 1997, Yao et al. 1995, Chalfant et al. 2002, Sawai et al. 1997, Lee et al. 1996). Die Second-Messenger Wirkung von Ceramiden wird durch hydrolysierende Ceramidasen beendet, sie können aber auch in Ceramid-1-Phosphat überführt werden, einem bioaktiven Sphingolipidmetabolit. Er reguliert unter anderem die Sekretion von Neurotransmittern in synaptischen Vesikeln des Gehirns (Bajjalieh et al. 1989), fördert die Phagolysosomenformation und besitzt direkte mitogene Effekte in den Fibroblasten (Hinkovska-Galcheva et al. 1998, Gomez-Munoz et al. 1997). Eine Anhäufung von Sphingolipiden ist mit vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Gaucher, Tay-Sachs und Niemann-Pick verbunden (Buccoliero und Futerman 2003). Darüber hinaus wurden CERK1 und C1P als Aktivatoren der Mastzelldegranulation und Proteinkinase C berichtet sowie die Ceramidkinase gelöst im Zytosol nachgewiesen (Mitsutake et al. 2004).

Die Ceramidkinase, Protein Q8TCT0, entfaltet mit den Kofaktoren Magnesium und Kalzium und einem pH-Optimum zwischen 6,0-7,5 die größte katalytische Aktivität mit einer Michaelis Menten Kinetik ( $K_m$ ) von 187 und  $32\mu\text{M}$  [<http://www.genecards.org>]. Auf zellulärer Ebene wird die Ceramidkinase membran-assoziiert und zytoplasmatisch vorgefunden. Die Expression auf Organebene findet vor allem im Gehirn sowie Herz-, Skelettmuskel-, Nieren-, Lebergewebe und Leukozyten statt.

CERK1 ist ein Protein mit einer Länge von 537 Aminosäuren und einem Gewicht von 60kDalton (Weizmann Institute of Science, Sugiura et al. 2002). CERK1 besitzt fünf konservierte Domänen (C1-5), die in abweichender Form bei den Sphingosinkinasen vorkommen. Die am Anfang des Proteins positionierte pH-Domäne übernimmt eine regulierende Funktion im Zusammenspiel mit G-Proteinen und der Aktivität des Enzyms (Gibson et al. 1994, Lemmon et al. 1996, Touhara et al. 1994, Harlan et al. 1994, Kavanaugh et al. 1995, Carré et al. 2004). Eine Aktivität regulierende, Kalzium-abhängige Domäne wird am Ende des Enzyms angenommen. Zusätzlich haben Phosphorylierungen de- und aktivierende Effekte, insbesondere am Serin in Position 300 (Sugiura et al. 2002). Homologien von CERK1 werden zu den Sphingosinkinasen Typ1 gefunden (Pettus et al. 2003).

Die Aktivität von CERK in synaptischen Vesikeln wird Kalziumkonzentrationsabhängig durch Neurotransmitter und Hormone reguliert und trägt selbst zur Exozytose im synaptischen Spalt durch Membranfusion bei (Augustine et al. 1987, Knight et al. 1982, Bajjalieh et al. 1989). Das Enzym ist an Phagozytose und Verschaltung zellulärer Signale und Transduktionskaskaden beteiligt (Hinkovska-Galcheva et al. 1998, Pettus et al. 2004, Gimenez-Ibanez et al. 2009). Biologische Erkenntnisse über CERK1 beweisen seine Rolle in der intrazellulärer Signaltransduktion (Miya et al. 2007). Studien bei anderen Ceramidkinasen, wie z. B. CERKL, das eine 29%ige Homologie zu CERK1 aufweist, belegen, dass Mutationen in den Hauptdomänen von CERKL mit Enzymaktivitätsverlust einhergehen und mit der Pathogenese der Retinitis pigmentosa verbunden sind (Bornancin et al. 2004). Das CERKL-Enzym auf Chromosom 2q31 besteht aus 13 Exonen. Es wird in neuroganglionären Zellen exprimiert und ist für diese Zellen lebensnotwendig. Die Retinitis pigmentosa wird mit dem autosomal rezessiven Defekt dieses Proteins und Akkumulation seiner Metaboliten im Nukleolus durch Apoptose in Photorezeptoren und anderen neuronalen Zellen induziert (Tuson et al. 2004).

Die Eigenschaften von CERK und seiner Stoffwechselprodukte gaben Anlass zur Hypothese, dass eine Funktionsstörung in regulatorischen Prozessen mit verursachend in schizophrenen Psychosen sein könnte. Als Kandidatengen für die periodische Katatonie wurde CERK1 auf Mutationen analysiert. Eine Übersicht der Domänen C1

bis C5 und der Aktivität steuernden pH-Domäne des Proteins, die die Bindung an Membranen-komponenten ermöglicht (Carré 2004), mit gefundenen Polymorphismen im CERK1 wird dargestellt (Abb. 18) [<http://www.genecards.org>].

```

1      MGATGAAEPLQSVLWVKQQRCAVSLEPARALLRWWRSPG
41     GAGAPGADACSVPVSEIIAVEETDVHGKHQGSWKQKMEK
81     PYAFTVHCVKRARRHRWKWAQVTFWCPEEQC1CHLWLQTLR
121    EMLEKLTSRPHC2LLVFINPFGGKGQC3GKRIYERKVAPLFTL
161    ASITTDIIVTEHANQAKETLYEINIDKYDGIVCVGGDGMF
201    SEVLHGLIGRC4TQRSAGVDQNHPRAVLVPSSLRIGIIPAGS
241    TDCVCYSTVGC5TSDAETSALHIVVGDSLAMDVSSVHHNSTL
281    LRYSVSLC1LGYGC2GFYC3GDIC4IKDSEC5KRWLGLARYDFSGLKC1TFL
321    SHHCYEGTVSFLPAQHTV/GGSPRDRKPCRAGCFVCRQSKQQ
361    LEEEQKKALYGLEAAEDVEEWQVVCC1GKFLAINATNMSCAC
401    RRSRGLSPAC2AHLGDGSSDLILIRKCSRC3FNFLRFLIRHTN
441    QQDQFDFTFVEVYRVKKFQFTSKHMEDESDC4LKEGGKKRF
481    GHICSSHPSCCCTVSNSC1SWNCC2DGEVLHSPAIEVRVHCQLV
521    RLFARGIEENPKPDSHS

```

Abbildung 18: Aminosäuresequenz von CERK1:

Hervorgehoben sind Varianten aus der Gensequenzierung inklusive der Variante V338G (rs36211081), die einen Aminosäureaustausch bewirkt, unterstrichen sind die katalytischen Domänen C1 bis C5, kursiv die PH-Domäne.

Insgesamt wurden in der Sequenzanalyse von CERK1 17 SNPs entdeckt (Tabelle 4). Dreizehn Varianten waren in intronischen Sequenzen lokalisiert und betrafen keine bekannten Splice-Stellen. Drei Varianten wurden als stumme Mutationen identifiziert und eine Variante (rs36211081) wegen ihrem konsekutiven Aminosäureaustausch in Kollektiven von Indexpatienten und Kontrollen auf einen signifikanten Häufigkeits-Unterschied analysiert. Fast 30% der Proteine sind polymorph, wobei die Variabilität sich proportional zu der Genlänge und der Populationsgröße verhält (Harris 1966, Nei 1987). Das Vorkommen von Mutationen ist auch von der Funktion abhängig, kodierende DNA-Abschnitte beinhalten weniger Mutationen als nicht kodierende (Li und Sadler 1991). Alte Mutationen kommen häufiger in einer Population vor als neue

(Vigilant et al. 1991). SNPs kommen reichlich vor und weisen eine kleinere Mutationsrate als Mikrosatelliten auf. Daher eignen sie sich zum Erstellen eines Katalogs der genetischen Variationen. Insbesondere komplexe Zusammenhänge und Erkrankungen können leichter in Beziehung zu der Mutation und dem Phänotyp gestellt werden (Risch und Merikangas 1996). Der Nachweis von SNPs verbessert Haplotypanalysen und verhilft der positionellen Klonierung für weitere LD-Analysen im Chromosom 22q-Bereich. Die detaillierte Allelfrequenz verhilft zu einer schnelleren Beurteilung und Findung relevanter, krankheitsassoziierter Polymorphismen. Die im CERK1 gefundenen Polymorphismen werden nacheinander analytisch dargestellt.

Der Polymorphismus rs36211081 [<http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP>], der bei der gesunden Kontrollperson vorkommt, bewirkt einen Aminosäureaustausch. Das Vorkommen der Variation V338G wurde mittels RFLP-Analyse in einem Kollektiv aus 115 Patienten mit periodischer Katatonie und 110 Kontrollen geprüft. Es zeigte sich, dass es ein seltener Polymorphismus mit einer Heterozygotenfrequenz von 2,2% unter den schizophrenen Patienten und 0,9% unter den gesunden Personen vertreten ist, der nicht mit periodischer Katatonie assoziiert ist ( $p = 0.87$ ). Derzeit ist noch nicht bekannt, ob und welche funktionellen Auswirkungen diese Variation hat. Ihre Lokalisation im Protein ist nicht eine katalytische oder regulierende Funktion geknüpft.

Als stumme Mutationen wurden rs12166204, rs36211083 und rs35318967 identifiziert. Der Polymorphismus rs12166204 hat keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz [<http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP>]. Er wurde bei einem erkrankten Probanden (1045), jedoch nicht bei einem anderen Indexpatienten (933) der gleichen Familie (F20) gefunden, was eine Krankheitsassoziation unwahrscheinlich macht. Der SNP rs36211083 [<http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP>] im Exon 11 des CERK1 bedingt weder einen Aminosäureaustausch (D377) noch segregiert er beim anderen Kandidaten der gleichen Familie. Der SNP rs35318967 liegt am Ende der katalytischen Domäne C5 und bedingt keinen Aminosäureaustausch (D502). Er fand sich bei den Patienten in Familien F15 und F17 und zeigte eine Allelfrequenz und Genotypverteilung, die den publizierten Daten der Gendatenbank entspricht: Allelfrequenz G:0,923 und A:0,077, Genotyp: GG:0,846 und GA:0,154 [<http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP>], was ebenso seine Krankheitsassoziation wahrscheinlich macht.

Zudem konnten weitere Polymorphismen, die bisher nicht bekannt waren, die SNPs rs5767329, rs2748349, rs36211082 und rs36211405 intronischer Sequenz der Datenbank hinzugefügt werden [<http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP>]. Alle gefundenen Variationen sind nicht mit periodischer Katatonie assoziiert. Die Varianten erweitern aber die populationsgenetische Datenbasis in diesem Bereich, 10 SNPS sind bereits in der NCBI-Datenbank bekannt gewesen, sieben weitere konnten mit dieser Arbeit hinzugefügt werden.

Leider ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gelungen, die Promoterbereiche und das Exon 1 des CERK1-Gens erfolgreich zu amplifizieren. Verantwortlich ist offensichtlich der hohe GC-Gehalt von über 80% und die repetitiven Sequenzen in dieser Region. Durch Bildung von thermostabilen Verbindungen und Sekundärstrukturen könnte eine spezifische Amplifikation verhindert werden (Sonnhammer und Durbin 1995, Benson 1999). Somit könnte dieser Genabschnitt noch potentiell krankheitsassoziiert sein.

## 6. Zusammenfassung

Die periodische Katatonie ist ein reliabel diagnostizierbarer Subtyp der unsystematischen Schizophrenien nach K. Leonhard. Charakteristisch sind psychomotorische Störungen qualitativer Natur mit hyperkinetischen und akinetischen Schüben. Grimassieren, Parakinesen, Iterationen und Negativismus, begleitet von paranoid halluzinatorischen Symptomen treten auf und werden gefolgt von einem katatonen Residualsyndrom. Das Morbiditätsrisiko für Verwandte ersten Grades von 25% weist auf einen Hauptgendefekt hin. In durchgeführten genomweiten Linkagestudien und Haplotypanalysen ist ein Hauptlokus auf Chromosom 15 und ein möglicher zweiter Lokus auf Chromosom 22 entdeckt worden. Haplotypanalysen und parametrische Kopplungsstudien in mit periodischer Katatonie betroffenen Familien zeigen, dass ihrer Vererbung ein autosomal dominanter Erbgang mit verminderter Penetranz zugrunde liegen könnte. Die markergestützte Haplotypanalyse und meiotische Bruchpunkte in einer Mehrgenerationenfamilie mit periodischer Katatonie hat im Chromosom 22q13 eine Region mit einem maximalen LOD-score von 1,85 am Marker D22S1169 für diese Erkrankung kartiert, die ca. 40 Gene beinhaltet. Im telomeren Bereich von Chromosom 22q standen unter den Kandidatengen u.a. MLC1 und CERK1. Diese Gene sind systematisch auf ihren Zusammenhang mit dem Phänotyp der periodischen Katatonie untersucht worden.

Diese Arbeit untersucht einen komplexen 33bp Insertions/Deletionspolymorphismus im Exon 11 des MLC1 und zeigt eine Gleichverteilung dieser Variante in repräsentativen Kollektiven von an periodischer Katatonie erkrankten Probanden und gesunden Kontrollen. Der Polymorphismus wird nicht translatiert, übt aber Amplifikationseffekte aus. Es ist bereits bekannt, dass Mutationen im MLC1 für die megalenzephalische Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC), einer autosomal rezessiv vererbten Erkrankung im Kindesalter, verantwortlich sind.

CERK1-Gen das eine Ceramidkinase kodiert, besteht aus 537 Aminosäuren. Sie katalysiert den Ceramidmetabolismus und ist in Prozesse der Proteinkinase C Aktivierung, Second-Messenger und Apoptose involviert. In dieser Arbeit ist eine systematische Suche nach genetischen Variationen im CERK1 des Chromosoms 22q13 durchgeführt worden. Hierzu wurde das Gen bei Probanden mit periodischer Katatonie

aus koppelnden Familien und gesunden Kontrollpersonen sequenziert. Die Suche ergab 17 SNPs, die zum Teil noch nicht beschrieben waren und den Datenbanken zugeführt wurden, um für weitere Haplotypanalysen und das HapMap Projekt verwendet werden zu können. Es konnte eine seltene Aminosäurevariation V338G gefunden werden, die bei periodischer Katatonie nicht häufiger als bei gesunden Kontrollen vorkam. Die Heterozygotenfrequenz betrug 2,2% unter den schizophrenen Patienten und 0,9% unter den Kontrollpersonen. Genetische Variationen im CERK1, die als verantwortlich für den Phänotyp der periodischen Katatonie sein konnten, fanden sich in der durchgeführten Analyse nicht.

## 7. Summary

Schizophrenia is a severe disorder, characterized by delusional beliefs, hallucinations, disordered speech and deficits in emotional and social behavior. Schizophrenia afflicts >1% of the population and is one of the most devastating and cost-intensive disorders in medicine.

Periodic catatonia is a familiar subtype of schizophrenia defined by Leonhard. The hereditary impact of the disease is impressive and has been discussed as a valid phenotype. The clinical profile involves qualitative psychomotor disturbances in both hyperkinetic and akinetic episodes with grimacing, parakinesis, iterations, or akinetic negativism frequently accompanied by paranoid-hallucinatory symptoms, and changing into a catatonic residual syndrome. It segregates within families in an autosomal dominant mode of transmission with a cumulative morbidity risk of 25% for first degree relatives. There is a major susceptibility locus mapped to chromosome 15 and a second suggestive locus mapped to chromosome 22 found in two independent linkage scans. The long arm of chromosome 22q locates deletion syndrome, which is associated with specific patterns of dysmorphic features and increased rates of psychosis in adults. Haplotype analysis recovered a region of 40 genes yielded a LOD score of 1,85 to the marker D22S1169 at chromosome 22q13 for periodic catatonia. Two positional brain expressed candidate genes known as MLC1 and CERK1 in this region are screened for variants.

Mutations in MLC1/KIAA0027 cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC). It is a rare autosomal recessively inherited subtype of the childhood-onset spongiform leukodystrophies with ataxia, spasticity and cognitive impairment, caused by loss of function mutations in MLC1 gene. An analysis of a complicated 33bp insertion/deletion polymorphism at the end of 3' end of exon 11 of MLC1 found equal frequency among schizophrenic patients and controls. Cumulative effects of high GC content and the 33bp-insertion/deletion-polymorphism may be the cause of preferential amplification of specific alleles of exon 11. Forward compelling arguments brought that genetic variants of MLC1 are not associated with schizophrenia. The region of 22q13 harbours the second candidate gene, CERK1, encoding the human ceramide kinase. Human ceramide kinase consists of 537 amino acids. The enzyme

catalyses specifically the phosphorylation of ceramide whereby it is involved in protein kinase C activation as second messenger and apoptosis. The mutation scan for variants revealed 17 single nucleotide polymorphisms. Among them one rare codon variant V338G was found neither segregating with the disease in the respective pedigree nor found at a significant frequency in a case-control association sample. This study excluded genetic variations in the coding and putative promoter regions of CERK as causative factors for periodic catatonia and provides a systematic SNP generation for forthcoming studies.

## 8. Appendix

### 8.1. Geräte

Automatische Eismaschine	Scotsman
Biophotometer	Eppendorf
Camera E.A.S.Y. 429 K	Herolab
Destillieranlage	Millipore
Gelkammern comfor mini, medium (Agarose)	Biozym
Gelkammern multigel long (PAA)	Biometra
Gelkammern Sub-Cell R GT	Bio-Rad
Geltrockner Typ D62	Biometra
Geltrocknerpumpe	KNF Neuberger
Hochspannungsgerät, Standart Power Pack	Biometra
Kamera Gelcam	Polaroid
Magnetrührgerät mit Heizplatte M32	GLW
PCR Maschine, UNO-Thermoblock	Biometra
PCR Maschinen, MJ Research PTC-225 Peltier Thermal Cycler	Biozym
pH Elektrode Sen Tix 21 Hartenstein	WTW
Pipettensauger Easypet	Eppendorf
Pipettensauger Transferpette®	Brand
Sequenzierer 3100 Genetic Analyzer	Hitachi
Spectrophotometer Ultrospec 3100 pro	AP-Biotech
Transilluminator UVT-40 M	Herolab
Transilluminator Fluo_Link	MWG-Biotech
Trockner	Heraeus
Tutthauer 3850 ELV Autoklav	Systec
Waage SAS 62	Scaltec
Waage basic lite	Sartorius
Waagen HL 52 TOLEDO und PM 300	Metter
Wasserbad	GFL

Zentrifuge Mikro 20	Hettich
Zentrifugen Rotanta 46 und 96 RS	Hettich
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf
Zentrifuge 3430 laboratory centrifuges	Sigma
Inkubator	Heraeus
Elektronische Mehrkanalpipette, PreCision®	Biozym
0,5-10 µl, 20-200µl Transferpipette R-8	Brand
10, 20, 100, 1000 µl Pipetten, single-channel Pipetor Lambda™	Corning
10, 20, 200, 1000 µl Pipetman Pipetten	Gilson

## 8.2. Material

0,2 ml Softstrips, PCR-Gefäße	Biozym
0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml Safeclip-Gefäße	Eppendorf
10, 200, 1000 µl Pipettenspitzen	Greiner
10, 50, 100, 250, 1000, 2000 ml Messzylinder	Superior
3 ml Pasteurpipetten	Hartenstein
5, 10, 25 ml Serological Pipetten	Sarstedt
50 ml 114x28 PP Röhren	Sarstedt
50, 100, 250, 1000 ml Erlenmeyerkolben	Schott
50, 100, 250, 1000, 2000, 5000 ml Messbecher	Schott
96-Multiplate™, PCR-Platten und Klebefilme	Biozym
Blotting Papier	Hartenstein
Collection Tubes 2 ml	Qiagen
Diamond Pipettenspitzen D200, D1000 Tower Pack™	Gilson
Filme, Polapan 667 professional B&W instant pack film	Polaroid
Gelkämme	s. Gelkammern
Gelträger	s. Gelkammern
Küvette, UVette centre hight 8,5 mm	Eppendorf
Latex Handschuhe, safe skin satin plus	Kimberly-Clark
Magnetrührer	Hartenstein

Messbecher	Ilabor TH
Messzylinder	Brand
Nunc Cryp Tube™ Vials	Nunc
Pasteurpipetten aus Glas ca. 150 mm	Brand
S-Moanovetten ® La/A/L' 9ml KE, 1,6mg EDTA/ml Blut	Sarstedt

### 8.3. Primer

Die Nomenklatur der Primer, die hier in Originalform gelistet ist, entstand 2001, als FLJ23239 als separates Gen kartiert war und heute 3'UTR des CERK1 einnimmt. Die Basenreihenfolge im Klon der NCBI-Gendatenbank entspricht dem Komplementärstrang codierender Sequenz. Die Primer tragen ihre forward und reverse Richtungsangaben nach dem Vorkommen ihrer Sequenz im Klon, daher wurden mit den reverse Primern (z. B. KIAA1646 Exon 2 R) die codierenden Basen in 5'→3' Richtung amplifiziert und sequenziert. Die Nummerierung der Exonbereiche hat sich als ein zusätzliches Exon am Anfang von CERK entdeckt wurde verschoben, so dass mit dem Primerpaar KIAA1646 Exon 1 der Bereich um das zweite Exon des CERK1 abgedeckt wurde usw.

**Primerliste:**

FLJ 23239 Exon 1 forward 5' – TGT GTT AAG CAC TTC GCG TC – 3'  
FLJ 23239 Exon 1 reverse 5' – GTG TAG TTT AGA AAA TGG CCC G – 3'  
FLJ 23239 Exon 2 forward 5' – TTA CAG ATC AAA GTT TAA GCC GC – 3'  
FLJ 23239 Exon 2 reverse 5' – CTG GAA GCT GGC AGT GTG TA – 3'  
KIAA0027 Gurling forward 5' – CAC AGG CTT CTC ACC TCC CT – 3'  
KIAA0027 Gurling reverse 5' – GGA GCG ACT TGA CCA CTA GC – 3'  
KIAA1646 Exon 1 forward 5' – AGA ATG TGG GAG AAG ACA TTT AGG – 3'  
KIAA1646 Exon 1 reverse 5' – CAC ACC CAG CCT GAA TTT CT – 3'  
KIAA1646 Exon 2 forward 5' – GAT CAC CCA ATC AGG CAT G – 3'  
KIAA1646 Exon 2 reverse 5' – TTT GGT GCA TAT TCA CTT GAG G – 3'  
KIAA1646 Exon 3 forward 5' – AGT GAG ACA CCG TCT AGA AAA AGC – 3'  
KIAA1646 Exon 3 reverse 5' – TTC GTT TTG ATT TTG TTA TTT TCG – 3'  
KIAA1646 Exon 4 forward 5' – GGC GGA TTT AGG AAA AGG AG – 3'  
KIAA1646 Exon 4 reverse 5' – TGA TTT GC TTT TAC GTG AGG – 3'  
KIAA1646 Exon 5 forward 5' –CGG GAA CGA AGA GAA CAG AG – 3'  
KIAA1646 Exon 5 reverse 5' – TCC TGA AGC TGG AAG CCT C – 3'  
KIAA1646 Exon 6 forward 5' – CAG AGT GGG ACA GGC CTG – 3'  
KIAA1646 Exon 6 reverse 5' – AGG GCC ATG GAA GGA AAG – 3'  
KIAA1646 Exon 7 forward 5' – GTA ACA TCT GTG AAG GCA GTC G – 3'  
KIAA1646 Exon 7 reverse 5' – GAA GGG GAT GGA GTG GAT G – 3'  
KIAA1646 Exon 8 forward 5' – TCA CCT TCC TAA CCG TCC TG – 3'  
KIAA1646 Exon 8 reverse 5' – CAG CAC AGC ATC CTA ACC AA – 3'  
KIAA1646 Exon 9 forward 5' – GAA ATG GAT GCC TGG TGC – 3'  
KIAA1646 Exon 9 reverse 5' – CAT ACG CAC TGC ACC TGC – 3'  
KIAA1646 Exon 10 forward 5' – GCT GGA ACA TAA ATT ACT CGC C – 3'  
KIAA1646 Exon 10 reverse 5' – GCG CCA TTG TAA CTG TGA CA – 3'  
KIAA1646 Exon 11 forward 5' – CTC AGG GCT CAA GGG GAT – 3'  
KIAA1646 Exon 11 reverse 5' – GAG CTG AAT GGT CCC TCT CA – 3'  
KIAA1646 Exon 12 forward 5' – TGA CCT GCG TGG AAA TCA TA – 3'  
KIAA1646 Exon 12 reverse 5' – CCT GTC CAG GAG TGG GG – 3'

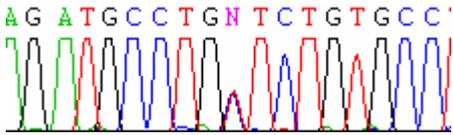
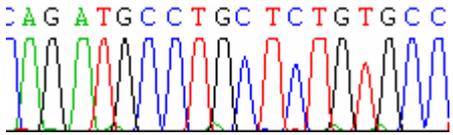
#### 8.4. Enzyme, Lösungen, Puffer, PCR-Reagenzien

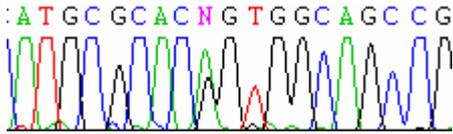
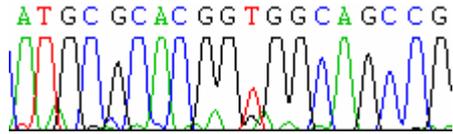
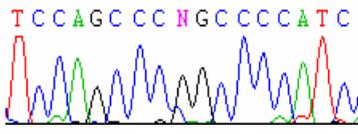
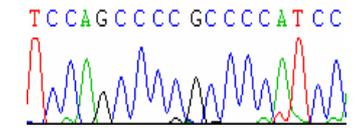
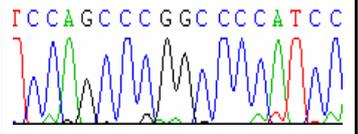
6 x Orange Loading Dye Solution 0,2% orange G, 0,05% xylene cyanol FF, 60% glycerol, 60mM EDTA	MBI-Fermentas
Big-Dye-Terminator-Mix	ABI
BPB-Stoppuffer 10ml 5x TBE, 20ml Ficoll 20%, 5ml Bromphenol, 15ml ddH <sub>2</sub> O	Sigma
Bovine Serum Albumine, BSA 100 x (10mg/ml)	New England Biolabs
DNA-Leiter, Peqgold 100bp 0,5ng DNA/ml mit 6 x Puffer	Peqlab
DNA-Leiter, Clone Ruler™ 100bp mit 6 x Loadingpuffer	MBI-Fermentas
dNTP-Lösung, je 2mM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP	MBI-Fermentas
dNTP-Lösung, je 1,25mM von dATP, dCTP, dGTP und dTTP	Peqlab
<i>Dra III</i> -Enzym ( <i>Deinococcus radiophilus</i> ) 20.000 U/ml 5'-C A C N N N ▼ G T G-3' 3'-G T G ▲ N N N C A C-5'	New England Biolabs
Kernlysispuffer 10mM TrisHCl pH 8,0, 400mM NaCl, 2mM Na <sub>2</sub> EDTA ad. 1000ml doppelt destilliertes Wasser	Merck, Sigma
Lysispuffer 155mM NH <sub>4</sub> Cl, 10mM KHCO <sub>3</sub> , 0,1mM EDTA ad. 1000ml doppelt destilliertes Wasser ad. 15% HCl, pH 7,4	Merck, Applichem

Magnesiumchloridlösung 25mM für PCR	MBI Fermentas
NEB 3-Puffer 10 x 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1mM Dithiothreitol, pH 7,9	New England Biolabs
PCR Puffer mit 10mM MgCl <sub>2</sub> 0,5mM KCl, 0,1mM Tris-HCl ( pH 8,3 ), 0,1mM MgCl <sub>2</sub> , 100µl 1% Gelatine ad.1000µl Wasser inject.	Merck, Sigma Fluka
PCR Puffer mit 15mM MgCl <sub>2</sub> 0,5mM KCl, 0,1mM Tris-HCl ( pH 8,3 ), 0,15mM MgCl <sub>2</sub> , 100µl 1% Gelatine ad.100µl Wasser inject.	Merck, Sigma Fluka
PCR Puffer 10 x ohne MgCl <sub>2</sub> 100mM Tris-HCl (pH 8,8 bei 25°C), 500mM KCl, 0,8% Nonidet P 40	MBI Fermentas
PCR Puffer Y 200mM Tris-HCl, ( pH 8,55 ), 160mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 20mM MgCl <sub>2</sub>	Peqlab
PAA-Gellösung 10% 98g Acrylamid, 2g Bisacrylamid ad. 1000ml 0,5 x TBE-Pufferlösung und 1000µl TEMED	Roth, Sigma
PB-Puffer	Qiagen
PE-Puffer	Qiagen
Primer	Metabion

Pronase E aus Streptomyces griseus	Serva
QG-Puffer	Qiagen
Taq-DNA-Polymerase SAWADY 5U/ $\mu$ l	Peqlab
Taq(Thermus aquaticus)-DNA-Polymerase 5U/ $\mu$ l	MBI Fermentas
TBE Pufferlösung 5x 210g Tris, 110g Borsäure, 80ml EDTA 0,5M pH 8.0 ad. 4000ml ddH <sub>2</sub> O	Applichem
TE Puffer 10mM TrisHCl pH 8,0, 0,1mM EDTA ad.200ml doppelt destilliertes Wasser, pH 8,0	Applichem, Merck
Verdünnungspuffer für Taq-Polymerase 20mM Tris-HCl ( pH 8,0 ), 100mM KCl, 0,2mM EDTA, 1,0 mM DTT, 55% - Glycerin und Satbilisatoren	Peqlab
Verdünnungspuffer für Taq-Polymerase 20mM Tris-HCl ( pH 8,0 ), 1mM DTT, 0,1mM EDTA 100mM KCl, 0,5% Nonidet P 40, 0,5% Tween 20, 50% Glycerol	MBI Fermentas

## 8.5. Übersichtstabelle Polymorphismen im CERK1

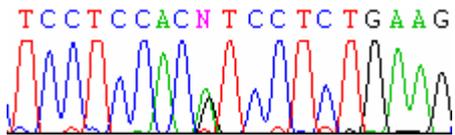
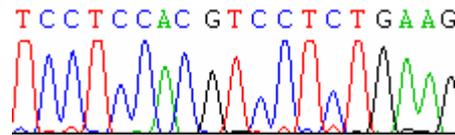
<b>Polymorphismen im CERK1 Exon 2</b>	
<b>Primer:</b> KIAA1646 Exon R*	<b>Aminosäure:</b> C50
<b>SNPs Base / Name / Position Klon** :</b> G2090A / <b>rs12166204</b> / Nt45437424 CTA-29F11	<b>Sequenz (bp) / Exon (bp) / Anzahl AS****:</b> 272 / 78 / 30
<b>Genotyp:</b> CC: 0,8, CT: 0,2 <b>Allelfrequenz:</b> C 0,9 und T: 0,1	
<b>Sequenzen*** :</b> Abb. 19: Proband 1045 R* G2090A WT/MT, Abb. 20: Kontrolle R* WT	
 <p>Abb. 19</p>	 <p>Abb. 20</p>

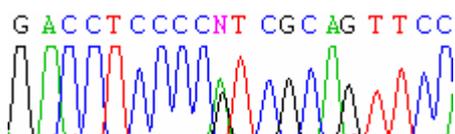
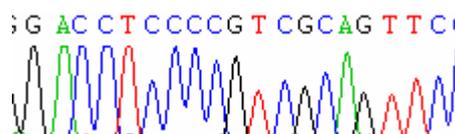
<b>Polymorphismen im CERK1 Intron 7</b>		
<b>Primer:</b> KIAA1646 Exon 6 F* und R* KIAA1646 Exon 7 F* und R*	<b>Aminosäure :</b> Ø	
<b>SNPs Base / Name / Position Klon ** :</b> C53476T / <b>rs16995595</b> / Nt45418024 59H18 C51380G / <b>rs12166204</b> / Nt45415928 59H18	<b>Sequenz (bp) / Exon (bp) / Anzahl AS****:</b> 249 / 78 / 26 und 288 / 156 / 52	
<b>Genotyp C53476T :</b> /**: GG: 0,8, GA: 0,2 / GG: 0,887, GA: 0,085, TT:0,028 <b>Allelfrequenz C53476T :</b> /**: G:0,9, A: 0,1 / G: 0,930, A: 0,070 <b>Genotyp C51380G :</b> GG: 0,2, GC: 0,6, CC: 0,2 <b>Allelfrequenz C51380G:</b> G:0,5, C: 0,5		
<b>Sequenzen*** :</b> Abb. 21: Proband 933 R* C53476T WT/MT, Abb. 22: Kontrolle R* WT Abb. 23: Proband 933 F C51380G WT/MT, Abb. 24: Proband 857 F WT Abb. 25: Proband 1045 F C51380G MT		
 <p>Abb. 21</p>	 <p>Abb. 22</p>	
 <p>Abb. 23</p>	 <p>Abb. 24</p>	 <p>Abb. 25</p>

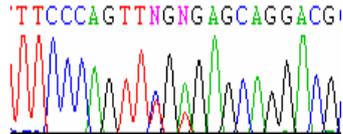
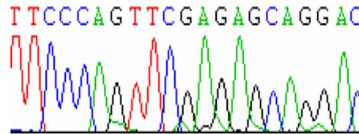
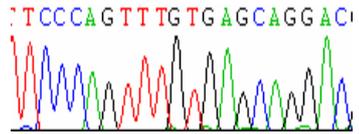
<b>Polymorphismen im CERK1 Intron 8</b>	
<b>Primer:</b> KIAA1646 Exon 7 F* und R* KIAA1646 Exon 8 F* und R*	<b>Aminosäure :</b> Ø
<b>SNPs Base / Name / Position Klon** :</b> C51143G / <b>rs5767329</b> / Nt45415691 59H18 G47202A / <b>rs9616098</b> / Nt45411750 59H18	<b>Sequenz (bp) / Exon (bp) / Anzahl AS****:</b> 288 / 156 / 52 und 242 / 108 / 36
<b>Genotyp C51143G :</b> GC: 0,4, GG: 0,6 <b>Allelfrequenz C51143G:</b> G:0,8, C: 0,2 <b>Genotyp G47202A :</b> GG: 0,8, GA: 0,2 <b>Allelfrequenz G47202A:</b> G:0,9, A: 0,1	
<b>Sequenzen*** :</b> Abb. 26: Proband 727 R* C51143G WT/MT, Abb. 27: Kontrolle R* WT Abb. 28: Kontrolle F G47202A WT/MT, Abb. 29: Proband 857 F WT	
<p>CCGC TGG T C NTGCCCCG AC T</p> <p>Abb. 26</p>	<p>CCGC TGG T C GTGCCCCG AC T</p> <p>Abb. 27</p>
<p>AG TGCAG T N AAG A A A A A A</p> <p>Abb. 28</p>	<p>AG TGCAG T G AAG A A A A A A</p> <p>Abb. 29</p>

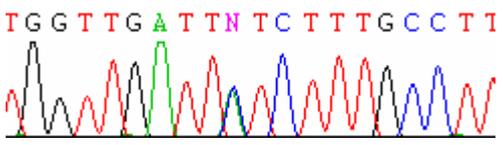
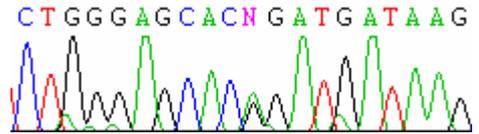
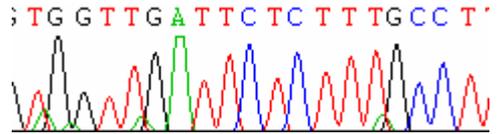
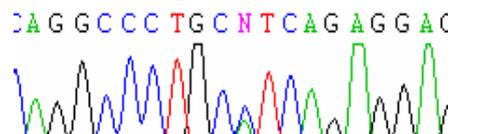
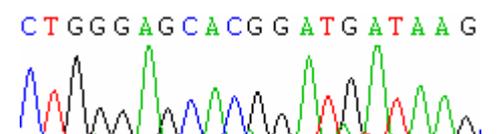
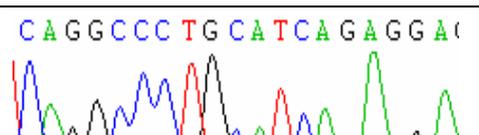
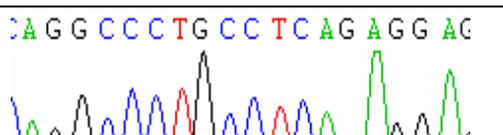
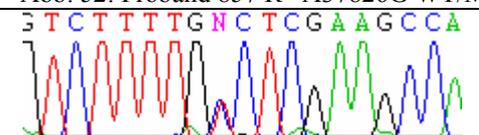
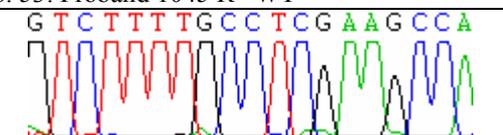
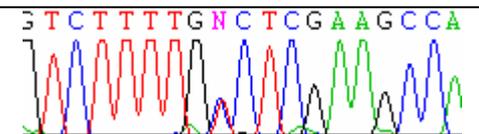
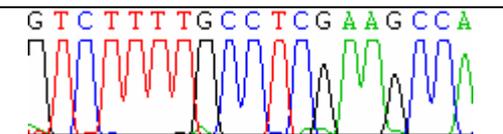
<b>Polymorphismen im CERK1 Exon 9</b>	
<b>Primer:</b> KIAA1646 Exon 8 F *	<b>Aminosäure:</b> V338G
<b>SNPs Base / Name / Position Klon** :</b> A47114C / Ø / Nt45411662 59H18	<b>Sequenz (bp) / Exon (bp) / Anzahl AS****:</b> 242 / 108 / 36
<b>Genotyp :</b> AA: 0,8, AG: 0,2 <b>Allelfrequenz:</b> A 0,9 und G: 0,1	
<b>Sequenzen*** :</b> Abb. 30: Kontrolle F* A47114C WT/MT, Abb. 31: Proband 857 F* WT	
<p>CG AG ATCCCN CCG TG TG T T</p> <p>Abb. 30</p>	<p>CG AG ATCCCA CCG TG TG T T</p> <p>Abb. 31</p>

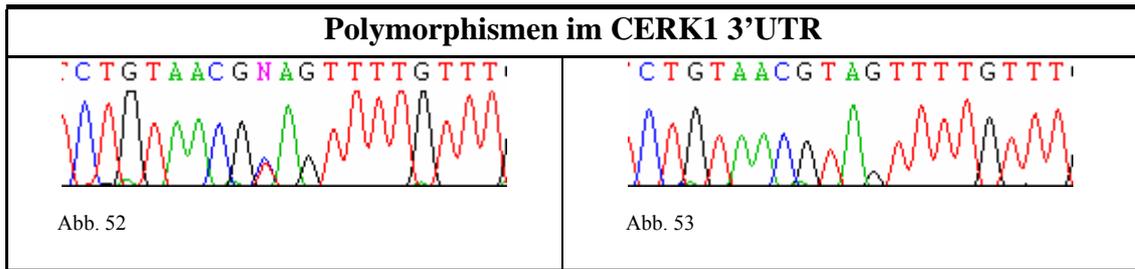
<b>Polymorphismen im CERK1 Intron 10</b>	
<b>Primer:</b> KIAA1646 Exon 9 F *	<b>Aminosäure :</b> Ø
<b>SNPs Base / Name / Position Klon** :</b> G45245A / Ø / Nt45409793 59H18	<b>Sequenz (bp) / Exon (bp) / Anzahl AS****:</b> 273 / 78 / 26
<b>Genotyp :</b> GG: 0,6, AG: 0,4 <b>Allelfrequenz:</b> A 0,2 und G: 0,8	
<b>Sequenzen*** :</b> Abb. 32: Proband 727 F* G45245A WT/MT, Abb. 33: Kontrolle F* WT	
<p>AG A A A C C C N C A C T C C A G C A</p> <p>Abb. 32</p>	<p>G A A A C C C G C A C T C C A G C A C</p> <p>Abb. 33</p>

<b>Polymorphismen im CERK1 Exon 11</b>	
<b>Primer:</b> KIAA1646 Exon 10 F *und R *	<b>Aminosäure : D377</b>
<b>SNPs Base / Name / Position Klon ** :</b> G43641A / Ø / Nt45408189 59H18	<b>Sequenz (bp) / Exon (bp) / Anzahl AS****:</b> 305 / 207 / 69
<b>Genotyp :</b> GG: 0,6, AG: 0,4 / Ø <b>Allelfrequenz:</b> A 0,2 und G: 0,8	
<b>Sequenzen*** :</b> Abb. 34: Kontrolle F* G43641A WT/MT, Abb. 35: Proband 1045 F* WT	
 <p>Abb. 34</p>	 <p>Abb. 35</p>

<b>Polymorphismen im CERK1 Exon 12</b>	
<b>Primer:</b> KIAA1646 Exon 11 F *	<b>Aminosäure : D502</b>
<b>SNPs Base / Name / Position Klon ** :</b> G41895A / Ø / Nt45406443 59H18	<b>Sequenz (bp) / Exon (bp) / Anzahl AS****:</b> 293 / 210 / 70
<b>Genotyp :</b> GG: 0,6, AG: 0,4 <b>Allelfrequenz:</b> A 0,2 und G: 0,8	
<b>Sequenzen*** :</b> Abb. 36: Proband 727 F* G43641A WT/MT, Abb. 37: Kontrolle F* WT	
 <p>Abb. 36</p>	 <p>Abb. 37</p>

<b>Polymorphismen im CERK1 3'UTRegion</b>		
<b>Primer:</b> KIAA1646 Exon 12 neu F *	<b>Aminosäure: Ø</b>	
<b>SNPs Base / Name / Position Klon ** :</b> T38983A / Ø / Nt45403531 59H18 T38981C / rs2542014 / Nt45403529 59H18	<b>Sequenz (bp) / Exon (bp) / Anzahl AS****:</b> 506 / 72 / 24	
<b>Genotyp T38983A :</b> TT: 0,2, TA: 0,6, AA: 0,2 <b>Allelfrequenz T38983A :</b> T:0,5, A: 0,5 <b>Genotyp T38981C :</b> TT: 0,2, TC: 0,6, CC: 0,2 <b>Allelfrequenz T38981C:</b> T:0,5, C: 0,5		
<b>Sequenzen*** :</b> Abb. 38: Proband 727 F* T38983/T38981C WT/MT, Abb. 39: Kontrolle F* T38983/T38981C MT, Abb. 40: Proband 1045 F* WT		
 <p>Abb. 38</p>	 <p>Abb. 39</p>	 <p>Abb. 40</p>
<b>Primer:</b> FLJ23239 Exon 1 und 2 F *und R* <b>Sequenz:</b> 945 bp		
<b>SNPs Base / Name / Position Klon ** :</b> G38548T / rs8143065 / Nt45403096 59H18 C38316T / rs801719 / Nt45402864 59H18 C38130A / rs801720 / Nt45402678 59H18	<b>Genotyp G38548T :</b> GG: 0,6, GT: 0,4 <b>Allelfrequenz G38548T :</b> G:0,8, T: 0,2 <b>Genotyp C38316T :</b> CC: 0,4, CT: 0,6 <b>Allelfrequenz C38316T :</b> C:0,667, T: 0,333 / C: 0,625, T: 0,375 <b>Genotyp C38130A :</b> CC: 0,5, CA: 0,333, AA: 0,167 <b>Allelfrequenz C38130A :</b> C:0,667, A: 0,333 / C: 0,801, A:0,199	

<b>Polymorphismen im CERK1 3'UTRegion</b>	
<b>Sequenzen*** :</b>	
Abb. 41: Proband 727 R* G38548T WT/MT Abb. 42: Kontrolle R* C38316T WT/MT Abb. 43: Kontrolle R * WT Abb. 44: Proband 857 F* C38130A WT/MT Abb. 45: Proband 933 R* WT Abb. 46: Kontrolle1 F* C38130A MT, Abb. 47: Kontrolle2 F* WT	 <p>Abb. 41</p>
 <p>Abb. 42</p>	 <p>Abb. 43</p>
 <p>Abb. 44</p>	 <p>Abb. 45</p>
 <p>Abb. 46</p>	 <p>Abb. 47</p>
<b>Primer: FLJ23239 Exon 1 und 2 R* Sequenz: 945 bp</b>	
<b>SNPs Base / Name / Position Klon ** :</b> G37994A / <b>rs3747258</b> / Nt45402542 59H18 <b>C37954T</b> / Ø / Nt45402502 59H18 A37826G / <b>rs2748348</b> / Nt45402374 59H18	<b>Genotyp G37994A</b> : GG: 0,667, GA: 0,333 <b>Allelfrequenz G37994A</b> : /** G: 0,833, A: 0,167 / G: 0,958, A: 0,042 <b>Genotyp C37954T</b> : CC: 0,667, CT: 0,333 <b>Allelfrequenz C37954T</b> : C: 0,833, T: 0,167 <b>Genotyp A37826G</b> : AA: 0,5, AG: 0,5 <b>Allelfrequenz A37826G</b> /**: A: 0,75, G: 0,25 / A: 0,575, G: 0,425
<b>Sequenzen*** :</b>	
Abb. 48: Proband 727 R* G37994A WT/MT, Abb. 49: Kontrolle R* WT Abb. 50: Proband 727 R* C37954T WT/MT, Abb. 51: Kontrolle R* WT Abb. 52: Proband 857 R* A37826G WT/MT, Abb. 53: Proband 1045 R* WT	
 <p>Abb. 48</p>	 <p>Abb. 49</p>
 <p>Abb. 50</p>	 <p>Abb. 51</p>



- \* F=forward Primer, R=reverse Primer
- \*\* <http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP>
- \*\*\* Indexnummern und Kontrollpersonen, WT=Wildtyp, MT=Mutante
- \*\*\*\* AS=Aminosäuren

## 8.6. Chemikalien

Acrylamid C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> NO	Roth
Agarose Seakem® LE	BMA
Ammoniumchlorid NH <sub>4</sub> Cl	Merck
Ammoniumperoxidsulfat, APS (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Roth
Bisacrylamid C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Roth
Borsäure BH <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	Applichem
Bromphenolblau C <sub>19</sub> H <sub>9</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> SNa	Sigma
Disnatrium EDTA-Salz Na <sub>2</sub> EDTA C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	Sigma
Essigsäure C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Roth
Ethanol C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Merck
Ethidiumbromid C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub>	Roth
Ethylendiaminetetracetat EDTA	Applichem
Ficoll	Sigma
Formaldehydlösung 37% mit 10% Ethanol	Merck
Gelatine Typ B (from bovine skin)	Sigma
Glycerol C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Sigma
HPLC-Wasser, H <sub>2</sub> O	Merck
Isopropylalkohol 2-Propanol C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> OH	Merck
Kaliumchlorid KCl	Merck
Kaliumhydrogencarbonat KHCO <sub>3</sub>	Merck

Magnesiumchlorid MgCl <sub>2</sub>	Fluka
Natriumcarbonat Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck
Natriumchlorid NaCl	Merck
Natrium-Dodecylsulfat SDS C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> NaO <sub>4</sub> S	Applichem
NNN',N-Tetramethylethylendiamin TEMED C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	Sigma
Salpetersäure 65% HNO <sub>3</sub>	Merck
Salzsäure HCl	Merck
Silbernitrat AgNO <sub>3</sub>	Applichem
Tris C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Applichem
Tris-HCl C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> *HCl	Merck

## 8.7. Software

Bio Edit 5.0.1.	Uni North Carolina
Chromas 1.62	Technelysium
EasyWin 32	Herolab
Primer.exe	Whitehead Institute for Biomedical Research
Staden Package 2000	Staden

## 9. Abkürzungen

Alle chemischen Elemente werden entsprechend dem internationalen Periodensystem der Elemente nach Mendelejew abgekürzt [<http://www.periodensystem.info>], alle Maßeinheiten werden nach SI (The International System of Units) abgekürzt [[http://www.bipm.fr/en/si/base\\_units](http://www.bipm.fr/en/si/base_units)] und hier nicht separat aufgeführt.

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BDT	Big-Dye-Terminator-Mix
BPB	Bromphenolblau

CERK	Ceramidkinase-Gen
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DHPLC	denaturing high-performance liquid chromatography
DKG	Diacylglycerolkinase
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DNA	deoxyribonucleic acid (m- messenger)
DSM	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetracetat
F	forward
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
ICD	International Classification of Diseases
LOD	Logarithm of the odds
Nt	Nukleotidposition
MLC	Megalenzephalische Leukenzenzephalopathie mit subkortikalen Zysten
MRT	Magnetresonanztomographie
MT	Mutante
P	Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung im Signifikanztest
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Polyethylen
Polym.	Polymorphismus
PP	Polypropylen
R	reverse

RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	ribonucleic acid (m- messenger)
rpm	rotation pro minute
s.	siehe
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SNP	Single nucleotide polymorphism
Syn.	Synonym
TAE	Tris-HCl-Eisessig-EDTA-Puffer
TBE	Tris-HCl-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
TEMED	N-Tetramethylethylendiamin
UTR	Untranslatierte Region
VCFS	Velokardiofaciales Syndrom
WT	Wildtyp
Zlr-Score	maximum likelihood ratio Z score

### 9.1. Internationale Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

## 10. Literaturverzeichnis

Ambrosini E., Serafini B., Lanciotti A., Tosini F., Scialipi F., Psaila R., Raggi C., Di Girolamo F., Petrucci T. C., Aloisi F. (2008) Biochemical characterization of MLC1 protein in astrocytes and its association with the dystrophin-glycoprotein complex. *Molecular and cellular neurosciences* 37:480-493

Augustine G. J., Charlton M. P., Smith S. J. (1987) Calcium action in synaptic transmitter release. *Annual Review of Neuroscience* 10:633-693

Avise J. C. (1994) *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, New York

Badner J. A., Gershon E. S. (2002) Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular Psychiatry* 7:405–411

Bajjalieh S. M., Martin T. F. J., Floor E. (1989) Synaptic vesicle ceramide kinase. A calcium-stimulated lipid kinase that co-purifies with brain synaptic vesicles. *The Journal of Biological Chemistry* 264:14354-14360

Bassett A. S., Chow E. W. (1999) 22q11 deletion syndrome: a genetic subtype of schizophrenia. *Biological Psychiatry* 46:882-891

Bateman A., Coin L., Durbin R., Finn R. D., Hollich V., Griffiths-Jones S., Khanna A., Marshall M., Moxon S., Sonnhammer E. L. L., Studholme D. J., Yeats C., Eddy S. R. (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* 32:138-141.

Beckmann H., Henn F., Sartorius N., Helmchen H., Lauter H. (2001) Neuropathology of the endogenous psychosis. *Contemporary psychiatry vol. 3. Specific psychiatric disorders*, Springer Berlin 3:81-100

Beckmann H., Franzek E., Stöber G. (1996) Genetic heterogeneity in catatonic schizophrenia: a family study. *American Journal of Medical Genetics* 67:289-300

Benson G. (1999) Tandem repeats finder: a program to analyse DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 27:573-580

Ben-Zeev B., Gross V., Kushnir T., Shalev R., Hoffman C., Shinar Y., Pras E., Brand N. (2001) Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy in 12 Israeli patients. *Journal of child neurology* 16:93-9

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

Bogerts B. (1993) Recent advances in the neuropathology of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 19:431-445

Bornancin F., Mechtcheriakova D., Stora S., Graf C., Wlachos A., Devay P., Urtz N., Baumruker T., Billich A. (2005) Characterization of ceramide kinase-like protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 1687:31-43

Boor I. P. K., de Groot K., Mejaski-Bosnjak V., Brenner C., van der Knaap M. S., Scheper G. C., Pronk J. C. (2006) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: an update and extended mutation analysis of MLC1. *Human Mutation* 27:505-12

Boor I. P. K., de Groot K., Waisfisz Q., Kamphorst W., Oudejans C. B., Powers J. M., Pronk J. C., Scheper G. C., van der Knaap M. S. (2005) MLC1: a novel protein in distal astroglia processes. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 64:412-9

Boor I., Nagtegaal M., Kamphorst W., van der Valk P., Pronk J. C., van Horsen J., Dinopoulos A., Bove K. E., Pascual-Castroviejo I., Muntoni F., Estévez R., Scheper G., van der Knaap M. S. (2007) MLC1 is associated with the Dystrophin-Glycoprotein Complex at astrocytic endfeet. *Acta Neuropathologica* 114:403-410

Buccoliero R., Futerman A. H. (2003) The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function. *Pharmacological Research* 47:409-419

Carré A., Graf C., Stora S., Mechtcheriakova D., Csonga R., Urtz N., Billich A., Baumruker T., Bornancin F. (2004) Ceramide kinase targeting and activity determined by its N-terminal pleckstrin homology domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 324:1215-9

Cavalli-Sforza L. L., Cavalli-Sforza F. (1995) *The great human diasporas: The history of diversity and evolution.* Addison-Wesley, New York

Chakravarti A. (1999) Population genetics-making sense out of sequence. *Nature Genetics* 21:56-60

Chalfant C. E., Rathman K., Pinkerman R. L., Wood R. E., Obeid L. M., Ogretmen B., Hannun Y. A. (2002) De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1 *The Journal of Biological Chemistry* 277:12587-12595

Coon H., Holik J., Hoff M., Reimherr F., Wender P., Myles-Worsley M., Waldo M., Freedman R., Byerley W. (1994) Analysis of chromosome 22 markers in nine schizophrenia pedigrees. *American Journal of Medical Genetics* 54:72-9

Dianzani I., Camaschella C., Ponzzone A., Cotton R. G. (1993) Dilemmas and progress in mutation detection. *Trends in Genetics* 9:403-405

Dowling T. E., Moritz C., Palmer J. D., Rieseberg L. (1990) *Nucleic Acids II: Restriction Site Analysis.* *Molecular Systematics* 250-317

Duarri A., Teijido O., López-Hernández T., Scheper G. C., Barriere H., Boor I., Aguado F., Zorzano A., Palacín M., Martínez A., Lukacs G. L., van der Knaap M. S., Nunes V., Estévez R. (2008) Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in MLC1 cause folding defects. *Human Molecular Genetics* 17:3728-3739

Durell S. R., Hao Y., Guy H. R. (1998) Structural models of the transmembrane region of voltage-gated and other K<sup>+</sup> channels in open, closed and inactivated conformations. *Journal of Structural Biology* 121:263-284

Franzek E., Beckmann H. (1993) Schizophrenie und Geburtensaisonalität- gegensätzliche Befunde in Abhängigkeit vom genetischen Risiko. *Fortschritte der Neurologie Psychiatrie* 61:22-26

Franzek E., Beckmann H. (1998) *Psychosen des schizophrenen Spektrums bei Zwillingen*. Springer Wien, New York

Gibson T., Hyvönen M., Musacchio A., Saraste M., Birney E. (1994) PH domain: the first anniversary. *Trends in Biochemical Sciences* 19:349-353

Gieselmann V., Zlogotora J. Harris A., Wenger D. A., Morris C. P. (1999) Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy. *Human Mutation* 4:233-242

Gimenez-Ibanez S., Hann D. R., Ntoukakis V., Petutschnig E., Lipka V., Rathjen J. P. (2009) AvrPtoB Targets the LysM Receptor Kinase CERK1 to Promote Bacterial Virulence on Plants. *Current Biology*, 19(5): 423-429

Goldberg R., Motzkin B., Marion R., Scambler P. J., Shprintzen R. J. (1993) Velo-cardio-facial syndrome: a review of 120 patients. *American Journal of Medical Genetics* 45:313-319

Gomez-Munoz A., Duffy P. A., Martin A., O'Brien L., Byun H. S., Bittman R., Brindel D. N. (1995) Short-chain ceramide-1-phosphates are novel stimulators of DNA synthesis and cell division: antagonism by cell-permeable ceramides. *Molecular Pharmacology* 47:833-839

Gomez-Munoz A., Frago L. M., Alvarez L., Varela-Nieto I. (1997) Stimulation of DNA synthesis by natural ceramide 1-phosphate. *Biochemical Journal* 325:435-440

Gottesman I. I. (1991) *Schizophrenia genesis: the origins of madness*. W.H. Freeman

Gothelf D., Frisch A., Munitz H., Rockah R., Aviram A., Mozes T., Birger M., Weizman A., Frydman M. (1997) Velocardiofacial manifestations and microdeletions in schizophrenic inpatients. *American Journal of Medical Genetics* 72:455-61

Goutieres F., Bouloche J., Bourgeois M., Aicardi J. (1996) Leukoencephalopathy, megalencephaly, and mild clinical course. A recently individualized familial leukodystrophy. Report of five new cases. *Journal of child neurology* 11:439-44

Hannun Y.A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* 274: 1855-1859

Harlan E. J., Hajduk P. T., Yoon H. S., Fesik S. W. (1994) Pleckstrin homology domains bind to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Nature* 371:168-170

Harris H. (1966) Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* 164:298-310

Hinkovska-Galcheva V. T., Boxer L. A., Mansfield P. J., Harsh D., Blackwood A., Shayman J. A. (1998) The Formation of Ceramide-1-phosphate during Neutrophil Phagocytosis and Its Role in Liposome Fusion. *The Journal of Biological Chemistry* 273:33203-33209

Hinkovska-Galcheva V., Kjeldsen L., Masfield P. J., Boxer L. A., Shayman J. A., Suchard S. J. (1998) Activation of plasma membrane-associated neutral sphingomyelinase and concomitant ceramide accumulation during IgG-dependent phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 91:4761-4769

Ivanov D., Kirov G., Norton N., Williams H. J., Williams N. M., Nikolov I. et al. (2003) Chromosome 22q11 deletions, velo-cardio-facial syndrome and early-onset psychosis. Molecular genetic study. *The British Journal of Psychiatry* 183: 409-413

Karayorgou M., Morris M. A., Morrow B., Shprintzen R. J., Goldberg R., Borrow J., Gos A., Nestadt G., Wolyniec P. S., Lassetter V. K. et al. (1995) Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 92:7612-7616

Kavanaugh W. M., Turck C. W., Williams L. T. (1995) PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine. *Science* 268:1177-1179

Kendler K. S., Diehl S. R. (1993) The genetics of schizophrenia: a current, genetic-epidemiologic prospective. *Schizophrenia Bulletin* 19:261-285

King M. C., Wilson A. C. (1975) Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* 188:107-116

Klein B., Weirich G., Brauch H. (2001) DHPLC-based germline mutation screening in the analysis of the VHL tumor suppressor gene: usefulness and limitations. *Human Genetics* 108:376-384

Kleist K. (1908) Untersuchungen zur Kenntnis der psychomotorischen Bewegungsstörungen bei Geisteskranken. Klinkhardt, Leipzig

Kleist K. (1909) Weitere Untersuchungen an Gesisteskranken mit psychomotorischen Störungen. Klinkhardt, Leipzig

Kleist K., Leonhard K., Schwab H. (1939) Die Katatonie auf Grund katamnesticer Untersuchungen. III Teil. Formen und Verläufe der eigentlichen Katatonie. Zeitung der gesamten neurologischen Psychiatrie 168: 535-586

Knapp M. (1997) Costs of schizophrenia. The British Journal of Psychiatry 171:509-518

Knight D. E., Baker P. F. (1982) Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. The Journal of Membrane Biology 68:107-140

Kolesnick R., Hannun Y. A. (1999) Ceramide and apoptosis. Trends in Biochemical Sciences 24:224-225

Kraepelin E. (1899) Psychiatrie. 6. Auflage. Johann Ambrosius Barth, Leipzig

Krogh A., Larsson B., von Heijne G., Sonnhammer E. L. L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. Journal of Molecular Biology 305/3:567-580.

Lander E., Kruglyak L. (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. Nature Genetics 11:241-247

Lee J. Y., Hannun Y. A., Obeid L. M. (1996) Ceramide inactivates cellular protein kinase Calpha. The Journal of Biological Chemistry 271:13169-13174

Leegwater P. A. J., Yuan B. Q., van der Steen J., Mulders J., Konst A. A. M., Ilja Boor P. K., Mejaski-Bosnjak V., van der Maarel S. M., Frants R. R., Oudejans C. B. M., Schutgens R. B. H., Pronk J. C., van der Knapp M. S. (2001) Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *American Journal of Human Genetics* 68:831-838

Leegwater P. A. J., Boor P. K., Yuan B. Q., van der Steen J., Visser A., Konst A. A., Oudejans C. B., Schutgens R. B., Pronk J. C., van der Knaap M. S. (2002) Identification of novel mutations in MLC1 responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Human Genetics* 110:279-283

Lemmon M. A., Ferguson K. M., Schlessinger J. (1996) PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signalling molecules to the cell surface. *Cell* 85: 621–624

Leonhard K. (1997) *Klassifikation der endogenen Psychosen und Ihre differenzierte Ätiologie*. 7. Auflage Thieme, Stuttgart

Leonhard K. (1999) *Classification of endogeneous psychoses and their differentiated etiology*. 2<sup>nd</sup> revised and enlarged edition. Springer Wien, New York

Letunic I., Copley R. R., Pils B., Pinkert S., Schultz J., Bork P. (2006) SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Research* 34:257-260

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, Lonnqvist 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. (2003) Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *American Journal of Human Genetics* 73: 34-48

Li W. H., Sadler L. A. (1991) Low nucleotide diversity in man. *Genetics* 129:513-523

Lindsay E. A., Morris M. A., Gos A., Nestadt G., Wolyniec P. S., Lasseter V. K., Shprintzen R., Antonarakis S. E., Baldini A., Pulver A. E. (1995) Schizophrenia and chromosomal deletions within 22q11.2. *American Journal of Human Genetics* 56:1502-1503

Liu H., Heath S. C., Sobin C., Roos J. L., Galke B. L., Blundell M. L., Lenane M., Robertson B., Wijsman E. M., Rapoport J. L., Gogos J. A., Karayiorgou M. (2002) Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus presents an unusual pattern and increased susceptibility to schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:3717-3722

McDowell D. G., Burns N. A., Parkes H. C. (1998) Localised sequence regions possessing high melting temperatures prevent the amplification of DNA mimic in competitive PCR. *Nucleic Acids Research* 26:3340-3347

McKusick V. A. (1969) On lumpers and splitters, or the nosology of genetic disease. *Perspective in Biology and Medicine* 12:298-312

McQuillin A., Kalsi G., Moorey H., Lamb G., Mayet S., Quedsted D., Baker P., Curtis D., Gurling H. (2002) A novel polymorphism in exon 11 of the WKL1 gene shows no association with schizophrenia. *European Journal of Human Genetics* 10:491-494

Meyer J., Huberth A., Ortega G., Syagailo Y. V., Jatzke S., Mössner R., Strom T. M., Ulzheimer-Teuber I., Stöber G., Schmitt A., Lesch K. P. (2001) A missense mutation in a novel gene encoding a putative cation channel is associated with catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Molecular Psychiatry* 6:302-306

Miles L., deGrauw T. J., Dinopoulos A., Cecil K. M., van der Knaap M. S., Bove K. E. (2008) Megalencephalic Leukoencephalopathy with Subcortical Cysts (MLC): a third confirmed case with literature review. *Pediatric and Developmental Pathology*

Mimica N., Folnegovic-Smalc V., Folnegovic Z. (2001) Catatonic schizophrenia in Croatia.. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 251:17-20

Mitsutake S., Kim T.- J., Inagaki Y., Kato M., Yamashita T., Igarashi Y. (2004) Ceramide kinase is mediator of calcium-dependent degranulation in mast cells. *The Journal of Biological Chemistry* 279:17570-17577

Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichmura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H., Shibuya N. (2007) CERK1, aLysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signalling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:19613-8

Mowry B. J., Holmans P. A., Pulver A. E., Gejman P. V., Riley B., Williams N. M., Laurent C., Schwab S. G., Wildenauer D. B., Bauché S., Owen M. J., Wormley B., Sanders A. R., Nestad G., Liang K. Y., Duan J., Walsh D., Williams H., Jay M., Albus M., Nertney D. A., Papadimitriou G., O'Neill A., O'Donovan M. C., Deleuze J.-F., Lerer F. B., Dikeos D., Kendler K. S., Mallet J., Silverman J. M., Crowe R. R., Levinson D. F. (2004) Multicenter linkage study of schizophrenia loci on chromosome 22q. *Molecular Psychiatry*:1-12

Mullis K. B. (1993) The polymerase chain reaction. Nobel Lecture Chemistry, World Scientific Publishing Co., Singapore

Murphy K. C., Jones L. A., Owen M. J. (1999) High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. *Archives of General Psychiatry* 56:940-945

Nedelcheva Kristensen V., Kelefiotis D., Kristensen T., Borresen-Dale A.- L. (2001) High-throughput methods for detection of genetic variation. *Biotechniques* 30:318-332

Nei M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press

Nishino I., Spinazzola A., Hirano M. (1999) Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE (mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy), a human mitochondrial disorder. *Science* 283:689-92

Nomura N., Miyajima N., Sazuka T., Tanaka A., Kawaarabayasi Y., Sato S., Nagase T., Seki N., Ishikawa K. I., Tabata S. (1994) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Research* 1:27-35

Papadopoulou L. C., Sue C. M., Davidson M. M., Tanji K., Nishino I., Sadlock J. E., Krishna S., Walker W., Selby J., Glerum D. M., Coster R. V., Lyon G., Scalais E., Lebel R., Kaplan P., Shanske S., De Vivo D. C., Bonilla E., Hirano M., DiMauro S., Schon E. A. (1999) Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nature Genetics* 23:333-7

Pascual-Castroviejo I., van der Knaap M. S., Pronk J. C., Garcla-Segura J. M., Guitierrez-Molina M., Pascual-Pascual S. I. (2005) Vacuolotic megalencephalic leukoencephalopathy: 24 year follow-up of two siblings. *Neurologia, Barcelona* 20:33-40

Pettus B. J., Bielawska A., Spiegel S., Roddy P., Hannun Y. A., Chalfant C. E. (2003) Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release. *The Journal of Biological Chemistry* 278:38206-38213

Pettus B. J., Bielawska A., Subramanian P, Wijesinghe D. S., Maceyka M., Leslie C. C., Evans J. H., Freiberg J., Roddy P., Hannun Y. A., Chalfant C. E. (2004) Ceramide 1-phosphate is a direkt activator of cytosolic phospholipase A2. *The Journal of Biological Chemistry* 279:11320-11326

Prober J. M., Trainor G. L., Dam R. J., Hobbs F. W., Robertson C. W., Zagursky R. J., Cocuzza A. J., Jensen M. A., Baumeister K. (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating didesoxyribonucleotides. *Science* 238:336-341

Pulver A. E., Karayiorgou M., Wolyniec P. S., Lasseter V. K., Kasch L., Nestadt G., Antonarakis S., Housman D., Kazazian H. H., Meyers D. et al. (1994) Sequential strategy to identify a susceptibility gene for schizophrenia: report of potential linkage on chromosome 22q12-q13.1: Part 1. *American Journal of Medical Genetics* 54:36-43

Riley B. P., McGuffin P. (2000) Linkage and associated studies of schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics* 97:23-44

Risch N., Merikangas K. (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273:1516-1517

Rubie C., Lichtner P., Gärtner J., Siekiera M., Uziel G., Kohlmann B., Kohlschütter A., Meitinger T., Stöber G., Bettecken T. (2003) Sequence diversity of KIAA0027/MLC1: are megalencephalic leukoencephalopathy and schizophrenia allelic disorders? *Human Mutation* 21:45-52

Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 74:5463-5467

SantaLucia J. Jr. (1998) A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95:1460-1465

Sawai H., Okazaki T., Takeda Y., Tashima M., Sawada H., Okuma M., Kishi S., Umehara H., Domae N. (1997) Ceramide-induced translocation of protein kinase C-delta and -epsilon to the cytosol. *The Journal of Biological Chemistry* 272:2452-2458

Scharfetter C., Nüsperli M. (1980) The group of schizophrenias, schizoaffective psychoses, and affective disorders. *Schizophrenia Bulletin* 6:586-591

Schumm J. W., Knowlton R. G., Braman J. C., Barker D. F., Botstein D., Akots G., Brown V. A., Gravius T. C., Helms C., Hsiao K., et al. (1998) Identification of more than 500 RFLPs by screening random genomic clones. *American Journal of Human Genetics* 42:143-159

Senitz D. (2008) *Das menschliche Gehirn – Pathohistomorphologie*. Shaker, Hamburg

Shprintzen R. J. (2000) Velo-cardio-facial syndrome: A distinctive behavioral phenotype. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* 6:142-147

Sonnhammer E. L., Durbin R. (1995) A dot-matrix program with dynamic threshold control suited for genomic DNA and protein sequence analysis. *Genetics* 167:GC1-10

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

Stöber G., Franzek E., Beckmann H., Schmidtke A. (2002) Exposure to prenatal infections, genetics, and the risk of systematic and periodic catatonia. *Journal of Neural transmission* 109:921-9

Stöber G., Franzek E., Lesch K. P., Beckmann H. (1995) Periodic catatonia: a schizophrenic subtype with major gene effect and anticipation. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 245:135-141

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

Stöber G., Pfulmann B., Nürnberg G., Schmidtke A., Reis A., Franzek E., Wienker T.F. (2001) Towards the genetic basis of periodic catatonia: pedigree sample for genome scan I and II. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 1:25-30

Stöber G., Saar K., Rüschenhoff F., Meyer J., Nürnberg G., Jatzke S., Franzek E., Reis A., Lesch K. P., Wienker T. F., Beckmann H. (2000) Splitting schizophrenia: periodic catatonia-susceptibility locus on chromosome 15q15. *American Journal of Human Genetics* 67:1201-1207

Stöber G., Seelow D., Rüschenhoff F., Ekici A., Beckmann H., Reis A. (2002) Periodic catatonia: confirmation of linkage to chromosome 15 and further evidence for genetic heterogeneity. *Human Genetics* 111:323-330

Sugiura M., Kono K., Liu H., Shimizugawa T., Minekura H., Spiegel S., Kohama T. (2002) Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. *The Journal of Biological Chemistry* 277:23294-23300

Thomson G. (1994) Identifying complex disease genes: progress and paradigms. *Nature Genetics* 8(2):108-110

Topcu M., Saatci I., Topcuoglu M. A., Kose G., Kunak B. (1998) Megalencephaly and leukodystrophy with mild clinical course: a report on 12 new cases. *Brain Development* 20:142-153

Touhara K., Inglese J., Pitcher J. A., Shaw G., Lefkowitz R. J. (1994) Binding of G-protein  $\beta\gamma$  subunits to pleckstrin homology domains. *Journal of Biological Chemistry* 269:10217–10220

Tuson M., Marfany G., González-Duarte R. (2004) Mutation of CERKL, a novel human ceramide kinase gene, causes autosomal recessive retinitis pigmentosa (RP26). *The American Journal of Human Genetics* 74/1:128-138

Usiskin S. I., Nicolson R., Krasnewich D. M., Yan W., Lenane M., Wudarsky M., Hamburger S. D., Rapoport J. L. (1999) Velocardiofacial syndrome in childhood-onset schizophrenia. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 38:1536-1543

Van den Oord E. J., Sullivan P. F. (2003) False discoveries and models for gene discovery. *Trends in Genetics* 19:537-42

Van der Knaap M. S., Barth P. G., Stroink H., van Nieuwenhuizen O., Arts W. F. M., Hoogenraad F., Valk J. (1995) Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Annals of Neurology* 37:324–334

Venkataraman K., Futerman A. H. (2000) Ceramide as a second messenger: Sticky solutions to sticky problems. *Trends in Cell Biology* 10:408-412

Verma R., Mukerji M., Grover D., B-Rao C., Das S, Kubendran S, Jain S., Brahmachari S. (2005) MLC1 Gene Is Associated with Schizophrenia and Bipolar Disorder in Southern India. *Biological Psychiatry*, 58: 16-22

Vigilant L., Stoneking M., Harpending H., Hawkes K., Wilson A. C. (1991) African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253:1503-1507

Wernicke C. (1900) *Grundriss der Psychiatrie in klinischen Vorlesungen*. Thieme, Leipzig

Wootton J. C., Federhen S. (1993) Statistics of local complexity in amino acid sequences and sequence databases. *Computers & Chemistry* 17/2:149-163

Yalcinkaya C., Yuksel A., Comu S., Kilic G., Cokar O., Dervent A. (2003) Epilepsy in vacuolating megalencephalic leukencephalopathy with subcortical cysts. *Seizure: The journal of British Epilepsy Association* 12:388-96

Yao B., Zhang Y., Delikat S., Mathias S., Basu S., Kolesnick R. (1995) Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature* 378:307-310

Zhang Y., Yao B., Delikat S., Bayoumy S., McGinley M., Chan-Hui P.Y., Lichenstein H., Kolesnick R. (1997) Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* 89:63-72

## **11. Danksagungen**

Ich möchte an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Jürgen Deckert und Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Helmut Beckmann für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit abzuschliessen zu können danken.

Besonderen Dank schenke ich meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Gerald Stöber, für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die exzellente, geduldige und fachkompetente Betreuung während der gesamten Arbeit.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Thomas Meitinger und Herrn Dr. Thomas Bettecken, für die ungemein engagierte Betreuung bei der Durchführung eines Teils der Experimente am Institut für Humangenetik GSF (Gesellschaft für Strahlenforschung) der Technischen Universität München.

Ich danke dem Forschungsteam, besonders Frau Conny Götz, Frau Dr. Claudia Rubie und Frau Dr. Kerstin Möller-Ehrlich.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in allen Belangen gefördert hat.

## **Lebenslauf**

### **Angaben zur Person**

Name: Markus Siekiera  
Geburtsdatum und -ort: 17.12.1976 in Stettin (Szczecin / Polen )

### **Schulbildung**

08/1983 – 07/1989 Volksschulbildung in Stettin  
09/1989 – 06/1997 Gymnasium Lohbrügge / Abitur

### **Zivildienst**

08/1997 – 08/1998 Rettungssanitäter / Deutsches Rotes Kreuz

### **Berufsausbildung**

09/1998 – 03/2001 Vorklinisches Studium / Universität Hamburg  
14.03.2001 Ärztliche Vorprüfung / Universität Hamburg  
04/2001 – 09/05 Klinisches Studium / Universität Würzburg  
09.06.2005 Approbation als Arzt (Würzburg)

### **Promotion**

2001 – 02.02.2009 Doktorand an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie  
und Psychosomatik der Universität Würzburg  
Rettungssanitäter beim Malteser Hilfsdienst Würzburg  
01.2.2002 – 31.03.2002 Doktorand der Gesellschaft für Strahlenforschung /  
Technische Universität München und Klinik und  
Poliklinik für Psychiatrie und Psychosomatik der  
Universität Würzburg

### **Aktuelle Tätigkeit**

Seit Oktober 2005 Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für  
Kardiologie, Pulmologie und Angiologie der Universität  
Düsseldorf

Düsseldorf, den 13.09.2009