

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

Direktor: Professor Dr. med. H. Beckmann

**Die Rolle von Varianten des
Kalzium-aktivierten Kaliumkanals KCNN3
bei sporadischer Migräne mit und ohne Aura**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Annette Weichselbaum
aus Sulzbürg

Würzburg, Dezember 2004

Referent: Prof. Dr. med. K.-P. Lesch
Korreferentin: Prof. Dr. med. C. Sommer
Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 2005

Die Promovendin ist Ärztin.

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen.....	2
2.1	Migräne	2
2.1.1	Historischer Überblick	2
2.1.2	Klassifikation, Diagnostik und Klinik.....	3
2.1.3	Epidemiologie	5
2.1.4	Pathophysiologie.....	6
2.1.5	Psychopathologische Aspekte	10
2.1.6	Populationsgenetik.....	11
2.1.7	Molekulargenetik.....	13
2.1.7.1	Familiäre hemiplegische Migräne	13
2.1.7.2	Molekulargenetische Hinweise durch phänotypisch verwandte Erkrankungen	15
2.1.7.3	Kandidatengene.....	16
2.2	KCNN3.....	20
2.2.1	Genstruktur des <i>KCNN3</i>	20
2.2.2	Proteinstruktur, Lokalisation und Funktion des <i>KCNN3</i>	22
2.2.3	Assoziation des ² [CAG] _n -repeat-Polymorphismus des <i>KCNN3</i> mit neuropsychiatrischen Erkrankungen	23
2.3	Mikrosatelliten	25
2.3.1	Mikrosatelliten als genetische Marker	25
2.3.2	Die Rolle der <i>triplet repeats</i> bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen.....	26
2.3.3	Methoden zum Nachweis von Mikrosatelliten- Längenpolymorphismen.....	28
2.4	Assoziationsstudien bei komplex vererbten Erkrankungen.....	31
3	Zielsetzung.....	33
4	Patienten, Material und Methoden	34
4.1	Patienten- und Kontrollgruppe	34
4.2	Materialien und Geräte.....	34
4.2.1	Synthetische Oligonukleotide.....	34
4.2.2	Enzyme.....	35

4.2.3	Radioaktives Material.....	35
4.2.4	Puffer und Lösungen.....	35
4.2.5	Chemikalien	36
4.2.6	Verbrauchsmaterialien	38
4.2.7	Geräte	38
4.2.8	Software.....	39
4.3	Experimentelle Methoden	39
4.3.1	Isolierung humaner genomischer DNA aus Vollblut.....	39
4.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
4.3.2.1	Standard-PCR	41
4.3.2.2	Radioaktiv-PCR	42
4.3.3	Elektrophoretische Auftrennung und Nachweis von DNA-Fragmenten.....	42
4.3.3.1	Horizontale Agarosegelelektrophorese und Nachweis mittels Ethidiumbromidfärbung.....	42
4.3.3.2	Vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese und Nachweis mittels Autoradiographie	43
4.3.4	DNA-Sequenzanalyse.....	45
4.3.5	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	47
4.4	Statistische Methoden.....	47
5	Ergebnisse	49
5.1	Fall-Kontroll-Studie zur Assoziation des ² [CAG] _n -Polymorphismus des KCNN3 mit Migräne	49
5.2	Etablierung neuer Methoden zum Nachweis von triplet-repeat-Längenpolymorphismen.....	53
5.2.1	<i>Real-Time</i> -PCR und Schmelzkurvenanalyse mit <i>SYBR Green</i> ...	53
5.2.2	PCR mit PAGE und Nachweis mittels <i>SYBR-Gold</i> -Färbung.....	57
5.3	Probleme und Lösungen der Radioaktiv-PCR mit PAGE und Autoradiographie	59
6	Diskussion.....	62
6.1	Diskussion der Ergebnisse der Assoziationsstudie	62
6.2	Diskussion der methodischen Ergebnisse	78

7	Zusammenfassung.....	84
8	Anhang.....	85
8.1	Abkürzungsverzeichnis	85
8.2	Literaturverzeichnis.....	87

1 Einleitung

Migräne ist eine Erkrankung mit hoher Prävalenz, die sich in 30 % der Fälle mit Aura (MA), in 70 % ohne Aura (MO) manifestiert. Die bisherigen Forschungsergebnisse sprechen dafür, dass es sich um eine multifaktorielle Erkrankung mit komplexer genetischer Vererbung handelt. Inwiefern MO und MA eine einzige oder zwei verschiedene Krankheitsentitäten darstellen und welche genetischen Ursachen diesen zugrunde liegen, wird allerdings kontrovers diskutiert. Auch bezüglich der zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen gibt es mehrere unterschiedliche Modelle. Dies hat eine Vielzahl möglicher Kandidatengene zur Folge, von denen einige mittels Kopplungsanalysen, Assoziationsstudien und Mutationsanalysen bereits untersucht wurden. Bisher lieferten die meisten Studien negative Ergebnisse oder stehen im Widerspruch zueinander, so dass nach wie vor entscheidende Hinweise für die genetischen Grundlagen der verschiedenen Manifestationsformen der Migräne fehlen. Lediglich bei der familiären hemiplegischen Migräne (FHM), einer autosomal dominant vererbten Sonderform der MA, konnten mehrere ursächliche Genloci identifiziert werden. FHM wurde mittels Kopplungsanalysen unter anderem auf Chromosom 1q21-23 kartiert (Wittekindt et al. 1998). Auf diesem Genabschnitt liegt auch das Gen *KCNN3*, das für einen Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanal kodiert, der in bestimmten Bereichen des Gehirns bevorzugt exprimiert wird und dort die Erregungsfrequenz und das Entladungsmuster der Neurone moduliert. Besondere Beachtung verdient ein hochpolymorpher CAG-*repeat*-tragender Genabschnitt im Exon 1 des *KCNN3*. Er kann zum einen als genetischer Marker fungieren, zum anderen könnte er selbst krankheitsauslösend sein – beruhen doch einige neurodegenerative Erkrankungen auf einer pathologisch vermehrten Anzahl sogenannter *triplet repeats*. *KCNN3* wurde bereits auf Assoziation mit verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen, insbesondere Schizophrenie, untersucht (Gargus et al. 1998). Seine Lage auf Chromosom 1q21.3 und die funktionelle Bedeutung seines Genprodukts lassen es auch als untersuchenswertes Kandidatengen für Migräne erscheinen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Migräne

Bei Migräne handelt es sich um periodisch auftretende Kopfschmerzen, die mit vegetativen Störungen einhergehen und zum Teil von neurologischen Ausfallserscheinungen begleitet werden.

2.1.1 Historischer Überblick

Über viele Jahrhunderte hinweg zeigte sich anhaltendes Interesse am Phänomen „Migräne“, einem ubiquitären Leiden mit vielen Gesichtern, bei dem es sich um mehr als nur eine bloße Krankheit handelt. Die Migräne spielt eine grosse Rolle in der Alltagsgeschichte und hat vielfältigen Eingang in die Literatur und Kunst gefunden – waren doch viele Wissenschaftler und Intellektuelle selbst davon betroffen.

Das Wort „Migräne“ entwickelte sich aus dem von Galen von Pergamon (131-201 n. Chr.) zur Bezeichnung eines Halbseitenkopfschmerzes verwendeten Wort „Hemikrania“. Bereits in der Antike gab es sehr präzise Beschreibungen der Migräne - in schriftlicher Form erstmals bei Hippokrates (etwa 400 v. Chr.). Im Verlauf von Altertum, Mittelalter und Beginn der Neuzeit gab es verschiedene Erklärungsansätze (Rapoport und Edmeads 2000). Ein Umbruch in den pathophysiologischen Vorstellungen erfolgte in der zweiten Hälfte des 17. Jahrhunderts, als zwei gegensätzliche Migränetheorien entstanden, deren Polarität bis heute Aktualität besitzt. Thomas Willis (1621-1675) postulierte erstmals eine vaskuläre Migränetheorie: Durch einen Blutstau in intrakraniellen Blutgefäßen komme es zur lokalen Schwellung von Membranen mit einer Dehnung der Nervenfasern, was sich als Kopfschmerz bemerkbar mache. Zur selben Zeit vertrat Robert Whytt (1714-1766) eine neurogene Migränetheorie: Infolge einer gestörten Nervenfunktion kontrahierten sich Blutgefäße, was wiederum zu einem pochenden Kopfschmerz führe (Hagner 1994). Bemerkenswert ist aus heutiger Sicht auch die von Johann Jakob Wepfer

(1620-1695) aufgestellte These, wonach der Kopfschmerz durch den Austritt von Serum aus den Gefäßen über den ersten Trigeminusast geleitet werde (Ensink 1994). Ein wichtiger Impuls in der Migräneforschung kam am Ende des 19. Jahrhunderts von Edward Liveing (1843-1907), der die Auffassung vertrat, dass das Gehirn selbst durch epileptiforme paroxysmale Aktivität massgeblich an der Entstehung einer Migräneattacke beteiligt sei (Edvinsson 1999). Der erstmalige kontrollierte Einsatz von Ergotaminpräparaten zur Behandlung von Migräneattacken in den 20er Jahren des 20. Jahrhunderts revolutionierte die Migränetherapie. Die zweite Hälfte des 20. Jahrhunderts kann man als „Serotoninära“ der Migränetherapie betiteln, in deren Verlauf immer selektivere Serotoninrezeptoragonisten synthetisiert wurden. Mit den Triptanen stehen heute Medikamente zur Verfügung, deren Wirkung sowohl mit einer vaskulären als auch einer neurogenen Entstehung des Migränekopfschmerzes in Einklang gebracht werden kann (Ensink 1994). Mit dem Bemühen um eine effektivere Migränetherapie ging die weitere Erforschung der Pathophysiologie dieser Erkrankung während der letzten Jahrzehnte einher, die zu einer Vielzahl von Hypothesen führte (siehe 2.1.4). Mit den Fortschritten in der Molekulargenetik wurde die Suche nach möglichen Genloci verstärkt. Gegenwärtig wird Migräne als eine komplexe Erkrankung gesehen, an der eine Vielzahl von Einflussfaktoren beteiligt sind.

2.1.2 Klassifikation, Diagnostik und Klinik

Die Einteilung verschiedener Migräneformen (und anderer Kopfschmerzarten) erfolgt heute gemäß den Klassifikationskriterien der *International Headache Society* (IHS) in 17 Unterformen. Grundlage der Klassifikation sind hierbei phänomenologische Unterschiede der Migränetyphen.

Die IHS unterscheidet zwei Haupttypen der Migräne, Migräne ohne Aura und Migräne mit Aura. Als eigenständige Migränesonderformen gelten ophthalmoplegische und retinale Migräne. Etwa 30% der Migränepatienten

leiden an Migräne mit Aura, 70% an Migräne ohne Aura, wobei bei einem Teil der Patienten beide Formen vorkommen (Russell et al. 1995b).

Bei der MO handelt es sich um idiopathische wiederkehrende Kopfschmerzattacken, die 4 bis 72 Stunden andauern. Der Kopfschmerz ist typischerweise mäßig bis stark, einseitig lokalisiert, pulsierend und wird durch körperliche Aktivität verstärkt. Typische Begleitphänomene sind Übelkeit, Erbrechen, Licht- und Lärmempfindlichkeit.

Die MA zeichnet sich durch verschiedene, den Kopfschmerzen vorangehende fokalneurologische Symptome, die sogenannte „Aura“, aus. Sie entwickelt sich typischerweise allmählich während einer Zeitspanne von 5 bis 20 Minuten, dauert nicht länger als eine Stunde an und ist voll reversibel. Bei 99% der Patienten tritt eine visuelle Aura (v.a. Augenflimmern oder wandernde Skotome) auf, es kann aber auch zu Sensibilitätsstörungen (31%), Sprachstörungen (18%) oder motorischen Ausfällen (6%) kommen (Ferrari 1998b). Migränekopfschmerz und Begleitphänomene schließen sich maximal eine Stunde nach Beendigung der neurologischen Aurasymptome an. Subtypen der MA sind Migräne mit prolongierter Aura, familiäre hemiplegische Migräne, Basilarismigräne, ophtalmoplegische Migräne und Migräneaura ohne Kopfschmerz sowie Migräne mit akutem Aurabeginn.

Sowohl bei MO als auch bei MA können Prodromalsymptome der eigentlichen Migräneattacke Stunden bis Tage vorausgehen. Diese können sich auf vielfältige, oft individualspezifische Weise als Hyper- oder Hypoaktivität, depressive Verstimmung, Heißhunger etc. äußern.

Davon zu unterscheiden sind die Auslösefaktoren einzelner Migräneattacken. Bei 90% aller Migränepatienten lösen bestimmte Trigger, z.B tyraminhaltige Nahrungsmittel, Alkohol, hormonelle Schwankungen im Rahmen des Menstruationszyklus oder ein veränderter Schlaf-Wach-Rhythmus regelmäßig oder gelegentlich eine Migräneattacke aus.

Die Diagnose „Migräne“ stützt sich ausschließlich auf Anamnese und klinischen Befund und erfordert gemäß den Kriterien der IHS mindestens zwei Migräneattacken mit Aura bzw. fünf Migräneattacken ohne Aura bei unauffälligem neurologischen Untersuchungsbefund. Als entscheidende diagnostische Hinweise gelten positive Familienanamnese (bei etwa 60% der Patienten), Erstmanifestation in der Pubertät, typisches Verlaufsmuster der Schmerzattacken und eventuell vorausgegangene Aura mit Plus- und Ausfallssymptomen (Diener 1994; Göbel 1994; Jurkat-Rott et al. 1998).

2.1.3 Epidemiologie

Die Verteilung der Migräne ist alters- und geschlechtsabhängig und differiert in verschiedenen ethnischen Gruppen bzw. Kulturkreisen.

Durchschnittlich leiden 5-7% der männlichen und 12-14% der weiblichen Bevölkerung der westlichen Welt an Migräne (Poeck und Hacke 2001). In afrikanischen und asiatischen Ländern durchgeführte Studien zeigen wesentlich niedrigere Prävalenzraten (1,5% in Hong Kong, 3% in Äthiopien, 8% in Japan) (Breslau und Rasmussen 2001a). Eine von Stewart und Mitarbeitern 1996 veröffentlichte Studie zeigte eine signifikant höhere Prävalenz der Migräne unter Kaukasiern (w 20,4%, m 8,6%) als unter in den USA lebenden Afrikanern (w 16,2%, m 7,2%) bzw. Asiaten (w 9,2%, m 4,8%). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sowohl soziokulturelle und Umweltfaktoren als auch genetische Komponenten eine Rolle in der Pathogenese der Migräne spielen (Stewart et al. 1996).

Die Einjahres-Prävalenzraten sind vor allem alters- und geschlechtsabhängig (Ferrari 1998b). Unter Erwachsenen tritt Migräne zwei-bis dreimal häufiger bei Frauen als bei Männern auf. Unter Kindern ist das Geschlechterverhältnis ausgewogen (Jurkat-Rott et al. 1998). Das durchschnittliche Erstmanifestationsalter bei Männern beträgt 10 bis 12 Jahre, bei Frauen 14 bis

16 Jahre. Während des zweiten Lebensjahrzehnts ist bei beiden Geschlechtern ein starker, kontinuierlicher Prävalenzanstieg zu verzeichnen (Ferrari 1998b). Der Prävalenzgipfel liegt bei Frauen zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr, bei Männern etwas früher. Migräne manifestiert sich in 90% der Fälle vor dem 50. Lebensjahr.

Bei Untersuchungen zum sozioökonomischen Status von Migräneklienten konnte bisher kein eindeutiger Zusammenhang zu Prävalenzunterschieden hergestellt werden (Breslau und Rasmussen 2001b).

Im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen wurde auch die Komorbidität der Migräne untersucht. Dabei trat Migräne signifikant gehäuft zusammen mit Epilepsie, episodischer Ataxie, depressiven Störungen, bipolaren Störungen, Angststörungen und - bei Frauen unter 45 Jahren - mit ischämischem Insult auf. Darüberhinaus scheint Migräne auch mit verschiedenen internistischen Erkrankungen assoziiert zu sein (Breslau und Rasmussen 2001a; Ferrari 1998a).

2.1.4 Pathophysiologie

Bis heute kennt man keinen eindeutigen, in sich geschlossenen pathophysiologischen Mechanismus zur Erklärung der Entstehung der Migräne. Stattdessen gibt es eine Vielzahl von pathophysiologischen Erklärungsmodellen, deren Komponenten eventuell Teile eines komplexen Mechanismus darstellen. Besonders schwierig ist es dabei zu unterscheiden, welche Veränderungen Auslöser und welche Folgen des pathologischen Geschehens sind.

Bis Anfang der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde die Auffassung vertreten, dass es sich bei Migräne um einen vaskulär bedingten Kopfschmerz handle, wobei die Aura Folge einer Vasokonstriktion, der Kopfschmerz hingegen Folge einer Vasodilatation sei (Moskowitz 1996). Es konnte gezeigt

werden, dass bei MA die Aurasymptome mit einer reduzierten regionalen Hirndurchblutung einhergehen, wohingegen die regionale Hirndurchblutung bei MO normal ist. Während der Kopfschmerzphase wurde bei beiden Migräneformen eine Weitstellung der Arteria cerebri media beobachtet (Russell et al. 2002). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass vaskuläre Veränderungen möglicherweise nicht Ursache, sondern Begleiterscheinung neuronaler Aktivität sind (Olesen et al. 1990). Die im Zuge neurophysiologischer, bildgebender (vor allem MRT, PET und transkranielle Dopplersonographie) und molekulargenetischer Untersuchungen entstandenen aktuellen Theorien zur Pathophysiologie konzentrieren sich hauptsächlich auf mögliche neuronale Fehlfunktionen. Eine genaue Darstellung würde den Rahmen dieser Arbeit sprengen, sie sollen daher an dieser Stelle nur kurz umrissen werden:

Es ist bekannt, dass Kopfschmerz von den sensiblen Nervenfasern der intrakraniellen Gefäße und Hirnhäute, dem trigeminovaskulären System, ausgeht, während das Gehirn selbst schmerzunempfindlich ist. Bisher sind die Auslöser für die Aktivierung nozizeptiver Fasern bei primären Kopfschmerzen ungeklärt. Es gibt zahlreiche Hinweise auf eine „neurogene Entzündung“, bei der es durch Stimulation eines Neurons zur Freisetzung von vasoaktiven Neuropeptiden und anderen Faktoren (v.a. Substanz P, Neurokinin A, NO, CGRP, PGE₂) kommt, die an postkapillären Arteriolen zu Plasmaextravasation, Ödembildung und Vasodilatation führen, das Neuron sensibilisieren und gleichzeitig das umliegende Gewebe beeinflussen. Dabei werden unter anderem Serotonin und Histamin freigesetzt, die ebenfalls zur Sensibilisierung beitragen. Die neuronale Aktivität der sensiblen Trigeminianteile wird im Nucleus caudalis des Trigemini-Kerns im Hirnstamm auf postsynaptische Neurone umgeschaltet und von dort über den Tractus spinothalamicus zum Thalamus und schließlich zu kortikalen Schmerzarealen weitergeleitet. Dabei kann es auch zu einer zentralen Sensibilisierung kommen. Offen bleibt allerdings die Frage, wie es zur Initiierung der neurogenen Entzündung kommt (Ebersberger 2002).

Das Phänomen der „*cortical spreading depression*“ (CSD) bezeichnet eine in Tierexperimenten auslösbare neuronale Exzitationswelle, die sich mit einer Geschwindigkeit von 2-3 Millimeter pro Minute unilateral über den Kortex ausbreitet und mit einer vorübergehenden Unterdrückung normaler neuronaler Aktivität einhergeht. Die betroffenen Neurone sind dabei etwa eine Minute lang unerregbar. Dabei wird die Homöostase des Ionenhaushalts im Gehirn gestört (Baloh 2000; Ferrari 1998b). Interessanterweise bewegen sich Skotome und visuelle Fortifikationen der Migräneaura mit derselben Geschwindigkeit über das Gesichtsfeld des Patienten. Eine gleichzeitig messbare „*spreading oligoemia*“ während der Aura breitet sich ebenfalls mit dieser Geschwindigkeit von okzipital nach frontal über den Kortex aus. Dies legte die Vermutung nahe, dass die CSD das Korrelat der Migräneaura darstellt. Die CSD-Theorie postuliert darüberhinaus, dass es während der kortikalen Exzitation zu einer Aktivierung der nozizeptiven trigeminovaskulären Fasern der über diesem Kortexareal liegenden Dura kommt, die zur Auslösung einer neurogenen Entzündung führt. Dies konnte beim Menschen bisher aber noch nicht hinreichend nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die CSD zwar das Korrelat der Aura, steht aber nicht in kausalem Zusammenhang mit der Kopfschmerzsymptomatik (Ferrari 1998b).

Seit langem weiss man, dass Serotonin (5-HT) eine Rolle bei Migräne spielt. Migränepatienten haben zwischen den Migräneattacken niedrige Serotoninplasmaspiegel und setzen während der Migräneattacken vermehrt Serotonin frei (Ferrari und Saxena 1993). Hochwirksame Migränemedikamente wirken bevorzugt an 5-HT-Rezeptoren: Medikamente aus der Gruppe der Mutterkornalkaloide (z.B. Ergotamin) sind dabei weniger selektiv und verursachen eine Reihe unerwünschter Nebenwirkungen. Daher werden heute bevorzugt Triptane zur Behandlung von Migräneanfällen eingesetzt. Diese wirken agonistisch an bestimmten Subtypen der 5-HT_{1B/D}-Rezeptorfamilie. Durch die Stimulation präsynaptischer 5-HT_{1D}-Rezeptoren an trigeminalen A δ -Fasern wird die neurogene Entzündung aufgrund einer verminderten - Freisetzung von CGRP gehemmt. An trigeminalen C-Fasern stimulierte 5-HT_{1D}-

Rezeptoren hemmen die neurogene Entzündung durch eine verminderte Freisetzung von Substanz P und Neurokinin A. Ausserdem wird die Erregbarkeit von Neuronen in Trigemuskernen des Hirnstamms durch stimulierte 5-HT_{1B/D}-Rezeptoren herabgesetzt. Über stimulierte 5-HT_{1B}-Rezeptoren an intrakraniellen Blutgefäßen kommt es zur Vasokonstriktion (Ferrari 1998b).

PET-Studien zeigten einen vermehrten regionalen Blutfluss im Bereich des zur Seite des Kopfschmerzes kontralateralen oberen Hirnstammes. Durch die Gabe von Sumatriptan blieb diese aktivierte Hirnstammzone unbeeinflusst, wohingegen sich die Kopfschmerzsymptomatik verbesserte und die zuvor ebenfalls gemessene Aktivierung der kortikalen Areale für Schmerzperzeption verschwunden war (Weiller et al. 1995). Es ist daher denkbar, dass bisher nicht näher bestimmte Regionen des Hirnstamms als „Migränegenerator“ fungieren.

Auch die Rolle des Nitroxid (NO) bei der Pathophysiologie der Migräne wird kontrovers diskutiert. Untersuchungen an Migränepatienten zeigten eine vermehrte Dilatation intrazerebraler Gefäße und vermehrte Entwicklung migräneähnlicher Kopfschmerzen nach Nitroglyzerininfusionen im Vergleich zur Kontrollgruppe. NO könnte daher eine zentrale Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der Migränekopfschmerzen spielen (Olesen et al. 1995).

Durch die Entdeckung genetischer Defekte in Kanalproteinen des ZNS bei der familiären hemiplegischen Migräne (siehe 2.1.7.1) wird in zunehmendem Maße über die pathophysiologische Bedeutung von Ionenkanälen nachgedacht. Veränderte Ionenkanäle können auf verschiedenste Art und Weise zu Instabilitäten im ZNS führen. Die Mutation des *CACNA1A*-Gens bei FHM führt beispielsweise zu einem veränderten P/Q-Typ-Kalziumkanal. P/Q-Typ-Kalziumkanäle sind wiederum bei der CSD und bei der Freisetzung von Neurotransmittern, darunter auch Serotonin, beteiligt (Richter et al. 2002). Veränderte Ionenkanäle könnten auch die generelle kortikale Übererregbarkeit

bedingen, die bei Migränepatienten im Stadium der Anfallsfreiheit vorliegt (Ferrari 1998b).

2.1.5 Psychopathologische Aspekte

Neben den somatischen Erklärungsmodellen gibt es in der Migränerforschung auch die Tradition psychopathologischer Erklärungsmodelle, die im Rahmen dieser Arbeit nur kurz erwähnt werden sollen.

Aus psychodynamischer Sicht bildet in der Regel ein intrapsychischer Konflikt die Basis für Kopfschmerzen. Es gibt im wesentlichen zwei Ansatzpunkte: Einige Autoren stellen Aggressionskonflikte und deren Abwehr in den Mittelpunkt ihrer Betrachtungen und sehen die Migränesymptomatik als Affektäquivalent an, andere Autoren betonen mehr eine narzisstische Störung (Ahrens et al. 1995). Beispiel für einen verhaltensmedizinischen Ansatz ist das Diathese-Stress-Modell (Bischoff et al. 1996). Daneben gibt es psychophysiologische Modelle, die davon ausgehen, dass die Regulation von Neurotransmittern und Gefäßstellungen durch psychosoziale Faktoren beeinflussbar ist (Kroner-Herwig et al. 1993) und psychische Faktoren über zentrale Mechanismen die Schmerzschwelle verändern (Olesen 1991). Obwohl sich die Mehrzahl der vorliegenden psychosomatischen Arbeiten explizit mit Migräne beschäftigen, gibt es mehr und mehr eine Tendenz, Migräne und Spannungskopfschmerz als ein Kontinuum mit zahlreichen Übergangsformen anzusehen (Ahrens et al. 1995).

Die Diskussion um die Frage, ob Migränepatienten eine typische Persönlichkeitsstruktur haben, nährt sich von klinischen Beobachtungen und populationsbasierten Studien mit standardisierten Persönlichkeitstests. Zusammenfassend kann man die am häufigsten beobachteten Charakterzüge der anankastischen und narzisstischen Persönlichkeitsstruktur zurechnen. Bei den populationsbasierten Studien waren Migränepatienten - im Gegensatz zu Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz oder gemischten

Kopfschmerztypen - hinsichtlich ihrer Persönlichkeitsstruktur verglichen mit Kontrollpersonen unauffällig. Studien, die mit dem *Eysenck Personality Questionnaire* arbeiteten, beobachteten bei Migränepatienten lediglich die Tendenz zu höheren Werten auf der Neurotizismus-Skala (Silberstein et al. 1995).

Psychopathologisch relevant ist auch die erhöhte Komorbidität von Migräne mit depressiven Erkrankungen und Angststörungen (Silberstein et al. 1995).

2.1.6 Populationsgenetik

Seit langem ist bekannt, dass Migräne in manchen Familien gehäuft vorkommt. Diese familiäre Häufung wurde während der letzten Jahrzehnte in einer Vielzahl von Studien nachgewiesen (Baloh 2000). Es gibt aber eine kontroverse Debatte darüber, inwieweit dies auf genetische oder Umweltfaktoren zurückzuführen ist (Waters 1995).

Da Migräne eine Prävalenz von bis zu 20% in der Normalbevölkerung hat, können mehrere Familienmitglieder davon betroffen sein, ohne dass Vererbung eine Rolle spielt. Auch gemeinsame Umweltfaktoren innerhalb einer Familie können zu einer familiären Häufung führen (Baloh 2000). Des Weiteren taucht die Frage auf, ob es sich bei Migräne um eine einzige Krankheit handelt oder ob MO und MA als zwei eigenständige Krankheitsentitäten zu sehen sind und somit nach unterschiedlichen Ursachen gefahndet werden muss. Gleichzeitig ist es denkbar, dass genetisch heterogene Migräneformen zum gleichen phänotypischen Krankheitsbild führen und umgekehrt phänotypisch unterschiedliche Formen durch die gleichen Gene verursacht sein könnten (Gervil et al. 1999a).

Um diese Fragen zu klären, wurden zahlreiche populationsgenetische Untersuchungen durchgeführt. Russell und Mitarbeiter verglichen das Erkrankungsrisiko für Verwandte ersten Grades mit dem für Lebenspartner von

Migränepatienten. Verwandte ersten Grades von MO-Patienten hatten ein 1,9-fach erhöhtes Risiko für MO und ein 1,4-fach erhöhtes Risiko für MA. Partner von MO-Patienten hatten ein 1,5-fach erhöhtes Risiko für MO. Verwandte ersten Grades von MA-Patienten hatten ein 3,8-fach erhöhtes Risiko für MA aber kein erhöhtes Risiko für MO. Partner von MA-Patienten hatten kein erhöhtes Risiko für MA. In Zwillingsstudien waren die Konkordanzraten bei monozygoten Zwillingen gegenüber den Konkordanzraten bei dizygoten Zwillingen für MA hochsignifikant und für MO signifikant erhöht (Gervil et al. 1999b; Russell 2001). Monozygote Zwillinge haben eine Konkordanzrate von 34% für MA (Ulrich et al. 1999). Eine Studie mit 5360 dänischen Zwillingen zeigte dagegen, dass es bezüglich des gleichzeitigen Vorkommens von MO und MA bei Zwillingspaaren keinen Unterschied gegenüber der Normalbevölkerung gibt (Russell et al. 2002).

Bezüglich des Vererbungsmusters bei Migräne wurde anfangs eine autosomal dominante Vererbung mit reduzierter Penetranz diskutiert. Eine 1993 von Mochi und Mitarbeitern durchgeführte Segregationsanalyse sprach für ein autosomal rezessives Vererbungsmodell. Auch ein X-chromosomaler Vererbungsmodus war lange Zeit im Gespräch, da Frauen ebenso wie Verwandte ersten Grades von betroffenen Männern häufiger an Migräne leiden. Die Ergebnisse neuerer Segregationsanalysen passen aber am besten zum Modell der multifaktoriellen Vererbung (Baloh 2000; Montagna 2000; Russell et al. 1995a). Somit nimmt man gegenwärtig an, dass es sich bei Migräne um eine komplex vererbte Erkrankung mit Schwellencharakter handelt, bei der genetische und Umwelteinflüsse gleichermassen eine Rolle spielen, wobei die genetischen Einflussfaktoren bei MA stärker zu sein scheinen als bei MO (Gervil et al. 1999a; Montagna 2000; Sandor et al. 2002).

2.1.7 Molekulargenetik

2.1.7.1 Familiäre hemiplegische Migräne

Bei der familiären hemiplegischen Migräne handelt es sich um eine seltene, besonders schwere Sonderform der MA, bei der ein autosomal-dominanter Vererbungsmodus nachgewiesen wurde.

Klinisch präsentiert sich die FHM mit einer Halbseitensymptomatik mit Hemiparese, Hemianopsie und cheirooralem Kribbeln oder Taubheitsgefühl, die den Kopfschmerzen 30 bis 60 Minuten vorausgeht und meist mehrere Tage andauert. Zusätzlich können zerebelläre Zeichen (Ataxie, Vertigo, etc.), Aphasie oder Bewusstseinsverlust während eines Migräneanfalls auftreten. Allerdings zeigen nicht alle betroffenen Individuen bei jeder Attacke das Vollbild der Erkrankung (Sandor et al. 2002). In einigen Familien mit FHM wurden im anfallsfreien Intervall Nystagmus, Ataxie und essentieller Tremor beobachtet. FHM kommt bei Männern und Frauen gleich häufig vor (Baloh 2000). Da von FHM betroffene Individuen abwechselnd hemiplegische Migräneattacken und klassische Migräneattacken mit Aura haben können, es in von FHM betroffenen Familien auch reine MA-Patienten gibt (Baloh 2000) und manche FHM-Mutationsträger an MA bzw. MO leiden, ohne jemals hemiplegische Symptome zu zeigen (Montagna 2000), erhofft man sich, durch die Erforschung der FHM wesentliche Beiträge zur Genetik der gängigeren Migräneformen zu erhalten.

FHM ist genetisch heterogen: Sie geht in 50 % der Fälle mit Mutationen des *CACNA1A*-Gens auf Chromosom 19p13 einher, das für die sogenannte α_{1A} -Untereinheit eines neuronalen spannungsabhängigen P/Q-Typ-Kalziumkanals kodiert. Diese α_{1A} -Untereinheit enthält die ionenleitende transmembranäre Pore und den Spannungssensor. Dieser P/Q-Typ-Kalziumkanal wird bevorzugt an präsynaptischen Nervenendigungen im Kleinhirn und Hirnstamm (sowie an neuromuskulären Endplatten) exprimiert und spielt eine Rolle bei der Kontrolle der zentralen (z.B. Serotonin) und peripheren (z.B. Acetylcholin) Neurotransmitterfreisetzung (Ophoff et al. 1996).

Es wurden mittlerweile 16 verschiedene Punktmutationen im *CACNA1A* nachgewiesen, die zu FHM führen. Am häufigsten kommt die Mutation T666M vor. Mutationen im *CACNA1A* sind nicht nur für FHM sondern auch für episodische Ataxie Typ 2 (EA-2) und spinocerebelläre Ataxie Typ 6 (SCA-6) verantwortlich (Montagna 2000). Diese Erkrankungen werden daher unter dem Begriff „allelische Ionenkanalkrankheiten“ zusammengefasst und weisen auch phänotypische Gemeinsamkeiten auf. Die pathophysiologischen Mechanismen, die durch Dysfunktionen dieses P/Q-Typ-Kalziumkanals ausgelöst werden, zur Symptomatik dieser Krankheitsbilder führen und eventuell auch an der Pathogenese anderer Migräneformen beteiligt sind, sind allerdings noch ungeklärt (Sandor et al. 2002).

Für einige FHM-Familien, bei denen eine Kopplung zu Chromosom 19 ausgeschlossen worden war, konnte Kopplung mit zwei Regionen auf Chromosom 1 nachgewiesen werden. Ducros und seine Mitarbeiter zeigten 1997, dass in drei französischen Familien FHM mit der Region 1q21-23 gekoppelt ist (signifikante Kopplung mit den beiden Mikrosatellitenmarkern D1S2635 (maximaler LOD score: 3,33) und D1S2705 (maximaler LOD score: 3,64)) (Ducros et al. 1997). Gardner und seine Mitarbeiter fanden im gleichen Jahr bei einer deutsch-amerikanischen Familie einen gekoppelten Genlocus auf 1q31 (maximale LOD scores für einen 44 cM umspannenden Bereich zwischen D1S158 und D1S2781) (Gardner et al. 1997).

Aufgrund der genetischen Heterogenität wird FHM gegenwärtig in zwei Subtypen unterteilt: FHM-1 (Genlocus auf Chromosom 19; MIM #141500) und FHM-2 (Genlocus auf Chromosom 1; MIM #602481). FHM-1 hat eine Penetranz von 80-90%, wohingegen FHM-2 eine Penetranz von nur 60% aufweist. Auch bezüglich des klinischen Erscheinungsbildes gibt es Unterschiede: Bei FHM-1 treten gehäuft zerebelläre Symptome (einschließlich essentiellen Tremor) und postiktale Koma auf, bei FHM-2 hingegen vermehrt Epilepsie und febrile Krämpfe (Montagna 2000).

2.1.7.2 Molekulargenetische Hinweise durch phänotypisch verwandte Erkrankungen

Um Hinweise auf mögliche molekulargenetische Ursachen der Migräne zu erhalten, werden auch phänotypisch verwandte Krankheitsbilder untersucht.

Sowohl die zerebrale autosomal dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukoenzephalopathie (CADASIL) als auch mitochondriale Enzephalopathie, Laktatazidose und Schlaganfall (MELAS) gehen mit ausgeprägten migräneartigen Kopfschmerzen einher. CADASIL wird autosomal dominant übertragen und ist von stark ausgeprägten Migräneattacken v.a. im Frühstadium der Erkrankung geprägt. Die MRT-Befunde stimmen mit denen bei Migränepatienten überein. CADASIL liegen ursächlich Mutationen im *Notch3*-Gen auf Chromosom 19p13 zugrunde (Baloh 2000). Das klinische Bild der MELAS ist sehr vielfältig. Regelmäßig kann man migräneähnliche Kopfschmerzen beobachten - oftmals als Prodromalsymptom. Eine maternal weitervererbte Mutation im mitochondrialen *tRNA-Leu(UUR)*-Gen ist dafür verantwortlich.

Klinisch auffällig überlappende Symptome mit FHM finden sich v.a. bei familiärer episodischer Ataxie Typ 2 und spinocerebellärer Ataxie Typ 6. FHM, EA-2 und SCA-6 werden außerdem alle autosomal dominant vererbt, gehören zur Gruppe der allelischen Ionenkanalkrankheiten und besitzen u.a. folgende gemeinsame Charakteristika: Episodische Symptomatik, Auslösung durch Triggerfaktoren, Manifestation nicht bei Geburt, Besserung der Symptomatik nach dem 50. Lebensjahr und therapeutisches Ansprechen auf Acetazolamid (Jurkat-Rott et al. 1998). Klinisch äußern sich sowohl EA-2 als auch FHM mit interiktalem Nystagmus, progressiver zerebellärer Ataxie und typischen Symptomen der Basilarismigräne. 50% der EA-2-Patienten haben migräneartige Kopfschmerzen. Im interiktalen EEG findet sich die gleiche paroxysmale Verlangsamung. Interessanterweise werden beide Krankheitsbilder durch Mutationen im *CACNA1A* verursacht. EA-2 kann in erster Linie durch Punktmutationen verursacht werden, die zu *frame shift* oder

abnormalem *splicing* führen, seltener durch CAG-repeat-Expansion. Die krankheitsverursachende Genveränderung für SCA-6 liegt ebenfalls auf dem *CACNA1A*. Eine Expansion von nur 21-27 CAG repeats führt bereits zu der Erkrankung (siehe 2.3.2) (Baloh 2000; Montagna 2000; Tournier-Lasserre 1999).

2.1.7.3 Kandidatengene

Aufgrund pathophysiologischer Überlegungen und neugewonnener Erkenntnisse über die Molekulargenetik phänotypisch verwandter Erkrankungen wurde während der letzten Jahre eine Reihe von Kandidatengenen für Migräne postuliert und auf Kopplung, Assoziation oder Mutationen getestet.

Wichtige Kandidatengene waren zunächst die Serotoninrezeptorgene, da der Serotoninhaushalt bei Migräneattacken verändert ist und Serotoninrezeptoragonisten gegenwärtig die wirksamsten zur Verfügung stehenden Medikamente im Migräneanfall sind. In den bisherigen Studien konnte aber nicht gezeigt werden, dass sie ursächlich an Migräne beteiligt sind. Weitere erfolgversprechende Kandidatengene schienen Dopaminrezeptorgene zu sein, da Dopaminhypersensitivität v.a. für Erbrechen und Übelkeit verantwortlich gemacht wird. Doch auch bei den Studien, in denen Dopaminrezeptorgene untersucht wurden, überwiegen negative Ergebnisse. Ebenso waren die für verschiedene prothrombotische Faktoren durchgeführten Studien meist negativ. Dies gilt auch für die Studien, die eine maternale Vererbung annahmen und die mtDNA betroffener Individuen untersuchten. Auch *CACNA1A* – der für FHM-1 gesicherte Genlocus – scheint bei gängigeren Migräneformen keine Rolle zu spielen. Ebenso lieferten Studien, die weitere neuronale Ionenkanalgene im Blickpunkt hatten, keine neuen Anhaltspunkte. Bei der Untersuchung mit genomweiten Markern fand man Kopplung mit verschiedensten Genloci, die aber erst noch durch weitere Untersuchungen bestätigt werden müssen.

Eine Zusammenstellung der untersuchten Kandidatengene für MO und MA zeigt Tabelle 1. (Die einzelnen Studien unterscheiden sich allerdings im Studienaufbau, in der Studiengröße, bezüglich diagnostischer Kriterien etc., so dass eine gesonderte, sorgfältige Bewertung vorgenommen werden muss. Aufgrund der unübersichtlichen Menge an durchgeführten Studien (vor allem der während der letzten Jahre immer beliebter gewordenen Assoziationsstudien) erhebt meine Zusammenstellung keinen Anspruch auf Vollständigkeit.)

Tab. 1: Kopplungs-, Mutations- und Assoziationsstudien verschiedener Kandidatengene mit MO bzw. MA

<i>Genlocus</i>	<i>Kopplung/Assoziation/Mutation</i>	
	<i>Negatives Ergebnis</i>	<i>Positives Ergebnis</i>
CACNLB1 auf 1q	Monari et al. 1997	
1q31-gekoppelte Marker		Lea et al. 2002 (M) Griffiths et al. 2001 (MO, MA)
Chromosom 3		Ophoff et al. 2001
Chromosom 4		Wessmann et al. 2001 (MA)
6p12.2-21.1		Carlsson 2002 (MO, MA)
14q21.2-22.3		Soragna et al. 2003
Xq24-28		Nyholt et al. 1998 (MO, MA) Griffiths et al. 2001
Xp22		Wieser et al. 2001 (MO, MA)
CACNA1A auf 19p13	Hovatta et al. 1994 Baloh et al. 1996 Kim et al. 1998 Lea et al. 2001 Monari et al. 1997 Cevoli et al. 1997	Nyholt et al. 1998 (MA>MO) May et al. 1995 (MA>MO) Terwindt et al. 2001 (MA>MO) Ambrosini et al. 2000 (MA)
CACNA1A-unabhängiger Marker auf 19p13		Jones et al. 2001 (MA)
Notch 3 auf 19p13		Ceroni et al. 2000 (MA)
Insulinrezeptor auf 19p13		White et al. 2001 (MO, MA)
5-HT _{1B} -Rezeptor	Monari et al. 1997	
5-HT _{1D} -Rezeptor	Monari et al. 1997 Maassen et al. 1998	
5-HT _{1F} -Rezeptor	Maassen et al. 1998	
5-HT _{2C} -Rezeptor auf Xq22-25	Buchwalder et al. 1996 Burnet et al. 1997	
5-HT _{2A} -Rezeptor auf 13q14-22	Buchwalder et al. 1996 Nyholt et al. 1996 Monari et al. 1997	
5-HT-SERT	Monari et al. 1997	Ogilvie et al. 1998 (MA, MO)

<i>Genlocus</i>	<i>Kopplung/Assoziation/Mutation</i>	
	<i>Negatives Ergebnis</i>	<i>Positives Ergebnis</i>
DRD2	Peroutka et al. 1997 (MO) Del Zompo et al. 1998 (MO) Dichgans et al. 1998	Peroutka et al. 1997 (MA)
DRD3	Del Zompo et al. 1998 (MO)	
DRD4	Del Zompo et al. 1998 (MO)	
Dopamin β Hydroxylase		Lea et al. 2000 (MO, MA)
Esterase-D ESD 2-2		Pardo et al. 1995
SCNA1, SCNA2, SCNA3, SCNA6	Montagna et al. 1999	
KCNA5, KCNA6	Montagna et al. 1999	
prothrombotische Faktoren	Haan et al. 1997 Haan et al. 1998 Corral et al. 1998 Soriani et al. 1998	D'Amico et al. (MA bei Protein S Mangel, Faktor 5 Leiden Mutation)
Komplement C3	Peroutka et al. 1997	
NOS 3	Griffiths et al. 1997	
iNOS	Lea et al. 2001	
HLAII DR2-Antigen	Martelletti et al. 1999 (MO)	Martelletti et al. 1999 (MA)
ACE		Paterna et al. 2000 (MO, MA)
TNF β		Martelletti et al. 2000 (MO)
MTHF Reduktase		Kowa et al. 2000 (MO, MA)
Endothelin Typ A Rezeptor		Tzourio et al. 2001 (MO, MA)
mtDNA	Klopstock et al. 1996 (MA) Haan et al. 1999 (MO, MA) Russell et al. 1997 (MO, MA) Majamaa et al 1998 (M-stroke)	Bresolin et al. 1991 (M-stroke) Shimomura et al. 1995 (M) Ojaimi et al. 1998 (MA-stroke) Majamaa et al. 1997 (M-stroke) Majamaa et al. 1998 (M-stroke) Sano et al. 1996 (M)

2.2 *KCNN3*

Das menschliche Gen *KCNN3* (GenBank accession number AF031815; MIM *602983; frühere Bezeichnungen: SK3, hSKCa3) wurde erstmals 1998 isoliert (Chandy et al. 1998). Es erstreckt sich über 163,1 kb auf Chromosom 1q21.3, gehört zur Genfamilie *KCNN1-4*, und kodiert für das Protein *KCNN3* (*potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 3*) (Sun et al. 2001).

2.2.1 Genstruktur des *KCNN3*

Chandy und seine Mitarbeiter isolierten 1998 die cDNA des menschlichen Gens *KCNN3*. Die cDNA-Sequenz des *KCNN3* wies Homologie mit der *sequence tagged site* (STS) G16005 auf, weshalb man zunächst vermutete, dass *KCNN3* auf Chromosom 22q11 lokalisiert sei (Chandy et al. 1998). Noch im selben Jahr lokalisierten Wittekindt und seine Mitarbeiter *KCNN3* mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf Chromosom 1q21.3 (Wittekindt et al. 1998). Dieser Genlocus wurde später von mehreren Forschergruppen durch unterschiedliche Methoden bestätigt (Austin et al. 1999; Dror et al. 1999; Figueroa et al. 2001; Navon 1998; Stöber et al. 2000).

KCNN3 besteht aus acht Exons (variierende Längen: 70 bp bis 1716 bp) und sieben Introns (variierende Längen: 676 bp bis 49,71 kb) mit Consensussequenzen für den Spleißvorgang an allen Exon-Intron-Übergängen, die den GT-AG-Regeln entsprechen. Im Exon 1 liegen zwei CAG *repeats*, die für zwei N-terminal gelegene Polyglutaminbereiche kodieren (siehe Abb.1). Die lange N-terminale zytoplasmatische Domäne mit den beiden Polyglutaminbereichen ist eine Besonderheit des *KCNN3*, die sonst bei keinem anderen Mitglied der Kanalfamilie zu finden ist. Das erste CAG-*repeat* ($^1[\text{CAG}]_n$) ist gering polymorph und enthält fast immer 12 CAGs. Das zweite CAG *repeat* ($^2[\text{CAG}]_n$) ist hochpolymorph, wobei die Länge zwischen 4 und 30 *repeats* variiert (mittlere Anzahl bei Kaukasiern: 19 *repeats*). Ausserdem enthält das erste Exon 768 bp untranslatierte Sequenz und die kodierende Sequenz für die

erste transmembranäre Domäne S1 des KCNN3. Exon 1 kodiert für die Domäne S2, Exon 3 für die Domänen S3, S4 und S5, Exon 4 für die P-Schleife und das äußere Drittel der Domäne S6, Exon 5 für die im Zytoplasma liegenden Anteile der Domäne S6 und Teile der Calmodulin-bindenden Domäne. Die Reste der Calmodulin-bindenden Domäne werden von den Exons 6-8 kodiert. Exon 8 enthält 297 bp kodierende und 562 bp untranslatierte Sequenz sowie mindestens zwei alternativ verwendete Signale zur Anheftung eines Poly(A)-Endes an die mRNA. Bei der Analyse der Introns wurde ein AC *repeat* im Intron 6 gefunden – ein weiterer möglicher Marker für Assoziations- und Kopplungsstudien mit *KCNN3*. In der 2261 bp umfassenden Region „stromaufwärts“ vom Transkriptionsstart liegen funktionelle Promotorelemente. Dort befinden sich auch zahlreiche potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, es wurden jedoch keine TATA-Elemente gefunden (Sun et al. 2001).

```

TCC TCT GGG GAT GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAA CAG CAG CAG
75
CAG CCA CCA CCG CCA GCG CCA CCA GCA GCC CCC CAG CAG CCC CTG GGA
                                KCNN3-IF CAG CAG CCC CTG GGA
CCC TCG CTG CAG CCT CAG CCT CCG CAG CTT CAG CAG CAG CAG CAG CAG
CCC TCG C→
CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CCA CCG CAT CCC CTG TCT CAG CTC
                                ←GAC AGA GTC GAG
GCC CAA CTC CAG AGC CAG CCC GTC CAC CCT GGC CTG CTG CAC TCC TCT
CGG GTT GAG G KCNN3-IR
                                312

```

Abb. 1: cDNA-Sequenz aus dem Exon 1 des *KCNN3* (UCSC Genome Browser on Human, July 1, 2003, Freeze)

Der gezeigte Ausschnitt enthält die beiden [CAG]_n-repeats (grau unterlegt). Das zur Amplifizierung verwendete Primerpaar KCNN3-IF/R ist kursiv gedruckt.

2.2.2 Proteinstruktur, Lokalisation und Funktion des KCNN3

1996 wurden von Köhler und seinen Mitarbeitern drei Mitglieder (hSK1, rSK2 und rSK3) einer bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntes Kaliumkanalfamilie kloniert und als SK-Kanäle (*small-conductance, calcium-activated potassium channels*, heutige Bezeichnung: KCNN-Kanäle) klassifiziert (Kohler et al. 1996). Alle von der *KCNN*-Genfamilie kodierten Kalzium-aktivierten Kaliumkanäle sind eng miteinander verwandt. Sie haben ein zu 80-90 Prozent übereinstimmendes Aminosäurenprofil im transmembranären Bereich und unterscheiden sich v.a. durch unterschiedliche Sequenz und Länge der N- und C-Termini (Kohler et al. 1996).

KCNN3 ist ein aus 736 Aminosäuren bestehendes integrales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 82025 Dalton. Es besteht aus sechs transmembranären alpha-helikalen Segmenten (S1-S6), einer charakteristischen P-Schleife zwischen S5 und S6 und zytosolischen N- und C-Termini. Die P-Schleife besitzt eine Betafaltblattstruktur und formt die Ionenpore. Im N-terminalen Bereich des Proteins liegen zwei Polyglutaminbereiche, die 25 Aminosäuren voneinander getrennt sind. KCNN3-Kanäle werden auf für sie charakteristische Art und Weise durch Apamin und Scyllatoxin blockiert (Fanger et al. 1999; Sun et al. 2001).

Kaliumkanäle sind Tetramere, die aus vier, meist homologen Untereinheiten aufgebaut sind (Alberts et al. 1995). Jede Untereinheit des KCNN3 bindet mit ihrem C-terminalen Ende an das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin, wodurch die Aktivität des Kanals spannungsunabhängig über die intrazelluläre Kalziumkonzentration reguliert wird (Xia et al. 1998). KCNN-Kanäle lösen bei einem intrazellulären Kalziumanstieg langsame hyperpolarisierende Nachpotentiale in Neuronen aus. (Intrazelluläre Kalziumanstiege können u.a. durch Aktionspotentiale mit nachfolgender Kalziumkanalöffnung aber auch durch Kalziummobilisierung über metabotrope Neurotransmitterrezeptoren erfolgen (Wolfart et al. 2001).) Untersuchungen an dopaminergen Neuronen des Mittelhirns zeigten, dass durch KCNN3 ausgelöste hyperpolarisierende

Nachpotentiale 50 ms nach Beendigung der Depolarisation ihren Höhepunkt erreichen und nach etwa 150 ms wieder verschwinden (Wolfart et al. 2001). Durch hyperpolarisierende Nachpotentiale werden wiederkehrende Aktionspotentiale inhibiert - ein Vorgang, der als „*spike-frequency adaption*“ bezeichnet und durch den die Antwort auf einen unverändert anhaltenden Reiz verringert wird (Xia et al. 1998). Dies ist äußerst wichtig für die normale Neurotransmission (Bond et al. 1999). Ausserdem werden NMDA-Rezeptoren durch hyperpolarisierende Nachpotentiale inaktiviert (Chandy et al. 1998). Erregbarkeit und Entladungsmuster zentraler Neurone werden also massgeblich durch KCNN-Kanäle reguliert.

Um die Verteilung des KCNN3 im menschlichen Gewebe festzustellen, wurden *Northern Blot* Analysen und *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Diese ergaben, dass die KCNN3-spezifische Expression hauptsächlich auf Gehirn, quergestreifte Muskulatur und lymphatisches Gewebe beschränkt ist. Innerhalb des Gehirns konnte eine hohe Intensität an KCNN3-mRNA in der Substantia nigra, der Area ventralis tegmentalis, den Basalganglien sowie in Hypothalamus, Hippocampus und Amygdala nachgewiesen werden. Geringere Intensität zeigte sich im zerebralen Kortex, im Kleinhirn und im Thalamus. KCNN3-Kanäle befinden sich also v.a. in dopaminergen Neuronen des mesolimbischen und nigrostriatalen Systems (Dror et al. 1999), es gibt jedoch auch dort Unterschiede in ihrer Verteilung und funktionellen Aktivität (Wolfart et al. 2001).

2.2.3 Assoziation des ²[CAG]_n-repeat-Polymorphismus des *KCNN3* mit neuropsychiatrischen Erkrankungen

Die bevorzugte Expression und funktionelle Bedeutung der KCNN3-Kanäle im Gehirn hat das *KCNN3* zu einem Kandidatengen für verschiedene neuropsychiatrische Erkrankungen werden lassen. Dabei wurde bisher besonderes Augenmerk auf den ²[CAG]_n-tragenden hochpolymorphen Bereich im Exon 1 gelegt. Bisher wurde die Assoziation zu Schizophrenie, bipolaren

affektiven Erkrankungen, Anorexia nervosa, idiopathischer generalisierter Epilepsie, Ataxie und Morbus Parkinson untersucht.

Da *KCNN3* sehr stark in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns exprimiert wird, wurde es bereits bei seiner Entdeckung als ein wichtiger Kandidatengenen für Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis angesehen (Chandy et al. 1998; Gargus et al. 1998). Dies wurde noch dadurch verstärkt, dass Schizophrenie mittels Kopplungsanalysen auf Chromosom 1q21-22 kartiert worden war (Brzustowicz et al. 2000). In den letzten Jahren wurden diesbezüglich zahlreiche Assoziationsstudien und Kopplungsanalysen durchgeführt, die kontrovers diskutierte Ergebnisse lieferten. In einigen Studien konnte nachgewiesen werden, dass längere $^2[CAG]_n$ -repeats signifikant häufiger bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen vorkommen (Bowen et al. 1998; Chandy et al. 1998; Dror et al. 1999; Wittekindt et al. 1998) Doch auch signifikant vermehrtes Auftreten kürzerer $^2[CAG]_n$ -repeats bei schizophrenen Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen wurde beobachtet (Stöber et al. 1998). In der großen Mehrzahl der Studien wurde allerdings keine positive Assoziation mit Schizophrenie gefunden (Antonarakis et al. 1999; Austin et al. 1999; Bonnet-Brilhault et al. 1999; Bowen et al. 2001; Chowdari et al. 2000; Hawi et al. 1999; Joober et al. 1999; Laurent et al. 2003; Meissner et al. 1999; Rohrmeier et al. 1999; Stöber et al. 2000; Tsai et al. 1999; Ujike et al. 2001; Wittekindt et al. 1998; Wittekindt et al. 1999). Einige Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Negativsymptomen bei Schizophrenie und längeren $^2[CAG]_n$ repeats (Cardno et al. 1999; Ritsner et al. 2002). Saleem und Mitarbeiter beobachteten, dass sich die Länge der beiden Allele bei schizophrenen Patienten stärker unterscheidet als bei Kontrollpersonen (Saleem et al. 2000).

Eine mögliche Assoziation zwischen der $^2[CAG]_n$ -repeat-Länge und bipolaren affektiven Erkrankungen wurde bisher nicht beobachtet (Hawi et al. 1999; Jin et al. 2001; Meira-Lima et al. 2001; Rohrmeier et al. 1999; Saleem et al. 2000; Ujike et al. 2001; Wittekindt et al. 1998).

Von Koronyo-Hamaoui und Mitarbeitern wurde in einer familienbasierten und einer Fall-Kontroll-Assoziationsstudie eine Assoziation zwischen langen $^2[CAG]_n$ -repeat-Allelen und Anorexia nervosa gefunden (Koronyo-Hamaoui et al. 2002).

In einer von Figueroa und Mitarbeitern durchgeführten Studie kamen bei Ataxiepatienten gehäuft lange $^2[CAG]_n$ repeats vor. 4,9% der Ataxiepatienten hatten Allele mit mehr als 21 CAG repeats. (Im Vergleich dazu haben weniger als 1% der Normalbevölkerung und der Schizophreniepatienten weltweit mehr als 21 CAGs (Figueroa et al. 2001).)

Es wurde bisher keine Assoziation des $^2[CAG]_n$ -repeat-Polymorphismus mit der Parkinsonkrankheit (Figueroa et al. 2001) oder der idiopathischen generalisierten Epilepsie gefunden (Sander et al. 1999).

2.3 Mikrosatelliten

Im menschlichen Genom gibt es eine Vielzahl von Basensequenzwiederholungen (repetitive Sequenzen) – häufig als sogenannte Satelliten-DNA in nicht-kodierenden Bereichen mit bislang ungeklärter Funktion. Basensequenzwiederholungen von 2 bis 10 Basenpaaren werden als Mikrosatelliten bezeichnet. Eine Sonderform der Mikrosatelliten stellen die „*triplet repeats*“ dar, die aus drei sich n-fach wiederholenden Nukleotiden (z.B. $[CAG]_n$) bestehen und häufig in kodierenden Bereichen vorkommen.

2.3.1 Mikrosatelliten als genetische Marker

Mikrosatelliten sind mehr oder weniger gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt. Dadurch dass es sich dabei um hochpolymorphe Bereiche handelt, die gewöhnlich unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion analysiert werden können, werden sie bevorzugt als genetische Marker für Kopplungs- und Assoziationsstudien und für das *DNA-fingerprinting* in der forensischen Medizin verwendet. (Löffler und Petrides 1998). Auch ein Großteil der bei der STS-

Markierung des menschlichen Genoms verwendeten Marker sind Mikrosatelliten.

Die Verteilung der Allelgrößen von Mikrosatelliten hängt von Mutationsprozessen und der demographischen Entwicklung einer Population ab (Andres et al. 2003; Kashi et al. 1997).

2.3.2 Die Rolle der *triplet repeats* bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen

Die Ursache einiger neurodegenerativer Erkrankungen liegt in der abnormen Vermehrung von *triplet repeats*, die innerhalb oder außerhalb des kodierenden Genabschnittes liegen können. Sie werden in zwei Formen eingeteilt: Typ-1-Erkrankungen (z.B. spinozerebellärer Ataxie (SCA) Typ 1, Chorea Huntington und spinobulbärer Muskelatrophie (SBMA)) sind eine pathologisch vermehrte Anzahl des Trinukleotids CAG im kodierenden Abschnitt des erkrankten Gens gemeinsam, die zu Polyglutaminbereichen in den entsprechenden Proteinen führt. Sie zeichnen sich durch dominanten Erbgang aus. Die Gruppe der Typ-2-Erkrankungen (z.B. Friedreich Ataxie und fragiles X-Syndrom) ist sehr heterogen. *Triplet-repeat*-Erkrankungen entstehen fast ausschließlich erst ab einer pathologischen Anzahl von etwa 40 Wiederholungen (Margolis et al. 1997; Perutz 1999). Einzige Ausnahme stellt bisher die SCA-6 dar, deren Ursache in einer Expansion von 21 bis 27 CAG *repeats* im *CACNA1A4* liegt. Die Normalbevölkerung trägt im Gegensatz dazu 4 bis 20 CAGs, so dass ein kontinuierlicher Übergang zwischen normalen und pathologischen Allelen entsteht, wobei schon ein einziges zusätzliches CAG *repeat* krankheitsauslösend sein kann (Matsuyama et al. 1997; Zhuchenko et al. 1997). Bei den meisten *triplet-repeat*-Erkrankungen wird beobachtet, dass sich die Krankheit von Generation zu Generation früher manifestiert und die Schwere mit steigender *repeat*-Länge zunimmt. Dies wird als Antizipation bezeichnet (Margolis et al. 1997).

Dass Mikrosatellitenbereiche eine wichtige Rolle in der Funktion normaler

Proteine spielen, zeigt sich darin, dass sie während des Evolutionsprozesses über weite Distanzen konserviert wurden (Kashi et al. 1997). Bei verschiedenen *triplet-repeat*-Erkrankungen sind zwar ganz unterschiedliche Gene betroffen, ihre auffälligen Gemeinsamkeiten wie beispielsweise die Tatsache, dass es bei fast allen Erkrankungen zur Neurodegeneration kommt, führten aber zur Suche nach gemeinsamen Pathomechanismen abnorm veränderter *triplet repeats*. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass *triplet repeats* je nach Lage im kodierenden oder nicht-kodierenden Genbereich unterschiedliche Funktionen erfüllen. Hinsichtlich der Pathomechanismen abnorm vermehrter CAG *repeats* und ihrer expliziten Neurotoxizität gibt es unterschiedliche Hypothesen:

[CAG]_n in einem kodierenden Genbereich führt zum n-fachen Einbau der Aminosäure Glutamin im exprimierten Protein. Polyglutaminbereiche verändern die Sekundärstruktur eines Proteins. Perutz nahm an, dass ab einer Schwelle von 35-40 CAG *repeats* abnorme Proteinkonformationen entstehen (Perutz 1999). In-vitro-Untersuchungen zeigten, dass diese Konformationsänderungen durch Anlagerung der Polyglutaminbereiche zur Bildung amyloidähnlicher Aggregate führt (Margolis und Ross 2001; Perutz 1996; Perutz 1999; Scherzinger et al. 1999). Die beobachteten Konformationsänderungen bei Proteinen mit Polyglutaminbereichen führten zur „*gain of function*“- Hypothese, bei der zwei verschiedene Mechanismen auf zellulärer Ebene in Erwägung gezogen werden: Zum einen könnte die Transkription beeinflusst werden. Auf direktem Weg könnte dies geschehen, wenn es sich um DNA-bindende Proteine handelt (Gerber et al. 1994), auf indirektem Weg über eine herabgesetzte Verfügbarkeit von Transkriptionskoaktivatoren, da von der Aggregatbildung auch Proteine mit vergleichsweise kleinen Polyglutaminbereichen betroffen sind, zu denen u.a. mehrere bekannte Transkriptionskoaktivatoren zählen. Zum anderen werden intrazelluläre amyloidähnliche Aggregate ubiquitiert und den Proteasomen zugeführt, sie können jedoch nur schwer abgebaut werden. Dadurch könnte deren proteolytische Aktivität erschöpft werden und es somit zum vermehrten Vorhandensein falsch

gefalteter oder beschädigter Proteine in einer Zelle kommen (Margolis und Ross 2001).

Im Gegensatz zur „*gain-of-function*“-Hypothese zielt das „*loss-of-function*“-Modell auf eine gestörte Funktion und Proteininteraktion von Proteinen mit abnormen Polyglutaminbereichen ab. So ist z.B. die Stimulierung des *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) durch Huntingtin herabgesetzt, wenn dieses durch Polyglutaminbereiche bei der Chorea Huntington pathologisch verändert ist (Zuccato et al. 2001).

Ein Beispiel dafür, wie vermehrtes Auftreten von CAGs die Genfunktion beeinflussen kann, ist die spinobulbäre Muskelatrophie: Ihr liegt eine $[CAG]_n$ -Expansion im ersten Exon des Androgenrezeptors (AR) zugrunde. Es konnte gezeigt werden, dass dies zu einer verminderten AR-mRNA- und AR-Protein-Expression führt. Ausserdem ist die Androgenbindungskapazität des Androgenrezeptors herabgesetzt (Choong et al. 1996).

$[CAG]_n$ in nicht-kodierenden Genbereichen (z.B. in Promotorregionen oder in regulatorischen Verstärkerelementen (*enhancer*)) könnten die Regulation der Genexpression nachhaltig beeinflussen.

2.3.3 Methoden zum Nachweis von Mikrosatelliten-Längenpolymorphismen

Um *triplet-repeat*-Längenpolymorphismen zu detektieren, muss die angewandte Methode sensitiv genug sein, um Nukleotiddifferenzen von minimal drei Basenpaaren unterscheiden zu können. Durch den vielfältigen Einsatz hochpolymorpher Mikrosatelliten als genetische Marker in der Molekulargenetik und beim *DNA-fingerprinting* in der forensischen Medizin sind Methoden zum einfachen, schnellen und kostengünstigen Nachweis der Anzahl von Mikrosatelliten-*repeats* von besonderem Interesse. Zunächst sollen die beiden

bisher am häufigsten angewandten Methoden, die diese Forderungen in unterschiedlichem Maße erfüllen, kurz umrissen werden:

Die wohl am häufigsten eingesetzte Methode, um Mikrosatelliten-Längendifferenzen zu bestimmen, ist eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit nachfolgender Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Detektierung mittels Autoradiographie. Dabei wird der Mikrosatelliten-tragende DNA-Abschnitt zunächst mittels einer PCR amplifiziert. Danach schließt sich die vertikale elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte auf denaturierenden Polyacrylamidgelen an. Die radioaktiv markierten PCR-Produkte werden schließlich autoradiographisch nachgewiesen. Um die Allelgrößen zu bestimmen, werden sie mit einem Längenstandard verglichen, der aus Fragmenten mit bekannter (durch Sequenzierung bestimmter) Mikrosatelliten-Länge erstellt wurde (Boormann et al. 2002).

Alternativ dazu kommt auch die *Automated Fragment Analysis Method* zum Einsatz. Dabei werden die Mikrosatelliten-tragenden DNA-Abschnitte unter Verwendung von *FAM (6-carboxy-fluorescein)*-markierten Primern mittels PCR amplifiziert. Ausserdem muss ein „Markermix“ erstellt werden, der als spezifischer Größenstandard dient. Dazu werden einige wenige DNA-Proben mit bekannter Mikrosatelliten-Größe mittels *ROX (6-carboxy-x-rhodamine)*-markierter Primer vervielfältigt und anschließend durch Mischung gleicher Mengen zu einem einzigen „Markermix“ verarbeitet. Den *FAM*-markierten PCR-Produkten unbekannter Länge werden deionisiertes Formamid und Markermix zugefügt, dann werden sie in einem automatischen *DNA-Sequencer* auf Basis der Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mittels geeigneter Software analysiert. Zu beachten ist, dass *ROX*-markierte Fragmente langsamer im elektrischen Feld wandern als *FAM*-markierte Fragmente mit gleicher DNA-Sequenz, so dass alle von der Software ermittelten Ergebnisse um einen durch direkte Sequenzierung zu ermittelnden Basenpaarunterschied korrigiert werden müssen (Boormann et al. 2002).

Im Vorfeld des experimentellen Teils dieser Arbeit stellte sich die Frage, welche neuen Methoden den bisher eingesetzten Standardmethoden beim Nachweis der *triplet-repeat*-Längenpolymorphismen überlegen sein könnten. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf zwei Methoden gelegt, die bisher nur bei anderen Fragestellungen zum Einsatz kamen, sich dort aber als äußerst sensitiv erwiesen. Dies ist zum einen die *Real-Time*-PCR mit Schmelzkurvenanalyse und zum anderen eine PCR mit nachfolgender vertikaler PAGE und Detektierung mittels *SYBR-Gold*-Färbung.

Bei der *Real-Time*-PCR wird die Quantität der durch PCR amplifizierten Matrizen mittels fluoreszierender Moleküle (Fluorophore) direkt - d.h. während des Amplifizierungsvorgangs - abgelesen. Die Fluorophore können entweder an sequenzspezifische Oligonukleotide endständig gekoppelt sein oder aber zwischen doppelsträngige Nukleinsäuren interkaliert werden. *SYBR-Green* ist beispielsweise ein interkalierendes Fluorophor, das 50-100 Mal stärker beim Vorhandensein doppelsträngiger DNA fluoresziert. In Abhängigkeit von der Quantität der amplifizierten Nukleinsäure steigt die Fluoreszenzintensität an. Somit kann die ursprünglich eingesetzte Menge an *template* (z.B. DNA) bestimmt werden. (Müller 2001). Diese Methode wird zur Zeit u.a. dazu verwendet, mRNA-Expressionsniveaus oder virale Titer zu messen (Ginzinger 2002).

Bei der Schmelzkurvenanalyse eines mittels PCR amplifizierten dsDNA-Abschnittes wird direkt im Anschluss an die PCR die Fluoreszenz des interkalierenden Fluorophors während eines kontinuierlichen Temperaturanstiegs- bzw. abfalls gemessen. Bei Erreichen der Denaturierungstemperatur nimmt die Fluoreszenzaktivität stark ab. Die Schmelztemperaturen sind dabei von Länge, G/C-Gehalt und Sequenz des DNA-Abschnittes abhängig (Ririe et al. 1997). Schmelzkurvendaten werden gewöhnlich auf zweierlei Arten graphisch dargestellt: Entweder wird die Fluoreszenz gegen die Temperatur (F über T) oder es wird die erste negative Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur ($-dF/dT$ über T) aufgetragen.

Bei ersterer stellt sich das Erreichen der Schmelztemperatur des PCR-Produkts als scharfer Abfall der Kurve dar, bei letzterer als *peak*.

Die Schmelzkurvenanalyse setzt man z.B. bei der Alleldiskrimination von *single nucleotide* Polymorphismen (*SNPs*) oder Insertions-/Deletionspolymorphismen ein (Lin et al. 2001; Sanders Sevall 2001).

Nukleinsäuren können mittels interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe sichtbar gemacht werden. Der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR-Gold* weist bei der Detektierung von dsDNA, ssDNA und RNA eine höhere Sensitivität als die alternativen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffe Ethidiumbromid oder *SYBR-Green I* bzw. *II* auf und durchdringt hochprozentige, dicke Gele gut. Interkaliertes *SYBR-Gold* wird bei einer Wellenlänge von 300nm und 495nm maximal zum Fluoreszieren angeregt und lässt sich somit mit gängigen UV-Transilluminatoren betrachten. Da die Gelmatrix *SYBR-Gold*-gefärbter Gele eine sehr geringe Hintergrundfluoreszenz hat, die gefärbten Nukleinsäurebanden aber stark fluoreszieren, lassen sich gute Ergebnisse bei der Darstellung der Nukleinsäurebanden erzielen. Ein weiterer Vorteil dieses Farbstoffes besteht darin, dass er nachfolgendes *Northern* oder *Southern Blotting* sowie enzymatische Reaktionen nicht behindert. (Tuma et al. 1999). Aufgrund dieser günstigen Eigenschaften ist *SYBR-Gold* prinzipiell gut zur Detektierung von Nukleinsäuren geeignet.

2.4 Assoziationsstudien bei komplex vererbten Erkrankungen

Multifaktorielle Erkrankungen gehorchen nicht den Gesetzen der klassischen Mendelschen Vererbung, sondern werden polygen vererbt. Man nimmt an, dass es dann, wenn bestimmte genetische und umweltbedingte Faktoren zusammentreffen und ihre Anzahl oder Stärke eine bestimmte Schwelle überschreitet, zum Ausbruch einer Erkrankung kommt (McGuffin 1999). Dabei übt bei komplex vererbten Erkrankungen jedes Gen nur einen kleinen Effekt aus und es liegt eine grosse genetische Heterogenität vor (Hardy 2002).

Zur genetischen Untersuchung komplexer Erkrankungen eignen sich klassische Kopplungsanalysen nur schlecht, da bei diesen vorausgesetzt wird, dass der Erbgang bekannt ist und das betroffene Gen einen überwiegenden Effekt auf den Phänotyp ausübt (Risch und Merikangas 1996). Stattdessen verwendet man eher sogenannte nicht-parametrische Methoden, zu denen unter anderem Assoziationsstudien im Fall-Kontroll-Design, im „Trio“-Design (betroffenes Kind mit Eltern) oder Design der *affected sib-pair analysis* gezählt werden (Weeks und Lathrop 1995).

In allelischen Assoziationsstudien wird die Häufigkeit polymorpher Markerallele bei Individuen mit einem bestimmten Phänotyp im Vergleich zu Individuen ohne diesen untersucht. Sie können als Fall-Kontroll-Studien oder familienbasiert durchgeführt werden. Das Markerallel kann dabei entweder mit dem Krankheitsgen gekoppelt oder selbst krankheitsverursachend sein (Gorwood 1999). Positive Assoziation bedeutet *per definitionem*, dass ein Markerallel tatsächlich ein Risikoallel für eine bestimmte Erkrankung darstellt, wenn es in der Fallgruppe signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe vorkommt (Hardy 2002).

Eines der Hauptprobleme klassischer Fall-Kontroll-Studien stellen falsch positive Assoziationen aufgrund von Stratifizierungseffekten einer Population dar. Um diesem Problem zu begegnen, wurden im Verlauf der letzten Jahre neue statistische Methoden entwickelt. Dabei sind vor allem die von Falk und Rubinstein 1987 entwickelte „haplotype relative risk“ –Methode (HRR) und der von Spielman et al. 1993 eingeführte „transmission disequilibrium test“ (TDT) zu nennen (Schulze und McMahon 2002).

3 Zielsetzung

KCNN3 ist aufgrund seiner Lage auf Chromosom 1q21.3 – einem mit FHM gekoppelten Genabschnitt - und der funktionellen Bedeutung und Lokalisation seines Genprodukts ein Kandidatengen für Migräne. Da es sich bei Migräne um eine Erkrankung mit komplexer Vererbung handelt, eignen sich bevorzugt Assoziationsstudien zur Erforschung ihrer genetischen Grundlagen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Polymorphismus des ²[CAG]_n-tragenden Abschnittes im Exon 1 des *KCNN3* in einer Fall-Kontroll-Studie auf Assoziation mit Migräne mit und ohne Aura zu testen. Dazu sollte das genetische Material von insgesamt 190 Migränepatienten und 232 Kontrollpersonen untersucht werden. MO- und MA-Patienten sollten als Fallgruppen sowohl zusammengefasst als auch getrennt betrachtet werden, um mögliche Hinweise auf genetische Unterschiede zu erhalten. Hauptaugenmerk sollte auf die Verteilung der Allel- und Genotypfrequenzen und das Vorkommen bestimmter Risikoallele gelegt werden.

Um *triplet-repeat*-Längenpolymorphismen nachzuweisen, waren bisher standardmäßig entweder eine PCR mit PAGE und nachfolgender Detektion mittels Autoradiographie oder aber die *Automated Fragment Analysis Method* angewandt worden.

Ziel des methodischen Teils dieser Arbeit war es, neue Methoden zum Nachweis von *triplet-repeat*-Längenpolymorphismen zu etablieren. Es sollte versucht werden, alternative Methoden zu finden, bei denen kein radioaktives Material verwendet wird und mit denen ein unkomplizierter, schneller, möglichst kostengünstiger Nachweis erzielt werden kann. Ebenso musste ausreichende Sensitivität als Kriterium erfüllt werden. Die *Real-Time*-PCR mit Schmelzkurvenanalyse und eine PCR mit PAGE und *SYBR-Gold*-Färbung schienen dafür potentiell geeignet zu sein und sollten daher neben der herkömmlichen PCR mit PAGE und nachfolgender Detektion mittels Autoradiographie vergleichend eingesetzt werden.

4 Patienten, Material und Methoden

4.1 Patienten- und Kontrollgruppe

Die Patientengruppe bestand aus insgesamt 190 Migränepatienten, davon 151 weibliche (w) und 39 männliche (m) mit einem Durchschnittsalter von 44,9 Jahren. Dabei wurde zwischen Patienten unterschieden, die an Migräne ohne Aura (81 w, 16 m; Durchschnittsalter: 44,4 Jahre) und mit Aura (70 w, 23 m; Durchschnittsalter: 45,4 Jahre) litten. Alle Patienten wurden mittels eines standardisierten Kopfschmerzfragebogens befragt und vollständig neurologisch untersucht. Zur Diagnosestellung wurden die Kriterien der *International Headache Society* herangezogen (siehe 2.1.2.). Anamnese, neurologische Untersuchung, Diagnosestellung und Blutentnahme wurden in der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg durchgeführt.

Die Kontrollgruppe bestand aus insgesamt 232 Individuen (148 w, 84 m; Durchschnittsalter: 48,6 Jahre). Bei 113 Kontrollpersonen (86 w, 27 m; Durchschnittsalter: 65,0 Jahre) wurde Kopfschmerz anamnestisch ausgeschlossen (migränefreie Kontrollen), die restlichen 119 Kontrollpersonen (62 w, 57 m; Durchschnittsalter: 32,2 Jahre) waren Blutspender. Das Probenmaterial der Kontrollpersonen wurde ebenfalls an der Universitätsklinik Würzburg gewonnen.

Alle Individuen der Patienten- und Kontrollgruppe waren kaukasischer Abstammung. Die Studie wurde von der örtlichen Ethikkommission genehmigt, alle Personen nahmen freiwillig und informiert daran teil.

4.2 Materialien und Geräte

4.2.1 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von MWG-Biotech (Eberstadt) synthetisiert. (Die Primersequenz der Primer KCNN3-I-F und KCNN3-I-R

entsprach den von Austin und Mitarbeitern veröffentlichten Primersequenzen (Austin et al. 1999.)

Bezeichnung	Primersequenz (5'→3')	Produktgröße (bp)		T_M (°C)	GC-Anteil (%)
		maximal ([CAG] ₁₂)	minimal ([CAG] ₂₄)		
KCNN3-I-F	CAGCAGCCCCTGGGACCCTCGC	115	151	71,4	77,3
KCNN3-I-R	GGAGTTGGGCGAGCTGAGACAG			65,8	65,8
KCNN3-Ia-F	CAGCCTCAGCCTCCGCAGCTT			65,7	66,7
KCNN3-Ia-R1	CTGAGACAGGGGATGCGGTGG	78	114	65,7	66,7
KCNN3-Ia-R2	TGGAGTTGGGCGAGCTGAGACA	92	128	64,0	59,1

4.2.2 Enzyme

Enzym	Hersteller	Verwendung
Taq DNA Polymerase	Eurogentec (Seraing, Belgien)	PCR-Reaktionslösungen
Pronase E	AppliChem (Darmstadt)	DNA-Extraktion

4.2.3 Radioaktives Material

Radioaktive Lösung	Hersteller	Verwendung
[alpha-P ³²]dCTP (Aktivität: 10 MBq in 27 µl)	Hartmann Analytic (Braunschweig)	Radioaktiv-PCR-Reaktionslösung

4.2.4 Puffer und Lösungen

denaturierender Stopppuffer: 1,5 ml Glycerol
25 mg Bromphenolblau-Xylenecyanol
10 ml H₂O

Stopppuffer: 97,5 % deionisiertes Formamid
0,03 % Bromphenolblau
0,03 % Xylenecyanol
10 mM EDTA (pH 7,5)

0,5xTBE-Puffer: 0,045 M Tris-Borat
0,001 M EDTA

1xTAE-Puffer: 0,04 M Tris-Acetat
0,001 M EDTA

1xTE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH8
0,1 mM Na₂EDTA

10 mM MgCl₂-Puffer : 500 mM KCl
100 mM Tris-HCl (pH 8,3)
0,25% Tween 20
0,25 mg/ml BSA
10 mM MgCl₂

Lysispuffer: 155 mM NH₄Cl
10 mM KHCO₃
0,1 mM Na₂EDTA

Kernlysispuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8)
400 mM NaCl
2 mM Na₂EDTA

6 %-ige Acrylamidstammlösung: 120 ml Sequenziergel Konzentrat
50 ml Sequenziergel Puffer Konzentrat
330 ml Sequenziergel Verdünner

12 %-ige Acrylamidstammlösung: 96 ml Sequenziergel Konzentrat
20 ml Sequenziergel Puffer Konzentrat
84 ml Sequenziergel Verdünner

SYBR-Gold-Färbelösung: 25 µl SYBR Gold
250 ml 1xTBE-Puffer

4.2.5 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Verwendung
0,5 M EDTA (pH 8,0)	AppliChem (Darmstadt)	TAE-Puffer, TBE-Puffer
10 mM EDTA (pH 7,5)	Pharmacia Biotech (Freiburg)	Stop Solution
100-Basenpaarleiter (DNA-Längenstandards XIV))	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)	Agarosegelelektrophorese
2-Propanol	Merck (Darmstadt)	DNA-Extraktion
96 %-iges Ethanol	AppliChem (Darmstadt)	DNA-Sequenzierung
97,5 % deionisiertes Formamid	Pharmacia Biotech (Freiburg)	Stopppuffer

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendung</i>
ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Original)	ABI Prism (Foster City, USA)	Sequenziermix
Ammoniumpersulfat (10 %)	AppliChem (Darmstadt)	Herstellung der PAA-Gele
Borsäure	AppliChem (Darmstadt)	TBE-Puffer
Bromphenolblau	Pharmacia Biotech (Freiburg)	Stoppuffer
BSA (bovines Serumalbumin)	New England BioLabs (Schwabach)	PCR-Puffer
dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Promega (Mannheim)	PCR-Reaktionslösung
Ethidiumbromidlösung (1 %)	Roth (Karlsruhe)	Anfärben der Agarosegele
Glycerol	Pharmacia Biotech (Freiburg)	Puffer- und Stammlösungen
H ₂ O (Aqua dest.)	Merck (Darmstadt)	Puffer- und Stammlösungen; molekularbiologische Reaktionsansätze
IQ SYBR Green Supermix	BioRad (München)	Realtime-PCR-Reaktionslösung
KCl	Pharmacia Biotech (Freiburg)	Puffer- und Stammlösungen
KHCO ₃	Pharmacia Biotech (Freiburg)	Puffer- und Stammlösungen
MgCl ₂	Pharmacia Biotech (Freiburg)	Puffer- und Stammlösungen
Na ₂ EDTA	Pharmacia Biotech (Freiburg)	Puffer- und Stammlösungen
Na-Acetat	AppliChem (Darmstadt)	DNA-Sequenzierung
NaCl	Pharmacia Biotech (Freiburg)	Puffer- und Stammlösungen
NH ₄ Cl	Pharmacia Biotech (Freiburg)	Puffer- und Stammlösungen
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	Quiagen (Hilden)	DNA-Sequenzierung
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Quiagen (Hilden)	DNA-Sequenzierung
SDS (sodium deodecyl sulfate)	Sigma (Steinheim)	DNA-Extraktion
SeaKem LE Agarose	BMA (Bio Whittaker Molecular Applications)	Herstellung der Agarosegele
Sequenziergel Konzentrat	Roth (Karlsruhe)	Herstellung der PAA-Gele
Sequenziergel Puffer Konzentrat	Roth (Karlsruhe)	Herstellung der PAA-Gele
Sequenziergel Verdünner	Roth (Karlsruhe)	Herstellung der PAA-Gele
SYBR Gold nucleic acid gel stain	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)	Anfärben der PAA-Gele

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendung</i>
TEMED (N,N,N',N'-Tetra-methylethyldiamine)	Sigma (Steinheim)	Herstellung der PAA-Gele
Tris-Base	AppliChem (Darmstadt)	TAE-Puffer, TBE-Puffer
Tris-HCl	AppliChem (Darmstadt)	Puffer- und Stammlösungen
<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendung</i>
Tween 20	Sigma (Steinheim)	PCR-Puffer
Xylene Cyanol	Pharmacia Biotech (Freiburg)	Stopppuffer

4.2.6 Verbrauchsmaterialien

<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Verwendung</i>
Abstandhalter	Peqlab (Erlangen)	PAGE
Fließpapier	Hartenstein (Würzburg)	PAGE mit Autoradiographie
Filmexponierungskassetten: AMPLI II universal	Philips (Hamburg)	Autoradiographie
Glasplatten	Peqlab (Erlangen)	PAGE
Kämme	Peqlab (Erlangen)	PAGE
Röntgenfilme: Fuji Medical X-ray film (100 NIF, 30x40 cm)	Fujifilm (Düsseldorf)	Autoradiographie
SYBR Gold Filter	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)	SYBR-Gold-PAGE

4.2.7 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Fabrikat</i>	<i>Hersteller (Ort)</i>	<i>Verwendung</i>
Elektrophorese-kammern:	BaseAce Vertical Gel Box	Stratagene (Heidelberg)	Radioaktiv-PAGE
	Easy Cast (Model: B2)	OWL Separation Systems (Portsmouth, USA)	Agarosegelelektrophorese
	Model P9DS	OWL Separation Systems (Portsmouth, USA)	SYBR-Gold-PAGE
Photometer:	BioPhotometer	Eppendorf AG (Hamburg)	Messen der DNA-Konzentrationen
Sequencer:	310 Genetic Analyzer	ABI PRISM (Weiterstadt)	DNA-Sequenzierung

Gerät	Fabrikat	Hersteller (Ort)	Verwendung
Spannungsgeräte:	2197 Power Supply	LKB Bromma (Freiburg)	Radioaktiv-PAGE
	ECPS 3000/150	Pharmacia (Freiburg)	SYBR-Gold-PAGE
	Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia (Freiburg)	Agarosegelelektrophorese
Thermocycler:	iCycler	BioRad (München)	Realtime-PCR und Schmelzkurvenanalyse
	UNO-Thermoblock	Biometra (Göttingen)	Standard- und Radioaktiv- PCR
UV-Transilluminator:	Fluo_Link (TFL-20M, 312 nm)	MWG Biotech (Eberstadt)	Betrachtung der gefärbten Gele
Vakuum- Geltrockner:	PHERO-TEMP	BIOTEC-Fischer (Reiskirchen)	Radioaktiv-PAGE
Zentrifugen:	Hettich Mikroliter Typ 2041	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)	DNA-Sequenzierung
	RC5C	Sorvall Instruments (Langenselbold)	DNA-Extraktion

4.2.8 Software

Experimenteller Teil:

- Gene Runner Version 3.05
- Sequencing Analysis Version 3.4
- iCycler iQ™ Multi-Color Real Time PCR Detection System

Statistische Auswertung:

- FastEHPlus
- SAS package 8.1

4.3 Experimentelle Methoden

4.3.1 Isolierung humaner genomischer DNA aus Vollblut

Eine Möglichkeit, genetisches Material als Grundlage für molekularbiologische Untersuchungen an Patienten zu gewinnen, besteht darin, die im Zellkern von Leukozyten enthaltene DNA als Träger der Erbinformation von allen übrigen

Zellkomponenten zu isolieren. Zunächst werden die kernhaltigen Zellen lysiert, die DNA von Zellbestandteilen getrennt und assoziierte Proteine proteolytisch verdaut. Nach erfolgter Proteolyse muß die DNA mittels Salzextraktion von Proteinen gereinigt und mit Ethanol ausgefällt werden (Surzycki 2000).

10 ml frisches EDTA-Blut wurden in einem Falconröhrchen mit 30 ml Lysispuffer versetzt, vorsichtig gemischt, 15 Minuten lang auf Eis inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 4 °C mit 1500 rpm zentrifugiert. Nach dem Abkippen des Überstandes wurden nacheinander 10 ml Kernlysispuffer, 650 µl 10%-iges SDS und 500 µl tiefgekühlte Pronase E zum *pellet* gegeben, gut durchmischt und bei 37 °C zwölf Stunden inkubiert. Daraufhin wurden 3,5 ml gesättigte 6 M NaCl-Lösung hinzugegeben, 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt und die Lösung zwei- bis viermal je 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 4000 rpm zentrifugiert, wobei jeweils nach dem Abzentrifugieren der Überstand vorsichtig in ein neues Röhrchen abgekippt und das *pellet* verworfen wurde. Die im Überstand verbleibende DNA wurde mit 7,5 ml 2-Propanol ausgefällt, mit einem sterilen Glashäkchen herausgefischt, in 500 µl 1xTE-Puffer gelöst und 12 Stunden lang bei Raumtemperatur durchmischt. Die isolierte DNA wurde daraufhin im Gefrier- bzw. Kühlschrank aufbewahrt.

4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird dazu verwendet, einen bestimmten DNA-Abschnitt zu vervielfältigen. Der Reaktionsansatz enthält neben der DNA-Matrize zwei Oligonukleotid-Primer (*forward* und *reverse*), die jeweils spezifisch an einem der beiden Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes binden, eine Mischung der vier Desoxynukleotidtriphosphate, Reaktionspuffer, Magnesium und eine thermostabile DNA-Polymerase. Nachdem die doppelsträngige DNA bei 95 °C denaturiert wurde, werden in immer wiederkehrenden Temperaturzyklen folgende Schritte durchlaufen: Anlagerung der Primer (Primer-spezifische *Annealing*-Temperatur), Synthese der neuen DNA-Stränge durch Verlängerung der Primer (72 °C), Denaturierung der DNA-

Matrize (95 °C). Nach n-facher Wiederholung der Zyklen erhält man theoretisch etwa 2^n Kopien des zwischen den Primerpaaren liegenden DNA-Abschnitts, die einer weitergehenden Analyse zur Verfügung stehen (Dingermann 1999).

4.3.2.1 Standard-PCR

Der Standard-PCR-Reaktionsansatz zur Vervielfältigung des 2 [CAG]_n-tragenden Abschnitts im Exon 1 des *KCNN3*-Gens enthielt folgende Reagenzien:

<i>Reagenzien</i>	<i>Menge</i>
10 mM MgCl ₂ -Puffer	2,5 µl
dNTPs (je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	1 µl
Taq-Polymerase (0,5 U)	1 µl
Primer forward: KCNN3-I-F (10 pmol/µl)	1 µl
Primer reverse: KCNN3-I-R (10 pmol/µl)	1 µl
DNA	3 µl
H ₂ O	15,5 µl

In einem *Thermocycler* wurde der Reaktionsansatz folgendem Temperaturprofil ausgesetzt:

<i>Schritte</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeitdauer</i>	<i>Vorgang</i>
1.	95 °C	5 Min.	Initiale Denaturierung
2.	95 °C	45 Sek.	Denaturierung der DNA-Matrize
3.	71,5 °C	45 Sek.	Anlagerung der Primer (<i>Annealing</i>)
4.	72 °C	45 Sek.	DNA-Synthese
5.	72 °C	5 Min.	Letzte DNA-Synthese

Die Schritte 2.-4. wurden 35 Mal wiederholt.

4.3.2.2 Radioaktiv-PCR

Soll das PCR-Produkt mittels Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und anschließend durch Autoradiographie dargestellt werden, muß dem PCR-Reaktionsansatz ein radioaktiv markiertes dNTP beigefügt werden.

Dem Standard-PCR-Reaktionsansatz (siehe 4.3.2.1) wurde pro 25 µl Gesamtvolumen 0,2 µl [α -P³²]dCTP (Aktivität: 10 MBq (270 µCi) in 27 µl) beigemischt.

4.3.3 Elektrophoretische Auftrennung und Nachweis von DNA-Fragmenten

Verschieden große Nucleinsäuren tragen eine Ladung, die proportional zur jeweiligen Moleküllänge ist. Dadurch können sie durch Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit von linearer doppelsträngiger DNA ist in einem bestimmten Bereich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Anzahl ihrer Nucleotidpaare. Sie wird außerdem von Konzentration und Vernetzungsgrad der Gelmatrix beeinflusst. Als Gelmatrix werden häufig Agarosegele oder Polyacrylamidgele verwendet. Die DNA-Fragmente werden in „Geltaschen“ aufgetragen. Dann legt man eine Gleichspannung an das Gel an, so dass die negativ geladenen DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell auf die Anode zuwandern und somit aufgetrennt werden. Nach der Elektrophorese können die DNA-Fragmente mittels Anfärbung oder Autoradiographie sichtbar gemacht werden (Dingermann 1999; Sambrook und Russell 2001).

4.3.3.1 Horizontale Agarosegelelektrophorese und Nachweis mittels Ethidiumbromidfärbung

Mit Agarosegelen unterschiedlicher Konzentration lassen sich DNA-Fragmente im Bereich von 100 bp bis 15000 bp auftrennen (Dingermann 1999).

Zur Herstellung eines Agarosegels wird die der gewünschten Gelkonzentration entsprechende Agarosemenge in 50 ml 1xTAE-Puffer gelöst und aufgeköcht, bis die Lösung klar ist. Nach Abkühlung auf etwa 50 °C gibt man 2 µl Ethidiumbromid zu, gießt die Agaroselösung in eine Gelkammer und setzt einen Kamm zum Formen der Geltaschen ein. Die Taschen des erstarrten Gels werden in eine mit 1xTAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer mit dem Gemisch aus DNA-Fragment und Stopppuffer (Mischungsverhältnis: 5:1) beladen. Bei einer Gleichspannung von 90 V (Laufzeit: etwa 30 Minuten) werden die DNA-Fragmente aufgetrennt. Nach der Elektrophorese lassen sich die DNA-Banden auf dem UV-Transilluminator bei 254 nm durch oranges Fluoreszieren des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar machen, abfotografieren und evtl. mit einem ebenfalls auf das Gel aufgetragenen DNA-Längenstandard vergleichen (Sambrook und Russell 2001; Surzycki 2000).

Zur Darstellung des 2 [CAG]_n-tragenden DNA-Abschnitte im Exon 1 des KCNN3-Gens wurden 3%-ige Agarosegele verwendet.

4.3.3.2 Vertikale Polyacrylamidgelelektrophorese und Nachweis mittels Autoradiographie

Polyacrylamidgele (PAA-Gele) sind engmaschiger als Agarosegele und somit bei der Auftrennung von Molekülen im unteren Molekulargewichtsbereich überlegen. Mit PAA-Gelen können DNA-Fragmente mit einem Längenunterschied von nur einem Basenpaar aufgetrennt werden (Dingermann 1999).

Zur Acrylamidstammlösung werden TEMED und APS gegeben, die die Polymerisationsreaktion der Acrylamidmonomere katalysieren. Die Gellösung wird zügig und luftblasenfrei zwischen zwei durch Kunststoffstreifen (Abstandhalter) getrennte, abgeklammerte Glasplatten gegossen. Zum Formen der Geltaschen wird ein Kamm eingesetzt. Nachdem das Gel auspolymerisiert ist, wird es in eine mit 1xTBE-Puffer gefüllte vertikale Elektrophoresekammer

eingespannt und mit DNA-Fragment beladen. Das doppelsträngige DNA-Fragment war zuvor mit denaturierendem Stopppuffer versetzt und anschließend 8 Minuten lang im Wasserbad bei 95 °C denaturiert worden.

Nach der Elektrophorese kann die Lokalisierung der DNA-Banden mittels Autoradiographie erfolgen. Das dem PCR-Reaktionsansatz zugesetzte radioaktiv markierte dNTP, das während des Amplifizierungsvorgangs der PCR in jedes neu synthetisierte DNA-Fragment mit eingebaut wurde, schwärzt direkt oder indirekt einen Röntgenfilm und detektiert somit alle DNA-Banden. Bei der „direkten Autoradiographie“ geschieht dies durch die beim radioaktiven Zerfall schwacher bis mittelstarker β -Strahler (z.B. ^3H , ^{35}S) entstehende Strahlung, bei der „indirekten Autoradiographie“ schwärzen Lichtquanten den Röntgenfilm, die von fluoreszierenden, auf Verstärkerfolien aufgetragenen Chemikalien durch die radioaktive Strahlung eines energiereicheren β -Strahlers (z.B. ^{32}P) freigesetzt werden (Dingermann 1999; Tuma et al. 1999).

Um die 115-151 bp umfassenden *KCNN3*-DNA-Fragmente entsprechend ihrer Anzahl an CAG *repeats* aufzutrennen, wurden 6 %-ige denaturierende PAA-Gele verwendet. Sie enthielten 100 ml 6 %-ige Acrylamidstammlösung, 700 μl APS(10 %) und 100 μl TEMED. Die Dicke der Abstandhalter (und somit die Geldicke) betrug 0,4 mm, die Gele waren 37,5x44 cm groß. Zum Formen der Geltaschen wurden Haifischzahnkämme verwendet. Die Geltaschen wurden mit 5 μl denaturierter DNA-Fragment-Lösung (bestehend aus PCR-Produkt (mittels [α - P^{32}]dCTP radioaktiv markiert, siehe 4.3.2.2) und denaturierendem Stopppuffer im Verhältnis 1:2) beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer bei 1800 V Gleichspannung (Stromstärke: 100 mA , Leistung: 40 Watt, Laufzeit: etwa 2,25 Stunden). Danach wurde das Gel auf Fließpapier transferiert, mit Frischhaltefolie bedeckt, auf einem Vakuum-Geltrockner bei 80 °C ca. 2,5 Stunden getrocknet und mehrere Tage in einer mit Verstärkerfolie versehenen Röntgenfilmkassette auf einen Röntgenfilm exponiert. Auf dem entwickelten Röntgenfilm

(Autoradiogramm) waren schließlich die aufgetrennten DNA-Banden sichtbar (siehe Abbildung 2).

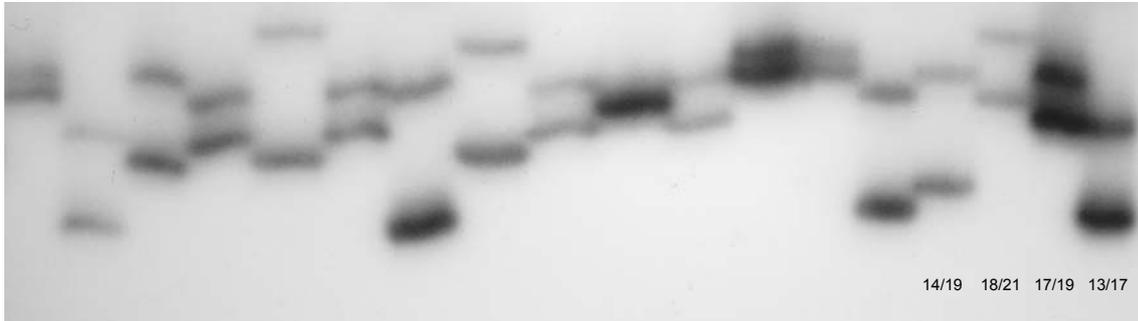


Abb. 2: Autoradiogramm

Zur Bestimmung der Allelgrößen wurden die mittels PCR vervielfältigten 115-151 bp umfassenden *KCNN3*-DNA-Fragmente durch vertikale PAGE aufgetrennt und anschließend autoradiographisch sichtbar gemacht. Die vier rechten Spuren wurden bei jeder PAGE mit aufgetragen und waren somit auf jedem Autoradiogramm als Größenstandard sichtbar (Allel1/Allel2).

4.3.4 DNA-Sequenzanalyse

Um die Basenabfolge in DNA-Fragmenten zu bestimmen, wird heute die von Sanger und Mitarbeitern 1977 entwickelte Kettenabbruchmethode in modifizierter Form angewandt:

Das Grundprinzip der als „*cycle-sequencing*“ bezeichneten Sequenziermethode besteht darin, in Zyklen ähnlich wie bei einer normalen PCR ein zum zu sequenzierenden DNA-Abschnitt komplementären Strang in Gegenwart der vier spezifischen Didesoxynukleotid-Triphosphate (ddNTPs) zu synthetisieren. Die ddNTPs führen an den eingebauten Stellen zu einem Kettenabbruch, so dass DNA-Fragmente aller statistisch möglichen Fragmentgrößen entstehen. Die in vier Reaktionsansätzen (mit jeweils einem der vier ddNTPs) entstandenen DNA-Fragmente können auf einem Sequenzierungsgel elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch (bei Einsatz radioaktiv markierter ddNTPs) sichtbar gemacht werden. Somit kann die Sequenz abgelesen werden.

Bei der automatisierten DNA-Sequenzierung sind entweder die Primer (*Dye-Primer-Methode*) oder die ddNTPs (*Dye-Terminator-Methode*) basenspezifisch

fluoreszenzmarkiert. Der Vorteil multifluorer Systeme mit vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten ddNTPs liegt darin, dass alle vier Reaktionsansätze gemischt, in einer einzelnen Gelspur mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die DNA-Fragmente gleichzeitig detektiert werden können (Dingermann 1999; Sambrook und Russell 2001).

Es wurden die $^2\text{[CAG]}_n$ -tragenden DNA-Abschnitte im Exon 1 des *KCNN3* zweier Individuen sequenziert, die sich autoradiographisch durch ein einziges CAG *triplet* zu unterscheiden schienen (kleinster Bandenabstand), um somit einen Standard zur Bestimmung der Allelgrößen zu erstellen. Die DNA-Abschnitte der beiden Individuen wurden zunächst mittels PCR amplifiziert (siehe 4.3.2.1 Standard-PCR) und gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Qualität des Reaktionsproduktes zu beurteilen. Das PCR-Produkt der DNA des einen Individuums konnte direkt aus der Reaktionslösung weiterverwendet werden, das PCR-Produkt der DNA des zweiten Individuums musste an der Stelle der sichtbaren Bande mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (50) gemäß den Herstellerangaben herausgelöst werden. Die PCR-Produkte wurden dann mit dem QIAquick PCR Purification Kit (250) entsprechend des vom Hersteller angegebenen Protokolls gereinigt. Anschließend wurde ein Sequenzierreaktion angesetzt (4 μl Sequenziermix, 3 μl Primer (2,5 pmol/ μl), 6 μl gesäubertes PCR-Produkt, 7 μl H₂O), das im *Thermocycler* folgenden Temperaturbedingungen ausgesetzt wurde:

Schritte	Temperatur	Zeitdauer	Vorgang
1.	96 °C	3 Min.	Initiale Denaturierung
2.	96 °C	10 Sek.	Denaturierung der DNA-Matrize
3.	59 °C	5 Sek.	Anlagerung der Primer
4.	60 °C	4 Min.	DNA-Synthese

Die Schritte 2.-4. wurden 25 Mal wiederholt.

Die dadurch entstandenen DNA-Fragmente wurden durch Ethanol-fällung präzipitiert. Dabei wurden 20 µl Sequenzierreaktionsprodukt mit 80 µl H₂O und 10 µl Na-Acetat gemischt, 250 µl 96%-iges Ethanol zugegeben und zehn Minuten zentrifugiert (15000 rpm bei Raumtemperatur). Der Überstand wurde abgekippt und eventuell verbliebene Tröpfchen vorsichtig entfernt. Zum verbleibenden *pellet* wurden 250 µl 75%-iges Ethanol gegeben. Daran schloss sich erneutes zehninütiges Zentrifugieren (15000 rpm bei Raumtemperatur), Abkippen des Überstandes und Entfernung verbliebener Tröpfchen an. Dann wurde das verbleibende *pellet* 30 Minuten lang bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in 20 µl H₂O aufgelöst und in Reaktionsgefäße mit Septen überführt. Danach wurde die aufbereitete DNA mit dem *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* nach der *Dye-Terminator*-Methode automatisch sequenziert. Die DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe geeigneter Software (Sequencing Analysis Version 3.4) analysiert.

4.3.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung und die Bestimmung des Reinheitsgrades der DNA erfolgte mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers bei 260 nm.

4.4 Statistische Methoden

Um die beiden Stichproben (Patienten- und Kontrollgruppe) auf eine Assoziation bestimmter ²[CAG]_n-tragender Allele des *KCNN3* zu testen, wurden drei verschiedene Genotyp-basierte Tests angewandt.

Zunächst kam das Programm FastEHPlus zum Einsatz. Ihm liegt ein Permutationstest zugrunde, der Genotypfrequenzen schätzt („EH“ steht für „*estimated haplotype frequency*“). Er basiert auf dem von Zhao und Mitarbeitern entwickelten Test EHPlus (Zhao et al. 2000). FastEH ist eines der wenigen Programme, das sich zur Schätzung der Genotypfrequenzen hochpolymorpher Marker eignet (Sasieni 1997). Dabei werden zuerst anhand der Allelfrequenzen der ermittelten Rohdaten die Genotypfrequenzen geschätzt. Dann wird mittels

einer Simulation errechnet, ob bestimmte Genotypen signifikant häufiger in der Fallgruppe als in der Kontrollgruppe vorkommen.

Zusätzlich wurde eine Einzelanalyse aller Allele anhand einer logistischen Regression durchgeführt, der der Wald- χ^2 -Test zugrundelag. (Dabei wurde das Programm SAS package 8.1 verwendet.) Mittels einer logistischen Regression kann man untersuchen, wie hoch der Einfluss des Vorhandenseins bzw. Nicht-Vorhandenseins bestimmter Faktoren auf die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung bzw. Nicht-Erkrankung ist. Die von uns verwendete dichotome Variable war dabei „Allel n vorhanden“ gegen „Allel n nicht vorhanden“. Da die Prävalenz der Migräne bei Frauen höher als bei Männern ist, wurde die Einzelanalyse der Allele mit dem Merkmal Geschlecht (männlich, weiblich) als Korrekturfaktor durchgeführt.

Schliesslich wurde noch der Cochran-Armitage Trend Test angewandt. (Dabei wurde ebenfalls das Programm SAS package 8.1 verwendet.) Der Cochran-Armitage Trend Test prüft einen Trend für eine binomial verteilte Variable über die Levels einer zweiten kategorialen Variable (Freidlin et al. 2002; Slager und Schaid 2001). Um eine binomial verteilte Variable zu erhalten, wurden die gefundenen Allele dichotomisiert (Allele 12-18 und Allele 19-24).

5 Ergebnisse

5.1 Fall-Kontroll-Studie zur Assoziation des $^2[CAG]_n$ -Polymorphismus des *KCNN3* mit Migräne

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 190 Migränepatienten und 232 Kontrollpersonen bezüglich ihrer $^2[CAG]_n$ -tragenden Allele des *KCNN3* (nachfolgend jeweils als Allel n bezeichnet) genotypisiert. Die Patientengruppe unterteilte sich dabei in Migränepatienten mit und ohne Aura, die Kontrollgruppe in explizit migränefreie Kontrollpersonen und Blutspender (siehe 4.1).

Dabei wurden insgesamt 13 verschiedene Allele mit einer zwischen 12 und 24 CAGs variierenden *repeat*-Anzahl gefunden. Am häufigsten kam dabei sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe das Allel 19 vor, am zweithäufigsten das Allel 18. Dies traf auch für die jeweiligen Untergruppen zu. Eine genaue Verteilung der Allelhäufigkeiten kann Tabelle 2 entnommen werden.

Allele	Migränepatienten			Kontrollpersonen		
	ohne Aura	mit Aura	insgesamt	migränefrei	Transfusion	insgesamt
Allel 12	0	0	0	1	0	1
Allel 13	7	5	12	10	14	24
Allel 14	11	7	18	10	9	19
Allel 15	3	3	6	1	0	1
Allel 16	6	7	13	11	10	21
Allel 17	21	17	38	22	20	42
Allel 18	44	40	84	54	56	110
Allel 19	69	72	141	79	74	153
Allel 20	20	17	37	21	32	53
Allel 21	9	16	25	15	17	32
Allel 22	2	2	4	2	3	5
Allel 23	0	0	0	0	3	3

Tab. 2: Verteilung der Allelfrequenzen bei Migränepatienten und Kontrollpersonen

Zur besseren Veranschaulichung wurden diese Ergebnisse in den Abbildungen 3, 4, 5 und 6 graphisch dargestellt.

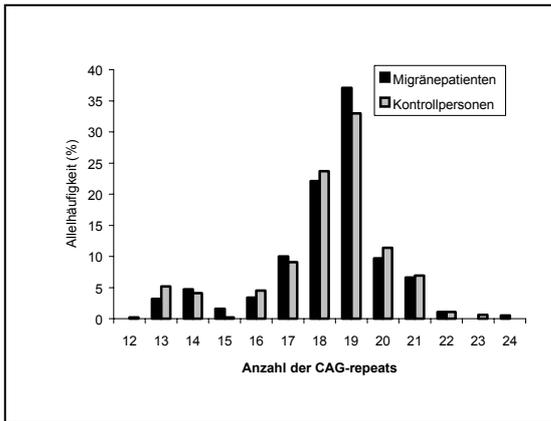


Abb. 3: Allelverteilung bei Migränepatienten und Kontrollpersonen

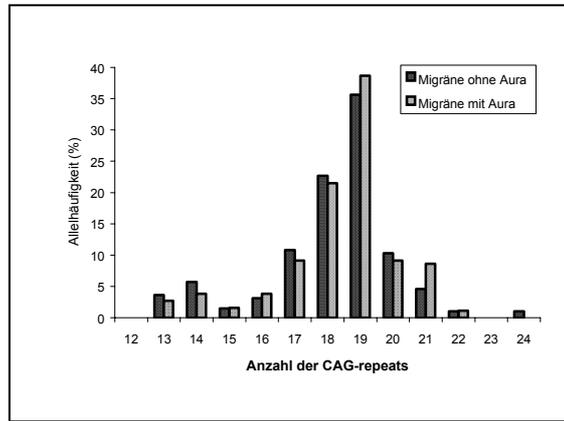


Abb. 4: Allelverteilung bei MO und MA

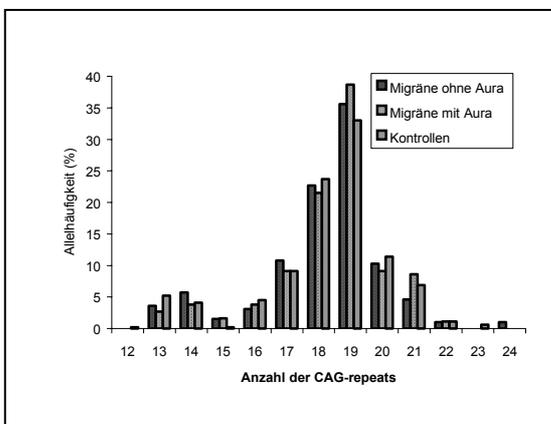


Abb. 5: Allelverteilung bei MO, MA und Kontrollpersonen

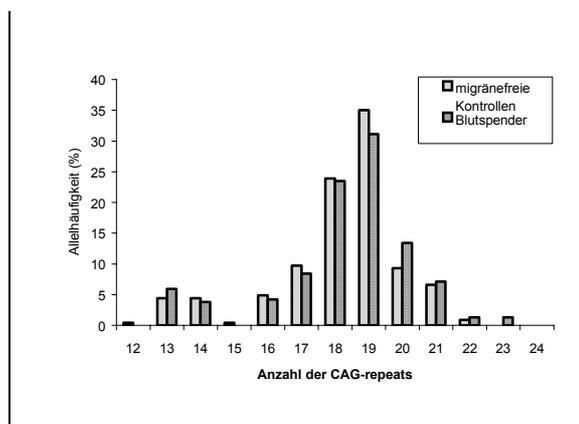


Abb. 6: Allelverteilung bei migränefreien Kontrollpersonen und Blutspenderkontrollpersonen

Allele	Anteil heterozygoter Allelträger (in % aller Versuchsteilnehmer)	Anteil homozygoter Allelträger (in % aller Versuchsteilnehmer)
Allel 12	0,24	0
Allel 13	8,06	0,24
Allel 14	8,29	0,24
Allel 15	1,66	0
Allel 16	8,06	0
Allel 17	17,06	0,95
Allel 18	30,81	7,58
Allel 19	41,71	13,98
Allel 20	18,96	1,18
Allel 21	13,03	0,24
Allel 22	2,13	0
Allel 23	0,71	0

Tab. 3: Verteilung der Genotypfrequenzen in der Gesamtstichprobe

Die Verteilung der Genotypen in der Gesamtstichprobe, d.h. die Verteilung hetero- und homozygoter Träger bestimmter Allele ist in Tabelle 3 aufgelistet.

Da die beiden Kontrollgruppen (migränefreie Kontrollpersonen und Blutspender) hinsichtlich der Geschlechterverteilung und dem Durchschnittsalter im Vergleich zueinander und zur Fallgruppe inhomogen waren, wurden zu Beginn der statistischen Auswertung die Allelfrequenzen der beiden Kontrollgruppen miteinander verglichen. Da sie sich nicht signifikant voneinander unterschieden, wurden alle Kontrollpersonen bei den nachfolgenden Berechnungen in einer einzigen Kontrollgruppe zusammengefasst. Bei der statistischen Auswertung der Rohdaten wurden alle Migränefälle insgesamt, alle Migränefälle mit Aura sowie alle Migränefälle ohne Aura jeweils separat gegen die Kontrollgruppe gerechnet. Für den Cochran-Armitage Trend Test wurden die Allele dichotomisiert. Die eine Allelgruppe umfasste die Allele 12 bis 18, die andere Allelgruppe die Allele 19 bis 24.

Beim Vergleich der gesamten Fallgruppe (MO und MA) mit der Kontrollgruppe ergab sich dabei folgendes: Die Auswertung mit dem FastEH erbrachte bezüglich der Genotypfrequenzen keine signifikanten Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen ($df=9$, $p=0,538$). Auch beim Cochran-Armitage Trend Test konnte kein Einfluss der dichotomisierten Allele auf die Erkrankung nachgewiesen werden (statistic (Z)=0,5823; $p=0,560$). Bei der Einzelanalyse der Allele anhand einer logistischen Regression zeigte sich, dass beim Vorliegen des Allels 15 das Erkrankungsrisiko um das 12fache erhöht ist ($df=1$; Wald- $\chi^2=5,009$; $p=0,025$; OR=0,085; 95% Konfidenzintervall: 0,010-0,736). Allerdings lag die Wahrscheinlichkeit, anhand des Allels 15 richtig vorauszusagen, ob der Status gesund oder krank vorliegt, bei nur 31,2%. Die Wahrscheinlichkeit, den Status gesund oder krank anhand des Allels 15 falsch vorauszusagen lag bei 12,2%. Der Einfluss des weiblichen Geschlechts spiegelte sich ebenfalls wieder ($df=1$; Wald- $\chi^2=14,338$; $p<0,001$; OR=0,415; 95% Konfidenzintervall: 0,264-0,655). Die anderen Allele einzeln zeigten keinen Einfluss auf die Erkrankung.

Im Vergleich der Fallgruppe MA mit der Kontrollgruppe ergab die Auswertung mit dem FastEH keine Unterschiede zwischen MA-Fällen und Kontrollen (df=9; p=0,652). Auch mit dem Cochran-Armitage Trend Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Fallgruppe MA und der Kontrollgruppe (statistic (Z)=1,076; p=0,282). Die Einzelanalyse der Allele mittels logistischer Regression zeigte eine positive Assoziation des Allels 15 mit MA (df=1; Wald-Chi²=3,962; p=0,047; OR=0,096; 95% Konfidenzintervall: 0,010-0,965). Der Status gesund bzw krank wurde anhand des Allels 15 bei 29,8% richtig und bei 14,8% falsch vorausgesagt. Auch bei MA zeigte sich der Einfluss des weiblichen Geschlechts (df=1; Wald-Chi²=4,852; p=0,028; OR=0,535; 95% Konfidenzintervall: 0,307-0,933).

Die Auswertung möglicher Unterschiede zwischen der Fallgruppe MO und der Kontrollgruppe ergab prinzipiell die gleichen Ergebnisse wie in der Gesamtstichprobe: Die Berechnungen mit dem FastEH lieferten keinen Unterschied zwischen MO-Fällen und Kontrollen (df=9; p=0,500). Negative Ergebnisse erbrachte auch der Cochran-Armitage Trend Test (statistic (Z)=-0,106; p=0,916). In der logistischen Regression zeigte sich wiederum, dass das Allel 15 bei MO signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe vorkommt (df=2; Wald-Chi²=4,910; p=0,027; OR=0,070; 95% Konfidenzintervall: 0,007-0,736) sowie der Einfluss des Geschlechtsunterschieds (df=1; Wald-Chi²=13,518; p<0,001; OR=0,308; 95% Konfidenzintervall: 0,165-0,577).

Zusammenfassend konnte eine positive Assoziation mit Migräne nur für die Genotypen gezeigt werden, die das Allel 15 tragen. Bezüglich aller anderen Genotypen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Migränepatienten und Kontrollpersonen.

5.2 Etablierung neuer Methoden zum Nachweis von triplet-repeat-Längenpolymorphismen

5.2.1 Real-Time-PCR und Schmelzkurvenanalyse mit SYBR Green

Um zu erproben, ob sich die Schmelzkurvenanalyse als neue Methode zum Nachweis von CAG-repeat-Längenpolymorphismen einsetzen lässt, wurde zuerst versucht, das Schmelzkurvenbild zu optimieren. Unter optimierten Bedingungen wurde dann die DNA zweier Individuen mit unterschiedlichen Allelgrößen des *KCNN3* untersucht.

Es wurde ein PCR-Reaktionsansatz hergestellt, der den Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* enthielt:

Reagenzien	Menge
IQ SYBR Green Supermix	12,5 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
DNA	1 µl
H ₂ O	9,5 µl

Im *iCycler* wurde mit dieser Reaktionslösung in einem ersten Schritt eine *Real-Time-PCR* durchgeführt, in einem zweiten Schritt schloss sich die Schmelzkurvenanalyse an. Das Temperaturprofil gestaltete sich dabei folgendermaßen:

Schritte	Temperatur	Zeitdauer	Vorgang
1.	95 °C	5 Min.	Real-Time-PCR
2.	95 °C	45 Sek.	
3.	T _A	45 Sek.	
4.	72 °C	45 Sek.	
5.	72 °C	5 Min.	
6.	95 °C	30 Sek.	

Schritte	Temperatur	Zeitdauer	Vorgang
7.	Temperaturerhöhung von 75 °C bis 95 °C in 0,5 °C-Schritten	10 Sek./Schritt	Schmelzkurvenanalyse

Die Schritte 2.-4. wurden in 35 Zyklen wiederholt.

Zunächst wurden für alle *Real-Time*-PCRs und nachfolgenden Schmelzkurvenanalysen die Primer KCNN3-I-F und KCNN3-I-R bei einer Annealingtemperatur von 71,5 °C verwendet.

Unter oben genannten Bedingungen erhielt man eine Schmelzkurve $-dF/dT$ über T mit zwei *peaks*, einen flacheren bei etwa 83 °C und einen spitzeren bei 91 °C. In der Leerprobe war nur der Fluoreszenzabfall bei 83 °C sichtbar. Die Bildung von Primer-Dimeren führt häufig zu einem artifiziellen unspezifischen zusätzlichen *peak*. Dieser ist dadurch vom spezifischen Schmelzpunkt der PCR-Produkte zu unterscheiden, dass Primer-Dimere aufgrund ihrer geringeren Länge typischerweise bei niedrigeren Temperaturen schmelzen, diese *peaks* weniger spitz und auch in einer Leerprobe sichtbar sind (Ririe et al. 1997). Der Schmelzpunkt bei etwa 83 °C war also offensichtlich auf die Bildung von Primer-Dimeren zurückzuführen, wohingegen es sich bei dem Schmelzpunkt bei etwa 91 °C um die eigentliche Denaturierungstemperatur des eingesetzten DNA-Abschnitts handelte.

Um diese Artefaktbildung zu verringern, wurden die Primerkonzentrationen systematisch verändert. Dabei zeigte sich, dass bei einer Primerkonzentration von 2,5 pmol/µl die Schmelzkurve am geringsten durch Primer-Dimere beeinflusst wird. In allen nachfolgend durchgeführten *Real-Time*-PCRs wurden daher Primer mit einer Konzentration von 2,5 pmol/µl verwendet.

Um den Einfluss der DNA-Konzentration auf die Schmelzkurve zu untersuchen, wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Die Konzentration der ursprünglichen DNA betrug 14 ng/µl und wurde in sieben Schritten jeweils auf das 10fache

verdünnt. (Das Experiment wurde in gleicher Weise mit denselben DNA-Konzentrationen nochmals wiederholt. Dabei konnten alle Ergebnisse repliziert werden.) Der Zusammenhang zwischen eingesetzter DNA-Konzentration und Beginn der PCR-Amplifizierung wurde anhand des „*threshold cycle*“ (C_T -Wert) beobachtet. (Der C_T -Wert ist dabei der erste Zyklus, ab dem die gemessene Fluoreszenz signifikant höher als die Hintergrundfluoreszenz ist. Er ist also ein wichtiger Parameter, wenn die Menge des *templates* bestimmt werden soll.)

eingesetzte DNA-Konzentration	C_T -Wert
14 ng/ μ l	20,5
1,4 ng/ μ l	24,3
$1,4 \times 10^{-1}$ ng/ μ l	28,4
$1,4 \times 10^{-2}$ ng/ μ l	31,6

Ab einer DNA-Konzentration von $1,4 \times 10^{-3}$ ng/ μ l und weniger fand keine Amplifizierung mehr statt. (Die Kurve entsprach der Kurve der Leerprobe.)

Die Schmelzkurve gestaltete sich bei einer DNA-Konzentration von 1,4 ng/ μ l am optimalsten, d.h. es konnte der höchste *peak* im Schmelzbereich der DNA bei gleichzeitig flachster Schmelzkurve in den angrenzenden Bereichen erzielt werden. Beim Einsatz höherer DNA-Konzentrationen konnte die Schmelzkurve nicht weiter optimiert werden.

Auch der Aufbau der Primer kann Einfluss auf die Schmelzkurve ausüben. Auf der Internetseite der *Plant-Microbe Genomics Facility* (PMGF) der *Ohio State University* (www.biosci.ohio-state.edu/~pmgf (version 1.0; Jan.2002)) werden Empfehlungen zum Primer-Design gegeben. Demnach sollen die Primer 18 bis 25 Nukleotide lang sein und eine ähnliche Schmelztemperatur von 58-60 °C haben. Unter den letzten fünf Nukleotiden am 3'-Ende sollten nicht mehr als zwei Cs oder Gs vorkommen, der G/C-Gehalt sollte bei etwa 50-60 % liegen. Das amplifizierte PCR-Produkt sollte zwischen 75 und 150 Basenpaaren lang sein.

Nach diesen Kriterien wurden unterschiedliche Primer konstruiert. (Da der zu amplifizierende Abschnitt in einem insgesamt sehr G/C-reichen DNA-Abschnitt

liegt, lag der G/C-Gehalt und die Schmelztemperatur der neu konstruierten Primer über den empfohlenen Werten. Alle anderen Kriterien konnten erfüllt werden (siehe 4.2.1)).

Es wurden zwei Reaktionsansätze wie oben beschrieben (mit einer DNA-Konzentration von 14 ng/µl und verschiedenen Primern (Konzentration 2,5 pmol/µl)) erstellt. Ein Ansatz enthielt die Primer KCNN3-Ia-F und KCNN3-Ia-R1, der andere Ansatz enthielt die Primer KCNN3-Ia-F und KCNN3-Ia-R2. Beide Ansätze wurden unterschiedlichen Annealingtemperaturen ausgesetzt (60,7 °C, 61,7 °C, 63,8 °C, 64,8 °C und 65,7 °C). Die Schmelzkurven beider Primerpaare ließen bei niedrigen Schmelztemperaturen auf die Bildung von Nebenprodukten bei der PCR-Reaktion schließen. Mit den Primerpaaren KCNN3-I-F / KCNN3-IR und KCNN3-Ia-F / KCNN3-Ia-R2 wurden gleich hohe *peaks* im DNA-Schmelzbereich erzielt, mit KCNN3-Ia-F / KCNN3-Ia-R1 weitaus niedrigere. Das optimalste Schmelzkurvenbild ergab sich für das Primerpaar KCNN3-Ia-F / KCNN3-Ia-R1 bei einer T_A von 63,8 °C. Der Einsatz unterschiedlicher Primer hatte unterschiedliche *threshold cycles* zur Folge:

Primerpaar	C_T
KCNN3-Ia-F / KCNN3-Ia-R2	12
KCNN3-Ia-F / KCNN3-Ia-R1	18
KCNN3-I-F / KCNN3-IR	20,5

C_T war mit dem Primerpaar KCNN3-Ia-F und KCNN3-Ia-R2 am niedrigsten (C_T : etwa 12), etwas höher (C_T : etwa 18) mit dem Primerpaar KCNN3-Ia-F und KCNN3-Ia-R1 und am höchsten (C_T : 20,5) mit dem Primerpaar KCNN3-I-F und KCNN3-IR.

Zusammenfassend wurden mit dem Primerpaar KCNN3-I-F / KCNN3-IR trotz späterem Einsetzen des Amplifizierungsvorganges (höherer C_T -Wert) die günstigsten Schmelzkurvenverläufe erzielt.

Nach dieser Phase der Optimierung sollte die Anwendbarkeit der Schmelzkurvenanalyse bei der Unterscheidung von Allelen mit verschiedenen CAG *repeats* untersucht werden. Dazu wurde die DNA zweier Individuen

ausgewählt, die sich bei der Auftrennung mittels PAGE und Autoradiographie hinsichtlich der Fragmentgrößen unterschieden hatte. (Individuum A war homozygot für das Allel $^2[\text{CAG}]_{18}$. Individuum B war heterozygot für die Allele $^2[\text{CAG}]_{13}$ und $^2[\text{CAG}]_{17}$.) Es wurde eine *Real-Time*-PCR mit nachfolgender Schmelzkurvenanalyse wie oben beschrieben durchgeführt (Primerpaar KCNN3-I-F / KCNN3-IR bei einer Konzentration von 2,5 pmol/ μl ; DNA-Konzentration: 14ng/ μl , T_A : 71,5 °C).

Für beide DNAs lag die Schmelztemperatur bei etwa 91 °C, der Unterschied eines einzigen CAG *repeats* konnte anhand der Schmelztemperatur nicht detektiert werden. Für die heterozygote DNA des Individuums B hätte man eine zweigipflige Kurve erwartet, da sich die entsprechenden DNA-Abschnitte der homologen Chromosomen um 4 CAG *repeats* voneinander unterscheiden. Das Schmelzkurvenbild zeigte aber nur einen einzigen *peak*.

Somit waren Allele mit unterschiedlicher CAG-*repeat*-Anzahl mittels *Real-Time*-PCR mit Schmelzkurvenanalyse unter den Bedingungen des hier gewählten Ansatzes nicht voneinander unterscheidbar.

5.2.2 PCR mit PAGE und Nachweis mittels SYBR-Gold-Färbung

Als Alternative zur Sichtbarmachung der durch vertikale PAGE aufgetrennten DNA-Fragmentbänder mittels Autoradiographie sollte eine Anfärbung von PAA-Gelele mit dem Farbstoff *SYBR-Gold* erprobt werden. Bei beiden Methoden macht man sich denselben Effekt zur Allelunterscheidung zunutze, nämlich unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten verschieden großer DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld. Daher sollten die Bedingungen der PCR und PAGE für *SYBR-Gold*-gefärbte Gele denen der PCR und PAGE mit nachfolgender Autoradiographie so weit wie möglich entsprechen. Dem konnte aber nur zum Teil entsprochen werden. Da die Gele mit *SYBR-Gold* gefärbt und mit dem UV-Transilluminator betrachtet werden sollten, mussten sie aus Gründen der technischen Durchführbarkeit dieser Schritte eine gewisse Dicke haben und durften eine bestimmte Größe nicht überschreiten. Durch die dafür zur Verfügung stehende Elektrophoresekammer konnten bestimmte Parameter nur

eingeschränkt variiert werden. Die Bedingungen waren daher durch gewisse technische Voraussetzungen eingeschränkt.

Der ${}^2[\text{CAG}]_n$ -tragende Abschnitt im Exon 1 des *KCNN3*-Gens wurde zunächst mit dem Standard-Reaktionsansatz amplifiziert (siehe 4.3.2.1).

Um einen Auftrennungseffekt von PAA-Gelen unterschiedlicher Porengröße zu untersuchen, sollten 8 %-, 10 %- und 12 %-ige denaturierende PAA-Gele zur vertikalen Elektrophorese verwendet werden. Zu 20 ml der 8 %-, 10 %, oder 12 %-igen Acrylamidstammlösung wurden 20 μl TEMED und 150 μl APS (10 %) gegeben. Es wurden Gele hergestellt, die 2 mm dick und 14x16 cm groß waren. Die Geltaschen wurden wahlweise mit Kämmen mit einer Zackenbreite von 3 mm bzw. 1 cm geformt und mit einer variierenden Menge an im Wasserbad für 10 Minuten bei 95 °C denaturierter DNA-Fragment-Lösung (bestehend aus PCR-Produkt und denaturierendem Stoppuffer im Verhältnis 1:1,6) befüllt. An die mit 1xTBE-Puffer (pH 8,0) befüllte vertikale Elektrophoresekammer wurde wahlweise eine Gleichspannung im Bereich von 65 V bis 1100 V bei variierender Stromstärke und variierender Laufzeit angelegt. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel etwa 30 Minuten lang in eine *SYBR Gold*-Färbelösung gegeben und anschließend mit dem UV-Transilluminator betrachtet.

Die Variierung unterschiedlicher Parameter führte zu folgenden Ergebnissen: Die amplifizierten DNA-Fragmente konnten prinzipiell mit allen verwendeten, am besten jedoch mit den 12 %-igen PAA-Gelen aufgetrennt und durch Anfärbung mit *SYBR-Gold* sichtbar gemacht werden. Bei der PCR-Reaktion wurden um das dreifache variierende DNA-Konzentrationen eingesetzt (bei Ausgangskonzentrationen zwischen minimal 58 ng/ μl und maximal 108 ng/ μl). Es konnte dabei kein Unterschied in der Qualität der DNA-Bandenmuster festgestellt werden. Die klarsten DNA-Fragment-Banden erhielt man, wenn die großen Geltaschen mit 13 μl denaturierter DNA-Fragment-Lösung (siehe Abb. 7), die kleinen mit 7 μl (siehe Abb. 8) befüllt wurden.

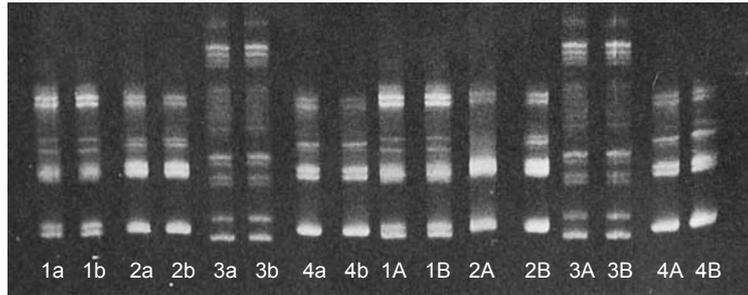
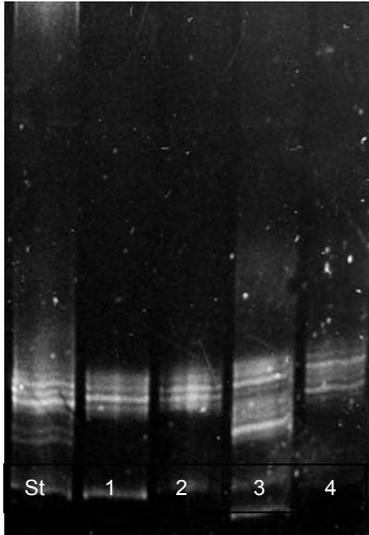


Abb. 8: SYBR-Gold-gefärbtes PAA-Gel mit 3mm breiten Taschen

Es wurde DNA vier verschiedener Individuen verwendet: 1: Allel17/Allel 19; 2: Allel18/Allel19; 3: Allel16/ Allel21; 4: Allel18/Allel18. Im PCR-Ansatz waren verschiedene DNA-Konzentrationen (Groß- und Kleinbuch-staben) sowie 1 µl (a/A) bzw. 3 µl (b/B) *template* eingesetzt worden.

Abb. 7: SYBR-Gold-gefärbtes PAA-Gel mit 10mm breiten Taschen

Es wurde DNA vier verschiedener Individuen verwendet: 1: Allel18/ Allel18; 2: Allel18/Allel19; 3:Allel14/ Allel19; 4: Allel17/ Allel20. Links (St) wurde als Größenstandard ein DNA-Gemisch aufgetragen, das die Allele 13,14,17,18,19 und 21 enthielt.

Bei höherer Gleichspannung wurden bessere Auftrennungseffekte als bei niedrigerer erzielt. Die besten Ergebnisse erhielt man bei einer angelegten Gleichspannung zwischen 750 V und 1100 V bei einer Laufzeit von etwa 2 Stunden. Je nach Frische der SYBR Gold-Färbelösung, Dicke des PAA-Gels und dem Polyacrylamidanteil – waren die Banden nach 10 bis 40 Minuten Einwirkdauer am besten sichtbar. Danach verschwanden sie zunehmend.

5.3 Probleme und Lösungen der Radioaktiv-PCR mit PAGE und Autoradiographie

Zur Genotypisierung aller Individuen der Patienten- und Kontrollgruppe wurde eine Radioaktiv-PCR mit nachfolgender PAGE und Autoradiographie angewandt. Dabei tauchten während des experimentellen Teils dieser Arbeit verschiedene Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung auf. An dieser Stelle möchte ich auf aufgetretene Probleme und ihre Lösungen eingehen – auch wenn sie routinierten Labormitarbeitern vielleicht banal erscheinen mögen.

Gleich zu Beginn stellte sich die Frage, wie die absolute $^2[CAG]_n$ -repeat-Länge eines jeden Individuums bestimmt werden sollte. Die auf einem Autoradiogramm sichtbaren DNA-Fragment-Banden können nur in Relation zueinander beurteilt werden, ihre absolute Größe ist dadurch ebenso wenig festlegbar wie der Basenpaarunterschied zweier benachbarter Banden. Ausserdem hat man zwischen verschiedenen Autoradiogrammen keinen festen Bezugspunkt, um z.B. die Allelgrößen miteinander zu vergleichen. Bei der Agarosegelelektrophorese löst man dieses Problem dadurch, dass man einen DNA-Längenstandard (z.B. eine 100-Basenpaarleiter) mit aufträgt. Ähnlich wurde auch bei den Autoradiogrammen verfahren. Es wurde zunächst die DNA zweier Individuen mit homologen Allelen sequenziert, die sich autoradiographisch durch den kleinsten vorkommenden Bandenabstand unterschieden. Bei der Sequenzierung wurde die genaue CAG-repeat-Anzahl ermittelt. Die Basensequenz der DNA beider Individuen unterschied sich nur durch ein einziges CAG repeat voneinander. Der kleinste Bandenabstand entsprach also einem Unterschied von einem CAG repeat. Daraufhin wurden auf demselben Autoradiogramm, auf dem die sequenzierten DNA-Fragmente abgebildet waren, vier Genotypen mit stark variierenden Allelen (mit 13, 14, 17, 18, 19 und 21 CAGs) ausgewählt und ihre absolute Größe bestimmt. Die DNA dieser vier Individuen wurde bei jeder PAGE mit aufgetragen und diente somit in Art einer „Basenpaarleiter“ als Größenstandard.

Bei der Radioaktiv-PCR trat anfangs das Problem auf, dass auf den Autoradiogrammen nur diffus verschwommene Schleier mit lediglich angedeuteten Banden zu sehen waren. Dies konnte größtenteils darauf zurückgeführt werden, dass die auf das Blotting-Papier transferierten PAA-Gele nicht schnell und gut genug trockneten, so dass es zur massiven Diffusion der aufgetrennten DNA-Fragmente kam. Man musste daher darauf achten, im Vakuum-Geltrockner tatsächlich ein gutes Vakuum zu erzeugen und nach Beendigung des etwa zweistündigen Trockenvorganges im Vakuum-Geltrockner die Frischhaltefolie vom geblotteten Gel abzuziehen und dieses an der Raumluft nachtrocknen zu lassen, bis keine feuchtglänzenden Stellen mehr

sichtbar waren. Erst dann durfte man das geblottete Gel in einer Röntgenfilmkassette exponieren.

Allerdings kam das Problem diffuser Banden zwischenzeitlich immer wieder auf und konnte durch Veränderung unterschiedlichster Versuchsparameter nicht gelöst werden. Mögliche Gründe dafür werden an späterer Stelle diskutiert (siehe 6).

Nachdem die Radioaktiv-PCR anfangs optimiert worden war, lieferte sie ab einem gewissen Zeitpunkt überhaupt keine Ergebnisse mehr. Zunächst konzentrierte sich die Fehlersuche auf die sich an die Radioaktiv-PCR anschließenden Schritte. Ausserdem wurden die DNA-Konzentrationen bestimmt und mehr *template* eingesetzt. Dabei konnte jedoch kein Fehler entdeckt und das Problem nicht behoben werden. Als daraufhin eine „kalte“ PCR, d.h. eine Standard-PCR ohne Zusatz eines radioaktiv markierten dNTPs durchgeführt und das PCR-Produkt auf einem Agarosegel aufgetrennt wurde, war auch auf diesem Gel keine Bande mehr sichtbar. Dies veränderte sich auch nach Austausch aller Lösungen nicht. Erst der Einsatz neuer Primer führte zur Behebung des Problems. Die *stock solution* der Primer war bei Ansetzen jeder PCR versehentlich mit aufgetaut worden und hatte offensichtlich die Primer zerstört. Dieser banale Fehler, der viel Zeit gekostet hatte, um ihn zu entdecken, hatte im wesentlichen zwei Konsequenzen: Zum einen wurde ab diesem Zeitpunkt parallel zur Radioaktiv-PCR immer auch eine „kalte“ PCR mit angesetzt und auf einem Agarosegel überprüft, ob es überhaupt zur Amplifizierung der DNA gekommen war. Zum anderen wurden einmalig viele *tubes* mit Primerverdünnungen hergestellt, von denen jede nach dreimaligem Auftauen verbraucht war.

Die bei der Etablierung der Realtime-PCR mit Schmelzkurvenanalyse und der PAGE mit *SYBR-Gold*-Färbung auftretenden Probleme und eine Beschreibung der Optimierung finden sich in einem gesonderten Ergebnisteil (siehe 5.2) sowie in der Diskussion (siehe 6.2).

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Ergebnisse der Assoziationsstudie

Die Untersuchung verschiedener Kandidatengene für Migräne lieferte bislang neben den vielen negativen nur wenige positive Ergebnisse. Diese sind allenfalls kleine Bruchstücke der genetischen Ursachen der Migräne, so dass die Suche nach den genetischen Mechanismen dieser Erkrankung weitergeht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Fall-Kontroll-Studie zur Assoziation des ²[CAG]_n-Polymorphismus des *KCNN3* mit Migräne durchgeführt. Dabei konnte ein seltenes Allel mit 15 CAG *repeats* bei MO- und MA-Patienten signifikant häufiger als in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Hinsichtlich der Verteilung aller übrigen gefundenen Allele zeigten sich weder für MO noch für MA bzw. Migräne insgesamt signifikante Unterschiede zwischen der Fall- und Kontrollgruppe. Nachfolgend möchte ich Aufbau, Auswertung und Aussagekraft der durchgeführten Studie kritisch beleuchten, die Wahl des Kandidatengens *KCNN3* diskutieren und schliesslich die Ergebnisse in den Zusammenhang des gegenwärtigen Forschungsstandes zur Aufklärung der genetischen Komponente der Migräne einzuordnen versuchen.

Vor der Durchführung einer genetischen Studie muss man sich für ein Studiendesign entscheiden. Diese Entscheidung orientiert sich an der Erkrankung selbst und führt zur Wahl des geeigneten genetischen Materials. Migräne wird gegenwärtig als eine multifaktorielle Erkrankung mit komplexer Vererbung angesehen, so dass man mit einer Vielzahl auf die Erkrankung Einfluss nehmender Gene rechnen muss, die sich im Sinne eines Schwelleneffekts addieren, isoliert gesehen wahrscheinlich aber nicht krankheitsauslösend sondern nur prädisponierend sind. Gene, die nur einen schwachen Effekt auf eine Erkrankung ausüben, sind durch Assoziationsstudien besser als durch Kopplungsanalysen identifizierbar (Baron 2001; Comings 1998; McGuffin 1999; Risch und Merikangas 1996; Weeks und Lathrop 1995). Da in dem ausgewählten Kandidatengen *KCNN3* ein

hochpolymorpher CAG-repeat-Polymorphismus vorkommt, schien eine Assoziationsstudie im Fall-Kontroll-Design somit geeignet zu sein.

Um bei Assoziationsstudien aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, müssen allerdings einige Punkte beachtet werden. Um die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse zu reduzieren, müssen Fall- und Kontrollgruppe hinreichend gross sein. Weeks und Lathrop gehen davon aus, dass das Risiko falsch positiver bzw. falsch negativer Ergebnisse hinreichend reduziert wird, wenn man mindestens 200 nichtverwandte Fälle und mindestens 200 Kontrollen untersucht, die hinsichtlich Alter, Geschlecht und ethnischer Abstammung abgeglichen sind (Weeks und Lathrop 1995). Im vorliegenden Fall bestand die Fallgruppe insgesamt aus 190 Migränepatienten, wovon 97 an MO und 93 an MA litten, die Kontrollgruppe beinhaltete 232 Individuen. Damit beinhalteten sowohl die Migränegruppe insgesamt sowie die Kontrollgruppe eine annähernd ausreichend hohe Zahl an Individuen. Berücksichtigt man aber, dass es sich bei MO und MA eventuell um genetisch heterogene Erkrankungen handelt (siehe 2.1.6), ist es sinnvoll, den Einfluss von Risikoallelen getrennt zu untersuchen, wie dies auch im Rahmen dieser Studie geschah. Um die Befunde zu bekräftigen und in ihrer Aussagekraft zu steigern, wäre dann allerdings eine größere Stichprobe wünschenswert. Auch die Forderung, dass Fall- und Kontrollgruppe altersmäßig abgeglichen sein sollen, wurde nur eingeschränkt erfüllt. Das Durchschnittsalter in der Fallgruppe stimmte für MO und MA gut überein und betrug 44,9 Jahre (MO: 44,4 Jahre; MA: 45,4 Jahre), in der Kontrollgruppe insgesamt lag das Durchschnittsalter bei 48,6 Jahren. Die Kontrollgruppe war allerdings heterogen aufgebaut. Das Durchschnittsalter bei den 119 Blutspenderkontrollen lag bei 32,2 Jahren, das der 113 migränefreien Kontrollen bei 65,0 Jahren, so dass Fall- und Kontrollgruppe primär nicht altersmäßig abgeglichen sind. Dies spielt aber glücklicherweise im vorliegenden Fall eine untergeordnete Rolle: Da die Prävalenz der Migräne zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr am höchsten ist, nach dem 50. Lebensjahr stark abfällt und sich Migräne in 90% der Fälle vor dem 50. Lebensjahr manifestiert (siehe 2.1.3), sind die migränefreien Kontrollen tatsächlich als „migränefrei“

anzusehen, da sie durchschnittlich weit über 50 Jahre alt sind und sich Migräne somit mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit bereits manifestiert hat. Bei den Blutspenderkontrollen steht ein ganz anderes Problem im Vordergrund. In ihrem Fall wurde Kopfschmerz anamnestisch nicht ausgeschlossen, so dass sich also durchaus – v.a. im Hinblick auf die hohe Prävalenz der Migräne in der Allgemeinbevölkerung – Migräniker unter ihnen befinden können. Daher wurden bei der statistischen Auswertung zunächst die Ergebnisse der beiden Kontrollgruppen auf Unterschiede bezüglich der Allelfrequenzen miteinander verglichen. Da sich in diesen beiden über 100 Personen umfassenden Kontrollgruppen aber keine signifikanten Unterschiede zeigten, wurden sie zu einer einzigen Kontrollgruppe zusammengefasst.

Desweiteren muss bei Assoziationsstudien bedacht werden, dass falsche positive Ergebnisse aufgrund von Stratifizierungseffekten in der Bevölkerung entstehen können. Dies gilt in erhöhtem Maße für multifaktorielle Erkrankungen. Am besten begegnet man diesem Problem, indem man genetisch isolierte Populationen untersucht (Montagna 2000; Saleem et al. 2000). In der vorliegenden Studie wurde zwar keine genetisch isolierte Population untersucht, es wurden aber nur Individuen kaukasischer Abstammung einbezogen. Fall- und Kontrollgruppe waren ethnisch abgeglichen. Da ein Vergleich der Allelfrequenzen des *CAG-repeat*-Polymorphismus des *KCNN3* in verschiedenen ethnischen Gruppen weltweit keine signifikanten Unterschiede ergab (Andres et al. 2003; Figueroa et al. 2001), ist es zudem unwahrscheinlich, dass Stratifizierungseffekte eine Rolle spielen.

Ein weiterer Kritikpunkt an der durchgeführten Assoziationsstudie ist das ungleiche Geschlechterverhältnis in der Fall- und Kontrollgruppe. Während in der Fallgruppe 3,9 mal so viele Frauen wie Männer vorkamen, lag der Anteil der Frauen in der Kontrollgruppe nur 1,8-fach über dem der Männer. Somit unterschieden sich Fall- und Kontrollgruppe bezüglich des Geschlechterverhältnisses stark und wichen zudem in beiden Gruppen von der Geschlechterverteilung der Migräne in der Normalbevölkerung ab (Jurkat-Rott

et al. 1998). Dies ist umso ungünstiger, da Migräne bei Frauen signifikant häufiger als bei Männern vorkommt, die Ursache dafür aber bislang unbekannt ist und somit einen wichtigen Faktor bei genetischen Untersuchungen darstellt. Sinnvollerweise hätten vor der eigentlichen statistischen Auswertung die Genotypfrequenzen bei Männern und Frauen in der Kontrollgruppe verglichen werden müssen, um sicherzugehen, dass keine Unterschiede bezüglich der Genotypverteilung bestehen. Bei der statistischen Berechnung der Wahrscheinlichkeit des Einflusses des Merkmals „männlich“ bzw. „weiblich“ für das Ereignis „krank“ bzw. „gesund“ in der logistischen Regression für Migräne insgesamt, betrug die *odds ratio* 0,415. Eine *odds ratio* kleiner eins bedeutet eigentlich, dass das Merkmal „männlich“ protektiv wirkt, wohingegen das Merkmal „weiblich“ als Risikofaktor zu werten ist. Diese Schlussfolgerung darf in der vorliegenden Studie aber nicht gezogen werden. Vielmehr spiegelt eine *odds ratio* kleiner eins in diesem Fall nur wider, dass in der Kontrollgruppe prozentual mehr Männer als in der Fallgruppe vorkommen. Bei der statistischen Auswertung schlug sich also nieder, dass Fall- und Kontrollgruppe hinsichtlich des Geschlechts nicht abgeglichen waren. Selbst wenn das Geschlecht einen Risikofaktor darstellt, kann er aufgrund des Fehlers im Studienaufbau in der durchgeführten Studie nicht nachgewiesen werden.

In Assoziationsstudien wird untersucht, ob bestimmte Allele überdurchschnittlich häufig bei einer Erkrankung vorkommen. Im Falle des 2 [CAG]_n-Polymorphismus des *KCNN3* bedeutet das, ob man Allele mit einer bestimmten CAG-repeat-Anzahl signifikant häufiger bei Migränepatienten findet. Es handelt sich hierbei um einen hochpolymorphen Marker, bei dem bisher Allele mit einer Variationsbreite von 4 bis 30 CAG repeats (bei einer mittleren Länge von 19 CAG repeats) beschrieben wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 13 verschiedene Allele mit 12 bis 24 CAG repeats nachgewiesen, wobei Allel 19 am häufigsten, Allel 18 am zweithäufigsten vorkam. Die Verteilung der Allelfrequenzen der Kontrollgruppe stimmte sehr gut mit der von Wittekindt und Mitarbeitern sowie der von Chandy und Mitarbeitern beschriebenen Verteilung überein (Chandy et al. 1998; Wittekindt et al. 1998).

In den bisherigen Assoziationsstudien mit *KCNN3* als Kandidatengen wurden die Allele fast immer in kurze Allele mit < 19 CAG repeats und lange Allele ≥ 19 CAG repeats unterteilt. Diese Dichotomisierung wurde auch für die statistische Auswertung der vorliegenden Studie vorgenommen. Es kamen weder lange noch kurze Allele überzufällig häufig bei MO, MA und Migräne insgesamt vor (p-Werte immer $> 0,05$, siehe 5.1). Zusätzlich wurden die einzelnen Allele getrennt untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl bei MO und MA als auch bei Migräne insgesamt das Allel 15 signifikant häufiger vorkommt. Die anderen Allele zeigten einzeln keinen Einfluss. Das Allel 15 kommt allgemein sehr selten in der Bevölkerung vor. In unserer Kontrollgruppe lag die Allelfrequenz bei 0,2%. Die nächstgelegenen kleineren Allele 13, 14 und größeren Allele 16 und 17 kamen wesentlich häufiger vor. Vergleichsweise ebenso selten kamen nur Allele ≤ 12 und ≥ 22 CAG repeats vor. In dieser Größenordnung liegen die Allelfrequenzen der Kontrollgruppen auch in den allermeisten der in der Literatur beschriebenen Studien (Austin et al. 1999; Chandy et al. 1998; Wittekindt et al. 1998 u.v.m.). Aufgrund der statistischen Ergebnisse kann das Allel 15 als Risikoallel für Migräne betrachtet werden – allerdings mit gewisser Vorsicht. Da es bei 3 MA- und 3 MO-Patienten, aber nur bei einer einzigen Kontrollperson gefunden wurde, bedingt sich die signifikante Häufung in gewisser Weise durch die Seltenheit dieses Allels. Wäre das Allel 15 nur zweimal öfter in der Kontrollgruppe vorgekommen, wäre schon überhaupt kein Unterschied zur MO bzw. MA mehr vorhanden gewesen. Der Status gesund bzw. krank konnte für Migräne anhand des Allels 15 auch nur in 31,2% der Fälle richtig vorausgesagt werden. Die Wahrscheinlichkeit einer falschen Voraussage lag bei 12,2%. Bedenkt man aber, dass die beiden nächstlängeren bzw. kürzeren Allele in der Allgemeinbevölkerung viel häufiger vorkommen, wäre es durchaus denkbar, dass Allel 15 auch funktionell eine besondere Bedeutung zukommt. Um dies zu beurteilen und da eine genetische Assoziation noch kein automatischer Beweis für eine pathogene Assoziation ist (Montagna 2000), müsste sich nun im Anschluss an die vorliegende Studie eine funktionelle molekularbiologische Analyse des Allels 15 sowie Studien mit größeren Fallzahlen anschließen.

Da sich ausser dem Allel 15 kein Einfluss längerer, kürzerer oder einzelner Allele zeigte, stellt sich die Frage, wie dieses Ergebnis im Hinblick auf den Stellenwert des *KCNN3* als Kandidatengen für Migräne zu bewerten ist. Da meines Wissens bisher noch keine genetischen Untersuchungen zwischen dem ²[CAG]_n-Polymorphismus des *KCNN3* und Migräne veröffentlicht wurden, ist es mir nicht möglich, die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit Ergebnissen in der Literatur zu vergleichen. (Lea und Mitarbeiter testen momentan eigenen Angaben zufolge verschiedene Marker auf dem von Ducros und Mitarbeitern veröffentlichten FHM-gekoppelten Abschnitt 1q21 bezüglich einer Assoziation mit Migräne (Lea et al. 2002). Ergebnisse wurden aber bislang nicht veröffentlicht.) Aufgrund der oben angeführten Kritikpunkte am Studiendesign hat die vorliegende Studie nur begrenzte Aussagekraft. Ausserdem schließt eine negative Assoziation eines einzigen Markers, im vorliegenden Fall des ²[CAG]_n-Polymorphismus, nicht die Assoziation anderer Marker in dieser Region, im vorliegenden Fall im *KCNN3*, aus (Baron 2001; Gambaro et al. 2000). Ausserdem könnte eine Allelvariante mit bestimmten Symptomen (z.B. Skotomen) einer multifaktoriellen Erkrankung, nicht aber mit der kompletten Diagnose (z.B. MA) assoziiert sein. Desweiteren müssten aufgrund des Schwelleneffekts additive Effekte mehrerer Gene berücksichtigt werden, da bei multifaktoriellen Erkrankungen viele Gesunde Träger von Risikoallelen sein können (Comings 1998). Aufgrund dieser und weiterer Schwächen gerieten Assoziationsstudien während der letzten Jahre zunehmend in die Kritik. Daraus entwickelte sich eine lebhafte Diskussion, welche Methode bei der Suche nach den Genen komplexer Erkrankungen am geeignetsten ist, die exemplarisch in den verschiedenen im „*American Journal of Medical Genetics*“ veröffentlichten „*Letters to the editor: The real problem in association studies*“ (Hardy 2002) verfolgt werden konnte. Einige Autoren plädieren gegenwärtig wieder vermehrt für eine Kombination von Assoziationsstudien, Kopplungsanalysen und Segregationsanalysen bei der Erforschung multifaktorieller Erkrankungen (Baron 2001; Gambaro et al. 2000; Gorwood 1999). *KCNN3* bleibt somit ein Kandidatengen für Migräne, das aufgrund der in dieser Studie nachgewiesenen positiven Assoziation des Allels 15 einerseits, der teilweise dargestellten

Problematik von Assoziationsstudien an und für sich und aufgrund der Schwächen im Studienaufbau andererseits durch erweiterte genetische Studien und funktionelle molekulargenetische Analysen hinsichtlich seiner pathogenetischen Bedeutung näher untersucht werden sollte.

Da gemäß den Ergebnissen der vorliegenden Studie das seltene Allel 15 des *KCNN3* im Gegensatz zu allen übrigen Allelen eine Rolle bei der Pathogenese der Migräne zu spielen scheint, wurde die Rolle des *KCNN3* als Kandidatengen für Migräne weiter untermauert. Es muss daher an dieser Stelle diskutiert werden, welche weiteren Überlegungen - u.a. durch Einbeziehung verwandter Krankheitsbilder und aus pathophysiologischer Sicht – für bzw. gegen *KCNN3* als Kandidatengen sprechen.

Ursprünglich war *KCNN3* als Kandidatengen postuliert worden, da es auf Chromosom 1q21.3 liegt – einer Region, die mit FHM-2 gekoppelt ist. Da die autosomal-dominant vererbte FHM eine Sonderform der MA ist, die bei betroffenen Individuen zusammen mit klassischen Migräneattacken auftreten kann, es in von FHM betroffenen Familien auch reine MA-Patienten gibt (Baloh 2000) und manche FHM-Mutationsträger an MA bzw. MO leiden ohne jemals hemiplegische Symptome zu zeigen (Montagna 2000), eignen sich FHM-Genloci prinzipiell als Kandidatengene für gängigere Migräneformen.

Allerdings lieferten Studien mit Markern des *CACNA1A* auf Chromosom 19p13, dessen Mutationen für 50% der FHM-Fälle verantwortlich ist, bislang widersprüchliche Ergebnisse (siehe 2.1.7.3). Aufgrund der Mehrzahl negativer Ergebnisse gibt es Zweifel daran, ob *CACNA1A* tatsächlich eine Rolle bei gängigeren Migräneformen spielt. Falls es pathogenetische Bedeutung hat, kann diese nicht sehr groß sein (Lea et al. 2001). Weitere FHM-gekoppelte Loci sind die Regionen 1q31 (Gardner et al. 1997) und 1q21-23 (Cevoli et al. 2002; Ducros et al. 1997). Anders als für den Genlocus 19p13 waren zum Zeitpunkt des Beginns des experimentellen Teils dieser Arbeit im September 2002 in den

gekoppelten Bereichen 1q31 und 1q21-23 noch keine Mutationen-tragende Gene identifiziert worden, welche FHM verursachen. Nachdem der experimentelle Teil dieser Arbeit bereits abgeschlossen war, wurde im Januar 2003 bekannt, dass FHM-2 in zwei italienischen Familien mit einem 28cM umfassenden Bezirk zwischen den Markern D1S2635 und CASQ1-SNP auf 1q23 gekoppelt ist (Marconi et al. 2003). Kurze Zeit später gaben De Fusco und seine Mitarbeiter bekannt, dass FHM-2 in den beiden 1q23-gekoppelten Familien mit zwei unterschiedlichen Punktmutationen im *ATP1A2*, einem die $\alpha 2$ -Untereinheit einer Na^+/K^+ -Pumpe kodierenden Gen, assoziiert ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass diese Punktmutationen durch Haploinsuffizienz der $\alpha 2$ -Untereinheit die Aktivität der Na^+/K^+ -Pumpe inhibieren (Fusco 2003). Aufgrund dieser neuen Entwicklung bei der Identifizierung der FHM-verantwortlichen Gene werden sich künftige Assoziationsstudien zu Migräne im Bereich 1q21-23 wahrscheinlich vorrangig auf Marker des *ATP1A2* als Kandidatengen fokussieren und *KCNN3* zunächst in den Hintergrund rücken. Da bisherige Studien zur Assoziation gängigerer Migräneformen mit dem FHM-verursachenden Gen *CACNA1A* wenig erfolgreich waren, verlieren jedoch auch andere mögliche Kandidatengene wie *KCNN3* nicht an Bedeutung. Ausserdem bleibt abzuwarten, ob die von Ducros und seinen Mitarbeitern auf 1q21-23 gekoppelten drei französischen Familien mit FHM ebenfalls Mutationen im *ATP1A2* aufweisen.

Es gibt weitere Gründe, die für *KCNN3* als Kandidatengen für Migräne sprechen: Die Ergebnisse von Figueroa und seine Mitarbeiter sprechen für eine Assoziation langer Allele des *KCNN3* mit Ataxie. 4,9% der Ataxiepatienten hatten Allele mit 22 oder mehr *CAG repeats*. Aufgrund der limitierten Aussagekraft einer einzelnen Assoziationsstudie, bleibt es abzuwarten, welche Ergebnisse weitere genetische Studien und funktionelle Analysen diesbezüglich liefern. Sollte sich bestätigen, dass eine vermehrte Anzahl an *CAG repeats* im *KCNN3* Ataxie verursacht, könnte dies auch als Hinweis für Migräne gedeutet werden, da bereits gezeigt werden konnte, wie FHM-1, EA-2 und SCA-6 alle durch Mutationen bzw. *CAG*-Expansionen im *CACNA1A* verursacht werden ,

wobei gleiche Genotypen zu verschiedenen Phänotypen führen können (siehe 2.1.7.2; Alonso et al. 2003). Auch gängigere Migräneformen scheinen mit EA-2 zusammenzuhängen. Die Hälfte aller EA-2 Patienten hat migräneartige Kopfschmerzen, die ihre meist durch Stress oder starke Emotionen ausgelösten, mehrere Stunden andauernden Anfälle begleiten. Auch die EEG-Bilder von Migräne- und EA-2-Patienten im anfallsfreien Intervall zeigen Übereinstimmungen (Baloh 2000). Bei Migränikern wurden im interiktalen Intervall Hypermetrie und andere Kleinhirnzeichen beobachtet (Sandor et al. 2002). Die Komorbidität für Ataxie und Migräne ist signifikant erhöht (Breslau und Rasmussen 2001b). Interessanterweise wird episodische Ataxie Typ 1 (EA-1) durch Mutationen im *KCNA1*-Gen auf Chromosom 12p13 verursacht, das für einen neuronalen spannungsgesteuerten Kaliumkanal kodiert (Browne et al. 1994).

Da Migräne und depressive sowie bipolare Störungen eine hohe Komorbidität aufweisen (Breslau und Rasmussen 2001a; Silberstein et al. 1995), stellt sich die Frage, inwiefern diese Erkrankungen auf genetischer oder psychopathologischer Ebene miteinander verknüpft sind. Gäbe es signifikante genetische Gemeinsamkeiten, so müssten sie mit bestimmten Polymorphismen in gemeinsamen Kandidatengenen assoziiert sein. Assoziationsstudien des *KCNN3* mit depressiven oder bipolaren Störungen brachten bisher keine positiven Ergebnisse (Hawi et al. 1999; Jin et al. 2001; Meira-Lima et al. 2001; Rohrmeier et al. 1999; Saleem et al. 2000; Ujike et al. 2001; Wittekindt et al. 1998).

Neben phänotypisch und genotypisch verwandten Krankheiten oder Erkrankungen mit Komorbidität liefern auch pathophysiologische Überlegungen wichtige Beiträge bei der Suche nach Kandidatengenen. Dabei erscheint es mir wichtig zu untersuchen, inwieweit Lokalisation und Funktion des Kalzium-regulierten Kaliumkanals *KCNN3* in einen Zusammenhang mit pathophysiologischen Abläufen bei Migräne gestellt werden können. Dies hat gegenwärtig allerdings noch weitgehend spekulativen Charakter, da es nach

wie vor unklar ist, welche pathophysiologischen Mechanismen tatsächlich hinter den Symptomen der Migräne stehen und es sich besonders schwierig gestaltet, ursächliche von Folge-mechanismen abzugrenzen (siehe 2.1.4). Die nachfolgenden Überlegungen sind daher rein hypothetisch.

KCNN3-mRNA wird in hohen Konzentrationen in dopaminergen Neuronen des nigrostriatalen Systems exprimiert. Dabei kontrolliert KCNN3 das Entladungsmuster der Neurone der Substantia nigra (Wolfart et al. 2001). Dies ließ *KCNN3* zu einem Kandidatengen für Schizophrenie werden, in der großen Mehrzahl der Assoziationsstudien konnte aber keine positive Assoziation gefunden werden (siehe 2.2.3). Eine primäre Verknüpfung dieser ZNS-Strukturen mit Migräne ist zunächst nicht erkennbar. Weitere Areale mit hoher KCNN3-mRNA-Dichte sind Hippocampus, Amygdala und dopaminerge Neurone der limbischen Mittelhirnkerne, wesentlichen Anteilen des limbischen Systems, sowie Kerngebiete des Hypothalamus (Dror et al. 1999). Dies könnte im Zusammenhang mit den bei Migräne als Prodromalerscheinungen häufig vorkommenden Stimmungsschwankungen, Appetitstörungen und Störungen des Wasserhaushalts stehen. Eine andere mögliche Verknüpfung könnte zu den klassischen Triggerfaktoren bestehen. Häufig lösen Störungen des Tag-Nacht-Rhythmus oder hormonelle Schwankungen Migräneattacken aus (Moskowitz 1996). Diese Funktionen werden vorwiegend im Hypothalamus gesteuert. Man weiss, dass KCNN-Kanäle eine Rolle bei der Regulation des zirkadianen Rhythmus und des Schlaf-Wach-Rhythmus spielen (Bond et al. 1999). Eine interessante Entdeckung wurde auch auf endokrinologischer Seite gemacht: Zum einen stellte man fest, dass KCNN3 im Gehirn weiblicher Meerschweinchen bevorzugt in neurosekretorischen Neuronen des Hypothalamus wie beispielsweise GnRH- und ADH-freisetzenden Neuronen exprimiert wird (Bosch et al. 2002). Dies könnte Triggereffekte und vegetative Symptome bei Migräne erklären. Zum anderen führte bei Ratten eine Behandlung mit Östrogen innerhalb eines Tages zu einer signifikanten Steigerung der KCNN3-mRNA-Expression im Hypothalamus (Bosch et al. 2002). Dies könnte in Zusammenhang mit der erhöhten Prävalenz der Migräne

bei Frauen und dem Anstieg der Prävalenz mit der Menarche stehen. Ausserdem ist die Menstruation ein typischer Auslöser von Migräneattacken, wohingegen sich die Migräne während einer Schwangerschaft oft verbessert (Breslau und Rasmussen 2001a). Wären tatsächlich bestimmte Allele oder Mutationen des *KCNN3* für Migräne prädisponierend, wäre es denkbar, dass eine vermehrte Expression des Genprodukts durch Veränderungen im Östrogenspiegel funktionelle Auswirkungen hat und somit zur anfallsweisen Symptomatik führt.

In geringeren Konzentrationen wird *KCNN3*-mRNA auch im zerebralen Kortex und im Kleinhirn exprimiert, Arealen, die für visuelle Auraphänomene und die v.a. bei MA-Patienten gehäuft auftretenden diskreten Kleinhirnzeichen verantwortlich gemacht werden (Sandor et al. 2002). Da die Konzentrationen im Kleinhirn aber im Gegensatz zu den *CACNA1A*-mRNA-Konzentrationen vergleichsweise gering sind, kamen bereits Zweifel daran auf, ob *KCNN3* tatsächlich als Kandidatengen für FHM zu betrachten ist (Dror et al. 1999). Dem ist entgegenzuhalten, dass bei der durch *CACNA1A*-Mutationen verursachten klinischen Variante FHM-1 zerebelläre Symptome im Vordergrund stehen, wohingegen bei FHM-2 vermehrt epileptiforme Symptome und febrile Krämpfe vorkommen.

Dass *KCNN3* als Kandidatengen für Migräne betrachtet wurde, hing mit der Kopplung der FHM-2 zu Chromosom 1q21-23 zusammen. Da FHM eine Sonderform der MA ist, steht die Erklärung der Entstehung von Aurasymptomen im Zusammenhang mit Lokalisation und Funktion des *KCNN3* im Vordergrund pathophysiologischer Überlegungen. Vieles spricht dafür, dass die „*cortical spreading depression*“ das pathophysiologische Korrelat der Migräneaura darstellt (siehe 2.1.4). Bei der CSD kommt es zu einer sich von dorsal nach frontal ausbreitenden neuronalen Exzitationswelle über dem Kortex. Messungen zeigten eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration während der CSD. Wahrscheinlich ist die erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration das die CSD auslösende Ereignis (Baloh 2000; Lauritzen 1994). Für die Clearance

des extrazellulären Kaliums sind in erster Linie Gliazellen verantwortlich. Eine beeinträchtigte Kalium-Clearance des Gehirns prädisponiert für CSD. Da im visuellen Kortex die geringste Verteilungsrate von Gliazellen gegenüber Neuronen vorherrscht, besteht dort eine reduzierte Schwelle für die Entstehung einer CSD (Ferrari 1998b). Ausserdem wurde gezeigt, dass die CSD von der Aktivierung des NMDA-Rezeptors abhängt (Lauritzen 1994). NMDA-Rezeptoren werden wiederum durch hyperpolarisierende Nachpotentiale, die von KCNN3-Kanälen ausgelöst werden, inaktiviert (Chandy et al. 1998). Funktionell veränderte KCNN3-Kanäle könnten rein hypothetisch sowohl über eine Störung der lokalen Kaliumhomöostase als auch über veränderte NMDA-Rezeptoraktivität an der Entstehung einer CSD beteiligt sein.

Unklar ist nach wie vor, ob CSD und Migränekopfschmerz kausal miteinander verknüpft sind. Eine mögliche Verbindung zwischen der CSD-Theorie und der trigeminovaskulären Theorie postuliert, dass nozizeptive trigeminovaskuläre Fasern der über dem Kortexareal liegenden Dura aktiviert werden und dadurch den typischen Migränekopfschmerz auslösen. Trigeminale Nervenfasern werden ihrerseits durch hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen depolarisiert (Moskowitz 1996; Moskowitz 1990), so dass auch hierbei eine Verknüpfung mit KCNN3-Kanälen denkbar wäre.

Da 5-HT_{1B/D}-Rezeptor-Agonisten die momentan effektivste Behandlung während einer Migräneattacke darstellen und Veränderungen im Serotoninmetabolismus bei Migränepatienten nachgewiesen wurden, ist der Serotoninhaushalt ein wichtiger Punkt in der Pathophysiologie der Migräne (siehe 2.1.4). Die Mehrzahl der bisher durchgeführten genetischen Studien ließ aber keine Assoziation von Serotoninrezeptorgenen mit Migräne erkennen (siehe 2.1.7.3). Hinweise auf eine primäre Verbindung zwischen dem Serotoninhaushalt und Kalzium-gesteuerten Kaliumkanälen konnte ich in der Literatur nicht finden. In-vitro-Experimente haben aber gezeigt, dass 5-HT_{1B/D}-Rezeptoren die spannungsabhängigen Einheiten von Kaliumkanälen regulieren

können und dadurch die Erregbarkeit der Nervenzelle beeinflusst werden kann (Bonaventure et al. 1998).

Hinter pathophysiologischen Mechanismen stehen letztendlich Vorgänge auf molekularbiologischer Ebene. Deshalb möchte ich nachfolgend darauf eingehen, welche Bedeutung der $^2[CAG]_n$ -Polymorphismus des *KCNN3* auf molekularer Ebene möglicherweise hat und inwiefern er sich auf die Symptombildung bei MO bzw. MA auswirken könnte. *KCNN3*-Kanäle erzeugen langsame hyperpolarisierende Nachpotentiale der Zellmembran. Dabei kommt es unter anderem zu einem inhibitorischen Effekt auf NMDA-Rezeptoren, so dass die neuronale Erregbarkeit herabgesetzt wird (siehe 2.2.2). Migränepatienten haben auch während anfallsfreien Intervallen eine in neurophysiologischen und magnetresonanztomographischen Untersuchungen nachweisbare kortikale Übererregbarkeit (van der Kamp et al. 1996). Ausserdem steht eine generalisierte kortikale Erregungswelle am Anfang jeder CSD. Diesen beiden Fällen gesteigerter neuronaler Aktivität könnten viele physiologische Vorgänge zugrunde liegen, unter anderem eine Dysfunktion der *KCNN3*-Kanäle. (Nebenbei bemerkt führte die Einflussnahme der *KCNN3*-Kanäle auf neuronale Erregungsmuster über Blockade der NMDA-Rezeptoren auch dazu, *KCNN3* als Kandidatengen für Epilepsie anzusehen (Litt et al. 1999), was aufgrund der erhöhten Komorbidität mit Migräne sowie den vorwiegend epileptiformen Symptomen bei FHM-2 wiederum für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit interessant ist. Eine von Sander und seinen Mitarbeitern durchgeführte familienbasierte Assoziationsstudie zeigte jedoch keine positive Assoziation des $^2[CAG]_n$ -Polymorphismus des *KCNN3* mit idiopathischer generalisierter Epilepsie (Sander et al. 1999). Ergebnisse weiterer Studien bleiben daher abzuwarten.)

Noch eine Stufe tiefer auf molekularbiologischer Ebene steht das Zustandekommen der langsamen hyperpolarisierenden Nachpotentiale über den Ausstrom von Kaliumionen durch die Kalzium-gesteuerten Kaliumkanäle. *KCNN3*-Kanäle sind als Tetramere aus vier Untereinheiten aufgebaut. Jede

Untereinheit ist durch *KCNN3* kodiert. Das hochpolymorphe CAG repeat in Exon 1, das zu einem Polyglutaminbereich im Protein führt, ist wiederum eine Motiv, das für *KCNN3* in seiner Kanalfamilie einzigartig ist und daher besonderes Interesse weckt (Sun et al. 2001).

Während man bei Kopplungsanalysen oder familienbasierten Studien CAG repeats auch als in eventuellem Kopplungsungleichgewicht mit einer Erkrankung stehende Marker verwenden kann, geht man bei einer Assoziationsstudie im Fall-Kontroll-Design davon aus, dass die Anzahl der CAG repeats selbst krankheitsauslösend sein könnte. Migräne hat sehr wenig mit den klassischen neurodegenerativen *triplet-repeat*-Erkrankungen vom Typ 1 gemeinsam (siehe 2.3.2), bei denen es ab einer pathologisch vermehrten Anzahl von mindestens 40 CAG repeats zum Ausbruch der Erkrankung kommt. Die einzige in diesem Zusammenhang interessante Erkrankung ist SCA-6, bei der bereits ein einziges zusätzliches CAG repeat im *CACNA1A* zur Erkrankung führen kann (siehe oben). Dass im Rahmen dieser Studie keine pathologische CAG-repeat-Expansion mit über 40 triplets gefunden wurde, ist wenig überraschend. Man nimmt an, dass bei multifaktoriellen Erkrankungen sehr geringe Veränderungen der *triplet-repeat*-Anzahl zu einer veränderten Funktion des Genprodukts führen, die nur zusammen mit weiteren Faktoren zur Erkrankung führt (Gargus et al. 1998; Koronyo-Hamaoui et al. 2002). Es war daher bei der Untersuchung des genetischen Materials von Migränepatienten im Falle eines positiven Ergebnisses eher zu erwarten, eine CAG-repeat-Anzahl im Übergangsbereich von normalen zu pathologischen Allelen zu finden. Dies bestätigte sich aber in der vorliegenden Studie nicht. Die Allelverteilung entsprach mit Ausnahme des Allels 15 der Allelverteilung in der Normalbevölkerung. Viele Assoziationsstudien des 2 [CAG]_n-Polymorphismus des *KCNN3* mit Schizophrenie zeigten keine signifikante Häufung langer oder kurzer Allele (siehe 2.2.3). Dies veranlasste Saleem und seine Mitarbeiter dazu, die Differenz der Allelgrößen zwischen Fall- und Kontrollgruppe zu vergleichen. Dabei entdeckten sie, dass Schizophreniepatienten gehäuft heterozygot für Allele mit einem Unterschied von ≥ 5 CAGs sind. Theoretisch untermauerten sie

ihr Ergebnis dadurch, dass große Unterschiede in den Allelgrößen zu einem assymetrischen KCNN3-Kanal mit unterschiedlich langen Glutaminbereichen in den vier Untereinheiten führen und somit die Funktion beeinträchtigen könnten (Saleem et al. 2000). Auch im Rahmen dieser Studie wäre es interessant, die bisherigen Ergebnisse um einen Vergleich der Allelgrößendifferenzen bei heterozygoten Anlageträgern zu erweitern.

Mögliche Erklärungen bezüglich des Pathomechanismus veränderter Polyglutaminbereiche auf zellulärer Ebene stellen die beiden gegensätzlichen „*loss-of-function*“ und „*gain-of-function*“-Hypothesen dar (siehe 2.3.2). Welcher Mechanismus der jeweiligen Erkrankung zugrunde liegt, dürfte in erster Linie von Aufbau, Funktion und Interaktion des jeweiligen Genprodukts abhängen. Ausgehend von den pathophysiologischen Untersuchungen könnte für KCNN3 die „*loss-of-function*“-Hypothese die ichtalen und interiktalen Beschwerden bei Migränepatienten besser erklären: Eine herabgesetzte Funktion der KCNN-3 Kanäle könnte durch verminderte hyperpolarisierende Nachpotentiale und sekundär vermehrte NMDA-Rezeptoraktivität zu vermehrter neuronaler Exzitation führen.

KCNN3 besitzt als einziger Kanal seiner Kanalfamilie die lange N-terminale zytoplasmatische Domäne, in der sich die beiden Polyglutaminbereiche befinden. Leider ist bisher nichts darüber bekannt, welche Bedeutung diese Domäne und speziell die Polyglutaminbereiche des KCNN3 für die Funktion des Kanals haben. Die Ionenkanal-formende Pore wird durch die P-Schleife gebildet, die Calmodulin-bindende Domäne, die die Aktivität des Kanals direkt über die Kalziumkonzentration der Nervenzelle reguliert, befindet sich im C-terminalen Ende des Proteins (Sun et al. 2001). Denkbar wäre es, dass dem N-terminalen Bereich eine übergeordnete regulatorische Funktion zukommt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass das Allel 15 ein Risikoallel für MO und MA darstellt. Um zu klären, ob Allel 15 tatsächlich ein Risikoallel für Migräne ist, müsste zunächst der Effekt verschieden vieler CAG *repeats* in physiologischen Studien zur Ionenkanalfunktion untersucht werden.

Ebenso müsste Allel 15 gesondert funktionell untersucht werden, um Anhaltspunkte für seine mögliche Pathogenität zu erhalten.

Vieles spricht dafür, dass bei der Entstehung der Migräne Ionenkanälen eine besondere Rolle zukommt. Ein Vorteil der Ionenkanalhypothese ist es, die heterogene Symptomatik eines Migräneanfalls und die Einflussnahme der zahlreichen Triggerfaktoren erklären zu können. Da bei Migränepatienten auch interiktal abnorme Befunde in EEG, MR und SPECT gefunden wurden, spricht einiges dafür, dass eine neuronale Basisstörung vorliegt (Baloh 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Assoziationsstudie wurde die Rolle des 2 [CAG]_n-Polymorphismus des *KCNN3* für Migräne untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das seltene Allel 15 sowohl mit MO als auch mit MA assoziiert ist. Aufgrund der Seltenheit dieses Allels sowie einiger Schwächen im Studienaufbau ist dieses Ergebnis allerdings unter gewissen Vorbehalten zu betrachten. Hinsichtlich aller übrigen 2 [CAG]_n-tragenden Allele des *KCNN3* zeigte sich keine positive Assoziation mit MO oder MA. Da der Anteil der Allel-15-Träger unter allen Migränepatienten in der vorliegenden Studie prozentual sehr gering ist, ist davon auszugehen, dass *KCNN3* keine übergeordnete Rolle in der Pathogenese der Migräne generell zukommt. Es ist allerdings vorstellbar, dass das aufgrund dieser Studie mit Einschränkungen als Risikoallel anzusehende Allel 15 beispielsweise im Zusammenhang mit bestimmten Triggerfaktoren steht. Ebenso ist es denkbar, dass ganz spezielle Symptome dieser sich interindividuell sehr unterschiedlich manifestierenden Erkrankung durch das Allel 15 und sein funktionell von den anderen Allelen abweichendes Genprodukt bedingt sind und daher nur bei Trägern dieses Allels auftreten. Um dies zu untersuchen, wären weitergehende Untersuchungen notwendig. Auch pathophysiologische und genetische Überlegungen sprechen in meinen Augen dafür, dass das *KCNN3*-Gen eine Rolle als Kandidatengen für Teilmechanismen der Migräne spielt. Doch selbst wenn Ionenkanaldysfunktionen tatsächlich eine pathogenetische Rolle bei Migräne

spielen, darf der Blickwinkel nicht ausschliesslich auf die genetischen Komponenten fallen. Vielmehr wird es auch in Zukunft notwendig sein, das Zusammenspiel verschiedener genetischer Faktoren und Umwelteinflüsse bei dieser komplexen Erkrankung zu berücksichtigen, um ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen zu erhalten und wirksamere Behandlungsmethoden zu entwickeln.

6.2 Diskussion der methodischen Ergebnisse

Beim Versuch, neue Methoden zum Nachweis von CAG-repeat-Längenpolymorphismen zu etablieren, zeigte sich, dass sich die PAGE mit SYBR-Gold-Färbung grundsätzlich dafür eignet. Mit der Real-Time-PCR mit Schmelzkurvenanalyse gelang der Nachweis in dem von uns gewählten Design nicht.

Der ursprüngliche Gedanke, die Real-Time-PCR mit Schmelzkurvenanalyse auf das Problem der Mikrosatelliten-Detektion anzuwenden, erwuchs aus dem bisherigen Einsatzbereich dieser Methode. Sie wird erfolgreich zum Nachweis von SNPs eingesetzt. Es handelt sich somit um eine sehr sensitive Methode. Dabei macht man sich allerdings unter Verwendung fluorogener Sonden und fluorogener Primer u.a. die Technik des „*fluorescence resonance energy transfer*“ (FRET) zunutze. Diese Technik kann aber bei CAG repeats nicht angewandt werden, da mittels Sonden in diesem Fall keine Unterscheidung der Allele möglich ist. Daher wurde SYBR Green als interkalierender Fluoreszenzfarbstoff bei der Schmelzkurvenanalyse verwendet.

Es gelang damit jedoch trotz Optimierung der Versuchsbedingungen (Konstruktion neuer Primer, DNA-Konzentrationsreihen etc. (siehe 5.2.1)) nicht, eine Unterscheidung der 2 [CAG]_n-tragenden Allele vorzunehmen. Es stellt sich die Frage, ob es daran liegt, dass diese Methode dafür nicht sensitiv genug ist, ein grundsätzlicher Fehler im Versuchsaufbau zugrunde liegt oder aber diese Methode auch aus theoretischen Überlegungen heraus prinzipiell eine

Unterscheidung von Mikrosatelliten-Längenpolymorphismen gar nicht leisten kann.

Schmelzkurvenanalysen mit *SYBR Green* sind bereits erfolgreich zur Alleldiskrimination eingesetzt worden. Lin und seine Mitarbeiter haben damit Individuen bezüglich des Insertions(I)/Deletions(D)-Polymorphismus des *angiotensin-converting enzyme (ACE)* genotypisiert (Lin et al. 2001). Vergleicht man deren Untersuchungen mit unserer Bestimmung der Allele 13, 17, und 18 im *KCNN3*-Gen (siehe 5.2.1), so gibt es wichtige Unterschiede bezüglich Basenabfolge, G/C-Gehalt und Länge der DNA-Abschnitte, die wiederum die Denaturierungstemperatur maßgeblich beeinflussen: Die zu unterscheidenden I- und D-Allele haben einen Längenunterschied von 19 Basenpaaren. Der G/C-Gehalt des I-Allels liegt bei 40,0 %, der des D-Allels bei 41,7 %. Die Schmelzpunkte unterschieden sich in 2,3 °C (73,9 °C (I-Allel) und 76,2 °C (D-Allel)). Im Gegensatz dazu beträgt der Längenunterschied der *KCNN3*-Allele minimal 3 Basenpaare, zwischen Allel 13 und Allel 18 sind es 15 Basenpaare. Bei Variation von nur einem CAG *repeat* ändert sich der G/C-Gehalt praktisch nicht. (Der G/C-Gehalt der mit dem Primerpaar *KCNN3-I-F/R* amplifizierten Allele beträgt: Allel 18: 68,42 %; Allel 17: 68,46 %; Allel 13: 68,64 %.) Bei der Schmelzkurvenanalyse konnten keine Schmelzpunktunterschiede sichtbar gemacht werden. Die mit dem Programm *Gene Runner (version 3.05)* berechneten Denaturierungstemperaturen (bei den unter 5.2.1 angegebenen Versuchsbedingungen) betragen für das Allel 13 87,3 °C, für das Allel 17 87,8 °C und für das Allel 18 87,9 °C. Bei einem Längenunterschied von nur 3 Basenpaaren und einem unterschiedlichen G/C-Gehalt von nur 0,04 % unterscheiden sich die errechneten Schmelztemperaturen also um 0,1 °C. Dieser Unterschied war mittels Schmelzkurvenanalyse des *iCyclers* nicht darstellbar. Ririe und Mitarbeiter geben an, dass PCR-Produkte ab einem Schmelztemperaturunterschied von 2 °C sauber differenziert werden können. (Sie arbeiteten allerdings mit dem *Lightcycler #LC24, Idaho Technology, Idaho Falls, ID* (Ririe et al. 1997).) Mit dem *Gene Runner (version 3.05)* errechnet sich ein Temperaturunterschied von 2 °C für den durch die Primerpaare *KCNN3I-*

F/R amplifizierten DNA-Abschnitt, wenn man die CAG-repeat-Anzahl von 13 CAGs auf 39 CAGs erhöht. (Das bedeutet eine gleichbleibende Sequenz, aber einen Längenunterschied von 78 Basenpaaren und eine G/C-Gehalt-Differenz von 0,7 %. Dass sich der G/C-Gehalt trotz relativ grossem Basenpaarunterschied nur sehr wenig verändert, liegt in der Natur der *triplet repeats*.) 2 [CAG]₁₃-Allele und 2 [CAG]₃₉-Allele müssten also theoretisch mittels Schmelzkurvenanalyse unterschieden werden können. Bei den untersuchten Patienten und Kontrollpersonen fanden sich aber nur Allele mit minimal 12 bis maximal 24 CAG repeats, so dass dies experimentell nicht überprüft werden konnte.

Sowohl aus den experimentellen Ergebnissen als auch aus den theoretischen Überlegungen kann man folgern, dass sich die Schmelzkurvenanalyse mit *SYBR Green* zur Unterscheidung von Allelen mit polymorphen *triplet repeats* nur eignet, wenn ein so großer Unterschied in der repeat-Anzahl vorliegt, dass die Änderungen des G/C-Gehalts und der Länge der Allele groß genug sind, um genügend große Veränderungen der Schmelztemperatur zu bedingen.

Durch PCR mit anschließender PAGE und *SYBR-Gold*-Färbung gelang die Unterscheidung der 2 [CAG]_n-tragenden Allele des *KCNN3*. Diese von uns neu etablierte Methode war allerdings der Auftrennung durch eine Radioaktiv-PCR mit anschließender PAGE und Autoradiographie hinsichtlich der Auflösung des Bandenmusters noch unterlegen.

Eines der Hauptprobleme der PAGE mit *SYBR-Gold*-Färbung war, dass auch unter optimierten Bedingungen die Ergebnisse sehr uneinheitlich bezüglich ihrer Qualität des Bandenmusters waren. Bei wiederholter Durchführung der Versuche mit identischer DNA stimmten die Allelgrößen zwar immer mit den im Autoradiogramm ermittelten Allelgrößen sowie mit der vormals unter scheinbar gleichen Versuchsbedingungen mit *SYBR-Gold* durchgeführten Detektion überein, die Banden präsentierten sich aber von scharf über verwaschen bis

nicht mehr abgrenzbar. Diese mangelnde Replizierbarkeit kann auf Versuchsparameter zurückgeführt werden, die nicht wahrgenommen und daher auch nicht kontrolliert worden waren. Rückblickend betrachte ich die Vernachlässigung der Temperatur im PAA-Gel als Hauptfehlerquelle. Temperaturdifferenzen im Gel haben ein uneinheitliches elektrisches Potential zur Folge. In wärmeren Regionen des Gels bewegen sich die Moleküle aufgrund der höheren Feldstärke schneller als in kälteren, die Banden erscheinen bei Aufsicht von oben somit breiter, da sie nicht im rechten Winkel zur Oberfläche stehen. Ausserdem hat die Geltemperatur signifikanten Einfluss auf die Diffusion (Sambrook und Russell 2001). Da bei Durchführung der Versuche nicht darauf geachtet worden war, welche Leistung an den Elektrophoresekammern abfiel, kann es erstens zu Temperaturdifferenzen im jeweiligen Gel gekommen sein, die verwaschene Banden zur Folge hatten, und zweitens zu unterschiedlicher Qualität der Ergebnisse unter scheinbar gleichen Versuchsbedingungen. Da das Spannungsgerät zu diesem Zeitpunkt von verschiedenen Mitarbeitern zu unterschiedlichsten Zwecken benutzt wurde, fiel gegen Ende der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit zwar auf, dass der Leistungsregler am Spannungsgerät zwischen den Versuchsreihen manipuliert worden war, dem wurde aber zum damaligen Zeitpunkt keine Bedeutung beigemessen. Es fand daher keine systematische Veränderung des Parameters Leistung bzw. Stromstärke statt. Auch bei der standardmäßig durchgeführten radioaktiven PAGE bestand das Problem, dass unter scheinbar gleichen Versuchsbedingungen die Qualität des Bandenmusters erheblich variierte. Hierbei war ebenfalls nicht bewusst auf konstant bleibende Leistung an der Elektrophoresekammer bei allen Versuchen geachtet worden. Schon damals war aufgefallen, dass die Glasplatten beim Abmontieren unterschiedlich warm waren. Verwaschenes Bandenmuster wurde damals jedoch damit nicht in Zusammenhang gebracht, sondern v.a. auf nachträgliche Diffusion beim Trocknen der Gele zurückgeführt (siehe 5.3). Für die zur *SYBR-Gold*-Färbung verwendeten PAA-Gele konnten bezüglich der optimalen Leistung keine Angaben in der Literatur gefunden werden. Denaturierende PAA-Gele (Sequenziergele), die 40x40 cm groß sind, sollen bei einer konstanten Leistung

von 55-75 Watt laufen, um eine konstante Geltemperatur von 45-50 °C zu erhalten (Sambrook und Russell 2001). Sowohl bei der PAGE mit *SYBR-Gold*-Färbung als auch bei der PAGE mit Autoradiographie könnte rückblickend betrachtet das teilweise diffuse Bandenmuster Folge unterschiedlicher Geltemperaturen gewesen sein, da die an den Elektrophoresekammern abfallende Leistung offensichtlich manipuliert worden war.

Ein weiterer Nachteil der PAGE mit *SYBR-Gold*-Färbung gegenüber der PAGE mit Autoradiographie waren enger zusammenliegende Banden. Während im Autoradiogramm die Banden der Allele, die sich in ihrer Größe nur durch ein einziges *CAG repeat* unterscheiden, im Abstand von mindestens zweieinhalb Millimetern aufgetrennt wurden, waren sie im *SYBR-Gold*-gefärbten PAA-Gel durchschnittlich 0,8 Millimeter voneinander entfernt. Im Autoradiogramm konnten die Banden anhand des aufgetragenen Größenstandards immer eindeutig der entsprechenden Allelgröße zugeordnet werden, in *SYBR-Gold*-gefärbten PAA-Gelen war dies nicht immer möglich. Beim 2 [CAG]_n-Marker des *KCNN3* mit mindestens 12 verschiedenen Allelen konnte man im Autoradiogramm die Entfernung der Banden sehr großer bzw. sehr kleiner Allele mit einem Lineal bestimmen. Im *SYBR-Gold*-gefärbten Gel lagen die Banden viel näher beieinander, so dass eine Abmessung mit dem Lineal nicht ausreichend ist. V.a. wenn das Gel „schief lief“, kam es zu Schwierigkeiten, die Banden zweifelsfrei zuzuordnen. Während zur Unterscheidung von homozygoten und heterozygoten Genotypen bei einem biallelischen Marker oder zur Bestimmung von Allelen mit größerer Basendifferenz als nur drei Basenpaaren die unter den genannten Bedingungen gefertigten *SYBR-Gold*-gefärbten Gele ausreichende Auflösung bieten, ist die Unterscheidung multiallelischer *CAG-repeat*-Marker in meinen Augen noch unzureichend und erfordert daher weitere Optimierung.

Ein Vorschlag zur Verbesserung ist die Verwendung größerer Gele, um durch eine längere Laufstrecke einen verbesserten Auftrennungseffekt zu erzielen. Wichtig erscheint es auch, die an der Elektrophoresekammer abfallende

Leistung und damit die Geltemperatur zu kontrollieren. Könnte somit eine Auftrennung der DNA-Fragmente mit *SYBR-Gold*-gefärbten Gelen erzielt werden, die mit der Qualität des Bandenmusters im Autoradiogramm vergleichbar ist, wäre sie diesem meiner Meinung nach vorzuziehen. Es könnte radioaktives Material eingespart werden, das teuer und in der Entsorgung problematisch ist und bei Durchführung der Versuche Strahlenschutzmaßnahmen erfordert. Mag zwar der experimentelle Umgang mit kleinen Mengen radioaktiven Materials hinsichtlich der Strahlenbelastung und Entsorgung und verglichen mit der natürlichen Strahlenbelastung relativ unbedenklich sein, so erscheint es mir dennoch langfristig gesehen sinnvoll, alternative Methoden anzuwenden.

SYBR-Gold-gefärbte Gele haben sich als geeignet erwiesen, Unterschiede von wenigen Basenpaaren in DNA-Fragmenten nachzuweisen und können schon jetzt zur Detektierung biallelischer Marker erfolgreich eingesetzt werden. Die technische Durchführung ist unkompliziert und mit relativ einfachen Mitteln zu bewerkstelligen. Es wäre daher in meinen Augen ein lohnenswertes Ziel, die PAGE mit *SYBR-Gold*-Färbung als Methode weiter zu optimieren und in Zukunft auch zur Bestimmung multiallelischer Mikrosatellitenmarker standardmäßig einzusetzen.

7 Zusammenfassung

Migräne wird gegenwärtig als multifaktorielle Erkrankung mit komplexem Vererbungsmodus verstanden. In einer Assoziationsstudie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern ein hochpolymorpher *CAG-repeat*-tragender Abschnitt des *KCNN3*-Gens zur Entstehung von sporadischer Migräne mit bzw. ohne Aura beiträgt.

Der methodische Teil dieser Arbeit beinhaltete die Etablierung neuer Methoden zum Nachweis von *triplet-repeat*-Längenpolymorphismen. Dabei wurde getestet, ob sich die *Real-Time*-PCR mit Schmelzkurvenanalyse und die *SYBR-Gold*-Färbemethode als Alternative zur standardmäßig verwendeten Polymerasekettenreaktion mit nachfolgender vertikaler Polyacrylamidgелеlektrophorese und Nachweis mittels Autoradiographie eignen.

Da *KCNN3* auf dem zur familiären hemiplegischen Migräne gekoppelten Genabschnitt auf Chromosom 1q21.3 liegt, sein Genprodukt – ein Kalzium-aktivierter Kaliumkanal – eine wichtige Rolle bei der Modulation neuronaler Erregungsmechanismen spielt und durch den *CAG*-Polymorphismus einen wichtigen Mikrosatellitenmarker einerseits und einen funktionell bedeutenden Bereich andererseits beinhaltet, erschien es als geeignetes Kandidatengen zur Untersuchung einer möglichen Assoziation mit Migräne. Im Rahmen der Assoziationsstudie wurden 190 Migränepatienten und 232 Kontrollpersonen hinsichtlich ihrer 2 [*CAG*]_n-tragenden Allele des *KCNN3* genotypisiert. Nachfolgend wurde die Verteilung der Genotyp- und Allelfrequenzen in der Fall- und in der Kontrollgruppe miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich, dass Träger eines seltenen Allels mit 15 *CAG*s signifikant häufiger an Migräne mit und ohne Aura erkranken. Bezüglich aller anderen Allele wurde keine Assoziation mit Migräne gefunden. Dies spricht dafür, dass *KCNN3* an der Pathogenese der Migräne beteiligt ist, ihm aber lediglich eine untergeordnete Rolle zukommt. *KCNN3* wurde somit als ein Kandidatengen für Migräne bestätigt, das durch funktionelle Analysen und weitere genetische Untersuchungen eingehender betrachtet werden sollte.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalzium
CADASIL	zerebrale autosomal dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukoenzephalopathie
CGRP	calcitonin-gene-related peptide
cM	Zentimorgan
CSD	cortical spreading depression
C _T	threshold cycle
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EA	Episodische Ataxie
EEG	Elektroenzephalogramm
FHM	Familiäre hemiplegische Migräne
G	Guanin
IHS	International Headache Society
K ⁺	Kalium
kb	Kilobasen (1000bp)
m	männlich
M	Mol
MA	Migräne mit Aura
mA	Milliampere
MBq	Mega-Becquerel
MELAS	mitochondriale Enzephalopathie, Laktatazidose und Schlaganfall
Min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter

MO	Migräne ohne Aura
mRNA	Messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
mtDNA	Mitochondriale DNA
Na ⁺	Natrium
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Nitroxid
OR	odds ratio
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SCA	Spinozerebelläre Ataxie
Sek	Sekunden
SNP	single nucleotide polymorphism
ssDNA	Einzelstrang-DNA
STS	sequence tagged site
T	Thymin
T _A	Annealingtemperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine
tRNA	Transfer-RNA
V	Volt
w	weiblich
W	Watt
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.2 Literaturverzeichnis

- Ahrens S, Streng H, Egle UT. Chronischer Kopfschmerz. In: Ahrens S, Hasenbring M, Schultz-Venrath U and Streng H, editors. Psychosomatik in der Neurologie. Stuttgart: Schattauer, 1995: 179-202.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molekularbiologie der Zelle. Weinheim: VCH, 1995.
- Alonso I, Barros J, Tuna A, Coelho J, Sequeiros J, Silveira I, Coutinho P. Phenotypes of spinocerebellar ataxia type 6 and familial hemiplegic migraine caused by a unique CACNA1A missense mutation in patients from a large family. Arch Neurol 2003; 60: 610-4.
- Andres AM, Lao O, Soldevila M, Calafell F, Bertranpetit J. Dynamics of CAG repeat loci revealed by the analysis of their variability. Hum Mutat 2003; 21: 61-70.
- Antonarakis SE, Blouin JL, Lasseter VK, Gehrig C, Radhakrishna U, Nestadt G, Housman DE, Kazazian HH, Kalman K, Gutman G, Fantino E, Chandy KG, Gargus JJ, Pulver AE. Lack of linkage or association between schizophrenia and the polymorphic trinucleotide repeat within the KCNN3 gene on chromosome 1q21. Am J Med Genet 1999; 88: 348-51.
- Austin CP, Holder DJ, Ma L, Mixson LA, Caskey CT. Mapping of hKCa3 to chromosome 1q21 and investigation of linkage of CAG repeat polymorphism to schizophrenia. Mol Psychiatry 1999; 4: 261-6.
- Baloh RW. The genetics of migraine. In: Pulst S-M, editor. Neurogenetics. New York Oxford: Oxford University Press, 2000: 389-401.
- Baron M. The search for complex disease genes: fault by linkage or fault by association? Mol Psychiatry 2001; 6: 143-9.
- Bischoff C, Zenz H, Traue HC. Kopfschmerz. In: Adler RH, Herrmann JM, Köhle K, Schonecke OW, Uexküll von T and Wesiack W, editors. Psychosomatische Medizin. München: Urban und Schwarzenberg, 1996: 714-730.
- Bonaventure P, Voorn P, Luyten WH, Leysen JE. 5HT1B and 5HT1D receptor mRNA differential co-localization with peptide mRNA in the guinea pig trigeminal ganglion. Neuroreport 1998; 9: 641-5.
- Bond CT, Maylie J, Adelman JP. Small-conductance calcium-activated potassium channels. In: Rudy B and Seeburg P, editors. Molecular and functional diversity of ion channels and receptors. Vol 868. New York: The New York Academy of Sciences, 1999: 370-378.
- Bonnet-Brilhault F, Laurent C, Campion D, Thibaut F, Lafargue C, Charbonnier F, Deleuze JF, Menard JF, Jay M, Petit M, Frebourg T, Mallet J. No evidence for involvement of KCNN3 (hSKCa3) potassium channel gene in familial and isolated cases of schizophrenia. Eur J Hum Genet 1999; 7: 247-50.
- Boormann DW, Guo Y, Visvanathan K, Helzlsouer K, O'Brien TG. Automated fragment analysis method for determining androgen receptor CAG repeat length. BioTechniques 2002; 33: 140-143.
- Bosch MA, Kelly MJ, Ronnekleiv OK. Distribution, neuronal colocalization, and 17beta-E2 modulation of small conductance calcium-activated K(+)

- channel (SK3) mRNA in the guinea pig brain. *Endocrinology* 2002; 143: 1097-107.
- Bowen T, Guy CA, Craddock N, Cardno AG, Williams NM, Spurlock G, Murphy KC, Jones LA, Gray M, Sanders RD, McCarthy G, Chandy KG, Fantino E, Kalman K, Gutman GA, Gargus JJ, Williams J, McGuffin P, Owen MJ, O'Donovan MC. Further support for an association between a polymorphic CAG repeat in the hKCa3 gene and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 1998; 3: 266-9.
- Bowen T, Williams N, Norton N, Spurlock G, Wittekindt OH, Morris-Rosendahl DJ, Williams H, Brzustowicz L, Hoogendoorn B, Zammit S, Jones G, Sanders RD, Jones LA, McCarthy G, Jones S, Bassett A, Cardno AG, Owen MJ, O'Donovan MC. Mutation screening of the KCNN3 gene reveals a rare frameshift mutation. *Mol Psychiatry* 2001; 6: 259-60.
- Breslau N, Rasmussen BK. The impact of migraine - epidemiology, risk factors and co-morbidities. *Neurology* 2001a; 56: 4-12.
- Breslau N, Rasmussen BK. The impact of migraine: Epidemiology, risk factors, and co-morbidities. *Neurology* 2001b; 56: S4-12.
- Browne DL, Gancher ST, Nutt JG, Brunt ER, Smith EA, Kramer P, Litt M. Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. *Nat Genet* 1994; 8: 136-40.
- Brzustowicz LM, Hodgkinson KA, Chow EW, Honer WG, Bassett AS. Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22. *Science* 2000; 288: 678-82.
- Cardno AG, Bowen T, Guy CA, Jones LA, McCarthy G, Williams NM, Murphy KC, Spurlock G, Gray M, Sanders RD, Craddock N, McGuffin P, Owen MJ, O'Donovan MC. CAG repeat length in the hKCa3 gene and symptom dimensions in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1999; 45: 1592-6.
- Cevoli S, Pierangeli G, Monari L, Valentino ML, Bernardoni P, Mochi M, Cortelli P, Montagna P. Familial hemiplegic migraine: clinical features and probable linkage to chromosome 1 in an Italian family. *Neurol Sci* 2002; 23: 7-10.
- Chandy KG, Fantino E, Wittekindt O, Kalman K, Tong LL, Ho TH, Gutman GA, Crocq MA, Ganguli R, Nimgaonkar V, Morris-Rosendahl DJ, Gargus JJ. Isolation of a novel potassium channel gene hSKCa3 containing a polymorphic CAG repeat: a candidate for schizophrenia and bipolar disorder? *Mol Psychiatry* 1998; 3: 32-7.
- Choong CS, Kempainen JA, Zhou ZX, Wilson EM. Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1527-35.
- Chowdari KV, Wood J, Ganguli R, Gottesman, II, Nimgaonkar VL. Lack of association between schizophrenia and a CAG repeat polymorphism of the hSKCa3 gene in a north eastern US sample. *Mol Psychiatry* 2000; 5: 237-8.
- Comings DE. Polygenic inheritance and micro/minisatellites. *Mol Psychiatry* 1998; 3: 21-31.
- Diener H-C. Pathophysiologie, Klinik, Diagnostik und Differentialdiagnose der Migräne. In: Ensink FBM and Soyka D, editors. *Migräne - aktuelle*

- Aspekte eines altbekannten Leidens. Berlin: Springer-Verlag, 1994: 89-103.
- Dingermann T. Gentechnik Biotechnik - Lehrbuch und Kompendium für Studium und Praxis. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1999.
- Dror V, Shamir E, Ghanshani S, Kimhi R, Swartz M, Barak Y, Weizman R, Avivi L, Litmanovitch T, Fantino E, Kalman K, Jones EG, Chandy KG, Gargus JJ, Gutman GA, Navon R. hKCa3/KCNN3 potassium channel gene: association of longer CAG repeats with schizophrenia in Israeli Ashkenazi Jews, expression in human tissues and localization to chromosome 1q21. *Mol Psychiatry* 1999; 4: 254-60.
- Ducros A, Joutel A, Vahedi K, Cecillon M, Ferreira A, Bernard E, Verier A, Echenne B, Lopez de Munain A, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. Mapping of a second locus for familial hemiplegic migraine to 1q21-q23 and evidence of further heterogeneity. *Ann Neurol* 1997; 42: 885-90.
- Ebersberger A. Pathophysiologie der Migräne. *Anaesthesist* 2002; 51: 661-667.
- Edvinsson L. On migraine pathophysiology. In: Edvinsson L, editor. *Migraine and headache pathophysiology*. London: Martin Dunitz, 1999: 3-16.
- Ensink FBM. Vom Mutterkorn zum selektiven Serotoninrezeptorantagonisten - Historische Aspekte der Entwicklung eines spezifischen Migränetherapeutikums. In: Ensink F.B.M. SD, editor. *Migräne- aktuelle Aspekte eines altbekannten Leidens*. Berlin: Springer, 1994: 25-60.
- Fanger CM, Ghanshani S, Logsdon NJ, Rauer H, Kalman K, Zhou J, Beckingham K, Chandy KG, Cahalan MD, Aiyar J. Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J Biol Chem* 1999; 274: 5746-54.
- Ferrari. Migraine. *Lancet* 1998a; 351: 1043-51.
- Ferrari MD. Migraine. *Lancet* 1998b; 351: 1043-51.
- Ferrari MD, Saxena PR. On serotonin and migraine: a clinical and pharmacological review. *Cephalalgia* 1993; 13: 151-65.
- Figueroa KP, Chan P, Schols L, Tanner C, Riess O, Perlman SL, Geschwind DH, Pulst SM. Association of moderate polyglutamine tract expansions in the slow calcium-activated potassium channel type 3 with ataxia. *Arch Neurol* 2001; 58: 1649-53.
- Freidlin B, Zheng G, Li Z, Gastwirth JL. Trend tests for case-control studies of genetic markers: power, sample size and robustness. *Hum Hered* 2002; 53: 146-52.
- Fusco D. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na/Kpump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Genetics* 2003; 33: 192-96.
- Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A. Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet* 2000; 355: 308-11.
- Gardner K, Barmada MM, Ptacek LJ, Hoffman EP. A new locus for hemiplegic migraine maps to chromosome 1q31. *Neurology* 1997; 49: 1231-8.
- Gargus JJ, Fantino E, Gutman GA. A piece in the puzzle: an ion channel candidate gene for schizophrenia. *Mol Med Today* 1998; 4: 518-24.
- Gerber HP, Seipel K, Georgiev O, Hofferer M, Hug M, Rusconi S, Schaffner W. Transcriptional activation modulated by homopolymeric glutamine and proline stretches. *Science* 1994; 263: 808-11.

- Gervil M, Ulrich V, Kaprio J, Olesen J, Russell MB. The relative role of genetic and environmental factors in migraine without aura. *Neurology* 1999a; 53: 995-9.
- Gervil M, Ulrich V, Kyvik KO, Olesen J, Russell MB. Migraine without aura: a population-based twin study. *Ann Neurol* 1999b; 46: 606-11.
- Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30: 503-512.
- Göbel H. Klassifikation der Migräne. In: Ensink FBM and Soyka D, editors. *Migräne - aktuelle Aspekte eines altbekannten Leidens*. Berlin: Springer-Verlag, 1994: 105-118.
- Gorwood P. Genetic association studies in behavioural neuroscience. In: Crusio WT and Gerlai RT, editors. *Handbook of molecular-genetic techniques for brain and behaviour research*. Vol 13. Amsterdam: Elsevier Science BV, 1999: 113-121.
- Hagner M. Das proteushafte Antlitz der Migräne - Überlegungen zur Kultur eines altbekannten Leidens. In: Ensink FBM and Soyka D, editors. *Migräne - aktuelle Aspekte eines altbekannten Leidens*. Berlin: Springer, 1994: 1-24.
- Hardy J. The real problem in association studies. *Am J Med Genet* 2002; 114: 253.
- Hawi Z, Mynett-Johnson L, Murphy V, Straub RE, Kendler KS, Walsh D, McKeon P, Gill M. No evidence to support the association of the potassium channel gene hSKCa3 CAG repeat with schizophrenia or bipolar disorder in the Irish population. *Mol Psychiatry* 1999; 4: 488-91.
- Jin DK, Hwang HZ, Oh MR, Kim JS, Lee M, Kim S, Lim SW, Seo MY, Kim JH, Kim DK. CAG repeats of CTG18.1 and KCNN3 in Korean patients with bipolar affective disorder. *J Affect Disord* 2001; 66: 19-24.
- Joober R, Benkelfat C, Brisebois K, Toulouse A, Lafreniere RG, Turecki G, Lal S, Bloom D, Labelle A, Lalonde P, Fortin D, Alda M, Palmour R, Rouleau GA. Lack of association between the hSKCa3 channel gene CAG polymorphism and schizophrenia. *Am J Med Genet* 1999; 88: 154-7.
- Jurkat-Rott K, Lerche H, Lehmann-Horn F. Migräne und episodische Ataxien. In: Rieß O and Schöls L, editors. *Neurogenetik*. Berlin: Springer-Verlag, 1998: 115-119.
- Kashi Y, King D, Soller M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet* 1997; 13: 74-8.
- Kohler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, Adelman JP. Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* 1996; 273: 1709-14.
- Koronyo-Hamaoui M, Danziger Y, Frisch A, Stein D, Leor S, Laufer N, Carel C, Fennig S, Minoumi M, Apter A, Goldman B, Barkai G, Weizman A, Gak E. Association between anorexia nervosa and the hSKCa3 gene: a family-based and case control study. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 82-5.
- Kroner-Herwig B, Fritsche G, Brauer H. The physiological stress response and the role of cognitive coping in migraine patients and non-headache controls. *J Psychosom Res* 1993; 37: 467-80.

- Laurent C, Niehaus D, Bauche S, Levinson DF, Soubigou S, Pimstone S, Hayden M, Mbangi I, Emsley R, Deleuze JF, Mallet J. CAG repeat polymorphisms in KCNN3 (hSKCa3) and PPP2R2B show no association or linkage to schizophrenia. *Am J Med Genet* 2003; 116: 45-50.
- Lauritzen M. Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 1994; 117 (Pt 1): 199-210.
- Lea RA, Curtain RP, Hutchins C, Brimage PJ, Griffiths LR. Investigation of the CACNA1A gene as a candidate for typical migraine susceptibility. *Am J Med Genet* 2001; 105: 707-12.
- Lea RA, Shepherd AG, Curtain RP, Nyholt DR, Quinlan S, Brimage PJ, Griffiths LR. A typical migraine susceptibility region localizes to chromosome 1q31. *Neurogenetics* 2002; 4: 17-22.
- Lin M-H, Tseng C-H, Tseng C-C, Huang C-H, Chong C-K, Tseng C-P. Real-time PCR for rapid genotyping of angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism. *Clinical Biochemistry* 2001; 34: 661-666.
- Litt M, LaMorticella D, Bond CT, Adelman JP. Gene structure and chromosome mapping of the human small-conductance calcium-activated potassium channel SK1 gene (KCNN1). *Cytogenet Cell Genet* 1999; 86: 70-3.
- Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin: Springer, 1998.
- Marconi R, De Fusco M, Aridon P, Plewnia K, Rossi M, Carapelli S, Ballabio A, Morgante L, Musolino R, Epifanio A, Micieli G, De Michele G, Casari G. Familial hemiplegic migraine type 2 is linked to 0.9Mb region on chromosome 1q23. *Ann Neurol* 2003; 53: 376-81.
- Margolis RL, Abraham MR, Gatchell SB, Li SH, Kidwai AS, Breschel TS, Stine OC, Callahan C, McInnis MG, Ross CA. cDNAs with long CAG trinucleotide repeats from human brain. *Hum Genet* 1997; 100: 114-22.
- Margolis RL, Ross CA. Expansion explosion: new clues to the pathogenesis of repeat expansion neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med* 2001; 7: 479-82.
- Matsuyama Z, Kawakami H, Maruyama H, Izumi Y, Komure O, Uda F, Kameyama M, Nishio T, Kuroda Y, Nishimura M, Nakamura S. Molecular features of the CAG repeats of spinocerebellar ataxia 6 (SCA6). *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1283-7.
- McGuffin P. Methodology of genetic research in psychiatry. *Acta Neuropsychiatrica* 1999; 11: 45-47.
- Meira-Lima IV, Zhao J, Sham P, Pereira AC, Krieger JE, Vallada H. Association and linkage studies between bipolar affective disorder and the polymorphic CAG/CTG repeat loci ERDA1, SEF2-1B, MAB21L and KCNN3. *Mol Psychiatry* 2001; 6: 565-9.
- Meissner B, Purmann S, Schurmann M, Zuhlke C, Lencer R, Arolt V, Müller-Myhsok B, Morris-Rosendahl DJ, Schwinger E. hSKCa3: a candidate gene for schizophrenia? *Psychiatr Genet* 1999; 9: 91-6.
- Montagna P. Molecular genetics of migraine headaches: a review. *Cephalalgia* 2000; 20: 3-14.
- Moskowitz. Migraine enters the molecular era. *Neuroscientist* 1996; 2: 191-200.
- Moskowitz MA. Basic mechanisms in vascular headache. *Neurol Clin* 1990; 8: 801-15.

- Müller H-J. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) - Das Methodenbuch. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2001.
- Navon. Strong association between schizophrenia and long CAG repeats in the hKCa3/KCNN3 gene, mapped to 1q21, among Israeli Jews. *Am J Hum Genet* 1998; 63: 337.
- Olesen J. Clinical and pathophysiological observations in migraine and tension-type headache explained by integration of vascular, supraspinal and myofascial inputs. *Pain* 1991; 46: 125-32.
- Olesen J, Friberg L, Olsen TS, Iversen HK, Lassen NA, Andersen AR, Karle A. Timing and topography of cerebral blood flow, aura, and headache during migraine attacks. *Ann Neurol* 1990; 28: 791-8.
- Olesen J, Thomsen LL, Lassen LH, Olesen IJ. The nitric oxide hypothesis of migraine and other vascular headaches. *Cephalalgia* 1995; 15: 94-100.
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mhrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell* 1996; 87: 543-52.
- Perutz MF. Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Curr Opin Struct Biol* 1996; 6: 848-58.
- Perutz MF. Glutamine repeats and neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 58-63.
- Poeck K, Hacke W. Neurologie. Berlin: Springer-Verlag, 2001.
- Rapoport A, Edmeads J. Migraine: the evolution of our knowledge. *Arch Neurol* 2000; 57: 1221-3.
- Richter F, Ebersberger A, Schaible HG. Blockade of voltage-gated calcium channels in rat inhibits repetitive cortical spreading depression. *Neurosci Lett* 2002; 334: 123-6.
- Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 1997; 245: 154-60.
- Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 1996; 273: 1516-7.
- Ritsner M, Modai I, Ziv H, Amir S, Halperin T, Weizman A, Navon R. An association of CAG repeats at the KCNN3 locus with symptom dimensions of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2002; 51: 788-94.
- Rohrmeier T, Putzhammer A, Schoeler A, Sartor H, Dallinger P, Nothen MM, Propping P, Knapp M, Albus M, Borrmann M, Knothe K, Kreiner R, Franzek E, Lichtermann D, Rietschel M, Maier W, Klein HE, Eichhammer P. hSKCa3: no association of the polymorphic CAG repeat with bipolar affective disorder and schizophrenia. *Psychiatr Genet* 1999; 9: 169-75.
- Russell MB. Genetics of migraine without aura, migraine with aura, migrainous disorder, head trauma migraine without aura and tension-type headache. *Cephalalgia* 2001; 21: 778-80.
- Russell MB, Hilden J, Sorensen SA, Olesen J. Familial occurrence of migraine without aura and migraine with aura. *Neurology* 1993; 43: 1369-73.
- Russell MB, Iselius L, Olesen J. Inheritance of migraine investigated by complex segregation analysis. *Hum Genet* 1995a; 96: 726-30.

- Russell MB, Rasmussen BK, Thorvaldsen P, Olesen J. Prevalence and sex-ratio of the subtypes of migraine. *Int J Epidemiol* 1995b; 24: 612-8.
- Russell MB, Ulrich V, Gervil M, Olesen J. Migraine without aura and migraine with aura are distinct disorders. A population-based twin survey. *Headache* 2002; 42: 332-6.
- Saleem Q, Sreevidya VS, Sudhir J, Savithri JV, Gowda Y, C BR, Benegal V, Majumder PP, Anand A, Brahmachari SK, Jain S. Association analysis of CAG repeats at the KCNN3 locus in Indian patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Am J Med Genet* 2000; 96: 744-8.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- Sander T, Scholz L, Janz D, Epplen JT, Riess O. Length variation of a polyglutamine array in the gene encoding a small-conductance, calcium-activated potassium channel (hKCa3) and susceptibility to idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res* 1999; 33: 227-33.
- Sanders Sevall J. Rapid allelic discrimination from real-time DNA amplification. *Methods* 2001; 25: 452-455.
- Sandor PS, Ambrosini A, Agosti RM, Schoenen J. Genetics of migraine: possible links to neurophysiological abnormalities. *Headache* 2002; 42: 365-77.
- Sasieni PD. From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 1997; 53: 1253-61.
- Scherzinger E, Sittler A, Schweiger K, Heiser V, Lurz R, Hasenbank R, Bates GP, Lehrach H, Wanker EE. Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 4604-9.
- Schulze TG, McMahon FJ. Genetic association mapping at the crossroads: which test and why? Overview and practical guidelines. *Am J Med Genet* 2002; 114: 1-11.
- Silberstein SD, Lipton RB, Breslau N. Migraine: association with personality characteristics and psychopathology. *Cephalalgia* 1995; 15: 358-69; discussion 336.
- Slager SL, Schaid DJ. Case-control studies of genetic markers: power and sample size approximations for Armitage's test for trend. *Hum Hered* 2001; 52: 149-53.
- Stewart WF, Lipton RB, Liberman J. Variation in migraine prevalence by race. *Neurology* 1996; 47: 52-9.
- Stöber G, Jatzke S, Meyer J, Okladnova O, Knapp M, Beckmann H, Lesch KP. Short CAG repeats within the hSKCa3 gene associated with schizophrenia: results of a family-based study. *Neuroreport* 1998; 9: 3595-9.
- Stöber G, Meyer J, Nanda I, Wienker TF, Saar K, Jatzke S, Schmid M, Lesch KP, Beckmann H. hKCNN3 which maps to chromosome 1q21 is not the causative gene in periodic catatonia, a familial subtype of schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2000; 250: 163-8.
- Sun G, Tomita H, Shakkottai VG, Gargus JJ. Genomic organization and promoter analysis of human KCNN3 gene. *J Hum Genet* 2001; 46: 463-70.

- Surzycki S. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Berlin: Springer-Verlag, 2000.
- Tournier-Lasserre E. CACNA1A mutations: hemiplegic migraine, episodic ataxia type 2, and the others. *Neurology* 1999; 53: 3-4.
- Tsai MT, Shaw CK, Hsiao KJ, Chen CH. Genetic association study of a polymorphic CAG repeats array of calcium-activated potassium channel (KCNN3) gene and schizophrenia among the Chinese population from Taiwan. *Mol Psychiatry* 1999; 4: 271-3.
- Tuma RS, Beaudet MP, Jin X, Jones LJ, Cheung CY, Yue S, Singer VL. Characterization of SYBR Gold nucleic acid gel stain: a dye optimized for use with 300-nm ultraviolet transilluminators. *Anal Biochem* 1999; 268: 278-88.
- Ujike H, Yamamoto A, Tanaka Y, Takehisa Y, Takaki M, Taked T, Kodama M, Kuroda S. Association study of CAG repeats in the KCNN3 gene in Japanese patients with schizophrenia, schizoaffective disorder and bipolar disorder. *Psychiatry Res* 2001; 101: 203-7.
- Ulrich V, Gervil M, Kyvik KO, Olesen J, Russell MB. Evidence of a genetic factor in migraine with aura: a population-based Danish twin study. *Ann Neurol* 1999; 45: 242-6.
- van der Kamp W, Maassen VanDenBrink A, Ferrari MD, van Dijk JG. Interictal cortical hyperexcitability in migraine patients demonstrated with transcranial magnetic stimulation. *J Neurol Sci* 1996; 139: 106-10.
- Waters WE. Migraine runs in families but is it inherited? *Bmj* 1995; 311: 1227.
- Weeks DE, Lathrop GM. Polygenic disease: methods for mapping complex disease traits. *Trends Genet* 1995; 11: 513-9.
- Weiller C, May A, Limmroth V, Juptner M, Kaube H, Schayck RV, Coenen HH, Diener HC. Brain stem activation in spontaneous human migraine attacks. *Nat Med* 1995; 1: 658-60.
- Wittekindt O, Jauch A, Burgert E, Scharer L, Holtgreve-Grez H, Yvert G, Imbert G, Zimmer J, Hoehe MR, Macher JP, Chiaroni P, van Calker D, Crocq MA, Morris-Rosendahl DJ. The human small conductance calcium-regulated potassium channel gene (hSKCa3) contains two CAG repeats in exon 1, is on chromosome 1q21.3, and shows a possible association with schizophrenia. *Neurogenetics* 1998; 1: 259-65.
- Wittekindt O, Schwab SG, Burgert E, Knapp M, Albus M, Lerer B, Hallmayer J, Rietschel M, Segman R, Borrmann M, Lichtermann D, Crocq MA, Maier W, Morris-Rosendahl DJ, Wildenauer DB. Association between hSKCa3 and schizophrenia not confirmed by transmission disequilibrium test in 193 offspring/parents trios. *Mol Psychiatry* 1999; 4: 267-70.
- Wolfart J, Neuhoff H, Franz O, Roeper J. Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons. *J Neurosci* 2001; 21: 3443-56.
- Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, Ishii T, Hirschberg B, Bond CT, Lutsenko S, Maylie J, Adelman JP. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* 1998; 395: 503-7.

- Zhao JH, Curtis D, Sham PC. Model-free analysis and permutation tests for allelic associations. *Hum Hered* 2000; 50: 133-9.
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 1997; 15: 62-9.
- Zuccato C, Ciammola A, Rigamonti D, Leavitt BR, Goffredo D, Conti L, MacDonald ME, Friedlander RM, Silani V, Hayden MR, Timmusk T, Sipione S, Cattaneo E. Loss of huntingtin-mediated BDNF gene transcription in Huntington's disease. *Science* 2001; 293: 493-8.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Lesch für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit im Labor der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Jobst Meyer, der jederzeit durch klärende Diskussionen, wertvolle Anregungen und konstruktive Kritik alle Schritte des praktischen und theoretischen Teils dieser Arbeit begleitet hat.

Für ihre vielfältige Unterstützung möchte ich mich außerdem bei Frau Gabriela Ortega, Herrn Dr. med. R. Mößner und Frau Dr. med. C. Freitag bedanken.

Frau Prof. Dr. med. C. Sommer, Neurologische Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg, gilt mein Dank für die Übernahme des Korreferats.

Lebenslauf

Personalien

Name Annette Weichselbaum
Geburtsdatum/-ort 09.06.1978 in Neumarkt/Opf.

Schulbildung

1984-1988 Grundschule Sulzbürg
1988-1997 Ostendorfer-Gymnasium Neumarkt/Opf.

Medizinstudium

10/1997-08/1999 vorklinischer Studienabschnitt an der Universität Würzburg
08/1999 Ärztliche Vorprüfung
05/2000-11/2004 klinischer Studienabschnitt an der Universität Würzburg
03/2001 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2001-08/2002 Auslandsstudium an der Universität Umeå/Schweden
08/2003 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2003-09/2004 Praktisches Jahr
11/2004 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Volontariat

1999/2000 Volontärin der Nepalhilfe Beilngries e.V. in Patan/Nepal

Würzburg, 1. Dezember 2004