

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und
Psychotherapie
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. J. Deckert

MLC1/KIAA0027 als Kandidatengen
für Periodische Katatonie

-

Eine Mutationsanalyse bei einer betroffenen Großfamilie

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Andreas Huberth
aus Ebermannstadt

Würzburg, Mai 2009

Referent: Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch

Koreferent: Prof. Dr. Peter Riederer

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.05.2010

Der Promovend ist Arzt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Meyer J, Huberth A, Ortega G, Syagailo YV, Jatzke S, Mossner R, Strom TM, Ulzheimer-Teuber I, Stöber G, Schmitt A, and Lesch KP:

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

Mol Psychiatry. May 2001;6(3):302-6.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Schizophrenie	1
1.1.1	Historische Betrachtung	1
1.1.2	Schizophrenie in ICD-10 und DSM-IV	4
1.1.3	Epidemiologie und Ätiologie	6
1.2	Strategien zur Identifizierung einer genetischen Krankheitsursache	7
1.2.1	Funktionelle Klonierung	7
1.2.2	Positionelle Klonierung und LOD-Score-Analyse	8
1.2.3	Die Kandidatengenmethode	10
1.3	Das Klassifikationssystem nach Leonhard	11
1.3.1	Die periodische Katatonie	12
1.4	<i>MLC1/KIAA0027</i> als Kandidatengen	13
1.4.1	Kenntnisstand über <i>KIAA0027</i> bei Untersuchungsbeginn .	13
1.4.2	Die megalenzepale Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC)	14
1.4.3	Möglicher Genlocus für die periodische Katatonie auf Chromosom 22q13	15
1.5	Fragestellung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17

II

2.1.1	Patientensammlung	17
2.1.2	DNA	17
2.1.3	Oligonucleotide	18
2.1.4	Enzyme	20
2.1.5	Reaktionskits	21
2.1.6	Puffer und Lösungen	21
2.1.7	Chemikalien	23
2.1.8	Geräte	24
2.1.9	Gebrauchswaren	25
2.1.10	Software	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	DNA-Präparation aus Blut	26
2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.3	PCR	31
2.2.4	RACE	37
2.2.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
2.2.6	Ethanolpräzipitation	42
2.2.7	Sequenzierung	43
2.2.8	DNA-Sequenzanalyse mittels BLAST	44
2.2.9	Prädiktion der Struktur des von <i>MLC1</i> kodierten Proteinprodukts	45
3	Ergebnisse	47
3.1	Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts	47
3.2	Mutationsanalyse von <i>MLC1</i> bei 5 Probanden	49
3.2.1	Punktmutationen ohne Änderung des Genprodukts	52
3.2.2	Punktmutation in Exon 6	52
3.2.3	Punktmutation in Exon 11	53
3.3	Strukturanalyse des vorhergesagten <i>MLC1</i> -Proteins	55

	III
4 Diskussion	59
5 Zusammenfassung	67
A Abkürzungsverzeichnis	79

Tabellenverzeichnis

1	Symptome 1. und 2. Ranges nach Kurt Schneider.[1]	3
2	Diagnostische Kriterien nach ICD-10 und DSM-IV.	5
3	Oligonukleotid-Primer zur Amplifizierung von <i>MLC1</i> -Fragmenten	19
4	Genspezifische Oligonukleotid-Primer für die 5'-RACE	20
5	Übersicht nachgewiesener <i>MLC1</i> -Varianten	51

Abbildungsverzeichnis

1	Stammbaum Familie 21 mit Bezeichnung der zugehörigen DNA-Proben	18
2	Primer für den Mutationsnachweis in Exon 6 (Mutation)	37
3	Reaktionsschritte der 5'-RACE	46
4	mRNA-Sequenz des <i>MLC1</i> -Gens	48
5	Nachweis der Punktmutation in Exon 6	54
6	Punktmutation in Exon 11	56
7	Nachweis der c1121a-Mutation in der Gelelektrophorese	57
8	Verteilung der c1121a-Mutation in Familie 21	58

1 Einleitung

1.1 Schizophrenie

Der Begriff der Schizophrenie wird von Laien meist als Bezeichnung für eine „gespaltene Persönlichkeit“ falsch verstanden. Eine „gespaltene Persönlichkeit“, im Fachterminus „Dissoziative Identitätsstörung“, ist im Vergleich zur Schizophrenie zwar selten, stößt aufgrund ihres sensationellen Charakters jedoch auf vergleichsweise großes Interesse in der Öffentlichkeit, wie es auch der Bekanntheitsgrad des Literaturklassikers „Dr. Jekyll und Mr. Hyde“ von Robert Louis Stevenson zeigen mag. Dagegen bleibt das Krankheitsbild der Schizophrenie den meisten Menschen unbekannt, obwohl diese oft heimtückisch verlaufende Erkrankung immerhin etwa ein Prozent der Bevölkerung weltweit betrifft [2].

1.1.1 Historische Betrachtung

Die „Schizophrenie“ fand erstmalig Ende des 19. Jahrhunderts unter Emil Kraepelins Bezeichnung „Dementia praecox“ eine weithin akzeptierte Beschreibung. Kraepelin stellte damit einen früh im Leben einsetzenden Prozess mit fortschreitendem geistigen Verfall in den Vordergrund der Erkrankung [3]. Anfang des 20. Jahrhunderts widersprach Eugen Bleuler der von Kraepelin postulierten vorrangigen Bedeutung eines chronischen Verlaufes. Das Hauptcharakteristikum der Erkrankung sah Bleuler vielmehr in einer Aufspaltung des Bewusstseins oder der Gesamtpersönlichkeit, einer mangelhaften Einheit des Denkens, Fühlens und

Wollens. Bleuler prägte den Begriff der „Schizophrenie“ [4] („schizo“ = „gespalten“; „phren“ = „Geist“), der alle Erkrankungen, darunter auch die „Dementia praecox“, mit einem umschriebenen psychopathologischen Syndrom, bestehend aus charakteristischen Denk-, Affekt- und Ich-Störungen, Autismus und Ambivalenz unter einem Begriff vereinigte. Einen progredienten Verlauf sah Bleuler bei einer „Schizophrenie“ als nicht zwingenderweise eintretend an.

Nach dem zweiten Weltkrieg entwickelte Kurt Schneider ein Schizophreniekonzept, in dem er zwischen Symptomen 1. und 2. Ranges (siehe Tabelle 1.) unterschied [1]. Nach Schneider liegt bei Vorhandensein von Symptomen 1. Ranges und gleichzeitigem Ausschluss einer körperlichen Grunderkrankung eine Schizophrenie vor. Auch ein gehäuftes Auftreten von Symptomen 2. Ranges erlaubt die Diagnose Schizophrenie.

Die verschiedenen Schizophreniekonzepte fanden unterschiedliche Verbreitung, so folgte man in Nordamerika vor allem den Ideen Bleulers, während in Europa vorwiegend Kraepelins Vorstellungen geteilt wurden. Frühe internationale Studien ergaben demzufolge große Unterschiede bezüglich Verbreitung und Kriterien zur Stellung der Diagnose „Schizophrenie“ [5] [6]. Als Antwort auf diese Studien entwickelten die Weltgesundheitsorganisation WHO und die Amerikanische Psychiatrische Vereinigung kriterienbasierte Diagnosesysteme für die Schizophrenie, was zu einer besseren Vergleichbarkeit der Diagnosen weltweit führte [7][8]. Die jeweiligen Diagnosekriterien in ihrer aktuellen Form finden sich in der 10. Auflage der „International Classification of Diseases“ (ICD-10) der WHO sowie in der 4. Auflage des „Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorders“ (DSM-IV) der American Psychiatric Association.

Abnorme Erlebnisweisen	Symptome 1.Ranges	Symptome 2.Ranges
Akustische Halluzinationen	Kommentierende Stimmen (imperative Stimmen), dialogische Stimmen, Gedankenlautwerden	Sonstige akustische Halluzinationen
Leibhalluzinationen	Leibliche Beeinflussungsergebnisse	Koenästhesien im engeren Sinne
Halluzinationen anderer Sinnesgebiete	—	Olfaktorische, optische, gustatorische Halluzinationen
Schizophrene Ich-Störungen	Gedankenentzug, Gedankeneingebung, Gedankenausbreitung, Willensbeeinflussung	—
Wahn	Wahnwahrnehmung	Wahneinfall, einfache Eigenbeziehung

Tabelle 1: Symptome 1. und 2. Ranges nach Kurt Schneider.[1]

1.1.2 Schizophrenie in ICD-10 und DSM-IV

In den Klassifikationssystemen des ICD-10 und des DSM-IV sind die Kriterien zur Diagnose der Schizophrenie in wesentlichen Anteilen sehr ähnlich. Dennoch gibt es auch wichtige Unterschiede (siehe Tabelle 2).

Beide Klassifikationen teilen das Konzept der Schizophrenie als einer durch eine Vielzahl unterschiedlicher Symptome charakterisierten Erkrankung. Zu diesen zählen unter anderem verschiedenartige produktiv psychotische oder auch „positive“ Symptome, wie Wahnvorstellungen oder Halluzinationen, und sogenannte „negative“ Symptome, wie Apathie, Sprachverarmung oder verflachte Affekte. Dabei unterscheiden die zwei Systeme in Anlehnung an das Konzept Kurt Schneiders die Symptome nach ihrer Relevanz. So sind für die Diagnosestellung mindestens zwei einer Gruppe von verschiedenen positiven und negativen Symptomen notwendig, ist ein Symptom jedoch typisch „schizophren“, z.B. dialogische oder kommentierende Stimmen, so genügt schon ein solches Symptom. Die Diagnose „Schizophrenie“ kann außerdem erst dann gestellt werden, wenn als Grund für den psychotischen Zustand eines Patienten sowohl eine körperliche Grunderkrankung (z.B. Hirntumor), psychotrope Substanzen (z.B. Amphetamine), als auch andersartige psychische Störungen (z.B. depressive oder manische Episode) ausgeschlossen sind. Gemeinsam ist dem ICD-10 und dem DSM-IV auch eine geforderte Mindestdauer für das Störungsbild, diese ist im ICD-10 mit einem Monat angegeben. Das DSM-IV verlangt im Unterschied dazu eine Persistenz der Symptome über einen Zeitraum von 6 Monaten. Zusätzlich sind soziale oder berufliche Leistungseinbußen für die Diagnose nach DSM-IV nötig. Die Diagnosekriterien für die Schizophrenie sind im DSM-IV demzufolge etwas enger als im ICD-10.

Diagnostische Kriterien	ICD-10	DSM-IV
Symptome	<p>mindestens eines der folgenden Symptome ist vorhanden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • bizarrer Wahn (z.B. Kontrollwahn) • schizophrene Ich-Störung (z.B. Gedankeneingebung) • kommentierende oder dialogische Stimmen <p style="text-align: center;">oder</p> <p>mindestens zwei der folgenden Symptome sind vorhanden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • sonstige akkustische Halluzinationen oder Halluzinationen anderer Sinnesmodalitäten • formale Denkstörungen (z.B. Gedankenabreißen, Danebenreden) • katatone Symptome • negative Symptome (z.B. flacher Affekt, Sprachverarmung) 	
Dauer	mindestens 1 Monat	mindestens 6 Monate
Ausschlusskriterien	die Symptome sind weder Folge einer anderen psychischen Störung noch einer körperlichen Grunderkrankung und sind nicht durch die Wirkung einer Substanz (z.B. Droge, Medikament) hervorgerufen	
sonstige Kriterien	—	seit Beginn der Störung soziale oder berufliche Leistungseinbußen

Tabelle 2: Diagnostische Kriterien nach ICD-10 und DSM-IV.

1.1.3 Epidemiologie und Ätiologie

Das Lebenszeitrisko für die Schizophrenie liegt bei engen Diagnosekriterien in einem Bereich von 0,7 bis 1,4 Prozent [9]. (Die Punktprävalenz beträgt 0,14 bis 0,46 Prozent, die Jahresinzidenz 0,016 bis 0,042 Prozent [10].) Schizophrenie tritt selten vor dem 10. oder nach dem 50. Lebensjahr neu auf. Der Häufigkeitsgipfel der Neuerkrankungen liegt bei Männern zwischen 15 und 25 Jahren, bei Frauen zwischen 25 und 35 Jahren.

Die Ätiologie der Schizophrenie ist im Detail noch ungeklärt, doch kann nach aktuellem Wissensstand von einem komplexen Entstehungsmechanismus mit genetischen und verschiedenen Umweltfaktoren ausgegangen werden. In einer Vielzahl von Studien konnte ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Verwandte schizophrener Probanden gezeigt werden [11]. So berichtet Moldin [12] von einem Wiederholungsrisiko von 48 Prozent für eineiige Zwillinge, 11 Prozent für Verwandte ersten Grades, 4,25 Prozent für Verwandte zweiten Grades, beziehungsweise 2 Prozent für Verwandte dritten Grades. In Adoptionsstudien ergab sich eine höhere Prävalenz der Schizophrenie in den biologischen gegenüber den Adoptivfamilien schizophrener Adoptivkinder [13]. Diese Ergebnisse belegen eine starke genetische Komponente der Schizophrenie. Dennoch ist anzumerken, dass Schizophreniepatienten in über 60 Prozent der Fälle keine ebenfalls erkrankten Verwandten ersten und zweiten Grades aufweisen [14].

Verschiedene Umweltfaktoren scheinen ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung der Schizophrenie zu spielen. So haben zahlreiche Studien, sowohl für die nördliche als auch für die südliche Hemisphäre, einen Überschuss von 5 bis 8 Prozent der Geburten Schizophrener, insbesondere solcher mit negativer Familienanamnese, in den Winter- und Frühlingsmonaten gezeigt [15]. Aktuelle Ergebnisse lassen einen Zusammenhang mit mütterlichen Infektionen während

der Schwangerschaft vermuten [16] [17]. Schwere mütterliche Mangelernährung während des ersten Trimesters, eine perinatale Hirnschädigung oder mütterliche Präeklampsie scheinen ebenfalls mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung von Schizophrenie verbunden zu sein [18]. Zur Ätiopathogenese werden sowohl eine gestörte Hirnentwicklung als auch neurodegenerative Prozesse diskutiert [19].

1.2 Strategien zur Identifizierung einer genetischen Krankheitsursache

Zur Identifizierung krankheitsverursachender Gendefekte kommen vor allem die Methoden der funktionellen Klonierung, der positionellen Klonierung mit LOD-Score-Analyse und der Kandidatengenmethode zum Einsatz.

Bei zahlreichen hereditären Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Alzheimer oder Mukoviszidose, ist es inzwischen gelungen, zugrunde liegende Gendefekte zu identifizieren. Dass auch bei der Ätiologie der Schizophrenie genetische Faktoren eine gewichtige Rolle spielen, wurde bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts von E. Kraepelin vermutet und ist mittlerweile unstrittig. Doch trotz intensiver Bemühungen war die Suche nach dem „Schizophrenie-Gen“ bisher noch nicht erfolgreich.

1.2.1 Funktionelle Klonierung

Ist bei einer hereditären Erkrankung das krankheitsvermittelnde Protein (z.B. Enzym, Strukturprotein etc.), also das defekte Genprodukt bekannt, so kann nach Entschlüsselung der Aminosäuresequenz des Proteins eine degenerierte DNA-Sonde hergestellt werden. In Hybridisierungsversuchen der degenerierten DNA-Sonde mit einer cDNA-Bank, kann dann die zugehörige cDNA identifiziert werden. Die chromosomale Position der entsprechenden genomischen DNA lässt sich

mittels in-situ-Hybridisierungstechniken, beispielsweise der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), bestimmen. Durch direkte Sequenzierung der genomischen DNA und Vergleich der DNA-Sequenzen gesunder bzw. erkrankter Probanden können dann krankheitsassoziierte Mutationen enttarnt werden. Beispielsweise findet sich im Falle der Phenylketonurie (häufigste genetische Anomalie des Aminosäurestoffwechsels, 1 Erkrankung auf 10 000 Neugeborene) bei den Erkrankten eine massive Erniedrigung der Aktivität des Enzyms Phenylalaninhydroxylase in der Leber. Durch funktionelle Klonierung gelang es, das Phenylalaninhydroxylasegen zu lokalisieren und diverse Phenylketonurie verursachende Mutationen zu identifizieren. Mittlerweile sind mehr als 240 verschiedene krankheitsverursachende Mutationen im Phenylalaninhydroxylasegen bekannt. Eine Erkrankung mit Phenylketonurie tritt nur dann auf wenn in beiden Allelen des Phenylalaninhydroxylasegens eine, nicht notwendigerweise gleichartige, Mutation vorliegt. Die einzelnen Mutationen führen zu jeweils unterschiedlich starken Enzymaktivitätsminderungen, die sich summieren, und somit den Schweregrad der Erkrankung beeinflussen.

1.2.2 Positionelle Klonierung und LOD-Score-Analyse

Mit der positionellen Klonierung können auch krankheitsverursachende Gene identifiziert werden, wenn die Pathogenese und somit das defekte Proteinprodukt nicht bekannt ist. Dieses Verfahren basiert auf der Technik der Kopplungsanalyse. Dabei versucht man in großen Familien mit mehreren Erkrankten (Multiplex-Familien) mittels genetischer Kartierung eine Cosegregation von genetischen Markern mit bekannter Genlokalisierung und der Erkrankung darzustellen.

Als Marker dienen dabei beispielsweise Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen oder auch so genannte „short tandem repeats“ (**STR**), polymorphe Tandemwiederholungen mit repetitiven Sequenzen aus meist 2 bis 5 Nucleotiden.

Mittels spezieller Computersoftware (z.B. GENEHUNTER) kann dann aus den Ergebnissen der gentischen Kartierung die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung der einzelnen Marker mit der Erkrankung berechnet werden. Die Kopplungswahrscheinlichkeit wird meist als **LOD-Score** (**L**ogarithm of the **O**dds) ausgedrückt, also als Logarithmus des Verhältnisses von der Wahrscheinlichkeit einer angenommenen Kopplung von Marker und Erkrankung zur Wahrscheinlichkeit einer angenommenen Nicht-Kopplung. Ein LOD-Score von +3 bedeutet somit, dass ein Zusammenhang von Marker und Erkrankung 1000-fach wahrscheinlicher ist, als dass kein Zusammenhang besteht, was im Allgemeinen als signifikanter Befund gewertet wird [20]. Ein LOD-Score im Bereich von +2 bis +3 vermittelt noch einen suggestiven Anhalt für eine Kopplung. Werte von kleiner als -2, also mehr als 100-fach höherer Wahrscheinlichkeit einer Nicht-Kopplung, wird als signifikanter Beleg gegen eine mögliche Kopplung angesehen.

Die LOD-Score-Analyse eignet sich primär zur Untersuchung monogen vererbter Krankheiten. Für polygene Erkrankungen, die Folge komplexer Interaktion mehrerer genetischer und unter Umständen exogener Faktoren sind, ist die klassische LOD-Score-Analyse wenig hilfreich, da für eine aussagekräftige LOD-Score-Berechnung ausreichende Kenntnisse über den Erbgang notwendig sind [21]. Durch Verwendung entsprechend modifizierter Berechnungsmethoden (z.B. GENEHUNTER-PLUS-Software) ist es jedoch auch in parameterfreien Kopplungsanalysen möglich, auf die genetische Lokalisation von Krankheitsgenen zu schliessen [22].

Ist durch die positionelle Klonierung die Kopplung eines genetischen Markers mit einer Erkrankung beschrieben, so kann nun durch Sequenzierung der in der Zielregion, also der Umgebung des Markers, liegenden Gene gezielt nach der krankheitsverursachenden Mutation gesucht werden. Da die Zielregionen jedoch meistens relativ groß sind, bedeutet dies, dass sehr viele Gene zu überprüfen

sind. In dieser Situation kann die Kandidatengenmethode zu einer deutlichen Verkürzung der Suche führen.

1.2.3 Die Kandidatengenmethode

Ist nach positioneller Klonierung die Anzahl der weiter zu untersuchenden potentiellen Krankheitsgene groß, so versucht man, mit der Kandidatengenmethode unter Verwendung weiterer Kriterien die vielversprechendsten Kandidaten unter diesen Genen auszusuchen. Ist zum Beispiel bei einem in der Zielregion liegenden Gen ein Genprodukt bekannt, welches eine Rolle in der Pathogenese der Erkrankung spielen könnte, so wird dieses Gen zum nahe liegenden Ziel genauerer Untersuchungen. Erfolgreich war dieses Vorgehen unter anderem beim Marfan-Syndrom.¹ Ist alternativ die Expression eines Gens im Zielorgan der Erkrankung beschrieben, so ist dieses natürlich eher das gesuchte Krankheitsgen, als ein Gen, das im erkrankten Organ nicht exprimiert wird. Bei fehlenden Untersuchungsergebnissen am Menschen kann hier auch die Expression der homologen Gene im Tierversuch einen Hinweis geben. Beispielsweise konnte auf diese Weise das Gen *BRCA1* als Kandidatengen für erblichen Brustkrebs festgelegt werden [25], mit erfolgreichem Resultat [26].

¹Das Marfan-Syndrom (Inzidenz 1:10000) ist eine autosomal dominante Erbkrankheit die das Bindegewebe betrifft. Charakteristisch ist ein ausgesprochener Hochwuchs der Patienten mit Langschädel und Spinnenfingrigkeit. Außerdem findet sich eine ausgeprägte Schlaffheit der Bänder mit Überstreckbarkeit der Gelenke. Typische Komplikationen der Erkrankung sind Auglinienluxation und Aortendilatation bis hin zur Aortenruptur. Für das Marfan-Syndrom wurde eine Kopplung mit Chromosom 15q festgestellt. Zeitgleich konnte auch das Gen für Fibrillin, einem wichtigen Bindegewebsbestandteil, auf Chromosom 15q lokalisiert werden. Innerhalb kurzer Zeit konnte das Fibrillin-Gen durch Mutationsnachweis als Krankheitsgen des Marfan-Syndroms identifiziert werden [23][24].

1.3 Das Klassifikationssystem nach Leonhard

Neben den großen Klassifikationssystemen von ICD-10 und DSM-IV existiert mit der Einteilung der endogenen Psychosen nach Karl Leonhard (1904-1988) eine weitere Klassifikation psychischer Erkrankungen, deren Reliabilität und Validität in einer Vielzahl von Studien verifiziert werden konnte [27] [28] [29]. Nach Leonhard [30][31] können die endogenen Psychosen nach Symptomen, Langzeitverlauf und Endzustand in 5 Hauptkategorien unterteilt werden:

1. monopolare phasische Psychosen
2. manisch-depressive Krankheit
3. zyклоide Psychosen
4. unsystematische Schizophrenien
5. systematische Schizophrenien

Hierbei teilt Leonhard die Schizophrenien in die Diagnosegruppen der systematischen sowie der unsystematischen Schizophrenien. Ein Hauptcharakteristikum der systematischen Schizophrenien ist nach Leonhard ein schleichender, chronisch-progredienter Krankheitsverlauf, im Gegensatz zu einem phasischen Krankheitsverlauf mit zwischenzeitlichen Remissionen bei den unsystematischen Schizophrenien. Dabei beschreibt Leonhard eine deutlich höhere familiäre Belastung bei unsystematischen Schizophrenieformen. So beobachtete er bei der periodischen Katatonie, einer unsystematischen Schizophrenieform, 22% erkrankte Eltern und 21,2% erkrankte Geschwister, andererseits lediglich 2,7% erkrankte Eltern bzw. 3,5% erkrankte Geschwister bei der unsystematischen Katatonie [30]. Leonhard ging deswegen von einem dominanten Vererbungsmodus für die periodische Katatonie aus.

Auch in ICD-10 und DSM-IV werden die Schizophrenien in Unterformen aufgeteilt, allerdings, ohne die von Leonhard propagierte Dichotomie von systematischen und unsystematischen Erkrankungen zu berücksichtigen. Dennoch können periodische und systematische Katatonie als valide Untergruppen der DSM- bzw. der ICD-Klassifikation betrachtet werden[32][27]. Stöber et *al.* konnten die Beobachtungen Leonhards im Bezug auf die starke familiäre Belastung bei der periodischen Katatonie bestätigen[33]. Damit liefert die Unterform der periodischen Katatonie, aufgrund der im Vergleich zur Gesamtgruppe der Schizophrenien deutlich höheren erblichen Belastung, einen vielversprechenden Ansatzpunkt für molekulargenetische Untersuchungen.

1.3.1 Die periodische Katatonie

Im folgenden Abschnitt soll nun kurz das Krankheitsbild der periodischen Katatonie, den Ausführungen Leonhards folgend[30], beschrieben werden.

Die periodische Katatonie wird geprägt von schubweise auftretenden hyperkinetischen und akinetischen Zuständen. Charakteristischerweise sind dabei die Symptome der beiden Pole nicht streng getrennt. So läßt sich während hyperkinetischer Phasen durch die Beimengung akinetischer Züge meist ein etwas steifer und ruckartiger Bewegungsablauf beobachten. Dadurch verlieren Bewegungen die natürliche Harmonie, Reaktivbewegungen sind teilweise nicht mehr als solche erkennbar und Ausdrucksbewegungen sind oft ihres sinnvollen Inhalts beraubt. Damit bekommen die Erregungszustände einen parakinetischen Charakter. Umgekehrt finden sich in der akinetischen Phasen, trotz einer allgemeinen Starre von Mimik und Körperhaltung, oft sinnentleerte, meist stereotyp bis iterativ ablaufende, Bewegungen einer Extremität. Auf diese Weise kann es auch zu Haltungstereotypen kommen, indem trotz Bewegungsverarmung bestimmte Haltungen immer wieder aktiv eingenommen werden. Oft zeigt sich in Phasen der Akinesie

bei passiven Bewegungsversuchen ein negativistisches Verhalten. Ebenso kann es aus der Bewegungsarmut plötzlich zu impulsiven und häufig aggressiven Handlungen kommen. Die einzelnen Krankheitsschübe klingen im Laufe von Wochen bis Monaten wieder ab. Nach den akuten Schüben treten regelmäßig Remissionen ein, wobei akinetische Zustände schneller zu bleibenden Defekten führen. Als Residualzustand in der Remission findet sich, in leichten Fällen, eine vorwiegend psychomotorische, aber teilweise auch affektive Lahmheit. Bei schwereren Verläufen kommt es, meist nach mehreren Krankheitsschüben, zu einer hochgradigen Abstumpfung der Patienten, die nicht selten zu einer vollkommenen Verwahrlosung der Betroffenen führt. Bei allen Defektschweregraden kann eine Reizbarkeit, teils mit aggressivem Verhalten, bestehen. Auch bei schweren Residualzuständen lassen sich meistens Symptome beider Krankheitspole beobachten, z.B. in Form von grimassierenden Gesichtsbewegungen bei sonst bestehender Bewegungsarmut.

Die periodische Katatonie tritt häufig bereits um das 20. Lebensjahr auf. Meist kommt die Erkrankung nach einem oder wenigen Schüben zum Stillstand und hinterlässt dann nur milde Defekte. Eher selten schreitet die periodische Katatonie zu schweren Endzuständen fort, woraus sich eine verhältnismäßig gute Prognose ergibt.

1.4 *MLC1/KIAA0027* als Kandidatengen

1.4.1 Kenntnisstand über *KIAA0027* bei Untersuchungsbeginn

Das *KIAA0027*-Gen auf Chromosom 22q13 wurde erstmals 1994 von Nomura et al. [34] beschrieben. Der Forschungsgruppe um Nomura war es durch Un-

tersuchungen an cDNA-Klonen einer unreifen myeloiden Zellreihe gelungen, die kodierenden Sequenzen von insgesamt 40 bisher unbekannt Genen (*KIAA0001-KIAA0040*) vorherzusagen.

Eine in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Northern-Blot-Analyse zeigte eine relativ hohe Expression des Gens im Gehirn, in geringerem Maße auch in weißen Blutkörperchen und in der Milz, ferner auch in Ovar, Plazenta, Prostata, Thymus und Lunge. Zeitgleich mit den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen führte eine Arbeitsgruppe um Leegwater Untersuchungen am *KIAA0027*-Gen hinsichtlich eines Zusammenhanges von Genveränderungen mit der seltenen hereditären Erkrankung der Megalenzephalen Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (**MLC**) durch. 2001 gelang es Leegwater et al., die Erkrankung mit MLC auf Mutationen im *KIAA0027*-Gen zurückzuführen[35]. Das *KIAA0027*-Gen wurde daraufhin vom HUGO-Nomenklatur-Komitee in *MLC1* umbenannt. Im weiteren wird deshalb die offizielle Bezeichnung *MLC1* verwendet.

1.4.2 Die megalenzephalale Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC)

Das Krankheitsbild der megalenzephalen Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (**MLC**) wurde 1995 erstmals beschrieben. Van der Knaap et al. beschrieben ein in der Kindheit auftretendes Syndrom aus Leukoenzephalopathie und Megalenzephalie [36]. Die betroffenen Kinder entwickeln ab dem frühen Kindheitsalter eine langsam fortschreitende Ataxie und Spastik, während die kognitiven Fähigkeiten in den ersten Erkrankungsjahren weitgehend unbeeinflusst bleiben. Meist tritt zusätzlich eine Epilepsie auf. Bei allen Patienten finden sich in Kernspinaufnahmen schwere Veränderungen der weißen Hirnsubstanz mit Zystenbildung. Insbesondere ist die supratentorielle weiße Substanz im Bereich der

Hemisphären betroffen. Eine Hirnbiopsie bei einem der Probanden zeigte in der Histologie ein spongiforme Leukoenzephalopathie ohne Beteiligung des Cortex [37]. Charakteristisch für die MLC ist die große Diskrepanz der schwergradigen Befunde im Kernspin zu den vergleichsweise milden klinischen Symptomen.

Aus dem Verteilungsmuster weiterer MLC-Erkrankter in den Familien der Probanden schlossen Van der Knaap et *al.* auf einen autosomal rezessiven Vererbungsmodus der MLC.

1.4.3 Möglicher Genlocus für die periodische Katatonie auf Chromosom 22q13

Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, besteht bei der Periodischen Katatonie eine starke familiäre Belastung, die mit einem dominanten Vererbungsmodus vereinbar wäre.

Die Arbeitsgruppe um Stöber beschrieb in Kopplungsuntersuchungen an 12 Multiplex-Familien mögliche Loci für ein Krankheitsgen auf Chromosom 15q15 und Chromosom 22q13 [38]. In einer parameterfreien Genom-weiten Kopplungsanalyse ergab sich unter Verwendung der GENEHUNTER PLUS-Software ein LOD-Score von 3,57 für eine Kopplung mit Chromosom 15q15. Für Chromosom 22q13 ergab sich mit 1,85 ein suggestiver LOD-Score für eine Kopplung mit der periodischen Katatonie. Dabei wurde die Kopplungswahrscheinlichkeit für Chromosom 22q13 fast ausschließlich von einer Multiplexfamilie gestützt, so dass davon auszugehen ist, dass der Kopplungsbefund, zumindest für die erwähnte Familie, nicht zufällig ist. Damit präsentieren sich die beschriebenen Chromosomenabschnitte als erfolgsversprechende Zielregionen für die Suche nach dem Krankheitsgen der periodischen Katatonie.

In unserer Arbeitsgruppe konnte die Zielregion auf Chromosom 22q13 durch weitere Genotypisierung mit spezifischen Markern für Chromosom 22 auf ein Intervall von circa 4 cM (zwischen Marker D22S1160 und Telomer) eingegrenzt werden. Für die von Stöber *et al.* beschriebene Multiplexfamilie ergab sich mit dem in der eingegrenzten Zielregion liegenden *MLC1*-Gen ein vielversprechendes Kandidatengen.

1.5 Fragestellung

Trotz vieler Versuche ist es bisher nicht gelungen, ein krankheitsverursachendes Gen für die Schizophrenie zu identifizieren. Ein Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass es sich bei der Schizophrenie wohl nicht um eine nosologische Entität sondern vielmehr um eine ätiologisch heterogene Gruppe von Erkrankungen handelt [30][39]. Mit der periodischen Katatonie ist eine diagnostisch gut abgrenzbare Untergruppe der Schizophrenie mit besonders großer hereditärer Belastung und eng umschrieben Krankheitsbild bekannt (siehe auch Kapitel 1.3.1).

Für eine von periodischer Katatonie betroffene Multiplex-Familie beschrieb Stöber *et al.* eine Kopplung mit Chromosom 22q13 [38]. Durch weitere Genotypisierung und eine Northern-Blot-Analyse zur organspezifischen *MLC1*-Expression ist es unserer Arbeitsgruppe gelungen, *MLC1* als vielversprechendes Kandidatengen für weitere molekularegenetische Untersuchungen zu bestimmen (siehe auch Kapitel 1.4).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen die Ergebnisse einer Mutationsanalyse von *MLC1*, aus Material der von Stöber *et al.* beschriebenen Multiplexfamilie [38], dargestellt werden. Relevante Mutationen werden anhand eines 327 Personen umfassenden Kontrollkollektivs bezüglich der Häufigkeit ihres Auftretens in der Normalbevölkerung quantifiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientensammlung

Die Rekrutierung der Mitglieder mehrerer von periodischer Katatonie betroffener Multiplex-Familien fand durch Beckmann et al. 1996 [32] und Stöber et al. 2000 [38] statt. Wie von Stöber et al. 2000 berichtet, basiert die suggestive Evidenz für eine Kopplung nach Chromosom 22q13, vor allem auf den Kopplungsdaten einer Multiplex-Familie (Laborinterne Bezeichnung: **Familie 21**).

2.1.2 DNA

Die DNA-Proben der von Stöber et al. [38] beschriebenen Familie 21, sowie dreier Patienten, F1, F2 und F3, aus Familien die eine schwache Kopplung nach 22q13 vermitteln, wurden uns freundlicherweise in gereinigter Form von Prof. Dr. Stöber zur Verfügung gestellt. Die DNA-Proben 8t1 bis 8t9 und 8u1 bis 8u15 der Mitglieder von Familie 21 sind anhand **der Abbildung 1** den einzelnen Familienmitgliedern zuordenbar. Die DNA-Probe 8u10 stand nicht zur Mutationsanalyse zur Verfügung. Des weiteren wurden DNA-Proben von 327 nicht schizophrenen und untereinander nicht verwandten Kontrollpersonen aus den Bereichen Unterfranken und Dresden verwendet. Die DNA-Konzentrationen aller verwendeten DNA-Proben betrug 50-100 ng/ μ l.

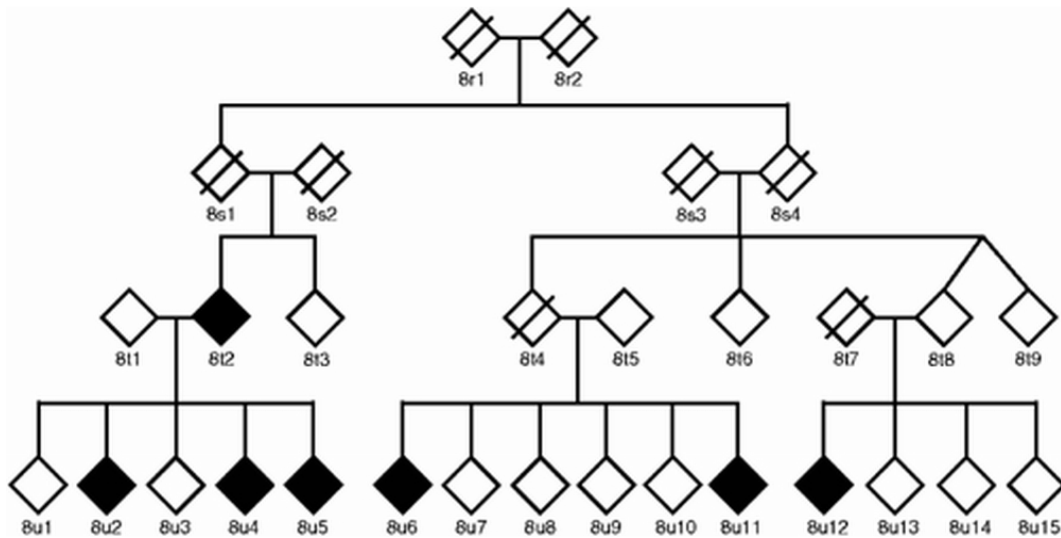


Abbildung 1: **Stammbaum Familie 21** mit Bezeichnung der zugehörigen DNA-Proben. Die an periodischer Katatonie erkrankten Familienmitglieder sind als schwarze Quadrate dargestellt, verstorbene Familienmitglieder als durchgestrichene Quadrate.

2.1.3 Oligonucleotide

Die in Tabelle 3 aufgelisteten Oligonukleotid-Primer wurden zur Amplifizierung von *MLC1*-Fragmenten im Rahmen von PCR und Sequenzierungsreaktion verwendet. In Tabelle 4 aufgeführte Oligonukleotid-Primer kamen im Rahmen der 5'-RACE zum Einsatz. Alle aufgelisteten Primer wurden von MWG-Biotech AG, (Ebersberg, D) bezogen und lagen in einer Konzentration von 100pmol/ μ l vor.

Tabelle 3: Oligonukleotid-Primer zur Amplifizierung von *MLC1*-Fragmenten

Bezeichnung	Sequenz	Annealing-Temp.
Exon 1 F	5'-ACA CCT GAC AAC ATC CAT CG-3'	58,2
Exon 1 R	5'-CCC CTT CCT TTC CTA GTT GG-3'	58,2
Exon 2 F	5'-GCA GTC CGT CAC CAG AGG-3'	59,5
Exon 2 R	5'-ATC TCA CCC TGA ACC CAG AC-3'	59,5
Exon 3 F	5'-GAC AGC CAT GAG CCA CTG-3'	62,5
Exon 3 R	5'-GCA GAA GTT GAA GGG TCA GG -3'	62,5
Exon 4 F	5'-TGG GCA GGA GCT TTA CTG TC-3'	57,9
Exon 4 R	5'-TGG AAG CGC AAA TGT TAG AG-3'	57,9
Exon 5 F	5'-CCA CCT ATT TCC AGC TCA AC-3'	60,5
Exon 5 R	5'-AGT GAA TGG CCT GAA GTG TG-3'	60,5
Exon 6 F	5'-AGG AGA GAG GGG TCT CAT GG-3'	58,3
Exon 6 R	5'-CCT GGA TGG GAA AAG TGG-3'	58,3
Exon 7 F	5'-AGC CAA CTC TTC GCC AAC TC-3'	58,3
Exon 7 R	5'-AAG GCG GTC TCG CAT CTA C-3'	58,3
Exon 9 F	5'-CAC CAA GGG AGG GCT AGG-3'	58,3
Exon 9 R	5'-TGC ATG GAG GGG TCA CTG-3'	58,3
Exon 9v3 F	5'-GAG AAC AGT CCC TGC TGA GCG-3'	63,6
Exon 9v3 R	5'-TGC ACT TCT TCG ACT ATT TCC TC-3'	63,6
Exon 10 F	5'-CTG GAG CTG TCC CTG GAG-3'	62,4
Exon 10 R	5'-AAA GGC AGA GGT TTC AGC AG-3'	62,4
Exon 11v2 F	5'-CCT TGC ACT GAC CTT GAA GC-3'	62,5
Exon 11v2 R	5'-GCA CCT GCT CTT TGT GAA GG-3'	62,5
Exon 12-10 F	5'-CTC GGC CTG GGA AGT TG-3'	61,0

Fortsetzung Tabelle 3

Bezeichnung	Sequenz	Annealing-Temp.
Exon 12-10 R	5'-TCT GAA CGC TGG CTG CTC-3'	61,0
Exon 6 non-MUT-IN F	5'-GCA CCC ACC TTC TTT TTC TTG C-3'	61,1
Exon 6 non-MUT-IN R	5'-CAG CCT TTG CAC TAA GAA TGG-3'	61,1
Exon 6 non-MUT-OUT F	5'-GTG GTG TCT CCT GGT GAT CC-3'	61,1
Exon 6 non-MUT-OUT R	5'-GGT CCA GCG AGG AGG ACT G-3'	61,1
Exon 6 MUT-IN F	5'-TGC ACC CAC CTT CTT TTT CTT GA-3'	61,1
Exon 6 MUT-IN R	5'-GAC CGT GGC TGA GAG TCC T-3'	61,1
Exon 6 MUT-OUT F	5'-GGT TTC TGA GAC CCA GGA GAG AG-3'	61,1
Exon 6 MUT-OUT R	5'-CGG TCC AGC GAG GAG GAC TT-3'	61,1

Tabelle 4: Genspezifische Oligonukleotid-Primer für die 5'-RACE

Bezeichnung	Sequenz
RACE1	5'-CTG CTC TGC CGT TGG GAG CAC TGG-3'
RACE2	5'-GCC GTT GGG AGC ACT GGT CTC TGG-3'
RACE3	5'-TGG TCT CTG GGT GAG GGA CTT CCA G-3'

2.1.4 Enzyme

Taq DNA Polymerase: *Eurogentec, Seraing, Belgien*

SfaN:	<u>Erkennungssequenz</u>	<u>Puffer</u>	<u>Herkunft</u>
	5'... G C A T C (N)5... 3'	NEBuffer 3	<i>Streptococcus</i>
	3'... C G T A G (N)9... 5'	(mitgeliefert)	<i>faecalis</i> ND547
	<u>Konzentration</u>	<u>Hersteller</u>	
	1000 Units/ml	<i>New England Biolabs</i>	

2.1.5 Reaktionskits

SMART RACE cDNA Amplification Kit

CLONTECH Laboratories, Palo Alto, USA

QIAquick: Gel Extraction Kit & PCR Purification Kit

QIAGEN, Hilden

QIAamp DNA Blood Midi Kit

QIAGEN, Hilden

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit

Applied Biosystems, Foster City, USA

2.1.6 Puffer und Lösungen

Puffer und Stammlösungen, die für PCR-Reaktionen oder andere molekularbiologische Reaktionsansätze mit kleinen Volumina verwendet wurden, wurden mit sterilem, bidestilliertem Wasser (LiChrosolv, Merck, D) angesetzt. Für alle anderen Lösungen wurde demineralisiertes Wasser aus der Hausleitung verwendet. Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Baker, Fluka, Merck, Roth, Pharmacia und Sigma bezogen.

2.1.6.1 Materialien für elektrophoretische Techniken

<u>TAE-Puffer</u> (pH 8,0)	40 mM	Tris-Acetat
	1 mM	Na_2EDTA
<u>6x Probenpuffer</u>	0,25%	Bromphenolblau
	0,25%	Xylencyanol
	30%	Glycerol
	50 mM	EDTA
<u>Ethidiumbromid-Lösung</u>	0,5%	EtBr in A. bidest

2.1.6.2 Materialien für DNA-Amplifikation mittels PCR

<u>PCR-Puffer</u>	500 mM	KCl
	100 mM	Tris-HCl (pH 8,3)
	0,25%(V/V)	Tween 20
	0,25 mg/ml	BSA
	7,5 mM	<u>oder</u>
	10 mM	<u>oder</u>
	15 mM	$MgCl_2$

2.1.7 Chemikalien

Ammoniumacetat	<i>Fluka, Neu Ulm</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma, Deisenhofen</i>
Bromphenolblau	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
BSA, purified (10 mg/ml)	<i>Biolabs</i>
dNTP-Sets(dGTP, dATP, dTTP, dCTP je 100mM)	<i>Genecraft, Münster</i>
Ethanol	<i>Baker, Deventer, NL</i>
Ethidiumbromid	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Glycerol	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
HPLC-Wasser <i>LiChrosolv</i>	<i>Merck, Darmstadt</i>
Isopropanol	<i>Merck, Darmstadt</i>
Natriumacetat	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
PeqGold 100 bp DNA-Leiter Plus	<i>Peqlab, Erlangen</i>
PeqGold 1 kb DNA-Leiter	<i>Peqlab, Erlangen</i>
POP6 Polymer	<i>PE Applied Biosystems, Foster City USA</i>
SeaKem LE Agarose	<i>Biozym Diagnostik, Olendorf</i>
Sure/Cut Buffer H	<i>Boehringer, Mannheim</i>
Tween-20	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>
Tris-Acetat, Tris-Borat, Tris-HCl	<i>Merck, Darmstadt</i>
Xylencyanol FF	<i>Sigma-Aldrich, Steinheim</i>

2.1.8 Geräte

Kapillarsequenzierer (ABI Prism 310)	<i>PE Applied Biosystem, Foster City, USA</i>
Bakterienschüttler	<i>A. Hartenstein GmbH, Würzburg</i>
BioPhotometer	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Gelsystem Perfect Blue Mini S und L	<i>PeqLab, Erlangen</i>
Gelsystem für PAA-Gele	
Heizrührplatte	<i>GLW, Würzburg</i>
Hybridisierungssofen	<i>MWG Biotech, Ebersberg</i>
Hybridisierungssofen	<i>Heraeus Instruments, Osterode</i>
Sorvall-Zentrifuge (Typ RC5C)	<i>Kendro, Hamburg</i>
Pipetten	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Polaroid-GelCam	<i>Polaroid, Offenbach</i>
Thermocycler T1	<i>Biometra, Göttingen</i>
Thermocycler T-GRADIENT	<i>Biometra, Göttingen</i>
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	<i>Heraeus, Hanau</i>
Ultraviolet Transluminator	<i>UVP, Upland, CA</i>
Vakuumzentrifuge Univapo 150 H	<i>Uniequip, Martinsried</i>
Waage PM 300	<i>Mettler, Gießen</i>
Waage Toledo	<i>Mettler, Gießen</i>
Wasserbad	<i>FL, Burgwedel</i>
Zentrifuge Mikroliter	<i>Hettich, Tuttlingen</i>
Zentrifuge Rotanta 96RS	<i>Hettich, Tuttlingen</i>
Zentrifuge Megafuge 1.OR	<i>Heraeus Instruments, Osterode</i>

2.1.9 Gebrauchswaren

Erlenmeyerkolben (500 ml)	<i>A. Hartenstein GmbH, Würzburg</i>
310 Genetic Analyzer capillary, 47 cm	<i>PE Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
310 Genetic Analyzer capillary, 61 cm	<i>PE Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
Genetic Analyzer sample tubes, 0,5 ml	<i>PE Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
Genetic Analyzer septa for 0,5 ml sample tubes	<i>PE Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
Pipettenspitzen	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Polaroid-Film (Typ 667)	<i>Polaroid, Offenbach</i>
Reaktionsgefäße PCR Softtubes 0,2 ml	<i>Biozym, Oldendorf</i>
Reaktionsgefäße Safe Lock 0,5 und 1,5 ml	<i>Eppendorf, Hamburg</i>

2.1.10 Software

Primerauswahl:	<i>Primer3 von Steve Rozen and Helen J. Skaletzsky (2000)</i>
Automatische Sequenzierung:	<i>ABI Prism 310 Data Collecting V2.0</i> <i>ABI Prism DNA Sequencing Analysis V3.4</i>
Datenbanksuche:	<i>NCBI BLAST V2.1.3</i>
Sequenzvergleiche:	<i>MacMolly Tetra, V1.0, Soft Gene GmbH</i>

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Präparation aus Blut

2.2.1.1 DNA-Extraktion

Um bestimmte DNA-Fragmente mittels PCR amplifizieren und weiterverarbeiten zu können, mußte zunächst genomische DNA gewonnen werden. Die Extraktion menschlicher DNA kann aus jeder beliebigen Zelle erfolgen, sofern sie einen Zellkern besitzt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete DNA wurde aus den Leukozyten des Blutes gewonnen.

2.2.1.2 Durchführung der DNA-Extraktion

Die Gewinnung genomischer DNA erfolgte mittels eines kommerziellen Extraktionskits, QIAamp DNA Blood Midi-Kit (Qiagen, Hilden, D), aus EDTA-Vollblut. Das QIAamp DNA Blood Midi-Kit basiert auf der selektiven Abtrennung von Oligonucleotiden aus Molekülgemischen mittels einer Kieselgel-Membran und anschließender Reinigung der auf der Membran immobilisierten DNA.

Der erste Arbeitsschritt zur Präparation der DNA aus den Leukozyten bestand in der Lysierung des Vollbluts. Hierzu wurden 2 ml EDTA-Vollblut mit 2,4 ml Lysepuffer Buffer AL und 200 μ l QIAGEN Protease vermischt und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Die Blutzellen wurden dadurch lysiert und der Proteinanteil von Blutplasma und Zellen getrennt. Die zuvor von DNA-bindenden Proteinen, Zell- und Kernmembran umgebene DNA wurde so freigelegt.

Im zweiten Schritt erfolgte die Adsorption der DNA an eine Kieselgel-Membran. Hierzu wurde das Lysat mit 2ml Ethanol vermischt. Zunächst wurde die Hälfte (3,3 ml) der entstandenen Suspension auf eine Mikrozentrifugationssäule (QIAamp

Midi column) überführt und für 2 Minuten bei 3000 rpm über dessen Kieselgel-Membran abzentrifugiert. Anschliessend wurden auch die verbliebenen 3,3 ml auf die Mikrozentrifugationssäule übertragen und abzentrifugiert. Der Ethanolgehalt, die Salzkonzentration und der pH-Wert des Lysat-Ethanol-Gemisches bedingten hierbei eine Adsorption der DNA an die Kieselgel-Membran, während andere Bestandteile des Lysats, die eine PCR hemmen könnten, die Membran passierten.

Es folgte das Waschen der membrangebundenen DNA. In zwei Schritten wurden zunächst 2 ml Waschpuffer Buffer AW1 für 1 Minute bei 5000 rpm und dann 2 ml Waschpuffer Buffer AW2 für 15 Minuten bei 5000 rpm über die Kieselgel-Membran abzentrifugiert. Dieser Waschschrift diente dazu, eventuell auf der Membran verbliebene Kontaminationen zu entfernen, ohne dabei die Membranbindung der DNA zu beeinflussen. In einem abschließenden Arbeitsschritt wurde die gereinigte DNA aus der Mikrozentrifugationssäule eluiert. Hierzu wurde die Kieselgel-Membran zuerst bei Raumtemperatur für 5 Minuten mit 300 μ l Elutionspuffer Buffer AE inkubiert und anschließend durch 5-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm die im Elutionspuffer gelöste DNA gewonnen. Um die DNA-Ausbeute zu maximieren, wurde dieser Schritt mit weiteren 300 μ l Elutionspuffer wiederholt. Die Ausbeute an genomischer DNA wurde anschließend spektralphotometrisch quantifiziert.

2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Konzentrationsbestimmung von DNA in den verschiedenen DNA-Präparationen nach dem Prinzip der Photometrie diente ein Biophotometer der Firma Eppendorf (Hamburg). Dabei ermöglicht die bei konstanter Probenschichtdicke lineare Beziehung der Extinktion E von UV-Licht der Wellenlänge 260 nm (Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren) und der in der Probe gelösten DNA-Menge die Bestimmung der DNA-Konzentration. Es gilt:

$$\text{Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Extinktion } 260 \text{ nm}$$

Verunreinigungen der Proben können dabei durch Verhältnisbildung von Absorptionswerten bei verschiedenen Wellenlängen erkannt werden. Da Proteine UV-Licht mit 280 nm Wellenlänge absorbieren, konnte durch Quotientbildung der Probenextinktionswerte bei 260 nm und 280 nm (E260/E280) die Reinheit der DNA-Lösung abgeschätzt werden. Die Werte für E260/E280 sollten dabei größer 1,8 betragen. Andere Verunreinigungen beispielsweise durch Kohlenhydrate oder Peptide führen zur Absorption von Licht mit 230 nm Wellenlänge, zur Sicherstellung der Probenreinheit wurde hier ein Wert für den Quotienten E260/E230 von größer 2,0 angestrebt.

2.2.1.4 Verdünnungen und Lagerung

Um die DNA in die PCR einsetzen zu können, mussten Verdünnungen hergestellt werden, so dass die DNA-Konzentration 50 - 100 ng/ μ l betrug. Die Aufbewahrung der DNA-Proben bei -20 bis -80°C machte eine Lagerung und Verwendung der Proben für mehr als 6 Monate möglich.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

2.2.2.1 Prinzip und Durchführung

Die Auftrennung von DNA unterschiedlicher Fragmentgrößen erfolgte durch horizontale Flachgelelektrophorese in einem konstanten homogenen elektrischen Feld. Dazu wurden 1-2 % Agarosegele aus Seakem-Agarose LE (Marine Colloids Div., Rockland USA) in den Perfect Blue Gelsystem Mini S bzw. L Elektrophoreseapparaturen der Firma Peqlab (Erlangen) verwendet.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurden 0,5 bis 2 g Seakem LE Agarose in 50 ml 1x TAE - Puffer, für die Verwendung im Perfect Blue Gelsystem Mini S,

oder in 100 ml 1x TAE - Puffer, für die Verwendung im Perfect Blue Gelsystem Mini L, in einer Mikrowelle bis zum vollständigen Lösen der Agarose erhitzt. Nach dem Abkühlen auf circa 40°C wurde der Agaroselösung zunächst Ethidiumbromidlösung (Sigma) zugegeben. Anschließend wurde die Agaroselösung in die zu den Elektrophoreseapparaturen gehörenden Gel-Träger, mit eingesetzten Gel-Kämmen, gegossen. Die durch weitere Abkühlung verfestigten Agarosegele wurden in die mit 1x TAE Puffer gefüllten Elektrophoreseapparaturen eingesetzt und die Gelkämme entfernt. Um eine Austrocknung der Gele und damit eine Veränderung der Auftrennungseigenschaften zu vermeiden, wurde das Volumen an 1x TAE Puffer in den Elektrophoreseapparaturen so gewählt, dass die komplette Geloberfläche mit etwa 2 mm Puffer bedeckt war.

Aufzutrennende DNA-Proben wurden mit 2-5 μ l Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen gegeben. Anschließend erfolgte die Elektrophorese bei einer konstanten Gleichspannung von 80 V (Perfect Blue Gelsystem Mini S) bzw. 120 V (Perfect Blue Gelsystem Mini L). Als Größenmarker zur DNA-Fragmentlängenbestimmung diente peqGOLD 100 bp DNA-LeiterPlus. Während der Elektrophorese erfolgte die Einlagerung von Ethidiumbromid in die doppelsträngige DNA. Dadurch konnten im Anschluss die DNA-Banden im Gel als im UV-Licht (Fluo.Link, MWG-BioTech) fluoreszierende Banden sichtbar gemacht und mit einer Kamera (Polaroid Gelcam) fotografiert werden.

Waren bestimmte DNA-Fragmente zur Weiterverwendung in Sequenzierung bzw. Restriktionsverdau bestimmt, so wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel exzidiert und wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben aus dem Gel isoliert.

2.2.2.2 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die DNA-Isolierung aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen (Hilden). Das vom Hersteller empfohlene Arbeitsprotokoll (www.qiagen.com) zur Gelextraktion wurde, wie im folgenden beschrieben, leicht modifiziert.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte, wurde die DNA im UV-Licht sichtbar gemacht (siehe Kapitel 2.2.2.1). Zeigte sich im Gel eine fluoreszierende Bande mit einer dem gewünschten PCR-Produkt entsprechenden Fragmentlänge (siehe Kapitel 2.2.3), so wurde diese DNA-Bande mit einem Skalpel unter Sicht aus dem Gel exzidiert. Dabei wurde darauf geachtet die Bande mit möglichst wenig nicht-DNA-enthaltender, die Bande umgebender Agarose auszuschneiden. Bei einer geschätzten Agarosegeldichte von 100 mg pro 100 μ l, wurde durch Abwiegen des gewonnenen Agarosegelblöckchen dessen Volumen bestimmt. Anschließend wurde das Agarosegelblöckchen in einem Reaktionsgefäß mit der 3-fachen Menge ihres Eigenvolumens Lösepuffer Buffer QG (Qiagen) bei 50°C bis zum vollständigen Auflösen der Gelblöckchen im Lösepuffer inkubiert. Nach Zugabe von einem Gelvolumen Isopropanol zur entstandenen Lösung wurde diese mit einem Vortex-Gerät gut durchmischt, in eine QIAquick spin column Mikrozentrifugationssäule (Qiagen) überführt und für 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Dabei erfolgt durch Zentrifugation eine Filtration der gelösten Agarose, während die gelöste DNA an die Kieselgel-Membran der Mikrozentrifugationssäule bindet. Als Auffanggefäß für das Filtrat dienten die im Kit enthaltenen 2 ml-Auffanggefäße oder 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße. Nach Entleeren des Auffanggefäßes wurden 0,5 ml Lösepuffer Buffer QG in die Mikrozentrifugationssäule gefüllt und für 1 Minute bei 14000 rpm abzentrifugiert, um auf der Kieselgel-Membran verbliebene Agarosereste auszuwaschen. Im Anschluss wurde das Filtrat verworfen.

Da bei späteren Anwendungen, insbesondere der Sequenzierung, inadäquate Salzkonzentrationen einen negativen Einfluss haben können und deshalb unerwünscht sind, erfolgte ein weiterer Waschschrift zur Entfernung von Puffersalzen aus der Mikrozentrifugationssäule. Hierfür wurden 0,75 ml ethanolhaltiger Waschpuffer Buffer PE auf die Kieselgel-Membran der Mikrozentrifugationssäule gegeben. Nach 2- bis 5-minütiger Einwirkungszeit erfolgte eine 1-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm. Nach Entleerung des Auffanggefäßes wurde erneut für 1 Minute bei 14000 rpm zentrifugiert, um Rest-Ethanol aus der Mikrozentrifugationssäule zu entfernen. Anschließend wurden das Auffanggefäß mit dem Filtrat verworfen und die Mikrozentrifugationssäule in ein neues, sauberes 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß plziert.

Abschließend wurde die an die Kieselgel-Membran adsorbierte DNA mit Wasser (LiChrosolv: Wasser für die Chromatographie, Merck) eluiert. Dazu wurde 20 μ l Wasser auf die Kieselgel-Membran der Mikrozentrifugationssäule gegeben und nach 1 Minute Einwirkungszeit für 1 Minute bei 14000 rpm abzentrifugiert. Die so gewonnene DNA-Lösung wurde bis zur Weiterverwendung bei 4°C aufbewahrt.

Isolierte DNA-Fragmente wurden für Restriktionsanalysen und zur Sequenzierung verwendet.

2.2.3 PCR

2.2.3.1 Prinzip

Die Polymerase-Ketten-Reaktion stellt eine in-vitro Imitation des natürlichen DNA-Replikationsmechanismus dar. Bei der PCR erfolgt die DNA-Replikation jedoch um das vielfache häufiger als auf Zellebene und ist spezifisch auf einen DNA-Abschnitt beschränkt.

Der Reaktionsansatz zur PCR beinhaltet eine DNA-Matrize, thermostabile Polymerase, 2 spezifische Oligonukleotidprimer, die vier Desoxynukleosidtriphosphate und einer der jeweiligen PCR angepaßten Puffermenge (siehe Kapitel 2.2.3.2.2). Das Prinzip der DNA-Amplifikation beruht auf der zyklischen Wiederholung von drei Reaktionsschritten:

1. Trennung der komplementären DNA Doppelstränge der DNA-Matrize durch Denaturierung bei 94°C.
2. Anlagerung (Hybridisierung) von zwei Oligonukleotid-Primern an die komplementäre DNA-Sequenz auf den Einzelsträngen der DNA-Matrize. Dies erfolgt bei einer sogenannten Annealing-Temperatur, die je nach Art und Länge des Primers unterschiedlich ist, aber meistens zwischen 50 - 60°C liegt. Die Primer sind synthetisch hergestellte DNA Stücke von ca. 20 Nukleotiden Länge, die von ihrer Basenabfolge so entworfen worden sind, dass sie in den jeweiligen Grenzregionen eines zu amplifizierenden Genabschnitts an den Einzelsträngen binden und damit den Startpunkt und die Richtung der Amplifikation bestimmen.
3. Synthese der komplementären DNA-Abschnitte. Die Synthese erfolgt vom 3'OH-Ende der Primer entlang der DNA-Einzelstränge mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase, deren Temperaturoptimum bei etwa 72°C liegt. Die DNA-Polymerase selbst ist nur in der Lage, komplementäre Nukleotide an einen DNA-Einzelstrang zu addieren, und benötigt zur Initiierung die oben bereits beschriebenen Primer. Nach Beendigung des 1. Zyklus liegt somit die Kopie des DNA Doppelstranges im Bereich des gewählten Genabschnittes vor. Diese Kopie und die Original-DNA dienen in den folgenden Zyklen, die entsprechend dem ersten Durchgang ablaufen, als Matrize zur weiteren DNA-Synthese. Somit vervielfältigt sich mit jedem Zyklus die ausgewählte Sequenz. Es findet bei n-Zyklen eine exponentielle Amplifikation auf das 2^n -fache der Start DNA-Menge statt.

Von entscheidender Bedeutung für die PCR in dieser Form ist die Verwendung einer thermostabilen Polymerase. Im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen wird die thermostabile Polymerase auch durch vergleichsweise hohe Temperaturen, wie im 1. Schritt benötigt, nicht denaturiert.

2.2.3.2 Etablierung der PCR für das *MLC1*-Gen

2.2.3.2.1 Primerdesign

Für die Amplifikation des *MLC1*-Gens wurden entsprechende Oligonukleotid-Primer mit Hilfe des online-Programms am Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, USA (www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www.cgi) unter Berücksichtigung der folgenden Punkte kreiert und bestellt:

- Vermeidung von mehr als drei Guanosin- oder Cytosin-Nukleotiden am 3' Ende des Oligonukleotid-Primers.
- Keine komplementären Sequenzen zwischen dem Primerpaar und innerhalb des Primers zur Vermeidung von Primerdimerbildung oder Rückfaltung des Primers durch intramolekulare Wasserstoffbrückenbildung.
- Die Größe des Oligonukleotid-Primers sollte mindestens 17 bp betragen.
- Der G/C-Gehalt des Oligonukleotid-Primers sollte zwischen 40 % und 60 % liegen.

2.2.3.2.2 Optimierung der PCR

Die erfolgreiche Durchführung nachfolgender Applikationen wie z.B. Mutationsdetektion oder Sequenzierung erfordert ein spezifisches Amplifikat möglichst ohne nicht-spezifische PCR-Produkte. Deshalb wurden nachfolgende Parameter, die einen Einfluss auf die Spezifität und Effektivität besitzen, in der PCR variiert.

Die Denaturierung der DNA und die Temperatur zur Anlagerung der Oligonukleotid-Primer (Annealing-Temperatur) werden durch die Höhe der Ionenkonzentration, vor allem die der K^+ - und Mg^{2+} -Ionen, und des pH-Wertes beeinflusst. Zusätzlich haben diese Faktoren einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Polymerase. Kationen schwächen durch Anlagerung an die negativ geladenen Phosphatgruppen des Desoxyribose-Rückgrats die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den einzelnen DNA-Strängen, so dass die Anlagerung des Primers an die Matrize verstärkt wird.

Die Variation von Kationenkonzentration im Reaktionsansatz und der Annealing-Temperatur im PCR-Protokoll bedingen dementsprechend unterschiedliche Reinheit und Ausbeute des PCR-Produkts. Ob die Bedingungen für die PCR günstig gewählt sind, lässt sich in der Gelelektrophorese überprüfen. So sprechen möglichst kräftige und scharf begrenzte DNA-Banden, mit der vorhergesagten Fragmentlänge, in der Gelelektrophorese für eine effektive und spezifische PCR.

Um die geeigneten Bedingungen herauszufinden wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Für jedes Primerpaar wurden Ansätze mit 3 verschiedenen Puffern hergestellt.
- Jeweils 3 Ansätze mit unterschiedlichem Puffer durchliefen anschließend ein gemeinsames PCR-Protokoll, wobei 5-8 verschiedene PCR-Protokolle programmiert wurden. Diese Protokolle unterschieden sich in der Annealing-Temperatur $T_{Annealing}$, die ausgehend von der niedrigeren Annealing-Temperatur der 2 Einzelprimer (Herstellerangabe), in Schritten von 0,5 bis 1,0 Grad Celsius zwischen den einzelnen Protokolle erhöht wurde.
- Nach Überprüfung der PCR-Produkte, wie oben beschrieben, konnten an-

schließlich geeignete Bedingungen gewählt werden. Die ausgewählten Annealing-Temperaturen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

2.2.3.3 Durchführung der PCR

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Volumen von 25 μl in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein Standardansatz enthielt im Einzelnen:

1,0 μl	dNTP-Mix (je 2 mM für jedes Nukleotid)
2,5 μl	MgCl ₂ -Puffer (7,5-15 mM)
1,0 μl	Primer forward (10 pmol/ μl)
1,0 μl	Primer reverse (10 pmol/ μl)
1,0 μl	Taq-Polymerase (5 U/ μl)
1,0 μl	DNA-Template (50 - 100 ng)
17,5 μl	dH ₂ O
<hr/>	
25,0 μl	Gesamtvolumen

Die Reaktion wurde in einem Biometra T-Gradient Thermocycler bzw. Biometra T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

PCR-Schritt		Zeit	Temperatur
Anfangs-Denaturierung		3 min	95°C
Zyklusschritte: 35 Zyklen	Denaturierung	30 sec	94°C
	Annealing	30 sec	T _{Annealing}
	Elongation	3 min	72°C
abschließende Elongation		3 min	72°C

2.2.3.4 Mutationsnachweis in Exon 6

Wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, konnte in der Sequenzierungsanalyse bei Proband F21 im Exon 6 eine heterozygote Punktmutation **c33874662a** nach-

gewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem Kollektiv von 50 Probanden aus der Normalbevölkerung die Allelfrequenz wie im Folgenden beschrieben mittels PCR und Gelelektrophorese bestimmt.

Zunächst wurden wie in Abbildung 2 veranschaulicht verschiedene Primer gewählt. Für die Wildtypsequenz und die Sequenz mit Mutation wurde je ein Upstream-Primer konstruiert der mit der letzten Nukleinsäure an der Position des beschriebenen Single Nuclear Polymorphism (SNP) an die genomische DNA bindet (*Exon 6 non-MUT-IN F* bzw. *Exon 6 MUT-IN F*). Außerdem wurde je ein zugehöriger Downstream-Primer (*Exon 6 non-MUT-IN R* bzw. *Exon 6 MUT-IN R*) und je ein weiterer Upstream-Primer (*Exon 6 non-MUT-OUT F* bzw. *Exon 6 MUT-OUT F*) ausgewählt.

Zum Nachweis der **c33874662a**-Punktmutation wurde nun eine im Vergleich zu Abschnitt 2.2.3.3 leicht modifizierte PCR angesetzt. Statt einem Volumen von $1\mu\text{l}$ des Upstream-Primers (Primer forward) wurde dem PCR-Ansatz je $0,5\mu\text{l}$ der Primer *Exon 6 MUT-IN F* und *Exon 6 MUT-OUT F* zugegeben. Das Volumen des Downstream-Primers *Exon 6 MUT-IN R* wurde nicht verändert. Anschließend wurde die PCR nach dem in Abschnitt 2.2.3.3 erläuterten Prinzip durchgeführt. Dabei erfolgte nur im Falle des Vorliegens der **c33874662a**-Mutation eine Amplifikation eines 219bp-DNA-Fragments (entsprechend der von den „MUT-IN-Primer“ flankierten DNA-Sequenz), da ansonsten der „mutationsspezifische“ Primer *Exon 6 MUT-IN F* nicht an die Template-DNA bindet. Bei Fehlen der Mutation wurde nur ein mit 360bp größeres DNA-Fragment zwischen den Primern *Exon 6 MUT-OUT F* und *Exon 6 MUT-IN R* amplifiziert. Nach Auftragen des PCR-Produkts in der Gelelektrophorese konnte nun aus dem Vorhandensein einer DNA-Bande mit entsprechender Länge auf das Vorliegen der Mutation in der entsprechenden Probe geschlossen werden.

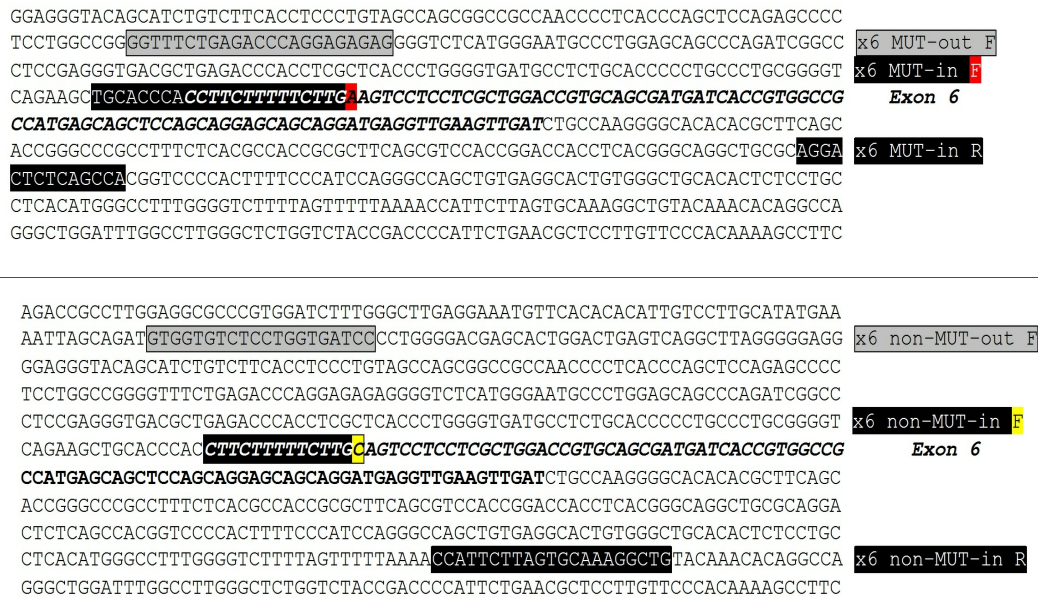


Abbildung 2: **Schema der Bindungsstellen der für den Mutationsnachweis in Exon 6 verwendeten Primer:** Die Bindungsstellen der verwendeten Primer sind an genomischer Einzelstrang-DNA der Region um Exon 6 farbige unterlegt. Oben: Sequenz mit Mutation und entsprechende Primer. Unten: Wildtypsequenz und entsprechende Primer. Der „mutationspezifische“ Primer *Exon 6 MUT-IN F* bindet mit seiner letzten Nukleinsäure an das aufgrund einer **c33874662a**-Mutation vorliegende Adenosin (rot unterlegt).

In einem analogen Reaktionsansatz mit den 3 Primern für die Wildtypsequenz wurde auch das Vorhandensein des Wildtypallels in allen Proben überprüft.

2.2.4 RACE

Die 5'-RACE zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts des *MLC1*-Gens wurde innerhalb der Arbeitsgruppe von Yana Syagailo durchgeführt. Da die im Rahmen dieser Arbeit angenommene cDNA-Sequenz auf den Ergebnissen dieser Untersuchung basiert und von grundlegender Bedeutung für die daraus gefolgerten Aussagen über die Struktur und Funktion des Genprodukts ist, sind das

Prinzip und die Durchführung der 5'-RACE an dieser Stelle kurz beschrieben.

2.2.4.1 Prinzip

Die Methode der 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) ermöglicht die Enden einer cDNA, ausgehend von einem bekannten Sequenzteil, zu amplifizieren [40] [41]. Zur Amplifikation des 5'-Endes der *MLC1*-cDNA wurde das SMART RACE cDNA Amplification Kit der Firma Clontech eingesetzt. Diese Abwandlung der RACE verwendet die so genannte SMART-Technik (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) [41]. Diese Technik basiert auf der Eigenschaft bestimmter Varianten der MMLV Reversen Transkriptase, die bei der Erststrangsynthese, ausgehend von Oligo-(dT)-Primern (5'-RACE cDNA Synthesis Primer*), einige zusätzliche Basen (vorwiegend dC) am 3'-Ende des Transkripts anhängen. Ein geeignetes Oligonukleotid (SMART II Oligonukleotid*) mit einer Reihe von Guanosin-Basen am 3'-Ende kann sich dadurch komplementär an den Erststrang anlagern und dient anschließend selbst als weitere Matrize für die Verlängerung des Erststrangs. Mit genspezifischen Primern (GSP) und Primern, die dem 5'-Bereich des SMART II Oligonukleotids entsprechen (Universalprimer/UP*), kann dann die Amplifikation des 5'-Endes der cDNA vom Erststrang ausgehend erfolgen. Die einzelnen Schritte werden in Abbildung 3 veranschaulicht.

2.2.4.2 Durchführung

Die Reaktionen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Erststrangsynthese wurde zunächst folgender Ansatz erstellt:

3,0 μl	Gesamt-RNA (874,5 ng/ μl)
1,0 μl	5'-RACE cDNA Synthesis Primer
1,0 μl	SMART II Oligonukleotid
<hr/>	
5,0 μl	Gesamtvolumen

*Teil des SMART RACE cDNA Amplification Kit

Nach gutem Durchmischen wurde der Ansatz zunächst für 2 Minuten auf 70°C erhitzt und anschließend für 2 weitere Minuten auf Eis gelagert. Danach wurden die weiteren Komponenten wie folgt hinzugefügt:

5,0 μl	Reaktionsansatz
2,0 μl	5 x First-Strand buffer
1,0 μl	DTT (20 mM)
1,0 μl	dNTP Mix (10 mM)
1,0 μl	MMLV Reverse Transkriptase (200 U/ μl)
<hr/>	
10,0 μl	Gesamtvolumen

Dieser Reaktionsansatz wurde erneut gemischt und für 1,5 Stunden im Wärmeschrank bei 42°C inkubiert. Mit 40 μl Tricine-EDTA wurde der Ansatz anschließend im Verhältnis 1 : 5 verdünnt und für 7 Minuten auf 72°C erhitzt. Die hergestellte cDNA wurde bei -20°C gelagert. Die eigentliche RACE-PCR wurde leicht abgewandelt zu den Angaben des Herstellers entsprechend folgendem Schema erstellt. Als genspezifische Primer (GSP) wurden die Primer RACE1, RACE2 und RACE3 verwendet.

2,5 μl	10x Buffer
0,5 μl	dNTP Mix
2,5 μl	Universal Primer Mix (UPM)
1,0 μl	GSP (10 pmol/ μl)
0,5 μl	50 x Advantage 2 Taq
5,0 μl	Erststrang cDNA
13,0 μl	dH ₂ O
<hr/>	
25,0 μl	Gesamtvolumen

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler unter den nachfolgenden Bedingungen.

PCR-Schritt		Zeit	Temperatur
Anfangs-Denaturierung		3 min	95°C
Zyklusschritte: 38 Zyklen	Denaturierung	30 sec	94°C
	Annealing	30 sec	68°C
	Elongation	3 min	72°C

Eine nested PCR wurde unter gleichen Bedingungen, ausgehend von den Produkten der ersten RACE-PCR, mit dem im Kit enthaltenen Nested Universal Primer sowie mit genspezifischen Primern durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf ein Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen, die Banden ausgeschnitten und gereinigt. Die Fragmente wurden anschließend in den pGEM-T-Vektor (Promega, Mannheim) kloniert und durch Sequenzierung analysiert. Bei einem zu hohen PCR-Hintergrund wurde vor der Klonierung eine zweite PCR mit dem Nested Universal Primer und einem zweiten, im PCR-Produkt liegenden genspezifischen Primer vom PCR-Produkt durchgeführt. Die PCR-Bedingungen entsprachen denen des ersten Durchgangs, nur dass eine niedrigere Annealing-Temperatur von 60°C gewählt wurde.

2.2.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

2.2.5.1 Prinzip und Anwendungsmöglichkeiten

Bakterielle Restriktionsendonukleasen dienen Prokaryonten dazu, organismusfremde DNA-Fragmente zu erkennen und zu zerschneiden, um die Bakterien vor Schäden durch fremdes Genmaterial (z.B. von Bakteriophagen) zu schützen. Restriktionsendonukleasen binden an spezifischen Erkennungssequenzen und durchtrennen die so erkannte Fremd-DNA. Das Wissen um den Wirkungsmechanismus der Restriktionsendonukleasen macht man sich bei verschiedenen molekulargenetischen Untersuchungsmethoden zunutze. Eine Anwendungsmöglichkeit stellt beispielsweise die Kartierung mittels Restriktionslängenpolymorphismen dar. Ei-

ne weitere Möglichkeit ist der Nachweis von Mutationen, wie im folgenden beschrieben.

2.2.5.2 Nachweis einer Punktmutation mit SfaN1

Die Sequenzierung von Exon 11 des *MLC1*-Gens zeigte bei einigen an periodischer Katatonie erkrankten Mitgliedern der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Familie eine zu einem Aminosäureaustausch führende Punktmutation. Durch diese Punktmutation entsteht eine bei der Wildtyp-Sequenz nicht existierende Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease SfaN1. Die erfolgreiche Spaltung von PCR-amplifiziertem Exon 11 mit SfaN1 ist also nur bei Mutationsträgern möglich und somit als Mutationsnachweis anzusehen.

Der Enzymverdau der durch Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion gereinigten PCR-Produkte von Exon 11 wurde mittels der Restriktionsendonuklease SfaN1 und des mitgelieferten Spaltungspuffer NEBuffer3 der Firma New England Biolabs (Schwalbach) durchgeführt.

Hierzu wurden zunächst 18 μl der in bidestilliertem Wasser gelösten gereinigten PCR-Produkte von Exon 11 mit 2 μl des Spaltungspuffer in ein Reaktionsgefäß gegeben und anschließend gründlich vermischt. Nach der weiteren Zugabe von 1 μl Restriktionsendonuklease (1 Unit/ μl) und erneut gründlicher Durchmischung des Reaktionsansatzes, wurde das Reaktionsgemisch für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde durch Agarose-Gelelektrophorese eine eventuell stattgefundene Reaktion (Nachweis der Punktmutation Leu309Met) überprüft. Als positive Kontrolle wurde jeweils ein Reaktionsansatz mit gereinigten PCR-Produkten von Exon 11 der Familienprobe 18 und 19 verwendet.

2.2.6 Ethanolpräzipitation

Um DNA aus einer wässrigen Lösung auszufällen wurde das Prinzip der Ethanolpräzipitation verwendet. Durch Zugabe von hochkonzentriertem Ethanol und monovalenten Kationen wird hierbei der gelösten DNA durch die Kationen die lösungsvermittelnde Hydrationshülle entzogen. Dadurch kommt es in dem durch die Zugabe von Ethanol nun weniger hydrophilen Lösungsmittel zu einer Ausfällung der DNA. Verunreinigungen verbleiben größtenteils in Lösung, so dass durch Entfernung des Lösungsmittels zusätzlich eine Reinigung der DNA erreicht werden kann. Hierzu wird die DNA-Lösung nach Zugabe von Kationen und Ethanol zentrifugiert, wodurch die DNA am Gefäßboden als Pellet präzipitiert. Im Anschluss kann das überstehende Lösungsmittel zum größten Teil vorsichtig mit der Pipette entfernt werden. Durch nochmalige Zugabe hochprozentigen Ethanols können restlich verbliebene Verunreinigungen in Lösung verbracht werden und nach erneuter Zentrifugation und vorsichtiges Abpipettieren des Pellet-Überstands entfernt werden. Das nicht mit der Pipette entfernbare Lösungsmittel kann dann beispielsweise in einer Vakuumzentrifuge durch Verdunstung entfernt werden. Abschließend wird die als Pellet ausgefällte, gereinigte DNA mit einem geeigneten Lösungsmittel aufgenommen, wobei durch entsprechende Volumenwahl die DNA-Konzentration im Vergleich zur ursprünglichen DNA-Lösung deutlich erhöht werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden je 20 μl der zur Sequenzierung bestimmten PCR-Produkte in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 80 μl dH_2O vermischt. Nach Zugabe von 10 μl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 250 μl Ethanol (100 %) wurde die DNA für 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstands wurde das entstandene Pellet anschließend mit 250 μl Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für 10 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde die DNA für 10 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet und

abschließend in 20 μl dH_2O aufgenommen. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die so erzeugten DNA-Lösungen bei -20°C aufbewahrt.

2.2.7 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode [42]. Bei dieser Methode werden einem PCR-Ansatz neben den vier Desoxynukleotiden (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) auch die vier zugehörigen Didesoxynukleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) beigefügt, wobei letztere mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Didesoxynukleotide werden bei der PCR an einer zufälligen Stelle in den DNA-Strang eingebaut und führen zu einem Kettenabbruch. Somit entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die jeweils mit einem der vier fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotid enden. Anhand der Fluoreszenzeigenschaften der DNA-Fragmente kann nach elektrophoretischer Längenauftrennung der Fragmente die Position der verschiedenen Nukleotide im ursprünglichen DNA-Molekül durch ein geeignetes Detektorsystem bestimmt werden. Für die zyklische Sequenzierung wurde das BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Der mitgelieferte Terminator Ready Reaction-Mix enthält neben den vier dNTPs auch ddNTPs (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP mit jeweils einem Fluoreszenzfarbstoff markiert), sowie die Ampli-Taq-DNA-Polymerase und Reaktionspuffer. Um nur einen DNA-Strang zu amplifizieren, wurde für die PCR nur jeweils ein Primer für Strang bzw. Gegenstrang verwendet. Der Reaktionsansatz für die Sequenzierungs-PCR mit dem PCR-Produkt des jeweiligen Exons mit einem der zugehörigen Primer bestand im Einzelnen aus:

4,0 μl	BigDye Terminator Ready Reaction Mix
3,0 μl	Primer (2,5 pmol/ μl)
3-6 μl	DNA (ca. 250 ng)
x μl	dH ₂ O
20,0 μl	Gesamtvolumen

Die Sequenzierungs-PCR erfolgte in einem T1- bzw. T-GRADIENT-Thermocycler (Biometra, Göttingen) unter folgenden Reaktionsbedingungen:

PCR-Schritt		Zeit	Temperatur
25 Zyklen	<i>Zyklusschritte:</i> Denaturierung	10 sec	96°C
	Annealing	30 sec	T _m
	Elongation	4 min	60°C

Wie in Abschnitt 2.2.6 dargestellt wurden die Reaktionsprodukte nach der PCR durch Fällung mit Ethanol gereinigt. Mit einem automatischen Kapillarsequenzierer des Modells ABI Prism 310 (PE Applied Biosystems, Foster City, USA) wurde im Anschluss die Sequenzanalyse unter Verwendung von Kapillaren mit 47 cm Länge (mit dem rapid sequencing protocol) und der ABI Prism 310 Data Collecting V2.0-Software durchgeführt. Als Gelmatrix für die Auftrennung diente das Polymer POP-6 (PE Applied Biosystems), als Laufpuffer der Genetic Analyzer Buffer (PE Applied Biosystems, Foster City, USA). Die Elektrophorese erfolgte bei 1500 V und 6 μA bei 50°C für 55 min. Für die Auswertung der Sequenzen wurde das Programm ABI Prism DNA Sequencing Analysis 3.4 verwendet.

2.2.8 DNA-Sequenzanalyse mittels BLAST

Das BLAST-Programm (Basic Local Alignment Search Tool) vergleicht Nukleotid- oder auch Proteinsequenzen mit anderen in Datenbanken hinterlegten Sequenzen und errechnet die Signifikanz von gefundenen Übereinstimmungen. Dies ermöglicht

beispielsweise die Zuordnung von ermittelten DNA-Sequenzen zu DNA-Sequenzen einer Datenbank, bei denen die chromosomale Lokalisation bekannt ist. Ausserdem können durch Sequenzvergleich DNA-Mutationen aufgedeckt werden.

Die in der Sequenzierung erhaltenen DNA-Sequenzen wurden auf den Internetseiten des Sanger Centre mit dem BLASTN-Programm (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/chr22>) mit der zum Untersuchungszeitpunkt veröffentlichten DNA-Sequenz von Chromosom 22 (Datenbankbezeichnung: SUPER_LINK_C22_01-12-1999) verglichen.

Die 8-stelligen Positionsnummern der in Tabelle 5 aufgezählten Punktmutationen entsprechen den Positionsnummern der Nukleotide in der SUPER_LINK_C22_01-12-1999-Datenbank.

2.2.9 Prädiktion der Struktur des von *MLC1* kodierten Proteinprodukts

Um aus der für *MLC1* vorhergesagten cDNA-Sequenz (siehe Abschnitt 3.1) Rückschlüsse hinsichtlich der wahrscheinlichen Struktur und Funktion des Genprodukts zu ziehen, wurden online verfügbare Proteinanalyse-Programme wie:

- SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>),
- EXPASY (<http://expasy.proteome.org.au/tools/#align>) und
- PSORT II (<http://psort.nibb.ac.jp>)

benutzt.

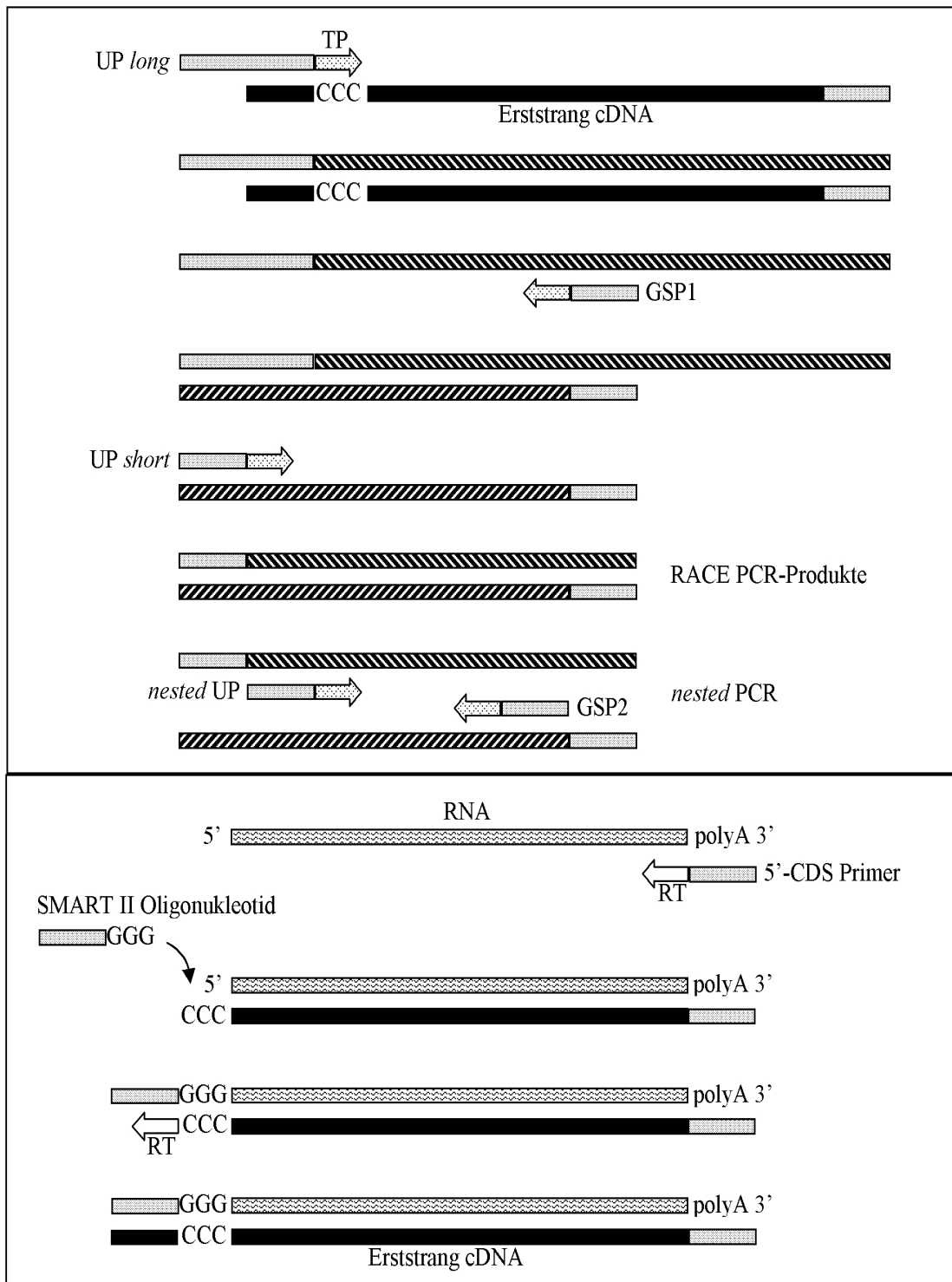


Abbildung 3: **Reaktionsschritte der 5'-RACE:** Die Polymerasen werden durch Pfeile repräsentiert. Die Primer sind als graue Kästen dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts

Die von Nomura et *al.* hinterlegte partielle cDNA für *MLC1* [34] (GenBank Accession Nummern D25217 für die cDNA und AL022327 für den genomischen PAC Klon RP3-355C18) konnte innerhalb der Arbeitsgruppe von Yana Syagailo mittels 5'-RACE auf eine cDNA-Gesamtlänge von 3515 Basenpaaren verlängert werden. Die so erhaltene cDNA ist unter der GenBank Accession Nummer AF319633 einsehbar.

In dem von Nomura et *al.* berichteten offenen Leseraster für *MLC1* findet sich ein Stop-Codon (TGA), so dass das ATG-Codon an Nukleotid-Position 197 der cDNA als korrekter Transkriptionsstartpunkt betrachtet werden kann. Es resultiert damit ein Protein aus 377 Aminosäuren.

In Abbildung 4 ist die von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichte cDNA-Sequenz (GenBank Accession Nummer AF319633) mit markiertem Transkriptionsstart- und Endpunkt dargestellt.

```

1 attgatattc aggaagcagc tctccttccc ctgccttcag ctcaagtttg ctgagctttt
61 gtttcatttg tgaatacttc ttgctggaag tccctcacc agagaccagt gctcccaacg
121 gcagagcagc gggggagata aagaactggg gacacgtggc tgtacattca gcacagctgt
181 ggtgtcccca agtgccATGA CCCAGGAGCC ATTCAGAGAG GAGCTGGCCT ATGACCGGAT
241 GCCCAGCTG GAGCGGGGCC GGCAAGACCC CGCCAGCTAT GCCCCAGACG CGAAGCCGAG
301 CGACCTGCAG CTGTCAAGA GACTGCCCC CTGCTTCAGC CACAAGACGT GGGTCTTCTC
361 TGTGCTGATG GGGAGCTGCC TCCTGGTGAC CTCGGGGTTT TCGCTGTACC TGGGGAACGT
421 GTTCCCGGCT GAGATGGATT ACTTGCGCTG TGCTGCAGGC TCTTGCATCC CCTCGGCAAT
481 TGTGAGCTTC ACCGTCTCCA GGAGGAACGC CAATGTGATT CCCAACTTTC AGATATTGTT
541 TGTTTCCACG TTTGCTGTGA CCACTACGTG TTTAATTTGG TTTGGATGCA AACTAGTCCT
601 GAACCCATCA GCAATAAACA TCAACTTCAA CCTCATCCTG CTGCTCCTGC TGGAGCTGCT
661 CATGGCGGCC ACGGTGATCA TCGCTGCACG GTCCAGCGAG GAGGACTGCA AGAAAAAGAA
721 GGGCTCCATG TCTGACAGCG CCAACATTCT GGACGAAAGT CCATTCCTG CTCGGGTCTC
781 GAAATCTTAC TCAGTCGTCG AGGTAATCGC AGGCATCTCT GCCGTCCTCG GGGGGATCAT
841 TGCCCTGAAC GTGGATGACT CAGTTTCAGG CCCACACCTC TCAGTGACGT TCTTTTGGAT
901 CCTAGTGGCC TGCTTTCCAA GTGCCATTGC CAGTCATGTG GCAGCAGAGT GCCTCCAGCA
961 GTGTCTGGTG GAGGTCCTGA TTGCCATAAG CAGCCTCACG TCTCCGCTGC TGTTACAGC
1021 CTCTGGATAT CTGTCATTCA GCATCATGAG AATCGTGGAG ATGTTTAAGG ATTACCCGCC
1081 AGCCATAAAA CCATCCTACG ATGTGCTGCT GCTGCTGCTG CTGCTAGTGC TCCTGCTGCA
1141 GGCCGGCCTC AACACGGGCA CCGCCATCCA GTGCGTGCGC TTCAAGGTCA GTGCAAGGCT
1201 GCAGGGTGCA TCCTGGGACA CCCAGAACGG CCCGCAGGAG CGCCTGGCTG GGGAGGTGGC
1261 CAGGAGCCCC CTGAAGGAGT TCGACAAGGA GAAAGCCTGG AGAGCCGTCG TGGTGCAAAT
1321 GGCCCAGTGA cccccagacg cggaaaaccgg gtggcagcgc ccagcctggc cccaagcatg
1381 gaaacgcaca acccctaatc gcctgagct actgcttcta acacctctt tcccttgtgt
1441 gagggcaaac caggotgcag gtggggtttt cacttcttag ggtagttaa ttttaaaata
1501 ggccaatggt ggctagtctg tcctcagtg agatcagtc gctccgagt gctcccgtgt
1561 cgtaacagca ggagcatggc cgcaacttcc caggccgagg aagggcccc ggctcggcct
1621 cttgagatgc ccacccctga actggccca gctcctctc ctgcctctc catgcttgg
1681 gctggagtgg gctctctgga cctgaccaga ctgtgggtcc ctgctctcc tgcccactct
1741 gaccgggctt cctccctcca cgcttagggg ctgtcccggg tactcagtc gccagtggg
1801 atcttaccca cttccctgca aggtgcaact gcccagggt caggctgcc agcggctctt
1861 cctggacagt gagagcaggg cttggcgcct ctgtcctggc ccgggagccg caggggcccc
1921 toctccagag cctgggcgca agcgacacag gctgccgctg ctctcccagg tgaatccac
1981 accagtccac gccgggtcgc ctgccctgtc tccctactta gaccagtc ttctagaggg
2041 atccaccgcc aactggccc gccacgtcc tgggtgctgt catgccagc ttggagtgcc
2101 acgtggccgc tgcccacgtc ccgggcaact tcatgccag cttggagtgc cacatggccg
2161 ctgcccacgt cccgggcact gtcatgccc gcttggagtg ccacgtggcc gotgctgtga
2221 caggcagtgt tcttgggggt ggggctgcat ccaaggcttt gtaaaccggc tggaccagt
2281 ctccctggcc ccagtgaccg ggggaagctg agcccctcc tctgtgttt gctcccatta
2341 ctcaaaatgc aggacagatc aggtcagagc ccaggaatc tcacagttc acccagcgc
2401 ctctacctcc tagcaagtac tttgtcttga tcctcactga gaaggccca gggcagcggg
2461 cttctccatc tccgtgttt tgggtcttta gggtacagcc caggcgtca ctgccacct
2521 gccaggctgc agggacagtt ggggtgtgaga ataactctgg ctttgggtag tgccatggc

```

Abbildung 4: mRNA-Sequenz des *MLC1*-Gens (GenBank Accession Nummer AF319633): Ausgehend von der von Nomura et al. [34] veröffentlichten partiellen cDNA von *MLC1* konnte in der 5'-RACE obige mRNA-Sequenz bestimmt werden (Fortsetzung siehe Seite 49). Der Transkriptionsstartpunkt und das zugehörige Stop-Codon im vorhergesagten offenen Leseraster sind in Fettdruck-Buchstaben hervorgehoben. Die resultierende cDNA-Sequenz ist in Großbuchstaben dargestellt.

```

2581 aggagtgggt ttccctgagt ctcctcgtcc cgagggcgcc tgggtcctcc cagctgacgg
2641 cagtaaatcc acagtgagtt ggggcgactg tgaaactgga atgctgttac tttgataatt
2701 actttccagc aggtgttttc cttcacaatg gttttgtttc tttccttctg atctgagaag
2761 acatgaacgt tttctcttca ccgccgtggg gtgtattgac tggccccca tgggctgctg
2821 gaaaggcccc gagatgcatc tgtggcctgg ggccatcaag atcaaagaac caggaggcct
2881 gggagatgca gctggatggg gcggcctgca gaccctgcca gggggtttga ggaccctccc
2941 aggtttccca ctgcggaaca ggagtgactc tggctgcca gataccttca tgggtttcat
3001 gacaagtgga atcattatth tcaaccattg aagggggatg caggcaagac accttcccag
3061 ctgctcctag aggggacaag ccaggccctc tctgcagtcc tcggcagctc cggaaggaca
3121 cagtcagggg ccgggcaaac actttggcca cagccccaaa caagcgccac cgtgggagag
3181 gagaggctgc tgtcactggt accggatgca gacccccacc tgtctgcagg ccacccccac
3241 ctccctgcag ctttgaggct gcgggggtct gctcctggga atgggggtgg agccacaggg
3301 acgacccggg gcgggctgat gtcttcttg gggcagacca gagagctcaa gtttcagagt
3361 cagaattagg cacttgaac gtttttgctg gcttgcactt tcttattttc ttattttaga
3421 gcgcttaaaa aatccgaaa aatggggttt aaaagaactg tctctttcag tctacattht
3481 tgtttaatac gcttgagcaa taaacgctga cttgc

```

Abbildung 4: **mRNA-Sequenz des *MLC1*-Gens (GenBank Accession Nummer AF319633)**: Fortsetzung der mRNA-Sequenz von *MLC1* von Seite 48

3.2 Mutationsanalyse von *MLC1* bei 5 Probanden

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die genomische Sequenz der Exons 1 bis 11 des *MLC1*-Gens sowie dessen Exon 12 bis zum vorhergesagten Stop-Codon durch Sequenzieren bei 5 Probanden untersucht. Dabei sind 4 der Probanden mit periodischer Katatonie erkrankt und gehören 4 verschiedenen von Stöber et al. [38] beschriebenen Multiplex-Familien an, die laborintern mit F1, F2, F3 und F21 bezeichnet wurden. Der in Abschnitt 1.3.1 beschriebene positive Kopplungsbefund basiert vor allem auf den Kopplungsdaten von Familie 21. Die fünfte untersuchte DNA-Probe stammt von einem gesunden Probanden, mit der laborinternen Bezeichnung 174. Im weiteren wird entsprechend auf die untersuchten DNA-Proben der Probanden unter den Abkürzungen F1, F2, F3, F21 und 174 Bezug genommen.

Neben der genomischen Sequenz der Exons wurden auch die unmittelbar angren-

zenden Bereiche der Introns auf Mutationen untersucht.

In Tabelle 5 findet sich ein Überblick der beobachteten Mutationen. Die Punktmutationen in Exon 6 bzw. Exon 11 sind in den Abschnitten 3.2.2 bzw. 3.2.3 genauer erläutert. Alle übrigen Mutationen werden in Abschnitt 3.2.1 besprochen.

Tabelle 5: **Übersicht der in der Sequenzanalyse nachgewiesenen *MLC1*-Mutationen;** Fortsetzung und Legende siehe Seite 51

	F1	F2	F3	F21	174
Exon 1	a33882564g	—	—	—	—
Exon 2	t33882252c	t33882252c	—	g33882236a	—
Exon 3	—	—	—	—	—
Exon 4	A33877542G	A33877542G	A33877542G	A33877542G	A33877542G
Exon 5	—	—	—	—	—
Exon 6	—	—	—	c33874662a =g512t(cDNA) =g708t(mRNA) TGC→TTC Cys→Phe	c33874585t c33874627t
Exon 7	—	—	—	t33874089c =a793g(mRNA) TCA→TCG Ser→Ser g33874092a =c790t(mRNA) TAC→TAT Tyr→Tyr	—
Exon 8	c33871436t	c33871436t	c33871436t	—	c33871436t
Exon 9	—	—	—	—	—

	F1	F2	F3	F21	174
Exon 10	—	—	—	a33865629g g33865838a g33865883c t33865913c	—
Exon 11	—	—	—	g33861416t =c1121a(mRNA) CTG→ATG Leu→Met	—
Exon 12	—	—	T33858783C =A1378G(mRNA)	—	t33858786c =a1375g(mRNA)

Tabelle 5: **Übersicht der in der Sequenzanalyse nachgewiesenen *MLC1*-Varianten;** Die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Varianten des *MLC1*-Gens sind in obiger Tabelle zusammengefasst. Die Sequenzvarianten sind den einzelnen DNA-Proben und dem jeweiligen Exon bzw. der unmittelbaren Exonumgebung zugeordnet. Die Mutationen sind jeweils mit der Base der Referenzsequenz, Positionsnummer und veränderter Base, in dieser Reihenfolge, bezeichnet. Dabei beziehen sich die Angaben mit 8-stelliger Positionsnummer auf die DNA-Sequenz „SUPER_LINK_C22_01-12-1999“ des Sanger-Centers (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/blast/submitblast/chr22> mit der der Sequenzabgleich erfolgte (siehe Abschnitt 2.2.8). Varianten im transkribierten Bereich, also in den Exons, sind außerdem mit einer Positionsnummer bezüglich der bei GenBank unter der Zugangsnummer **AF319633** hinterlegten vorhergesagten mRNA-Sequenz angegeben. Bei Vorliegen einer heterozygoten Punktmutation wurden die Basen mit Kleinbuchstaben bezeichnet (Bei homozygoter Punktmutation → Großbuchstaben). C=Cytosin, A=Adenosin, T=Thymin, G=Guanin

3.2.1 Punktmutationen ohne Änderung des Genprodukts

Wie in Tabelle 5 aufgelistet, finden sich bei den Probanden an mehreren, teils unterschiedlichen Stellen der Exon-nahen genomischen DNA Punktmutationen. Nachdem die DNA der Introns bei der Transkription nicht in mRNA umgeschrieben werden, führen diese Sequenzvarianten zu keiner Veränderung des Genprodukts. Bis auf die beschriebene Punktmutation im Intronbereich um Exon 4 sind die Probanden bezüglich der Sequenzvarianten im Intronbereich heterozygot. Die Punktmutation bei Exon 4 ist hingegen bei allen Probanden homozygot, so dass diese Abweichung von der Referenzsequenz den Sanger-Zentrums bemerkenswert, obgleich wiederum ohne Einfluss auf das Genprodukt ist.

In Exon 12 findet sich bei den Probanden F3 und 174 jeweils eine Punktmutation nach dem vorhergesagten Stop-Codon, so dass auch hier keine Änderung des Genprodukts auftritt.

Die beiden heterozygoten Punktmutationen in Exon 7 des Probanden F21 haben ebenfalls kein verändertes Genprodukt zur Folge, da es sich um so genannte „silent mutations“ handelt. Das bedeutet, durch die Sequenzvariante wird zwar ein für eine Aminosäure codierendes Triplet verändert, aber das geänderte Triplet codiert für die selbe Aminosäure. So bedingt die Punktmutation **t33874089c** eine Tripletänderung von *TCA* zu *TCG*, wobei beide Triplets für die Aminosäure Serin codieren. Durch die Punktmutation **g33874092a** wird aus dem für Tyrosin codierenden Triplet *TAC*, das ebenfalls für Tyrosin codierende Triplet *TAT*.

3.2.2 Punktmutation in Exon 6

In Exon 6 findet sich bei Proband F21 die heterozygote Punktmutation **c33874662a**, also eine Änderung der mRNA an Position 708 (GenBank accession number

AF319633). Durch die Sequenzvariante wird aus dem für Cystein codierenden Triplet *TGC* das für Phenylalanin codierende Triplet *TTC*.

3.2.2.1 Keine Kosegregation von Punktmutation und Erkrankung

Bei der Sequenzierung eines anderen an periodischer Katatonie erkrankten Probanden aus der Familie 21 fand sich die Punktmutation **c33874662a** nicht, so dass eine Kosegregation von Erkrankung und Mutation ausgeschlossen werden kann.

3.2.2.2 Abschätzung der Allelfrequenz

Zur Abschätzung der Allelfrequenz der Punktmutation **c33874662a** wurde an DNA-Proben von 50 Probanden aus der Normalbevölkerung mittels der in Abschnitt 2.2.3.4 beschriebenen Methode eine Mutationsanalyse durchgeführt. Es fanden sich 11 heterozygote und keine homozygoten Punktmutationsträger. Außerdem ließ sich bei allen Probanden das Wildtyp-Allel nachweisen. Bei 11 Phenylalanin-Allelen von insgesamt 100 Allelen, kann somit nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz eine Phenylalanin-Allelfrequenz von 11% geschätzt werden.

3.2.3 Punktmutation in Exon 11

Die Sequenzanalyse von Exon 11 der DNA-Probe F21 erbrachte eine Abweichung der DNA an Position 1121 der mRNA (GenBank accession number AF319633). Wie in Abbildung 6 dargestellt finden sich im Sequenzierungsgel an mRNA-Position 1121 neben einem der Referenzsequenz entsprechenden Cytosin-Peak zusätzlich ein Adenosin-Peak. Auch die Sequenzanalyse des DNA-Gegenstrangs weist einen solchen „Doppel-Peak“ auf und bestätigt das Vorliegen einer Punktmutation c1121a in heterozygoter Ausprägung. Diese Punktmutation bewirkt eine Veränderung des für Leucin kodierenden Triplets *CTG* zu dem Triplet *ATG*, welches für Methionin kodiert. In den DNA-Proben F1, F2, F3 und 174 findet

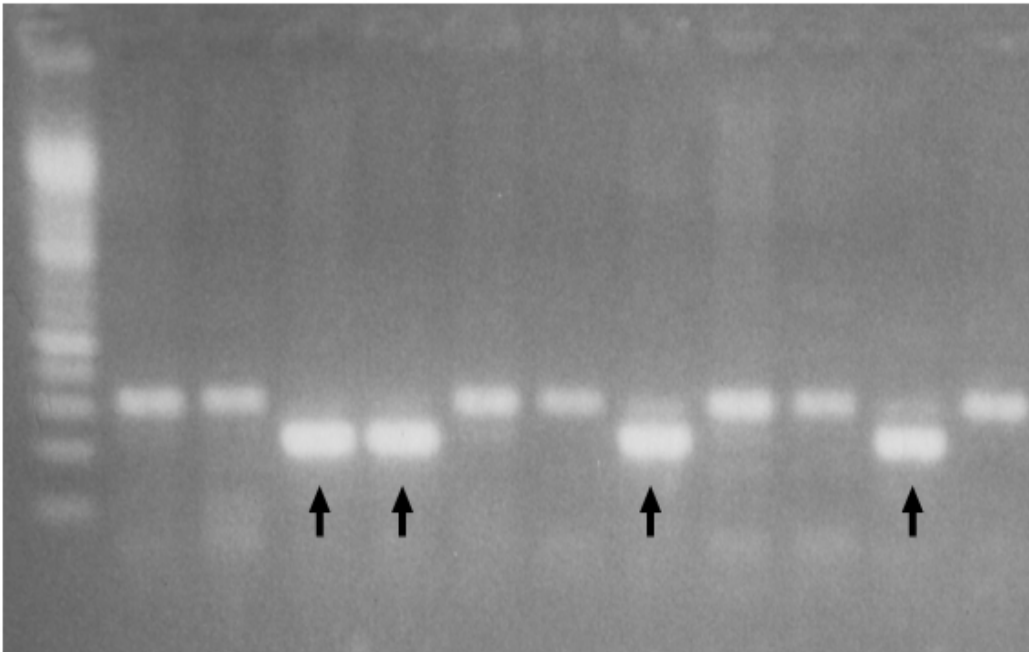


Abbildung 5: **Nachweis der Punktmutation in Exon 6:** Die Sequenzvariante führt zu einem kürzeren PCR-Produkt welches sich in der Gelelektrophorese darstellen lässt (jeweils mit Pfeil markiert).

sich keine Sequenzvarianten in Exon 11.

3.2.3.1 Kosegregation von Punktmutation und Erkrankung in Familie 21

Durch Restriktionsenzymverdau mit dem Enzym SfaN1 wurde die Verteilung der c1121a-Mutation wie in Abschnitt 2.2.5.2 beschrieben untersucht. Dabei ließ sich in der Gelelektrophorese, wie in Abbildung 7, bei allen an periodischer Katatonie erkrankten Mitgliedern von Familie 21 die c1121a-Mutation nachweisen.

Die DNA-Banden mit charakteristischer Fragmentlänge sind als Mutationsnachweis zu werten. Im Vergleich mit dem Familienstammbaum, siehe Abb. 8, zeigt sich, dass alle an periodischer Katatonie erkrankte Familienmitglieder auch c1121a-Mutationsträger sind. Auch die nicht an periodischer Katatonie erkrank-

ten Familienmitglieder 8t4, 8t6, 8t8, 8t9, 8u1, 8u3, 8u7, 8u8, 8u9, 8u14 und 8u15 sind Mutationsträger. Dennoch kann von einer Kosegregation von Mutation und Erkrankung in Familie 21 gesprochen werden, da bei den nicht erkrankten Mutationsträger ein subklinischer Krankheitsverlauf oder eine Erkrankung im weiteren Lebensverlauf möglich ist.

3.2.3.2 Keine Punktmutation bei 327 Probanden aus der Normalbevölkerung

Mittels Restriktionsenzymverdau wurden die DNA-Proben von 327 nicht schizophrenen und untereinander nicht verwandten Kontrollpersonen aus den Bereichen Unterfranken und Dresden hinsichtlich des Vorliegens der c1121a-Mutation untersucht. Dabei konnten keine Mutationsträger ausserhalb von Familie 21 gefunden werden. Die vorliegenden Untersuchungsergebnissen deuten somit auf eine Assoziation der c1121a-Mutation mit der Erkrankung an periodischer Katatonie hin.

3.3 Strukturanalyse des vorhergesagten MLC1-Proteins

Die Strukturanalyse des vorhergesagten MLC1-Proteins erfolgte mittels der in Abschnitt 3.3 genannten Programme. Für das MLC1-Protein ergaben sich sechs wahrscheinliche transmembranäre Segmente (S1-S6) mit einer Porenregion zwischen den Segmenten S5 und S6. Die größte Übereinstimmung mit bekannten Proteinsequenzen findet sich für den humanen spannungsgesteuerten Kaliumkanal KCNA1 der zur Gruppe der Shaker-Kanäle zählt, gefolgt von anderen Kanalproteinen der selben umfangreichen Genfamilie. Allerdings sind charakteristische Eigenschaften wie der Selektivitätsfilter in der Porenregion und der Spannungssensor im Transmembransegment S4 nur schlecht erhalten.

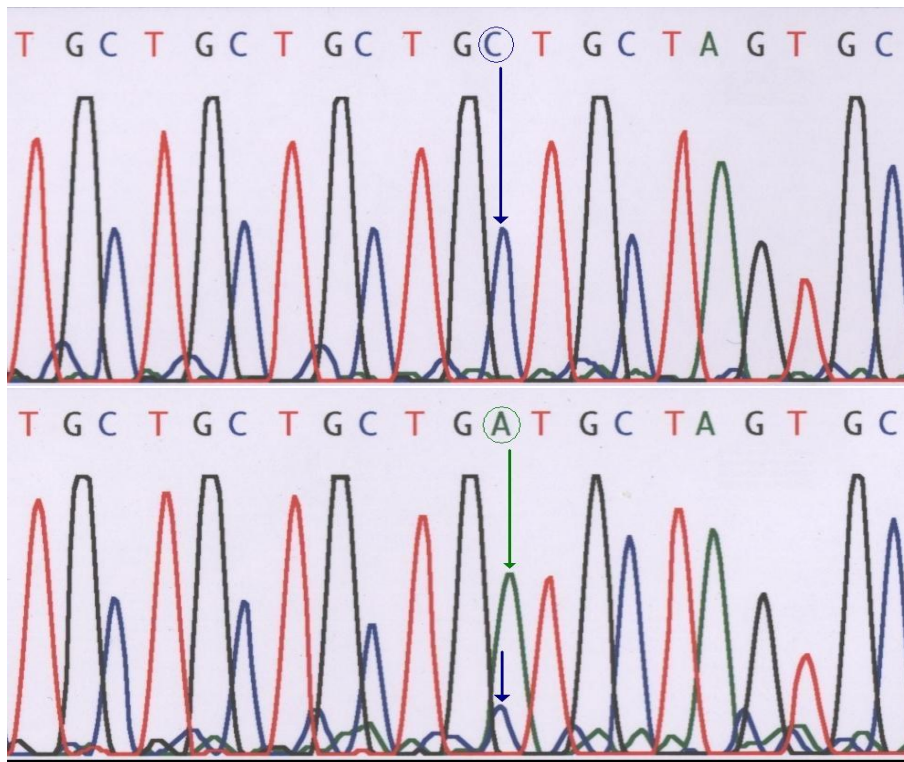


Abbildung 6: **Nachweis der c1121a-Mutation in der Sequenzanalyse:** Gegenüberstellung der unveränderten Referenzsequenz bei DNA-Probe F2 (oben) und der DNA-Probe F21 (unten). An mRNA-Position 1121 findet sich in der Referenzsequenz ein Cytosin-Peak in der Sequenzanalyse (blauer Kreis). In DNA-Probe F21 finden sich an gleicher Position ein Adenosin-Peak (grüner Kreis) und ein kleinerer Cytosin-Peak, was einer heterozygoten DNA-Sequenz entspricht. C=Cytosin, A=Adenosin, T=Thymin, G=Guanin

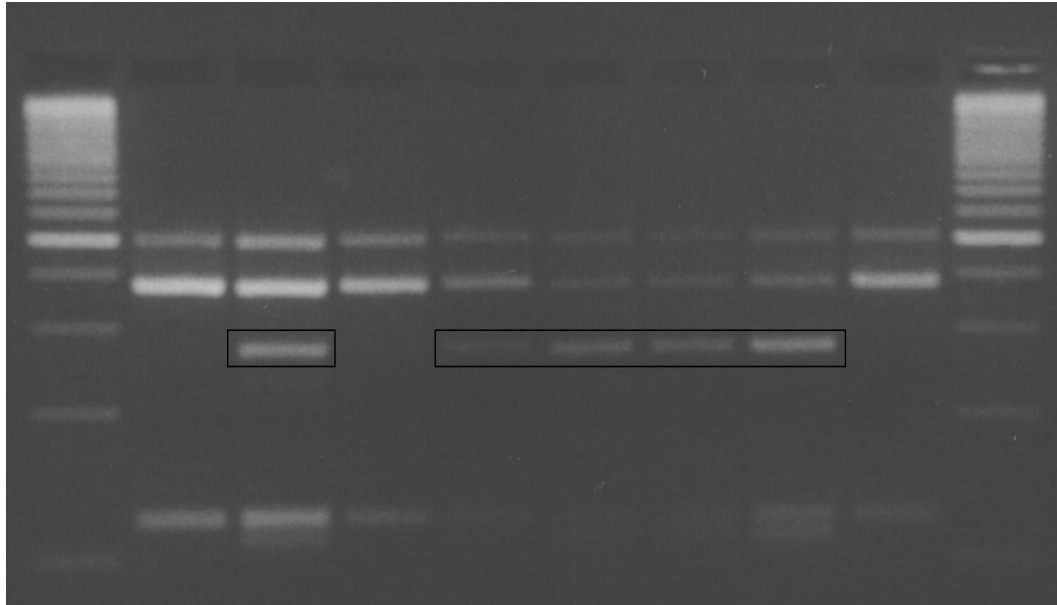


Abbildung 7: **Nachweis der c1121a-Mutation in der Gelelektrophorese:** Die c1121a-Mutation erzeugt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym SfaN1. Im Restriktionsenzymverdau gereinigter PCR-Produkte von Exon 11 mit SfaN1 findet nur bei Vorliegen der c1121-Mutation eine Reaktion statt, welche durch das Auftreten von DNA-Fragmenten entsprechender Länge in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann. Im obigen Bild sind die Produkte von Restriktionsenzymanalysen mit den DNA-Proben einiger Mitglieder von Familie 21 nebeneinander aufgetragen. Die für das Vorliegen der Mutation charakteristischen DNA-Banden sind als schwarzer Kasten markiert.

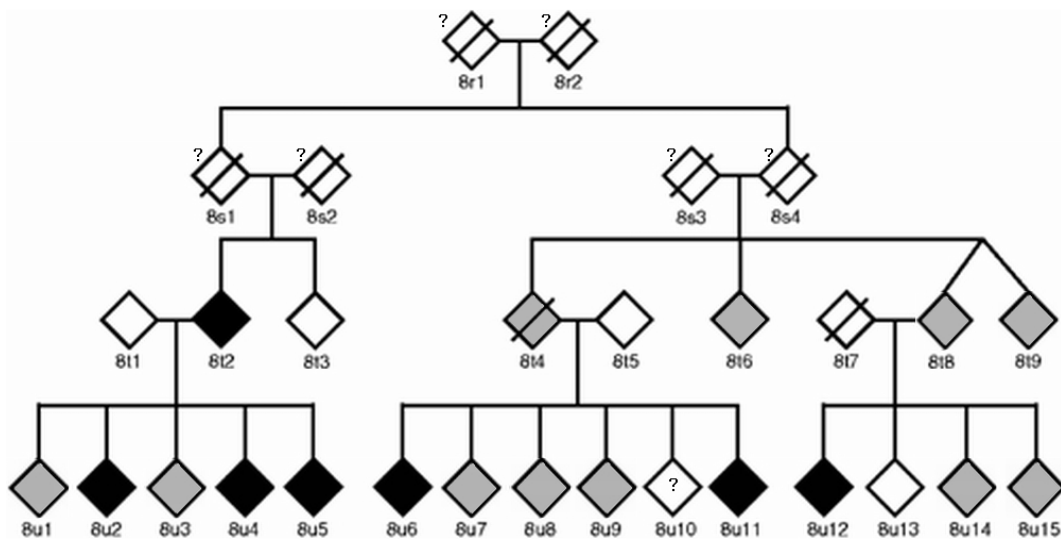


Abbildung 8: **Verteilung der c1121a-Mutation in Familie 21:** Die an periodischer Katatonie erkrankten Familienmitglieder sind als schwarze Quadrate dargestellt, verstorbene Familienmitglieder als durchgestrichene Quadrate. Bei allen mit schwarzen und grauen Quadraten dargestellten Familienmitgliedern fand sich die c1121a-Mutation. Für die mit Fragezeichen gekennzeichneten Familienmitglieder lagen keine DNA-Proben vor.

4 Diskussion

Die Periodische Katatonie ist eine Unterform der Schizophrenien, die mit einer hohen erblichen Belastung einhergeht und deren Vererbungsmuster mit einer autosomal-dominanten Transmission vereinbar wäre. In einer Kopplungsanalyse konnte unter anderem für Chromosom 22q13 ein suggestiver Kopplungsbefund erhoben werden [38]. Wie in Abschnitt 1.4 beschrieben, gelang es unserer Arbeitsgruppe nach weiterführenden Untersuchungen mit dem *MLC1*-Gen ein vielversprechendes Kandidatengen für eine Mutationsanalyse zu ermitteln. Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun die für das Genprodukt codierenden Abschnitte des *MLC1*-Gens bei drei an Periodischer Katatonie erkrankten Probanden aus verschiedenen Multiplexfamilien auf kosegregierende Mutationen zu untersuchen. Hierfür wurde zunächst mittels 5'-RACE die bekannte partielle cDNA (Gen-Bank Accession Nummer D25217) auf eine cDNA-Gesamtlänge von 3515 Basenpaaren (GenBank Accession-Nummer AF319633) verlängert. Unter Annahme des von Nomura *et al.* beschrieben offenen Leserasters [34] ergibt sich somit ein Protein aus 377 Aminosäuren. Anhand dieser Ergebnisse konnten die Exons des *MLC1*-Gens in der bekannten genomischen DNA-Sequenz von Chromosom 22 (Datenbankbezeichnung: SUPER_LINK_C22_01-12-1999) annotiert und in der Folge spezifisch mittels PCR amplifiziert und im weiteren einer Mutationsanalyse unterzogen werden.

Im Rahmen der Sequenzierungsanalyse konnten wie in Abschnitt 3.2.1 erläutert

verschiedene singuläre nukleäre Polymorphismen ohne Änderung des Genprodukts nachgewiesen werden. Außerdem fand sich in Exon 6 des an Periodischer Katatonie erkrankten Probanden F21 eine heterozygote Punktmutation, welche einen Aminosäureaustausch von Cystein zu Phenylalanin nach sich zieht (siehe Abschnitt 3.2.2). Eine Kosegregation dieser Punktmutation mit Periodischer Katatonie konnte jedoch ausgeschlossen werden, da sich die Mutation in der Sequenzanalyse bei einem anderen Erkrankten der gleichen Familie nicht nachweisen ließ. Die Allelfrequenz des Phenylalaninallels in einer Gruppe von 50 Probanden aus der Normalbevölkerung betrug 11%. Diese beschriebenen SNPs könnten sich in Zukunft als genetische Marker für verschiedene molekulargenetische Untersuchungen hilfreich erweisen.

In einer der drei untersuchten Multiplex-Familien (Familie 21) fand sich in Exon 11 eine heterozygote Punktmutation, die zu einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Methionin (Leu309Met) führt. Für die Leu309Met-Mutation konnte eine Kosegregation mit der Erkrankung an Periodischer Katatonie gezeigt werden. Zwar waren zum Untersuchungszeitpunkt nicht alle Mutationsträger an Periodischer Katatonie erkrankt, dies könnte jedoch durch einen späteren Erkrankungszeitpunkt bei den gesunden Mutationsträgern bedingt sein. Außerdem ist auch eine unvollständige Penetranz der Erkrankung, die möglicherweise der Triggersung durch äußere Einflüsse bedarf, denkbar. Weder in einer Kontrollgruppe aus 327 Probanden aus der Normalbevölkerung noch in den zwei anderen untersuchten Multiplex-Familien konnte die Mutation nachgewiesen werden (siehe 3.2.3). Die Annahme der Kosegregation von Mutation und Erkrankung ist also aufgrund der Untersuchungsergebnisse als gerechtfertigt anzusehen, wenn auch mit Beschränkung auf die beschriebene Familie.

Mittlerweile wird ein kausaler Zusammenhang einer Veränderung in MLC1 mit der Entstehung von Periodischer Katatonie von einigen Autoren angezwei-

felt. McQuillin und Mitarbeiter sequenzierten Exon 11 des *MLC1*-Gens bei 174 britischen Schizophreniepatienten, von denen 22 an Periodisch Katatoner Schizophrenie erkrankt waren [43]. Es gelang zwar eine Reihe von Polymorphismen identifizieren, die in gleicher Häufigkeit bei den erkrankten Personen und in einer Kontrollgruppe gefunden wurden, aber die Leu309Met-Mutation konnte bei keinem Patienten nachgewiesen werden. In einem anderen Kollektiv von 43 Schizophreniekranken, darunter 15 Personen mit Periodisch Katatoner Schizophrenie, fanden Devaney und Mitarbeiter in der Sequenzanalyse keine relevanten Mutationen im *MLC1*-Gen [44]. Die Autoren beider Artikel folgerten daher, dass Veränderungen in *MLC1* wahrscheinlich keine Rolle bei der Pathogenese der Periodischen Katatonie spielen.

Der Arbeitsgruppe um Rubie und Stöber gelang es in einer weiteren Familie mit Periodischer Katatonie die Mutation Leu309Met nachzuweisen [45]. Außerdem fanden sie bei Patienten mit katatoner Schizophrenie und Kontrollprobanden eine Vielzahl von Polymorphismen und Varianten des *MLC1*-Gens sowie einen 33 bp Insertions/Deletions-Polymorphismus in Exon 11, die jedoch keine Assoziation zum Auftreten der Erkrankung zeigten. Aus der Tatsache, dass ein erkranktes Familienmitglied die Leu309Met-Mutation von seinem nicht betroffenen Elternteil geerbt hatte, schlossen sie einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen der Mutation und der Erkrankung aus. Allerdings ließen sie dabei das aus der Psychologie bekannte Phänomen des *assortative mating* außer Acht [46]. Als *assortative mating* wird dabei der Umstand bezeichnet, dass sich Personen mit ähnlichen Verhaltensmerkmalen, z.B. aufgrund einer gleichartigen Erkrankung und ähnlichen Lebensumständen, häufig als Paar zusammenfinden. Daher sollte das mutationstragende Elternteil, nochmals auf das Vorliegen von Krankheitssymptomen untersucht werden, um eine eventuell vorliegende schwächere Ausbildung der Krankheitssymptomatik nicht zu übersehen.

Kaganovich und Mitarbeiter fanden bei der Untersuchung von 117 Schizophreniekranken einer israelisch-jüdischen Population keine Assoziation der Erkrankung mit der Leu309Met-Mutation [47]. Eine indische Forschergruppe fand in einem Kollektiv von Schizophreniekranken und Patienten mit bipolaren Störungen insgesamt 33 *MLC1*-Varianten sowie 3 neue Mutationen [48], dabei zeigten einige der häufigen Varianten in einzelnen Familien Assoziationen zum Auftreten der Erkrankung.

Von einer Arbeitsgruppe um Selch [49] konnte an einem Kollektiv von 212 Schizophreniekranken, davon 56 mit Periodischer Katatonie, eine Assoziation von Polymorphismen im Promotorbereich sowie zwei single nuclear polymorphisms im Intron-Bereich von *MLC1* mit der Erkrankung an periodisch katatonischer Schizophrenie gezeigt werden. Beachtenswert ist auch, dass sich weder in der Gesamtgruppe der Schizophrenieerkrankten noch in einer Kontrollgruppe mit 106 Patienten mit bipolaren Störungen eine signifikante Krankheitsassoziation der Polymorphismen zeigen ließ. Das *MLC1*-Gen scheint also spezifisch mit der Periodischen Katatonie assoziiert zu sein. In welcher Form *MLC1* an der Pathogenese an Periodischer Katatonie beteiligt ist, ob als verursachendes Krankheitsgen oder als über Summationseffekte mit anderen Gendefekten zur Krankheitsentstehung beitragendes Gen, bleibt aber zu klären.

Für eine andere neurologischen Erkrankung, der Megalenzephalen Leukoencephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC), ist eine Assoziation mit Veränderungen in *MLC1* mittlerweile zweifelsfrei nachgewiesen. Bei der MLC handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte neurodegenerative Erkrankung. Klinisch manifestiert sich die MLC mit zunehmender Ataxie und Spastik im frühen Kindheitsalter. Morphologisch findet sich eine Makroenzephalie, sowie eine Zystenbildung und spongiforme Veränderungen der weißen Substanz. Die Forschergruppe aus Leiden um Leegwater und van der Knaap fand in 13 Familien mit

MLC insgesamt 12 verschiedene Mutationen des *MLC1*-Gens [35]. Mittlerweile konnten noch eine Vielzahl weiterer Mutation bei MLC-Patienten im selben Gen beschrieben werden [50] [51] [45] [52] [53]. Allerdings konnte nicht bei allen MLC-Patienten eine *MLC1*-Mutation aufgezeigt werden, so dass eine genetische Heterogenität der Erkrankung anzunehmen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in einer Strukturanalyse des vorhergesagten *MLC1*-Gens eine entfernte Ähnlichkeit zu spannungsabhängigen Kaliumkanälen aus der Familie der Shakerkanäle, insbesondere zu KCNA1, aufgezeigt werden (siehe Abschnitt 3.3) [54]. Diese Ähnlichkeit ist bemerkenswert, insbesondere in der Zusammenschau von bisherigen Forschungsergebnisse zur Funktion von Kaliumkanälen und der bei der Periodischen Katatonie zu beobachtenden progressiven Komponente der Erkrankung mit zunehmender Behandlungsresistenz. So konnte für spannungsabhängige Kaliumkanäle aus der Familie der Shakerkanäle signifikante Änderungen der Kanalleitungseigenschaften durch die Oxidation von Methionin im Bereich der Porenregion gezeigt werden [55] [56]. Modellvorstellungen für die neurodegenerativen Prozesse im Rahmen eines Langzeitverlaufs von Schizophrenie vermuten unter anderem eine Beteiligung von N-methyl-D-aspartat (NMDA) Rezeptorantagonisten [19]. Vorstellbar ist die Oxidation des durch die Leu309Met-Mutation in der Porenregion eingefügten Methionins, beispielsweise durch über den NMDA-Rezeptor vermittelte excitotoxische Prozesse und oxidativen Stress während einer psychotischen Episode [57] [58]. Über einen solchen Mechanismus ließe sich eine fortschreitende Funktionsbeeinträchtigung des putativen *MLC1*-Kanalproteins erklären.

In der Vergangenheit konnte bereits für andere neurologische Erkrankungen ein Zusammenhang mit Veränderungen von Kaliumkanalproteinen aufgedeckt werden. So konnten Browne und Mitarbeiter zeigen, dass Mutationen in KCNA1 ursächlich für episodische Ataxie und Myokymie sind [59] [60]. Mutationen

in den spannungsabhängigen Kaliumkanälen KCNQ2 und KCNQ3 konnten als ursächlich für die Entstehung der benignen familiären neonatalen Konvulsionen (BFNC), einer autosomal dominanten Form der generalisierten Epilepsien, ermittelt werden [61] [62].

Vor diesem Hintergrund ist somit ein kausaler Zusammenhang der Leu309Met-Mutation im *MLC1*-Gen mit der Erkrankung an Periodischer Katatonie durchaus denkbar.

In unserer Forschungsgruppe [63] konnte gezeigt werden, dass MLC1 in Gliazellen exprimiert wird. Die *MLC1* mRNA konnte dabei durch in-situ-Hybridisierung ausschließlich in Gliazellen des adulten Gehirns von Mäusen, insbesondere in Astrozyten, Bergmann-Glia und Ependymzellen, lokalisiert werden.

Mittlerweile konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigt werden, dass es sich bei MLC1 um ein Membranprotein handelt [64]. Teijido und Mitarbeitern gelang es, durch in-situ-Hybridisierung und immunhistochemische Untersuchungen am adulten Mausgehirn MLC1 im axonalen Anteil von Neuronen, sowie in Gliazellen, insbesondere der Bergmann-Glia, Ependymzellen, der Pia mater und in Astrozyten nachzuweisen [65]. Die Wissenschaftler zeigten weiterhin, dass Mutationen in *MLC1* zu einer Störung der Tertiärstruktur des Proteins führten. Dieser Effekt wurde in vitro durch Zugabe von Curcumin, einem Inhibitor der Ca²⁺-ATPase, aufgehoben. Diese Ergebnisse könnten einen ersten Therapieansatz bieten für Patienten, die an MLC erkrankt sind.

In weiteren Untersuchungen der Gruppe um Teijido konnte MLC1 in Astrozyt-Astrozyt-Kontaktregionen sowie in Neuronen in der Plasmamembran und in vesikulären Strukturen lokalisiert werden. Die Forscher stellten daraufhin die Hypothese auf, dass MLC auf eine Dysfunktion von Astrozyten und Neuronen zurück-

zuföhren ist [66].

Auch Boor und Mitarbeiter fanden, dass MLC1 im Wesentlichen in Gliazellen an Grenzregionen von verschiedenen Geweben, insbesondere den Endfüßen der Astrozyten, exprimiert wird [64]. Sie vermuteten eine Beteiligung von MLC1 an Transportvorgängen durch die Blut-Hirn- und Blut-Liquor-Schranke.

Eine wichtige Funktion von Astrozyten ist die Regulation der extrazellulären Kaliumkonzentration und damit auch des pH-Werts im Gehirn. Dabei scheinen in den astrozytären Endfüßen lokalisierte und mit dem Dystrophin-assoziierten Glycoprotein Complex (DGC) wechselwirkende Kanalproteine, z.B. der Wasserkanal Aquaporin-4 und der Kaliumkanal Kir4.1, eine zentrale Rolle zu spielen [67].

Der Dystrophin-assoziierten Glycoprotein Complex (DGC) wird in verschiedenen Geweben exprimiert und ist bisher am Besten für die Skelettmuskulatur charakterisiert worden, wo er das Zytoskelett der Muskelfasern mit der extrazellulären Matrix verbindet. Mutationen in verschiedenen DGC-Komponenten verursachen unterschiedliche Muskeldystrophien, z.B. Morbus Duchenne. In der Gruppe der angeborenen Muskeldystrophien ist der muskuläre Phänotyp auch häufig mit Abnormalitäten des Gehirns verbunden [68] [69]. Insbesondere bei einer Unterart der angeborenen Muskeldystrophie (Typ MCD1A) finden sich dabei im Gehirn-MRT vergleichbare Veränderungen der weißen Substanz wie bei der MLC [70].

Von der Arbeitsgruppe um Boor und van der Knaap konnte durch immunhistochemische Färbungen an Gehirngewebe MLC1 mit DGC-Proteinen co-lokalisiert werden [71]. In Gehirngewebe eines MLC-Patienten konnte die Abwesenheit von MLC1 sowie eine veränderte Expression einiger DGC-Proteine demonstriert werden. Außerdem zeigten die Forscher eine direkte Proteininteraktion zwischen

MLC1 und Kir4.1. Aus diesen Beobachtungen schlussfolgerten die Autoren, dass MLC1 mit dem Dystrophin-assoziierten Glycoprotein Complex (DGC) in den astrozytären Endfüßen assoziiert ist.

Möglicherweise spielt *MLC1* auch nicht nur bei der Entstehung von Erkrankungen des ZNS eine Rolle. In einer Arbeit von Dong-Dong wurde eine vermehrte Expression von *MLC1* in Leberkarzinomzellen nachgewiesen [72]. In vitro bewirkte eine Überexpression von *MLC1* hier auch ein verbessertes Zellwachstum. Ob diese Ergebnisse in zukünftigen Arbeiten bestätigt werden können bleibt abzuwarten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte durch den Nachweis einer Punktmutation im *MLC1*-Gen und ihrer Assoziation mit dem Auftreten von Periodischen Katatonie ein wichtiges Indiz für eine kausale Rolle von MLC1 in der Ätiopathogenese der Periodischen Katatonie gefunden werden.

Trotz erster Ansätze bleibt die genaue Klärung der Funktion von MLC1 und seiner pathophysiologischen Bedeutung für die Entstehung von Krankheiten wie der Periodischen Katatonie bzw. der MLC ein vordringliches Forschungsziel. Ein besseres Verständnis für die Pathogenese der direkt assoziierten Erkrankungen könnte vielleicht auch einen neuen Zugang zu der bisher ätiologisch schlecht verstandenen Erkrankungsgruppe der Schizophrenien eröffnen. Außerdem bleibt zu hoffen, dass die Kenntnis der Ätiopathogenese von MLC und Periodischer Katatonie die Entwicklung neuer Therapieansätze dieser für die Patienten so schwerwiegenden Erkrankungen ermöglicht.

5 Zusammenfassung

Die Periodische Katatonie ist eine diagnostisch gut abgrenzbare Untergruppe der Schizophrenie mit besonders großer familiärer Belastung. Durch Kopplungsuntersuchungen konnte eine Kopplung der Erkrankung mit Chromosom 22q13 gezeigt werden. In der Zielregion findet sich auch das *MLC1*-Gen (alternative Bezeichnungen *WKL1* oder *KIAA0027*), für welches bereits eine Assoziation mit einer anderen erblichen Hirnerkrankung, der Megalenzephalen Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC), bekannt ist. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte nun eine Mutationsanalyse von *MLC1* als Kandidatengen für die Periodische Katatonie am Material einer mehrfach betroffenen Großfamilie.

Durch Verlängerung der bekannten partiellen cDNA-Sequenz von *MLC1* mittels 5'-RACE ergab sich unter Annahme des von Nomura *et al.* (1994) beschriebenen offenen Leserasters ein 377 Aminosäuren großes Protein. Die Strukturanalyse des vorhergesagten MLC1-Proteins zeigt die größte Übereinstimmung für den humanen spannungsgesteuerten Kaliumkanal KCNA1. In der Vergangenheit konnte bereits bei anderen neurologischen Erkrankungen ein Zusammenhang mit veränderten Kaliumkanalproteinen nachgewiesen werden.

In der bekannten genomischen DNA-Sequenz konnten 12 Exons annotiert werden. Bei der Sequenzierungsanalyse der codierenden Genabschnitte von *MLC1* fand sich bei allen erkrankten Mitgliedern der untersuchten Multiplexfamilie ein heterozygoter Austausch von Cytosin zu Adenin an mRNA-Position 1121 (GenBank Accession-Nummer AF319633). Diese Punktmutation führt zu einem Ami-

nosäureaustausch von Leucin zu Methionin im MLC1-Protein. Bei einigen nicht erkrankten Familienmitgliedern ließ sich die veränderte DNA-Sequenz ebenfalls nachweisen, was jedoch durch eine unvollständige Krankheitspenetranz oder einen späteren Erkrankungszeitpunkt begründet sein könnte. In einem Kontrollkollektiv von 327 Probanden aus der Normalbevölkerung sowie bei je einem erkrankten Mitglied von drei anderen mehrfach von periodischer Katatonie betroffenen Familien konnte die Missense-Mutation nicht gefunden werden.

In dieser Arbeit wurde die Assoziation einer sinnverändernden Mutation im *MLC1*-Gen mit dem Auftreten von periodischer Katatonie in einer mehrfach betroffenen Familie gezeigt. Die Aufklärung der Funktion von MLC1 verspricht somit wichtige Erkenntnisse zur Ätiopathogenese sowohl der Megalenzephalen Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten als auch der Periodischen Katatonie.

Literaturverzeichnis

- [1] Schneider K. *Klinische Psychopathologie*. Thieme, Stuttgart, 1967.
- [2] Andreasen NC. Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia. *Lancet. Aug 19;346(8973):477-81*, 1995.
- [3] Kraepelin E. *Psychiatrie*. Barth, Leipzig, 1909.
- [4] Bleuler E. *Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien*. In Aschaffenburg G (Hrsg) *Handbuch der Psychiatrie*. Deuticke, Leipzig, 1911.
- [5] Kendell RE, Cooper JE, Gourlay AJ, Copeland JR, Sharpe L, and Gurland BJ. Diagnostic criteria of american and british psychiatrists. 1971.
- [6] Wing JK, Cooper JE, and Sartorius N. *The measurement and classification of psychiatric symptoms*. Cambridge University Press, Cambridge, 1974.
- [7] Flaum M and Andreasen NC. Diagnostic criteria for schizophrenia and related disorders: options for dsm-iv. *Schizophr Bull.;17(1):133-56*, 1991.
- [8] Regier DA, Kaelber CT, Roper MT, Rae DS, and Sartorius N. The icd-10 clinical field trial for mental and behavioral disorders: results in canada and the united states. *Am J Psychiatry. Sep;151(9):1340-50*, 1994.
- [9] Jablensky A, Sartorius N, Ernberg G, Anker M, Korten A, Cooper JE, Day R, and Bertelsen A. Schizophrenia: manifestations, incidence and course

- in different cultures. a world health organization ten-country study. 1992, Psychol. Med. Monographs Supp. 20: 1-97.
- [10] Jablensky A. Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*;250(6):274-85, 2000.
- [11] Kendler KS and Diehl SR. *Schizophrenia: genetics*. In: Kaplan, H. I.; Sack, B. J. (eds.) : *Comprehensive Textbook of Psychiatry*, pages 942–957. Williams and Wilkins, Baltimore, 1985.
- [12] Moldin SO. *Sponsoring initiatives in the molecular genetics of mental disorders*. In: *Genetics and Mental Disorders : Report of the NIMH Genetics Workgroup*. Bethesda, Md.: NIH 98-4268, 1998.
- [13] Gottesman II. *Schizophrenia Genesis: The Origins of Madness*. W. H. Freeman, New York, 1991.
- [14] Gottesman II and Erlenmeyer-Kimling L. Family and twin strategies as a head start in defining prodromes and endophenotypes for hypothetical early-interventions in schizophrenia. *Schizophr Res. Aug 1;51(1):93-102*, 2001.
- [15] Torrey EF, Miller J, Rawlings R, and Yolken RH. Seasonality of births in schizophrenia and bipolar disorder: a review of the literature. *Schizophr. Res. 28: 1-38*, 1997.
- [16] Buka SL, Tsuang MT, Torrey EF, Klebanoff MA, Bernstein D, and Yolken RH. Maternal infections and subsequent psychosis among offspring. *Arch Gen Psychiatry. Nov;58(11):1032-7*, 2001.
- [17] Patterson PH. Maternal infection: window on neuroimmune interactions in fetal brain development and mental illness. *Curr Opin Neurobiol. Feb;12(1):115-8*, 2002.

- [18] Tsuang M. Schizophrenia: genes and environment. *Biol Psychiatry. Feb 1;47(3):210-20*, 2000.
- [19] Lieberman JA. Pathophysiologic mechanisms in the pathogenesis and clinical course of schizophrenia. *J Clin Psychiatry.;60 Suppl 12:9-12*, 1999.
- [20] Lander E and Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet. Nov;11(3):241-7*, 1995.
- [21] G van Camp. Strategies for identification of disease genes. *Acta neuropsychiatrica;11,2*, 1999.
- [22] Kong A and Cox NJ. Allele-sharing models: Lod scores and accurate linkage tests. *Am J Hum Genet. Nov;61(5):1179-88*, 1997.
- [23] Löffler G and Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin, sechste edition, 1998.
- [24] Gray JR and Davies SJ. Marfan syndrome. *J Med Genet. May;33(5):403-8*, 1996.
- [25] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, and Ding W. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene brca1. *Science. Oct 7;266(5182):66-71*, 1994.
- [26] Struewing JP, Brody LC, Erdos MR, Kase RG, Giambarresi TR, Smith SA, Collins FS, and Tucker MA. Detection of eight brca1 mutations in 10 breast/ovarian cancer families, including 1 family with male breast cancer. *Am J Hum Genet. Jul;57(1):1-7*, 1995.

- [27] Pfuhlmann B, Franzek E, Stöber G, Cetkovich-Bakmas M, and Beckmann H. On interrater reliability for leonhard's classification of endogenous psychoses. *Psychopathology. Mar-Apr;30(2):100-5*, 1997.
- [28] Franzek E and Beckmann H. Season-of-birth effect reveals the existence of etiologically different groups of schizophrenia. *Biol Psychiatry. Aug 15;32(4):375-8*, 1992.
- [29] Beckmann H and Franzek E. Deficit of birthrates in winter and spring months in distinct subgroups of mainly genetically determined schizophrenia. *Psychopathology.;25(2):57-64*, 1992.
- [30] Leonhard K. *Aufteilung der endogenen Psychosen und ihre differenzierte Ätiologie*. Thieme, Stuttgart, siebte edition, 1995.
- [31] Leonhard K. *Differenzierte Diagnostik der endogenen Psychosen, abnormen Persönlichkeitsstrukturen und neurotischen Endentwicklungen*. Verlag Gesundheit, Berlin, vierte edition, 1991.
- [32] Beckmann H, Franzek E, and Stöber G. Genetic heterogeneity in catatonic schizophrenia: a family study. *Am J Med Genet. May 31;67(3):289-300*, 1996.
- [33] Stöber G, Franzek E, Lesch KP, and Beckmann H. Periodic catatonia: a schizophrenic subtype with major gene effect and anticipation. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.;245(3):135-41*, 1995.
- [34] Nomura N, Miyajima N, Sazuka T, Tanaka A, Kawarabayasi Y, Sato S, Nagase T, Seki N, Ishikawa K, and Tabata S. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. i. the coding sequences of 40 new genes (kiaa0001-kiaa0040) deduced by analysis of randomly sampled cdna clones from human immature myeloid cell line kg-1 (supplement). *DNA Res.;1(1):47-56*, 1994.

- [35] Leegwater PA, Yuan BQ, van der Steen J, Mulders J, Konst AA, Boor PK, Mejaski-Bosnjak V, van der Maarel SM, Frants RR, Oudejans CB, Schutgens RB, Pronk JC, and van der Knaap MS. Mutations of *mlc1* (*kiaa0027*), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am J Hum Genet. Apr;68(4):831-8.*, 2001.
- [36] van der Knaap MS, Barth PG, Stroink Hand van Nieuwenhuizen O, Arts WF, Hoogenraad F, and Valk J. Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann Neurol. Mar;37(3):324-34*, 1995.
- [37] van der Knaap MS, Barth PG, Vrensen GF, and Valk J. Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropathol (Berl). Aug;92(2):206-12*, 1996.
- [38] Stöber G, Saar K, Ruschendorf F, Meyer J, Nurnberg G, Jatzke S, Franzek E, Reis A, Lesch KP, Wienker TF, and Beckmann H. Splitting schizophrenia: periodic catatonia-susceptibility locus on chromosome 15q15. *Am J Hum Genet. Nov;67(5):1201-7*, 2000.
- [39] Garver DL. The etiologic heterogeneity of schizophrenia. *Harv Rev Psychiatry. Mar-Apr;4(6):317-27*, 1997.
- [40] Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, and Lukyanov SA. An improved pcr method for walking in uncloned genomic dna. *Nucleic Acids Res. Mar 25;23(6):1087-8*, 1995.
- [41] Chenchik A, Diachenko L, Moqadam F, Tarabykin V, Lukyanov S, and Siebert PD. Full-length cdna cloning and determination of mrna 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cdna. *Biotechniques. Sep;21(3):526-34*, 1996.

- [42] Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR. Dna sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A. Dec;74(12):5463-7*, 1977.
- [43] McQuillin A, Kalsi G, Moorey H, Lamb G, Mayet S, Quedsted D, Baker P, Curtis D, and Gurling HM. A novel polymorphism in exon 11 of the wkl1 gene, shows no association with schizophrenia. *Eur J Hum Genet. Aug;10(8):491-4*, 2002.
- [44] Devaney JM, Donarum EA, Brown KM, Meyer J, Stöber G, Lesch KP, Nestadt G, Stephan DA, and Pulver AE. No missense mutation of wkl1 in a subgroup of probands with schizophrenia. *Mol Psychiatry. ;7(4):419-23*, 2002.
- [45] Rubie C, Lichtner P, Gärtner J, Siekiera M, Uziel G, Kohlmann B, Kohlschütter A, Meitinger T, Stöber G, and Bettecken T. Sequence diversity of kiaa0027/mlc1: are megalencephalic leukoencephalopathy and schizophrenia allelic disorders? *Hum Mutat. Jan;21(1):45-52*, 2003.
- [46] Baron M, Endicott J, and Ott J. Genetic linkage in mental illness. limitations and prospects. *Br J Psychiatry. Nov;157:645-55. Review.*, 1990.
- [47] Kaganovich M, Peretz A, Ritsner M, Bening Abu-Shach U, Attali B, and Navon R. Is the wkl1 gene associated with schizophrenia? *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. Feb 15;125(1):31-7*, 2004.
- [48] Verma R, Mukerji M, Grover D, B-Rao C, Das SK, Kubendran S, Jain S, and Brahmachari SK. Mlc1 gene is associated with schizophrenia and bipolar disorder in southern india. *Biol Psychiatry. Jul 1;58(1):16-22*, 2005.
- [49] Selch S, Strobel A, Haderlein J, Meyer J, Jacob CP, Schmitt A, Lesch KP, and Reif A. Mlc1 polymorphisms are specifically associated with periodic catatonia, a subgroup of chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry. May 15;61(10):1211-4.*, 2007.

- [50] Leegwater PA, Boor PK, Yuan BQ, van der Steen J, Visser A, Könst AA, Oudejans CB, Schutgens RB, Pronk JC, and van der Knaap MS. Identification of novel mutations in *mlc1* responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum Genet. Mar;110(3):279-83*, 2002.
- [51] Patrono C, Di Giacinto G, Eymard-Pierre E, Santorelli FM, Rodriguez D, De Stefano N, Federico A, Gatti R, Benigno V, Megarbané A, Tabarki B, Boespflug-Tanguy O, and Bertini E. Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology. Aug 26;61(4):534-7*, 2003.
- [52] Tsujino S, Kanazawa N, Yoneyama H, Shimono M, Kawakami A, Hatanaka Y, Shimizu T, and Oba H. A common mutation and a novel mutation in japanese patients with van der knaap disease. *J Hum Genet. 48(12):605-8*, 2003.
- [53] Riel-Romero RM, Smith CD, and Pettigrew AL. Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in two siblings owing to two novel mutations: case reports and review of the literature. *J Child Neurol. Mar;20(3):230-4*, 2005.
- [54] Meyer J, Huberth A, Ortega G, Syagailo YV, Jatzke S, Mossner R, Strom TM, Ulzheimer-Teuber I, Stöber G, Schmitt A, and Lesch KP. A missense mutation in a novel gene encoding a putative cation channel is associated with catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Mol Psychiatry. May;6(3):302-6*, 2001.
- [55] Ciorba MA, Heinemann SH, Weissbach H, Brot N, and Hoshi T. Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc Natl Acad Sci USA. Sep 2;94(18):9932-7*, 1997.

- [56] Chen J, Avdonin V, Ciorba MA, Heinemann SH, and Hoshi T. Acceleration of p/c-type inactivation in voltage-gated k(+) channels by methionine oxidation. *Biophys J. Jan;78(1):174-87*, 2000.
- [57] Coyle JT and Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science. Oct 29;262(5134):689-95*, 1993.
- [58] Olney JW. Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. *Biol Psychiatry. Sep;26(5):505-25*, 1989.
- [59] Browne DL, Brunt ER, Griggs RC, Nutt JG, Gancher ST, Smith EA, and Litt M. Identification of two new *kcnk1* mutations in episodic ataxia/myokymia families. *Hum Mol Genet. Sep;4(9):1671-2*, 1995.
- [60] Browne DL, Gancher ST, Nutt JG, Brunt ER, Smith EA, Kramer P, and Litt M. Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, *kcnk1*. *Nat Genet. Oct;8(2):136-40*, 1994.
- [61] Singh NA, Charlier C, Stauffer D, DuPont BR, Leach RJ, Melis R, Ronen GM, Bjerre I, Quattlebaum T, Murphy JV, McHarg ML, Gagnon D, Rosales TO, Peiffer A, Anderson VE, and Leppert M. A novel potassium channel gene, *kcnq2*, is mutated in an inherited epilepsy of newborns. *Nat Genet. Jan;18(1):25-9*, 1998.
- [62] Singh NA, Westenskow P, Charlier C, Pappas C, Leslie J, Dillon J, AndersonVE, Sanguinetti MC, and Leppert MF. *Kcnq2* and *kcnq3* potassium channel genes in benign familial neonatal convulsions: expansion of the functional and mutation spectrum. *Brain. Dec;126(Pt 12):2726-37*, 2003.
- [63] Schmitt A, Gofferje V, Weber M, Meyer J, Mössner R, and Lesch KP. The brain-specific protein *mlc1* implicated in megalencephalic leukoencephalopa-

- thy with subcortical cysts is expressed in glial cells in the murine brain. *Glia*. Dec;44(3):283-95, 2003.
- [64] Boor PK, de Groot K, Waisfisz Q, Kamphorst W, Oudejans CB, Powers JM, Pronk JC, Scheper GC, and van der Knaap MS. Mlc1: a novel protein in distal astroglial processes. *J Neuropathol Exp Neurol*. May;64(5):412-9, 2005.
- [65] Teijido O, Martínez A, Pusch M, Zorzano A, Soriano E, Del Río JA, Palacín M, and Estévez R. Localization and functional analyses of the mlc1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum Mol Genet*. Nov 1;13(21):2581-94, 2004.
- [66] Teijido O, Casaroli-Marano R, Kharkovets T, Aguado F, Zorzano A, Palacín M, Soriano E, Martínez A, and Estevez R. Expression patterns of mlc1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol Dis*. Jun;26(3):532-45, 2007.
- [67] Connors NC, Adams ME, Froehner SC, and Kofuji P. The potassium channel kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem*. Jul 2;279(27):28387-92, 2004.
- [68] Muntoni F, Brockington M, Torelli S, and Brown SC. Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol*. Apr;17(2):205-9, 2004.
- [69] Cohn RD Lisi MT. Congenital muscular dystrophies: new aspects of an expanding group of disorders. *Biochim Biophys Acta*. Feb;1772(2):159-72, 2007.
- [70] van der Knaap MS, Smit LM, Barth PG, Catsman-Berrevoets CE, Brouwer OF, Begeer JH, de Coo IF, and Valk J. Magnetic resonance imaging in

classification of congenital muscular dystrophies with brain abnormalities. *Ann Neurol. Jul;42(1):50-9*, 1997.

- [71] Boor I, Nagtegaal M, Kamphorst W, van der Valk P, Pronk JC, van Horsen J, Dinopoulos A, Bove KE, Pascual-Castroviejo I, Muntoni F, Estevez R, Scheper GC, and van der Knaap MS. Mlc1 is associated with the dystrophin-glycoprotein complex at astrocytic endfeet. *Acta Neuropathol. Oct;114(4):403-10*, 2007.
- [72] Dong-Dong L. Up-regulation expression of mlc1 in human liver cancer tissue and enhanced smmc7721 cell tumorigenesis in vivo and vitro. *Hepatogastroenterology. Jul-Aug;52(64):1186-90*, 2005.

A Abkürzungsverzeichnis

μl	Mikroliter
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
cM	Centimorgan
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxynucleosid-5'-triphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - 4th Edition</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	<i>expressed sequence tag</i>

<i>et. al.</i>	<i>et alteri</i>
G	Guanosin
g	Gramm / Erdbeschleunigung
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ICD-10	<i>International Classification of Diseases - 10th Revision</i>
kb	Kilobasenpaare (1000 bp)
<i>KIAA0027</i>	ursprüngliche Bezeichnung für <i>MLC1</i>
l	Liter
LOD	<i>logarithm of the odds</i>
M	molar (mol/l)
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MLC	<i>megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts</i>
mM	Millimol
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
N	normal
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Saline-Lösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pmol	Picomol

RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuclease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sec.	Sekunden
STR	<i>single tandem repeat</i>
T	Thymin
T _a	Annealing-Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
T _m	Schmelztemperatur der Primer
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
TTP	Thymin-5'-triphosphat
U	<i>unit</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
WHO	<i>World Health Organization</i> (Weltgesundheitsorganisation)
ZNS	zentrales Nervensystem

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere bedanke ich mich bei meinem Betreuer Herrn Professor Dr. Jobst Meyer, unter dessen fachkundiger und engagierter Anleitung diese Arbeit entstanden ist.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung der Arbeit und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Außerdem möchte ich mich besonders bei Frau Gabriela Ortega bedanken, die mir in praktischen Dingen immer zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Peter Riederer danke ich für das Interesse an der vorliegenden Arbeit und für die Übernahme des Koreferats.

Zudem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Doktoranden an der Universitäts-Nervenlinik Würzburg bedanken, die mich durch praktische Tipps und konstruktive Kritik unterstützt haben.