

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

Direktor: Professor Dr. med. Jürgen Deckert

**Assoziation von Varianten des für den
Kaliumchloridkanal KCC3 kodierenden
Gens *SLC12A6*
mit katatoner Schizophrenie
und bipolaren Erkrankungen**

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

vorgelegt von
Zoi Athanassiadou
aus Bamberg

Würzburg, den 03.12.2009

Referent: Prof. Dr. med. K.-P. Lesch
Korreferent: Prof. Dr. med. T. Grimm
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2010

Die Promovendin ist Ärztin.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
2	Theoretischer Hintergrund	3
2.1	Katatone Schizophrenie	3
2.1.1	Historischer Überblick der Schizophreniekonzepte.....	3
2.1.2	Diagnose und klinisches Bild	6
2.1.3	Epidemiologie	9
2.1.4	Neuropathologie	10
2.1.4.1	Forschungsergebnisse	10
2.1.4.2	Neuropathologische Erklärungsmodelle	10
2.1.5	Populationsgenetik	13
2.1.6	Molekulargenetik.....	14
2.1.6.1	Studienergebnisse der Schizophrenieforschung im Überblick.....	14
2.1.6.2	Kandidatengene	17
2.1.7	Zusammenhänge zwischen bipolaren Erkrankungen und schizophrenen Psychosen	19
2.1.7.1	Definition bipolarer Erkrankungen	19
2.1.7.2	Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen bipolaren und schizophrenen Erkrankungen	19
2.2	<i>SLC12A6</i>	22
2.2.1	Genstruktur des <i>SLC12A6</i>	22
2.2.2	Allgemeines, Proteinstruktur und Lokalisation des K ⁺ -Cl ⁻ Kanals KCC3.	23
2.2.3	Funktion des K ⁺ -Cl ⁻ Kanals KCC3.....	27
2.2.4	Assoziation von Polymorphismen des <i>SLC12A6</i> mit Erkrankungen	31
2.3	Assoziationsstudien bei komplex vererbten Erkrankungen.....	34
3	Fragestellungen und Hypothesen	35

4	Patienten, Material und Methoden	39
4.1	Patienten und Kontrollgruppe	39
4.2	Verwendete Materialien	41
4.2.1	Oligonukleotide	41
4.2.2	Enzyme	41
4.2.3	Chemikalien	42
4.2.4	Puffer und Lösungen	43
4.2.5	Verbrauchsmaterialien	44
4.2.6	Geräte	45
4.2.7	Software	46
4.3	Methoden	47
4.3.1	DNA-Extraktion	47
4.3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	48
4.3.3	Reinigung des PCR-Produkts	52
4.3.4	Restriktion	53
4.3.5	Elektrophoretische Auftrennung und Nachweis von DNA- Fragmenten .	55
4.3.5.1	Agarosegelelektrophorese	55
4.3.5.2	SSCP (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>)-Analyse	56
4.4	Statistische Methoden	59
5	Ergebnisse	60
5.1	Promotor- und 5'-UTR-Variante	60
5.2	Thymininsertion im Intron 4	60
5.3	Zusammenfassung	61
6	Diskussion	66
6.1	<i>SLC12A6</i> als Kandidatengen	68
6.2	Varianten des <i>KCC3</i> -Gens und deren Assoziation mit bipolaren Erkrankungen/ schizophrenen Psychosen	72

6.3	Einschränkungen der Studie.....	76
7	Ausblick	78
8	Zusammenfassung.....	80
9	Anhang	82
9.1	Abkürzungsverzeichnis	82
9.2	Literaturverzeichnis.....	85

Danksagung

1 Einleitung

Schizophrene Psychosen gehören mit einer Erkrankungswahrscheinlichkeit von ca. 1% in der Durchschnittsbevölkerung zu den häufigsten psychiatrischen Erkrankungen. Bislang blieb die Ätiologie dieser Psychosen jedoch ungeklärt und die Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen differieren teilweise sehr stark untereinander. Der Vererbungsmodus erscheint sehr komplex, wobei sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle zu spielen scheinen.

Eine Sonderstellung im Formenkreis schizophrener Psychosen nimmt die periodische Katatonie, die zur katatonen Schizophrenie gezählt wird, ein. Bei der Entstehung dieser Erkrankung kann von einem entscheidenden genetischen Einfluss ausgegangen werden, da sie in einer autosomal dominanten Form vererbt zu werden scheint (Stöber G, 2001). Hierdurch rückt diese Schizophrenieform ins Interesse der genetischen Forschung, nachdem es nun möglich erscheint, mit Hilfe molekulargenetischer Untersuchungen die Pathogenese dieser Erkrankung aufzudecken.

In einer von Stöber *et al.* durchgeführten genomweiten, nicht-parametrischen Kopplungsanalyse wurde die Region 15q14-15 zwischen den Markern D15S144 und D15S1028 mit einem LOD-Score von 3,57 ($p = 2.6 \times 10^{-5}$) (GENEHUNTER-PLUS) als Kandidatenregion für periodische Katatonie ermittelt (Stöber G, 2000). Auch andere Forschungsgruppen gehen davon aus, dass der Bereich des Chromosoms 15q13-15 eine Suszeptibilitätsregion für erbliche schizophrene Psychosen und bestimmte Schizophrenieformen, bei denen die Fortleitung eines akustisch evozierten Potentials (P50) beeinträchtigt ist, darstellt (Freedman R, 1997; Gejman PV, 2001; Riley BP, 2000).

Auf dem Genabschnitt 15q14 findet sich das Gen *SLC12A6*, das für den Kalium-Chloridkanal KCC3 kodiert und für elektroneutrale Bewegung von Ionen durch die Zellmembran zuständig ist (Hiki K, 1999; Mount DB, 1999; Race JE, 1999). Daneben scheint dieser Kanal, dessen Isoform KCC3A hauptsächlich im ZNS exprimiert ist, in der Regulation der Zellproliferation eine wichtige Rolle zu spielen (Shen MR, 2001). Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass die Zellproliferation neuronaler Stammzellen bei schizophrenen Patienten gestört ist (Reif A, 2006). Es zeigte sich außerdem, dass Mutationen dieses Gens involviert sind in der Pathogenese des sogenannten Andermann-Syndroms, einer progressiven sensomotorischen

Neuropathie mit Agenesie des *Corpus callosum*, die neben einer geistigen Retardierung auch zu psychotischen Episoden führen kann (Casaubon LK, 1996; Filteau MJ, 1991; Howard HC, 2002; Howard HC, 2003; Uyanik G, 2006). *SLC12A6* erscheint somit nicht nur aufgrund seiner Position auf Chromosom 15q14, sondern auch aufgrund der physiologischen Bedeutung des Genprodukts, insbesondere dessen Vorkommen im Bereich des Gehirns, ein äußerst interessantes Kandidatengen für schizophrene Psychosen darzustellen.

Mutationsanalysen des Gens *SLC12A6* führten zur Detektion zweier seltener G-Varianten im Bereich des Promotors und der 5'-UTR (*untranslated region*), sowie einer Thymidininsertion im Intron 4 des Gens. Untersucht wurden hierbei zwei an periodischer Katatonie erkrankte Mitglieder eines als Familie 11 bezeichneten Stammbaums (Meyer J, 2005).

Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe einer Assoziationsstudie zu klären, ob die zwei seltenen G-Varianten im Bereich des Promotors und der 5'-UTR, sowie die Thymidininsertion im Intron 4 des *SLC12A6*-Gens in der Pathogenese schizophrener Psychosen involviert sind.

Darüber hinaus soll jedoch auch das Augenmerk auf bipolare Erkrankungen gerichtet werden, da nach Berrettini bipolare Erkrankungen und schizophrene Psychosen neben einigen klinischen Merkmalen möglicherweise auch Suszeptibilitätsgene gemein haben (Berettini W, 2000). In einer von Turecki *et al.* durchgeführten Kopplungsanalyse zeigte sich eine Assoziation von bipolaren Erkrankungen, die positiv auf das Psychopharmakon Lithiumgabe reagieren, mit der chromosomalen Region 15q14 (Turecki G, 2001). Auch Ferreira *et al.* gehen in einer aktuellen Studie davon aus, dass der chromosomale Abschnitt 15q14 eine Kandidatenregion für bipolare Erkrankungen darstellt (Ferreira M, 2008).

Im Rahmen dieser Assoziationsstudie soll somit geklärt werden, ob die zwei seltenen G-Varianten im Bereich des Promotors und der 5'-UTR, sowie die Thymidininsertion im Intron 4 des *SLC12A6*-Gens bei der Entwicklung schizophrener Psychosen und bipolarer Erkrankungen eine Rolle spielen.

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Katatone Schizophrenie

2.1.1 Historischer Überblick der Schizophreniekonzepte

Beschreibungen einzelner Symptome, die denen entsprechen, die wir heute bei schizophrenen Psychosen antreffen, lassen sich bereits in Aufzeichnungen aus dem Altertum finden. Bis zum 19. Jahrhundert bestand jedoch keine geschlossene Konzeption, die alle bislang verstreut beobachteten Symptome zusammengefasst hätte.

Ende des 19. Jahrhunderts gelang dem deutschen Psychiater **EMIL KRAEPELIN** (1856-1926) die systematische Klassifikation psychischer Störungen. In der 4. Auflage seines Lehrbuches aus dem Jahre 1893 sprach KRAEPELIN erstmals von *Dementia praecox*. Der Begriff *Dementia praecox* stand für eine "subakute Entwicklung eines eigenartigen geistigen Schwächezustandes im jugendlichen Alter" (Baer R, 1998).

Im 20. Jahrhundert wurde die Kritik an KRAEPELINS Begriff der *Dementia praecox* immer größer. Der Schweizer **EUGEN BLEUER** (1857-1939) führte den Ausdruck „Schizophrenie“ in die psychiatrische Terminologie ein. Dabei legte er einen Schwerpunkt auf die durch die Erkrankung verursachte Lockerung integrierter psychischer Funktionen, wobei er die Desintegration des Denkens als Hauptproblem ansah (Baer R, 1998; Gottesman II, 1993). Nach Bleuer existieren sogenannte Grundstörungen, und aus diesen resultieren sogenannte akzessorische Störungen (siehe Tabelle 1).

Grundstörungen	Akzessorische Symptome
- Assoziationslockerung	- Wahnbildung
- Gefühlsambivalenz	- Halluzination
- Affektstörung	- Katatonie
- Autismus	

Tabelle 1: Bleuers Schizophreniebegriff

Bleuers Ansicht widersprach zwar der von Kraepelin nicht grundsätzlich, dennoch löste sie Kraepelins *Dementia praecox*-Auffassung ab (Baer R, 1998; Boyle M, 2002).

Das katatone Syndrom (griechisch: *κατά* = herab, *τόνος* = (An-)Spannung), das eine Störung der Motorik und des Antriebs beschreibt, war sowohl für Bleuer als auch für Kraepelin eine eigenständige klinische Form der Schizophrenie, was zur offiziellen Doktrin wurde und 1977 durch ICD-9 und 1980 durch DSM-III zum Ausdruck kam.

Neben Bleuer entwickelte auch **KURT SCHNEIDER** (1887-1967) seine eigene Vorstellung des Schizophreniebegriffes. Für Schneider entschied der Querschnitt der Symptome über die Diagnose Schizophrenie, wobei der defiziente Verlauf als Kriterium aufgegeben wurde. Er entwickelte Symptome ersten und zweiten Ranges, die bei der Diagnose der Schizophrenie helfen sollten. Wenn auch nur ein einziges dieser Symptome ersten Ranges beim Patienten zu finden sei, handle es sich - nach Schneiders Worten - "in aller Bescheidenheit" um Schizophrenie (Schneider K, 2007/S.62).

	Symptome 1. Ranges	Symptome 2. Ranges	uncharakteristische Symptome
Wahrnehmungsstörungen	- dialogische, kommentierende, imperative Stimmen - Gedankenlautwerden, leibliche Beeinflussungserlebnisse (Leibhalluzinationen)	- optische, olfaktorische, gustatorische, taktile Halluzinationen - Zonästhesien	- sensorische Störungen - illusionäre Verkennung
Ich-Störungen	- Gedankeneingebung - Gedankenentzug - Gedankenausbreitung - Willensbeeinflussung		- Depersonalisation - Derealisation
Inhaltliche Denkstörung	- Wahnwahrnehmung (Personenverkennung)	- Wahneinfall	

Tabelle 2: Symptome 1. und 2. Ranges nach K. Schneider

In der deutschsprachigen Psychiatrie entstand eine weitere Entwicklungslinie, die vom großen Gegenspieler Kraepelins, **CARL WERNICKE** (1848-1905) ausging und welche die grobe Einteilung psychiatrischer Störungen nach Kraepelin und seinen Nachfolgern nicht akzeptierte. Wernicke arbeitete auf dem Gebiet der deskriptiven

Psychiatrie und der zentralen Neurologie, der sogenannten Aphasie-Lehre. (Leonhard K, 2003).

Sein Schüler, **KARL KLEIST** (1879-1960) vertiefte die Betrachtungen Wernickes anhand von Studien an Patienten mit Hirntraumen. Karl Kleist spaltete aus der Gruppe der manisch-depressiven Erkrankungen und einem Bereich der Schizophrenien die sogenannten zykliden Psychosen ab.

KARL LEONHARD (1904-1988), dem Schüler Kleists, gelang schließlich im Jahre 1957 eine äußerst differenzierte Aufteilung endogener Psychosen (Möller HJ, 1998). Leonhard teilte die Gruppe der Schizophrenien in systematische und unsystematische Schizophrenien ein, wobei unsystematische Schizophrenien phasenhaft, nicht schleichend progredient wie systematischen Schizophrenien verlaufen und spontane Remissionen auftreten können (siehe Abbildung 1). Mit Hilfe dieser Einteilung, die sich in zahlreichen Studien als valide herausgestellt hat, ist eine sehr genaue diagnostische und prognostische Beurteilung der jeweiligen Psychose ermöglicht worden (Beckmann H, 1996; Pfuhlmann B, 1997; Tolna J, 2001).

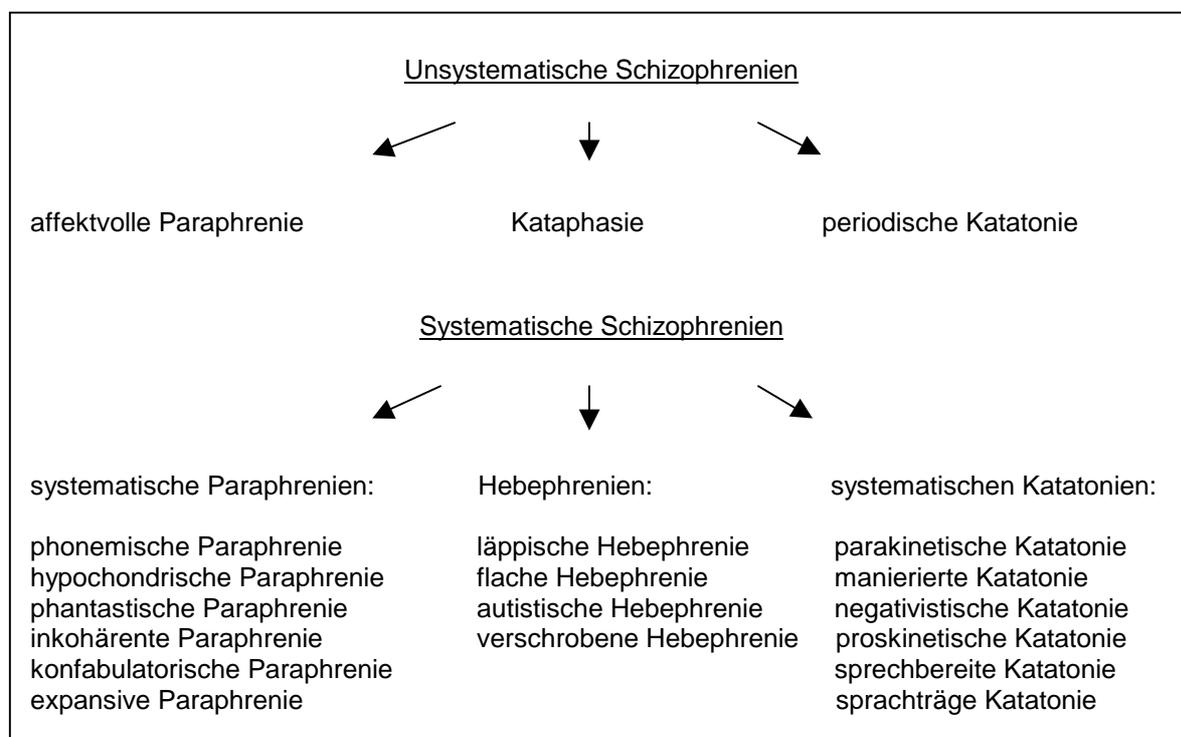


Abbildung 1: Aufteilung schizophrener Psychosen nach K. Leonhard

2.1.2 Diagnose und klinisches Bild

Allgemeine Diagnosekriterien

Die Diagnose Schizophrenie stützt sich im Allgemeinen auf zwei Pfeiler. Zum einen muss eine körperliche Erkrankung ausgeschlossen werden, zum anderen ein psychopathologischer Befund vorliegen. Im historischen Überblick wurden bereits die Symptome bzw. Diagnosekriterien der Schizophrenie nach E. Bleuer und K. Schneider dargestellt.

Tabelle 3 zeigt die Diagnosekriterien der Schizophrenie nach ICD-10 und DSM-IV im Überblick.

ICD-10 (internationale Klassifikation psychischer Störungen) (≥ 1 der ersten 4 oder ≥ 2 der letzten 4 genannten Symptome)	DSM-IV (diagnostisches u. statistisches Manual psychischer Störungen)
1 Monat lang	
Wahn Kontroll-, Beeinflussungswahn Leibliche Beeinflussungserlebnisse, Wahnwahrnehmung Kulturell unangemessener Wahn, bizzarer Wahn	Wahn
Dialogisierende/ kommentierende Stimmen Anhaltende Halluzinationen jeglicher Sinnesmodalität	Halluzinationen
Gedankenabreißen oder Einschreibungen in den Gedankenfluss	Desorganisierte Sprechweise
Ich-Störungen Gedankenentzug, -lautwerden, -eingebung Gedankenausbreitung	
Katatone Symptome	
Negative Symptome Verflachter Affekt, Apathie, sozialer Rückzug (Autismus)	Negative Symptome Verflachter Affekt, Apathie, sozialer Rückzug (Autismus)
Eindeutige und durchgängige Verhaltensänderung	Grob desorganisiertes oder katatonisches Verhalten

Tabelle 3: Zusammenfassung der ICD-10 und DSM-IV Diagnosekriterien der Schizophrenie

Im Folgenden soll nun auf einen eigenständigen Subtyp der Schizophrenien, auf die periodischen Katatonie und deren klinisches Bild eingegangen werden. Diese Schizophrenieform scheint einem starken genetischen Einfluss zu unterliegen und in einer autosomal dominanten Form vererbt zu werden (Stöber G, 2001).

Periodische Katatonie

Die periodische Katatonie zeichnet sich durch einen akuten Beginn und einen phasenhaften Verlauf aus, welcher jedoch weniger stark ausgeprägt ist als z.B. bei manisch depressiven Erkrankungen.

Im Vordergrund der periodischen Katatonie stehen psychomotorische Störungen, die durch einen bipolaren Charakter gekennzeichnet sind.

Der **Pol des Erregungszustandes** zeigt sich durch Unruhe und Hyperkinesien, die nicht zweckgerichtet oder durch äußere Einflüsse beeinflusst sind. Es finden sich Stereotypien in Form von Iterativbewegungen, d.h. stereotype Wiederholungen von rhythmischen Bewegungen und Verbigerationen, stereotype Wiederholung einzelner Silben und Worte.

Auf der anderen Seite findet sich der **Pol der psychomotorischen Hemmung**, der sich u.a. in Form von Akinesien zeigt. Der Patient kann einen Stupor aufweisen, d.h. seine Reaktionen auf die Umgebung sind vermindert, ebenso wie spontane Bewegungen und Aktivität. Äußerst bizarr empfindet der Außenstehende die *Flexibilitas cerea*, die wachsartige Biegsamkeit, wobei der Patient in eine von außen auferlegte Stellung der Glieder oder des Körpers verharrt. Die sogenannten Haltungstereotypien zeichnen sich durch ein freiwilliges Einnehmen und Beibehalten verzerrter Haltungen aus. Eine Begleiterscheinung der Akinesie ist der Negativismus. Hierbei handelt es sich um ein triebhaftes Widerstreben, Anregungen von außen werden in einen Gegenimpuls verwandelt.

Wichtig ist die Tatsache, dass die Zustände der Akinese und Hyperkinese selten in einer reinen Form auftreten, meist finden sich Symptome des anderen Pols beigemischt. So kann bei einer Hyperkinese durch die Beimengung von Akinese ein Bewegungsmuster entstehen, das äußerst starr, ruckartig und unharmonisch im Ablauf erscheint. Das Bewegungsspiel wirkt demnach parakinetisch. Umgekehrt können sich in einem akinetischen Zustand hyperkinetische Züge entwickeln. Der Kranke liegt z.B. starr im Bett, schlägt aber iterierend mit einem Arm auf die Bettkante. Des Weiteren kann es zum Ausbruch von impulsiven Handlungen bei bewegungsarmen Patienten kommen. Diese Ausbrüche sind häufig mit Aggressivität verbunden. In seltenen Fällen entwickeln sich auch ängstliche und ekstatische Zustände (Leonhard K, 2003).

Nach akuten katatonen Schüben kommt es häufig zu Remissionen, wobei der Defektzustand umso ausgeprägter ist, je häufiger die Schübe aufgetreten sind.

2.1.3 Epidemiologie

Gottesman fasste die von 1921 bis 1987 veröffentlichten Daten aus europäischen Familienstudien zum Thema Schizophrenie zusammen und konnte somit das durchschnittliche Erkrankungsrisiko verschiedener Personengruppen ermitteln (Gottesman II, 1991). Das Lebenszeitrisko an Schizophrenie zu erkranken beträgt in der Gesamtbevölkerung 1% und es ist umso größer, je mehr Verwandte an dieser Erkrankung leiden, bzw. je näher der Verwandtschaftsgrad zu betroffenen Personen ist. So liegt z.B. das Risiko für eine Erkrankung von Geschwistern bei 9%, wenn eines der Geschwister betroffen ist und bei 17%, wenn zusätzlich ein Elternteil erkrankt ist. Am höchsten ist das Risiko unter monozygoten Zwillingen, wenn ein Zwilling an Schizophrenie erkrankt ist (48%) und bei Nachkommen von Eltern, die beide an dieser Psychose leiden (46%) (Gottesman II, 1991).

Andere Autoren gehen davon aus, dass das Risiko an Schizophrenie zu erkranken in der Gesamtbevölkerung lediglich bei 0,5% liegt und bei Verwandten von Schizophrenen bei 4,8% (Kendler KS, 1993).

Schizophrene Psychosen sind keine Zivilisationskrankheiten, d.h. sie kommen in allen Kulturkreisen mit etwa gleicher Häufigkeit vor. Ebenso treten sie in den unterschiedlichen sozialen Schichten mit gleicher Häufigkeit auf.

Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen, wobei Männer durchschnittlich einige Jahre früher erkranken. Das Ersterkrankungsalter liegt bei Männern zwischen 20 und 25, bei Frauen zwischen 25 und 30 Lebensjahren (Müller P, 1999).

Im Rahmen epidemiologischer Untersuchungen wurde auch die Komorbidität der Schizophrenie untersucht. Die Ergebnisse der einzelnen Studien differieren teilweise sehr stark untereinander. In fünf von sieben durchgeführten Studien zeigte sich, dass das Risiko, schizoide oder paranoide Persönlichkeitsstörungen zu entwickeln, bei Verwandten von schizophrenen Personen im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung 4 bis 4,5-fach erhöht ist. Ebenso ist auch das Risiko, an schizoaffektiven und schizophreniformen Erkrankungen, Wahnerkrankungen und atypischen Psychosen zu erkranken, im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung signifikant erhöht. Sechs von neun Studien sehen kein erhöhtes Risiko bei Verwandten von schizophrenen oder schizoaffektiven Personen für die Entwicklung affektiver Erkrankungen. Drei von neun Studien zeigen hingegen ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entwicklung uni- und bipolarer affektiver Erkrankungen (Kendler KS, 1993; Riley BP, 2000).

2.1.4 Neuropathologie

2.1.4.1 Forschungsergebnisse

Bislang konnten keine spezifischen neuropathologischen Veränderungen auffindig gemacht werden, die sich ausschließlich bei schizophrenen Patienten finden lassen. Es gelang jedoch, eine Reihe unspezifischer makroskopischer Veränderungen, welche gehäuft bei schizophrenen Patienten auftreten, aufzudecken. Dazu gehören erweiterte Liquorräume, insbesondere Erweiterungen der beiden Seitenventrikel und des 3. Ventrikels (Brown R, 1986; Crow TJ, 1989; Pakkenberg B, 1987), Größenreduktion des *Corpus callosum* (Schenton ME, 2001), eine Volumenreduktion im Bereich des Temporallappens, v.a. des Hippocampus, Gyrus parahypocampalis und Gyrus amygdaloideum (Bogerts B, 1990; Bogerts B, 1985; Brown R, 1986) und eine Volumenvermehrung im Bereich der Basalganglien (Heckers S, 1991).

Die Volumenreduktion wird als Folge einer geringeren Neuropil- und Neuronengröße gesehen, weniger als Folge eines Neuronenverlustes. Immunozytochemische Versuche zeigten weiterhin, dass die reduzierte Neuronengröße aus Veränderungen im Bereich der synaptischen, dendritischen und axonalen Organisation resultiert (Harrison PJ 1999).

Daneben zeigten sich in *post mortem* Studien auch zytoarchitektonische Veränderungen bei Patienten mit schizophrenen Psychosen. Es fanden sich atypische Nervenzellen und Heterotypien im Bereich des Hippocampus, der *Regio entorhinalis*, im temporalen und frontalen *Cortex* (Harrison PJ 1999).

2.1.4.2 Neuropathologische Erklärungsmodelle

Es existieren zahlreiche Theorien, welche versuchen, die Pathogenese schizophrener Psychosen zu erklären. Im Folgenden werden die wichtigsten Modelle kurz beleuchtet.

Gehirnentwicklungsmodell:

Das Gehirnentwicklungsmodell geht von einer gestörten Gehirnentwicklung, bzw. -reifung als Ursache für die Entwicklung schizophrener Psychosen aus (Jakob H, 1986; Jakob H, 1994; Marenco S, 2000; Weinberger D, 1987). So wird angenommen, dass eine intrauterine Schädigung des Gehirns, z.B. im Rahmen von Infektionen zur

Entwicklung schizophrener Psychosen führen kann (Marenco S, 2000). *Post mortem* Studien zeigten Nervenzellveränderungen, Malformationen und zytoarchitektonische Abweichungen bei schizophrenen Patienten, die durch eine gestörte neuronale Migration während des zweiten Trimenons der Gestation erklärbar sind (Stöber G, 2002a).

Neurotransmittermodell:

Nicht nur im Bereich der Neuroanatomie, auch im Bereich der Neurochemie konnten bislang keine spezifischen, für schizophrene Psychosen typischen Veränderungen nachgewiesen werden. Im Fokus der Forschung stehen hierbei Neurotransmitter, wie Dobutamin, 5-Hydroxytryptamin, Glutamat, sowie das GABA-System.

Die Dopamin-Hypothese geht davon aus, dass die Symptome der Schizophrenie aufgrund einer dopamininduzierten Überaktivität entstehen. Dies kann durch einen Überschuss an Dopamin oder durch eine erhöhte Sensivität auf Dopamin, z.B. infolge vermehrter Dopaminrezeptoren bedingt sein. Diese Hypothese entstand, da mit Hilfe von Dopamin (D_2)- Antagonisten eine antipsychotische Therapie möglich ist, und nach Gabe von Amphetaminen, die zu einer Dopaminausschüttung führen, paranoide Psychosen entstehen (Roberts GW, 1997). Untersuchungen zeigten, dass es bei schizophrenen Patienten nach Gabe von Amphetaminen zu einer erhöhten präsynaptischen Ausschüttung von Dopamin kam, was für eine erhöhte Empfindlichkeit der dopaminergen Neuronen bei schizophrenen Patienten spricht (Abi-Dargham A, 1998; Breier A, 1997).

LSD, ein 5-Hydroxytryptamin(5-HT)-Agonist, verursacht paranoide Psychosen, weshalb vermutet wurde, dass 5-HT in der Pathogenese der Schizophrenie involviert ist. Veränderungen des 5-HT_{2A} - und 5-HT_{1A} -Rezeptors wurden in *post mortem* Untersuchungen von nicht medikamentös behandelten schizophrenen Patienten ausfindig gemacht (Trichard C, 1998).

Nicht kompetitive Antagonisten des N-Methyl-D-Aspartat-Subtyps des Glutamatrezeptors verursachen schizophrenieähnliche Psychosen, was ebenfalls zur Annahme führte, dass der Rezeptor in die Pathogenese involviert ist (Hashimoto K, 2002; Volk DW, 2002).

Bislang unbekannt bleibt, welche Neuronen bzw. Synapsen von den beobachteten neurochemischen Veränderungen betroffen sind. Ebenfalls unklar ist die Verbindung zwischen den neuroanatomischen und neurochemischen Ergebnissen.

Diskonnektivitätstheorie:

Zahlreiche Autoren gehen von einer gestörten Konnektivität kortikaler Neurone, insbesondere im präfrontalen und temporalen *Cortex* als Ursache schizophrener Psychosen aus. Neben der Hyperkonnektivitätstheorie infolge fehlender Eliminierung von Synapsen während der Entwicklung des Gehirns und der Hypokonnektivitätstheorie infolge einer zu starken Eliminierung axonaler Äste und Synapsen existiert die sogenannte Dyskonnektivitätstheorie (Innocenti GM, 2003). Diese Theorien sind kompatibel mit dem Modell einer gestörten Gehirnentwicklung bei schizophrenen Patienten (Jakob H, 1986; Marengo S, 2000; Weinberger D, 1987). Eine fehlerhafte Regulation der Produktion oder Eliminierung axonaler Äste und Synapsen könnte zu einer abnormen Konnektivität unter kortikalen Neuronen führen und dadurch zur Hyper-, Hypo- oder Dyskonnektivität, wobei die Ergebnisse zahlreicher Studien für die Theorie der Hypokonnektivität sprechen. Die Theorie der Hypokonnektivität ist des Weiteren vereinbar mit der morphologischen Beobachtung erweiterter Ventrikel, sowie auf Transmitterebene mit beeinträchtigter frontotemporalen Interaktionen und reduzierter glutamaterger Transmission bei schizophrenen Patienten (Innocenti GM, 2003).

In einem von Schenton *et al.* veröffentlichten Rückblick über zwischen 1986 und 2000 erschienenen Studien von *Corpus callosum*-Veränderungen bei schizophrenen Patienten zeigte sich in der Mehrzahl der Fälle eine Reduktion des *Corpus callosum*, der Verbindungsstruktur zwischen den beiden Großhirnhemisphären (Schenton ME, 2001). Diese Feststellung wäre ebenfalls mit der Hypokonnektivitätstheorie vereinbar. Die Verkleinerung des *Corpus callosum* bei schizophrenen Patienten könnte infolge eines Verlustes interhemisphärischer Axone oder einer Reduktion des Axondurchmessers bzw. des Durchmessers der Myelinscheide, z.B. aufgrund von Demyelinisierung aufgetreten sein. Daneben sprechen auch neuropathologische Tests, die eine eingeschränkte interhemisphärische Integration beweisen, wie z.B. eine verlängerte interhemisphärische Fortleitungszeit bei schizophrenen Patienten für die Hypokonnektivitätshypothese. Möglicherweise tritt jedoch parallel zur Verminderung der callosalen Verbindungen eine Reorganisation der verbliebenen Axone und eine Bildung abnormer axonaler Verbindungen auf, was schließlich die Hypothese der Dyskonnektion als Ursache schizophrener Psychosen untermauern würde (Innocenti GM, 2003).

2.1.5 Populationsgenetik

Zahlreiche Familien-, Zwillings-, und Adoptionsstudien gehen davon aus, dass die Erkrankung der Schizophrenie eine genetische Komponente besitzt, wobei bislang keine genetische Variante gefunden wurde, die zur Entwicklung dieser Psychose führt (Karayiorgou M, 1997; Riley BP, 2000). Betrachtet man das Erkrankungsrisiko von Verwandten, deren Familien von Schizophrenie betroffen sind, wird klar, dass dieses Risiko nicht mit einem durch ein einfaches Mendelsches Vererbungsmodell vorhergesagtem Risiko zu vergleichen ist (McGuffin P, 1995). Der Vererbungsmodus scheint vielmehr äußerst komplex zu sein, wobei die Art der Vererbung unklar und die Penetranz inkomplett ist. Zudem handelt es sich bei der Schizophrenie höchstwahrscheinlich um eine heterogene Erkrankung (Riley BP, 2000; Risch N, 1990; Tsuang M, 1993). Zwillingsstudien zeigen, dass die Neigung zur Entwicklung der Schizophrenie nicht ausschließlich genetischer Natur ist, sondern dass es sich vielmehr um eine Erkrankung handelt, bei der zusätzlich Umweltfaktoren eine Rolle zu spielen scheinen, die schließlich zur Manifestation der Erkrankung führen (Riley BP, 2000).

Eine Sonderstellung im Formenkreis schizophrener Psychosen nimmt die **periodische Katatonie** ein, da bei dieser Erkrankung von einem entscheidenden genetischen Einfluss auf das Krankheitsbild ausgegangen werden kann.

Mit Hilfe von Familienstudien konnte gezeigt werden, dass Verwandte ersten Grades von Patienten mit periodischer Katatonie ein kumulatives Morbiditätsrisiko von 26,9% haben, ebenfalls diese Psychose zu entwickeln (Beckmann H, 1996; Stöber G, 1995). Geschwister eines an periodischer Katatonie erkrankten Patienten haben ein auf das Alter korrigiertes Morbiditätsrisiko von 24,4%, wobei das Morbiditätsrisiko unter den Geschwistern für Männer bei 18,1% und für Frauen bei 23,7% liegt. Das Risiko für Mütter liegt bei 33,7% und für Väter bei 15,4% an dieser Psychose zu erkranken (Beckmann H, 1996; Stöber G, 2001). Die periodische Katatonie betrifft beide Geschlechter mit gleicher Häufigkeit, ohne signifikante Unterschiede was das Alter der Erstmanifestation betrifft (Stöber G, 1998).

Aufgrund der Häufigkeit von Stammbäumen mit ähnlichen klinischen Bild dieser Psychose, der unilinearen vertikalen Transmission und dem Morbiditätsrisiko von 26,9% wird vermutet, dass es sich bei der periodischen Katatonie um eine eigene

nosologische Entität innerhalb der Gruppe schizophrener Psychosen handelt, der ein autosomal dominanten Vererbungsmodus zugrunde zu liegen scheint (Stöber, 2001).

2.1.6 Molekulargenetik

2.1.6.1 Studienergebnisse der Schizophrenieforschung im Überblick

Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei schizophrenen Psychosen wahrscheinlich um oligo-, wenn nicht sogar polygene Erkrankungen, bei deren Manifestation auch Umweltfaktoren eine Rolle zu spielen scheinen. Hierdurch wird die Suche nach dem genetischen Hintergrund erschwert (McGuffin P, 1995; Riley BP, 2000; Risch N, 1990; Tsuang M, 1993).

Mit Hilfe genetischer Marker wurden seit Mitte der 80iger Jahre sogenannte Kopplungsuntersuchungen durchgeführt, wodurch chromosomale Regionen eingegrenzt werden konnten, in denen sich möglicherweise Dispositionsgene befinden, die zur Entstehung schizophrener Psychosen beitragen könnten.

Tabelle 4 zeigt eine Zusammenstellung möglicher Suszeptibilitätsloci der vergangenen 20 Jahre. Es handelt sich hierbei um eine Zusammenfassung aus Daten einer Metaanalyse von Lewis *et al.* und Badner *et al.*, Suarez *et al.*, sowie Daten von Owen *et al.*, Riley *et al.*, Harrison *et al.*, Kirov *et al.* und weiteren Quellen. (Badner JA, 2002; Crow TJ, 2007; Harrison PJ, 2005; Kirov G, 2005; Lewis CM, 2003; Owen M, 2000; Riley BP, 2000; Suarez BK, 2006).

Chromosom	Genlocus (Kandidatengene)	Kopplungs-/Assoziationsstudien	
		Negatives Ergebnis	Positives Ergebnis
1	1q32-q41 1q44 1p35-p32 1q22-q23 1p13.3-q23.3 1q233-q31.1 DISC1 : 1q42 RGS4 : 1q21-22		Hovatta <i>et al.</i> 1998 Blovin <i>et al.</i> 1998 Garver <i>et al.</i> 1998 Shaw <i>et al.</i> 1998 Lewis <i>et al.</i> 2003 Lewis <i>et al.</i> 2003 Millar <i>et al.</i> 2000 Miyoshi <i>et al.</i> 2003 Chowdari <i>et al.</i> 2002 Morris <i>et al.</i> 2004
2	2q12-q13 2p22-q21 2p13-p12 2p12-q22.1 2q22.1-23.3		Moises <i>et al.</i> 1995 Levinson <i>et al.</i> 1998 Hallmeyer <i>et al.</i> 1999 Aschauer <i>et al.</i> 1993 Coon <i>et al.</i> 1998 Lewis <i>et al.</i> 2003 Lewis <i>et al.</i> 2003
3	3p24 DRD3 : 3q13 3p25.3-p22.1	Levinson <i>et al.</i> 1996	Pulver <i>et al.</i> 1994,1995 Crocq <i>et al.</i> 1992 Williams <i>et al.</i> 1998 Lewis <i>et al.</i> 2003
4	4q24-q32		Kaufmann <i>et al.</i> 1998 Hovatta <i>et al.</i> 1999
5	5q11-q13 5q22-q31 5q23.2-q34	Aschauer <i>et al.</i> 1990 Crowe <i>et al.</i> 1998,1999 Moises <i>et al.</i> 1995	Sherrington <i>et al.</i> 1988 Kennedy <i>et al.</i> 1988 Schwab <i>et al.</i> 1997 Straub <i>et al.</i> 1997 Lewis <i>et al.</i> 2003
6	6p24-p22 6q21-q22.3 6pter-p22.3 6p22.3-p21.1 DTNBP1 : 6p22	Mowry <i>et al.</i> 1995 Riley <i>et al.</i> 1996 Van Den Bogaert <i>et al.</i> 2003	Levinson <i>et al.</i> 1996 Moises <i>et al.</i> 1995 Straub <i>et al.</i> 1995 Cao <i>et al.</i> 1997 Martinez <i>et al.</i> 1999 Lewis <i>et al.</i> 2003 Lewis <i>et al.</i> 2003 Straub <i>et al.</i> 2002 Schwab <i>et al.</i> 2003 Numakawa <i>et al.</i> 2004 Funke <i>et al.</i> 2004
7	7q21.1-q21.3 7q21.3-q22 GRM3 : 7p21-22	Tochigi <i>et al.</i> 2006 Marti <i>et al.</i> 2002	Blouin <i>et al.</i> 1998 Faraone <i>et al.</i> 1998 Fujii <i>et al.</i> 2003 Mössner <i>et al.</i> 2008
8	8p22-p21 8p 8p22-p21.1 8p23.3-p21.2 NRG1 : 8p12-p21 PPP3CC : 8p21		Pulver <i>et al.</i> 1995 Levinson <i>et al.</i> 1996 Dombroski <i>et al.</i> 1997 Brzustowicz <i>et al.</i> 1999 Badner <i>et al.</i> 2002 Lewis <i>et al.</i> 2003 Suarez <i>et al.</i> 2006 Steffanson H <i>et al.</i> 2002, 2003 Gerber <i>et al.</i> 2003
9	9q34.3 D9S175	Meszaros <i>et al.</i> 1996	Riley <i>et al.</i> 1997 Kaufmann <i>et al.</i> 1998 Moises <i>et al.</i> 1995

Chromosom	Genlocus (Kandidatengene)	Kopplungs-/Assoziationsstudien	
		Negatives Ergebnis	Positives Ergebnis
10	10p15-q21 10pter-p14		Faraone <i>et al.</i> 1998 Straub <i>et al.</i> 1998 Lewis <i>et al.</i> 2003
11	11q DRD2 : 11q23 11q22.3-q24.1 11p13.1-q14.1	Gill <i>et al.</i> 1993 Zhe Wu <i>et al.</i> 1993 Mulcrone <i>et al.</i> 1995 Kalsi <i>et al.</i> 1995	St.Clair <i>et al.</i> 1990 Lewis <i>et al.</i> 2003 Suarez <i>et al.</i> 2006
13	13q14.1-q32 13q 5HT_{2A} : 13q11 DAOA, DAO : 13q22-34	Straub <i>et al.</i> 1997 Jensen <i>et al.</i> 1998 Barden <i>et al.</i> 1999	Lin <i>et al.</i> 1995,1997 Antonarakis <i>et al.</i> 1996 Brzustowicz <i>et al.</i> 1999 Blouin <i>et al.</i> 1998 Riley <i>et al.</i> 1998 Curtis and Sham 1995 Badner <i>et al.</i> 2002 Williams <i>et al.</i> 1997 Chumakov <i>et al.</i> 2002 Schumacher <i>et al.</i> 2004 WangX <i>et al.</i> 2004
14	14pter-q13.1 AKT1 : 14q32		Lewis <i>et al.</i> 2003 Staal <i>et al.</i> 1988 Boyd <i>et al.</i> 2002
15	15q13-15 15q15 15q21.3-q26.1 CHRNA7 : 15q13-14	Neves- Pereira <i>et al.</i> 1998 Curtis <i>et al.</i> 1999	Freedman <i>et al.</i> 1997 Gejman <i>et al.</i> 2001 Riley <i>et al.</i> 2000 Stöber <i>et al.</i> 2000 Lewis <i>et al.</i> 2003 Riley <i>et al.</i> 1997
16	16p13-q12.2		Lewis <i>et al.</i> 2003
18	18q11.2 18q22.1-qter	Van Broeckhoven <i>et al.</i> 1998, 1999	Wildenauer <i>et al.</i> 1997 Lewis <i>et al.</i> 2003
20	20p12.3-p11		Lewis <i>et al.</i> 2003
22	22q12-q13.1 22q 22pter-q12.3 COMT : 22q11 PRODH2 : 22q11	Kalsi <i>et al.</i> 1995 Riley <i>et al.</i> 1996 Williams <i>et al.</i> 2003 Ohtsuki <i>et al.</i> 2004	Pulver <i>et al.</i> 1994 Coon <i>et al.</i> 1994 Shaw <i>et al.</i> 1998 Hallmeyer <i>et al.</i> 1998 Badner <i>et al.</i> 2002 Lewis <i>et al.</i> 2003 Shiffmann <i>et al.</i> 2002 Chen <i>et al.</i> 2004 Gogos <i>et al.</i> 1999 Liu <i>et al.</i> 2002 Li <i>et al.</i> 2004
X	DXYS14	Asherson <i>et al.</i> 1992 Wang <i>et al.</i> 1993 Crow <i>et al.</i> 1994 Barr <i>et al.</i> 1994 Maier <i>et al.</i> 1995 Kalsi <i>et al.</i> 1995	Collinge <i>et al.</i> 1991 D'Amato <i>et al.</i> 1992

Tabelle 4: Zusammenfassung: Suszeptibilitätsloci und Kandidatengene (dick gedruckt) schizophrener Psychosen. Zusammenfassung und Literaturzitate aus Lewis *et al.*, Badner *et al.*, Suarez *et al.*, Owen *et al.*, Riley *et al.*, Harrison *et al.*, Kirov *et al.* (Badner JA, 2002; Crow TJ, 2007; Harrison PJ, 2005; Kirov G, 2005; Lewis CM, 2003; Owen M, 2000; Riley BP, 2000; Suarez BK, 2006) und weiteren im Literaturanhang vermerkten Quellen. Diese Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

2.1.6.2 Kandidatengene

Den nächsten Schritt bei der Suche nach dem molekulargenetischen Hintergrund schizophrener Psychosen stellt die Sammlung möglicher Kandidatengene dar. Unter einem Kandidatengen versteht man ein Gen, welches für ein Protein kodiert, das möglicherweise in der Pathogenese einer Erkrankung involviert ist. Moises fasste Kriterien bei der Auswahl möglicher Kandidatengene zusammen. Zunächst müssen sich Kandidatengene in einer chromosomalen Region befinden, für welche eine Kopplung zur Erkrankung nachgewiesen ist. Die Gene sollten weiterhin für Proteine kodieren, die in der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle zu spielen scheinen (Moises H, 2001).

Da von einigen Neurotransmittersysteme angenommen wird, dass sie in der Pathogenese schizophrener Psychosen involviert sind, stellen Gene, die z.B. für dopaminerge und serotonerge Rezeptoren kodieren, vielversprechende Kandidatengene dar. So konnte im Rahmen einer europäischen Multicenter-Assoziationsstudie eine Assoziation zwischen Schizophrenie und dem Polymorphismus T102C im HTR_{2A}-Rezeptor-Gen (*HTR_{2A}*) gefunden werden (Williams J, 1996). Daneben wurde über eine Assoziation zwischen Schizophrenie und einem Polymorphismus in Exon 1 des Dopamin-Rezeptor D3-Gens (*DRD3*) berichtet (Crocq MA, 1992). Interessante Kandidatengene stellen weiterhin das auf Chromosom 6 lokalisierte Dysbindin-Gen (*DTNBP1*), welches eine Rolle in der Synapsenbildung und Signaltransduktion im Gehirn zu spielen scheint (Straub RE, 2002) und das auf Chromosom 8 gelegene Neuregulin1-Gen (*NRG1*), welches die glutamaterge Neurotransmission und somit die Entwicklung von Glia- und Nervenzellen zu beeinflussen scheint dar (Steffanson H, 2002).

Tabelle 4 bietet einen Überblick über einige wichtige Kandidatengen und den jeweiligen zugehörigen chromosomalen Regionen.

In einer von Stöber *et al.* durchgeführten Kopplungsanalyse wurden 12 Familien mit insgesamt 135 Individuen untersucht. 57 Personen zeigten das Bild der periodischen Katatonie. Es wurden 356 Marker mit einem durchschnittlichen Abstand von 11 cM verwendet. Nach Durchführung einer nicht-parametrischen, genomweiten Kopplungsanalyse wurde neben einem Locus auf Chromosom 22q13 mit einem LOD-Score von 1,85 ($p = 1.8 \times 10^{-3}$), ein Locus auf Chromosom 15q14-15 mit einem

LOD-Score von 3,57 ($p = 2.6 \times 10^{-5}$; GENEHUNTER-PLUS) als Kandidatenregion für periodische Katatonie ermittelt (Stöber G, 2000).

Auch andere Forschungsgruppen gehen davon aus, dass Chromosom 15q13-15 eine Suszeptibilitätsregion für erbliche schizophrene Psychosen und Schizophrenie in Verbindung mit bestimmten neurophysiologischen Defiziten (mangelnde Inhibition eines akustisch evozierten Potentials P50) darstellt (Freedman R, 1997; Gejman PV, 2001; Riley BP, 2000).

Betrachtet man die chromosomalen Region 15q13-15, so lassen sich in diesem Bereich einige Kandidatengene finden.

Vielversprechende Kandidatengene wie das Gen, das für den nikotinergen $\alpha 7$ -Rezeptor kodiert und CX36, beide auf der chromosomalen Region 15q13-15 gelegen, konnten bereits durch Meyer *et al.* als Kandidatengene ausgeschlossen werden (Meyer J, 2002a; Meyer J, 2002b).

Gene, die für die eukaryotische Translationsinitiationsfaktor $3\alpha 1$ -Untereinheit (*EIF3S1*), die Phospholipidase C $\beta 2$ - Untereinheit (*PLCB2*) und die eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 2α Kinase 4 (*EIF2AK4*) kodieren, wurden ebenfalls als mögliche Kandidatengene für erbliche Schizophrenien von Moises *et al.* vorgeschlagen (Moises H, 2001).

Interessanterweise gilt die chromosomale Region 15q14 zudem auch als Kandidatenregion für bipolare Erkrankungen, die positiv auf das Psychopharmakon Lithium reagieren (Turecki G, 2001). Erst kürzlich konnte die Region 15q14 auch von Ferreira *et al.* als Kandidatenregion für bipolare Erkrankungen bestätigt werden (Ferreira M, 2008)

Da bereits eine gemeinsame Kandidatenregion von bipolaren Erkrankungen und schizophrenen Psychosen existiert, ist es möglich, dass sich auch weitere Parallelen zwischen bipolaren Erkrankungen und schizophrenen Psychosen - im speziellen der periodischen Katatonie - finden lassen und diese Erkrankungen möglicherweise auch Kandidatengene gemein haben.

Im folgenden soll daher nun der Focus auf bipolare Erkrankungen gerichtet und die Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu schizophrenen Psychosen herausgestellt werden.

2.1.7 Zusammenhänge zwischen bipolaren Erkrankungen und schizophrenen Psychosen

2.1.7.1 Definition bipolarer Erkrankungen

Als bipolare affektive Störung (auch bekannt unter dem Begriff "manisch-depressive Erkrankungen") bezeichnet man eine Untergruppe von Erkrankungen aus der Gruppe der affektiven Störungen. Es handelt sich hierbei um seelische Erkrankungen, bei denen die Betroffenen unter willentlich nicht kontrollierbaren, extremen Auslenkungen ihres Antriebs, ihrer Aktivität und ihrer Stimmung leiden, die weit außerhalb des Normalniveaus in Richtung einer Depression oder einer Manie schwanken.

Bipolare affektive Störungen sind gekennzeichnet durch einen phasischen Verlauf mit depressiven, manischen oder hypomanischen Episoden, bei denen sowohl die Kriterien einer Manie als auch einer Depression erfüllt sind. Depressionen zeichnen sich durch gedrückte Stimmung und drastisch verminderten Antrieb aus. Manische Phasen gehen immer mit einem abnorm und anhaltend gehobenen Antrieb und Rastlosigkeit, oft mit inadäquat euphorischer oder gereizter Stimmung einher, mitunter aber auch mit depressiver Symptomatik (bis hin zu gemischten Phasen). Unter einer Hypomanie versteht man eine weniger stark ausgeprägte Manie. Eine Hypomanie liegt jedoch bereits deutlich über einem normalen Aktivitäts- und/oder Stimmungsausschlag. Zwischen den Krankheitsepisoden tritt in der Regel eine Besserung des klinischen Bildes ein. Bei längerem Verlauf mit mehreren Episoden können jedoch Residualsymptome bestehen bleiben (Saß H, 2003).

2.1.7.2 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen bipolaren und schizophrenen Erkrankungen

Bipolare Erkrankungen und schizophrene Psychosen sind enger miteinander verbunden als lange Zeit angenommen wurde. Dieser Vorstellung trägt schon K. Leonhard 1957 Rechnung (Leonhard K, 2003).

Sowohl bipolare als auch schizophrene Erkrankungen betreffen jeweils 1% der Bevölkerung und weisen weltweit in etwa dieselbe Häufigkeit auf. Eine Manifestation findet im frühen Erwachsenenalter statt, wobei bei bipolaren Erkrankungen und schizophrenen Psychosen kaum Kinder im präpubertären Alter betroffen sind. Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen. Eine familiäre Häufung konnte

sowohl für bipolare Erkrankungen als auch für schizophrene Psychosen nachgewiesen werden, wobei Zwillingsstudien eine nahezu gleiche Vererbungswahrscheinlichkeit aufzeigten (für bipolare Erkrankungen ~65%, für schizophrene Psychosen ~50%). Des Weiteren findet sich ein erhöhtes Risiko für Verwandte betroffener Familien an schizoaffektiven Erkrankungen und rekurrenden unipolaren Episoden zu erkranken.

Auch der Verlauf der Erkrankungen ist sehr ähnlich. Die Erkrankten sind meist lebenslang betroffen, wobei es zu partiellen und kompletten Remissionen kommen kann, denen meist Exazerbationen folgen (Berrettini W, 2000).

Insbesondere die periodische Katatonie teilt wesentliche Grundzüge mit bipolaren Erkrankungen, wie den bipolaren Charakter und den phasenhaften Verlauf der Erkrankung (Leonhard K, 2003). Die periodische Katatonie kann ebenso bei Störungen der Stimmung, insbesondere bei bipolaren Erkrankungen auftreten (Taylor MA, 2003).

Was die Ätiologie bipolarer Erkrankung bzw. schizophrener Psychosen anbelangt, ist letztendlich bei beiden Erkrankungen unklar, welche die auslösenden Faktoren sind. Empirische und genetische Studien weisen auf hereditäre Faktoren insbesondere bei der manisch-depressiven Krankheit hin (Stöber G, 2003).

Die Unterschiede zwischen bipolaren Erkrankungen und schizophrenen Psychosen betreffen zum einen das klinische Bild, zum anderen die Therapie der Erkrankungen. Bipolare Erkrankungen sind Erkrankungen der Stimmung, wohingegen schizophrene Psychosen Erkrankungen des Denkens darstellen (siehe auch 2.1.2). Obgleich der Gesundheitszustand einzelner Patienten mit schizophrener Psychose durch die Gabe von Lithium gebessert werden kann, ist dies bei Weitem nicht mit den Erfolgen vergleichbar, die dieses Medikament bei bipolaren Erkrankungen erzielt. Auch bestimmte elektrophysiologische Besonderheiten finden sich nur bei schizophrenen Patienten (Freedman R, 1997)

Molekulargenetische Gemeinsamkeiten bipolarer und schizophrener Erkrankungen:

Da zahlreiche Gemeinsamkeiten zwischen bipolaren Erkrankungen und schizophrenen Psychosen existieren, kann vermutet werden, dass diese Erkrankungen auch einige genetische Risikofaktoren gemein haben, und somit gemeinsame Suszeptibilitätsloci für beide Erkrankungen existieren.

Auf den chromosomalen Regionen 18q22, 21q21, 4p16 und 12q24 fanden sich Suszeptibilitätsloci, die ausschließlich mit bipolaren Erkrankungen, und umgekehrt Loci auf 6p22, 6q21 und 8p22, die ausschließlich mit schizophrenen Psychosen assoziiert sind. Es konnten jedoch auch einige überschneidende chromosomale Regionen ausfindig gemacht werden, die sowohl mit bipolaren Erkrankungen als auch mit schizophrenen Psychosen assoziiert sind. Es handelt sich hierbei um genetische Loci auf 18p11.2, 22q11-13, 13q32 und 10p14 (Berrettini W, 2000).

Im Rahmen einer Metaanalyse von Badner und Gershon zeigten sich Suszeptibilitätsloci, die mit bipolaren Erkrankungen assoziiert sind auf Chromosom 13q und 22q, die mit schizophrenen Psychosen assoziierten auf 8p, 13q, and 22q (Badner JA, 2002). Eine Metaanalyse von Segurado *et al.*, bei der Patienten mit bipolaren Erkrankungen untersucht wurden, konnten die Ergebnisse von Badner *et al.* jedoch nicht bestätigen. Suszeptibilitätsloci, die möglicherweise mit bipolaren Erkrankungen assoziiert sind, fanden sich auf den chromosomalen Regionen 14q, 9p-q, 10q, 18p-q, and 8q (Segurado R, 2003).

In einer von Turecki *et al.* durchgeführten Kopplungsanalyse zeigte sich weiterhin eine Assoziation von bipolaren Erkrankungen, die positiv auf Lithiumgabe reagieren, mit dem chromosomalen Abschnitt 15q14 (Turecki G, 2001). Auch Ferreira *et al.* gehen davon aus, dass die Region 15q14 eine Kandidatenregion für bipolare Erkrankungen darstellt (Ferreira M, 2008). Die chromosomale Region 15q13-15 wird, wie bereits erwähnt, ebenfalls in Verbindung gesetzt mit der periodischen Katatonie (Meyer J, 2002b; Stöber G, 2000; Stöber G, 2002b), vererbaren schizophrenen Psychosen (Gejman PV, 2001; Riley BP, 2000) und schizophrenen Psychosen mit neurophysiologischem Defizit (d.h. mit einem Defizit, das akustisch evozierte Potential P50 zu inhibieren) (Freedman R, 1997).

Im Folgenden soll nun das Kandidatengen *SLC12A6*, welches auf der gemeinsamen Suszeptibilitätsregion 15q14 zu finden ist, sowie dessen Genprodukt näher beleuchtet werden.

2.2 SLC12A6

Das humane Gen *SLC12A6* (Solute carrier family 12, member 6; Gen Bank accession number AF108831; MIM *604878) wurde im Jahr 1999 von Hiki *et al.*, Mount *et al.* und Race *et al.* unabhängig voneinander isoliert und kloniert. Es gehört zur Genfamilie *SLC12A1-9*, kodiert für den Kalium-Chlorid-Kanal KCC3 (Kalium-Chlorid-Cotransporter 3) und befindet sich auf Chromosom 15q14 (Hiki K, 1999; Mount DB, 1999; Race JE, 1999).

2.2.1 Genstruktur des *SLC12A6*

Hiki *et al.* führten mit RNA aus HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*), die 4 Stunden mit VEGF (*vascular endothelial cell growth factor*) behandelt wurden Polymerasenkettenreaktionen (PCRs) durch. Nach dieser Behandlung wurde das PCR-Produkt einer Bande, die durch VEGF-Behandlung verstärkt hervortrat, analysiert, was zur Identifikation einer cDNA führte, deren Sequenz starke Ähnlichkeit zur Sequenz des Gens *KCC1* aufwies. Das von dem Gen kodierte Protein wurde als Kalium-Chlorid Kanal KCC3 bezeichnet und das Gen somit als *KCC3*-Gen (bzw. *SLC12A6*). Mit Hilfe von Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurde *SLC12A6* auf Chromosom 15 zwischen den genetischen Markern D15S1010 und D15S1040 kartiert (Hiki K, 1999). Mount *et al.* kartierten etwa zeitgleich mittels Radiation-Hybrid-Analysen das zunächst als *KCC4* bezeichnete, später jedoch auf *KCC3* umbenannte Gen auf Chromosom 15 zwischen den genetischen Markern D15S1040 und D15S118 (Mount DB, 1999). Auch Race und Mitarbeiter lokalisierten das *KCC3*-Gen mittels Radiation-Hybrid-Kartierung auf Chromosom 15, ca. 7,58 centi-Rays entfernt vom genetischen Marker D15S144 (Race JE, 1999).

SLC12A6 besteht aus 104,5 - 85,28 kb und 25 Exons. Zunächst wurde die Existenz zweier alternativer erster Exons, Exon 1a und Exon 1b nachgewiesen, die von separaten Promotoren kontrolliert werden, so dass zwei unterschiedliche KCC3-Proteine, KCC3a und KCC3b entstehen (Hiki K, 1999; Mount DB, 1999; Pearson MM, 2001; Race JE, 1999). Bislang konnten jedoch neben den bereits erwähnten KCC3a- und KCC3b-Proteinen weitere Transkripte des *SLC12A6* nachgewiesen werden, die durch Beginn der Transkription an verschiedenen Exons und/oder

alternatives *splicing* entstehen können (Siehe auch Abbildung 5) (Mercado A, 2005; Moser D, 2008).

Die von Mount *et al.* klonierte menschliche *KCC3*-cDNA hat eine Länge von 4237 Nukleotiden mit einer 5'-UTR (*untranslated region*) von 165 bp und einer 3'-UTR von 622 bp (Mount DB, 1999).

2.2.2 Allgemeines, Proteinstruktur und Lokalisation des K^+ - Cl^- Kanals *KCC3*

Allgemeines

Wie bereits erwähnt, kodiert das Gen *SLC12A6* für den Kalium-Chlorid-Cotransporter *KCC3*. K^+ - Cl^- -Cotransporter (*KCCs*) gehören zur Familie der Kation-Chlorid-Cotransporter. Ebenfalls zu dieser Familie gehörig ist die Gruppe der Na^+ -abhängigen Kation-Chlorid-Cotransporter, die aus einem Na^+ - Cl^- -Cotransporter (*NCC*) und zwei Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -Cotransporter (*NKCC1* und *NKCC2*) bestehen (Delpire E, 2002; Mount DB, 1999).

Abbildung 3 zeigt die Familie der Kation-Chlorid-Cotransporter mit den jeweiligen Untergruppen im Überblick.

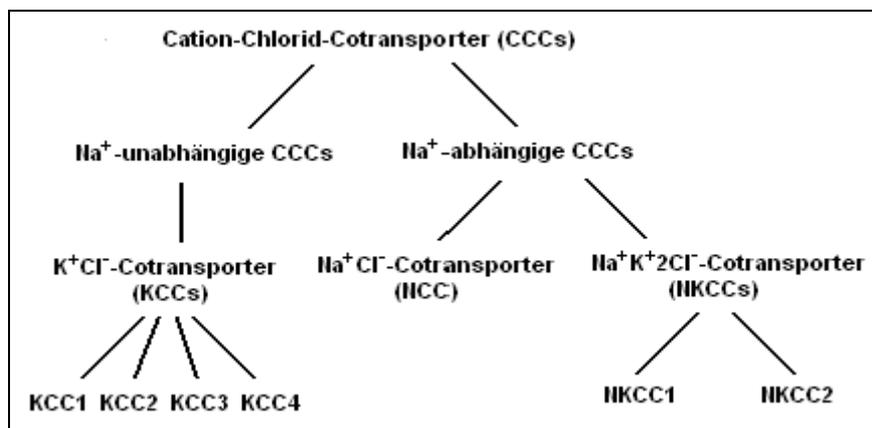


Abbildung 3: Die Familie der Kation-Chlorid-Cotransporter im Überblick

Kation-Chlorid-Cotransporter sind, allgemein gesprochen, für elektroneutrale Bewegungen von Ionen durch die Plasmamembran zuständig, wodurch die ionische und osmotische Homöostase verschiedener Zelltypen geregelt wird. Sie haben eine

wichtige Funktion in der Modulierung neuronaler Kommunikation und der Kontrolle der Erregbarkeit des ZNS (Pearson MM, 2001).

Alle Mitglieder dieser Familie sind Membranproteine, bestehend aus 10 bis 12 transmembranären Segmenten. Die transmembranäre Domäne 2 ist für die Ionenbindung zuständig (siehe auch Abbildung 4) (Delpire E, 2002). Neben diesen Gemeinsamkeiten gibt es jedoch zahlreiche Unterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen. Die Cotransporter unterscheiden sich zum einen in ihren physiologischen Eigenschaften, zum anderen sind sie in den verschiedensten Geweben des Körpers exprimiert und werden durch unterschiedliche Gene der *SLC12*- Familie kodiert.

Im folgenden soll der Blick auf den Kalium-Chlorid-Cotransporter KCC3 gerichtet werden.

Proteinstruktur

Der KCC3 besteht aus 12 transmembranären Domänen mit langen intrazellulären NH₂- und COOH-Termini und einer großen, zwischen den transmembranären Domänen 5 und 6 gelegenen extrazellulären Schleife mit fünf möglichen N-Glycosylierungsstellen (Dupré N, 2003; Hiki K, 1999; Mount DB, 1999; Pearson MM, 2001; Race JE, 1999). Die große extrazelluläre Schleife ist ein gemeinsames Kennzeichen der KCC-Familie. Die primäre Aminosäuresequenz des KCC3-Proteins ist zu 77% mit der Sequenz des KCC1- und zu 73% mit der des KCC2-Proteins identisch. Unterschiede zu KCC1 finden sich im N-terminalen Bereich des Proteins, im extrazellulären Anteil zwischen den transmembranären Domänen 3 und 4 und zwischen 5 und 6, und schließlich im Bereich des C-Terminus. Anders als KCC2 findet sich bei KCC3 keine Glutaminsäure zu Beginn der transmembranären Domäne 2, die für die verstärkte Kaliumbindung des Kalium Chlorid-Kanals KCC2 verantwortlich sein soll (Hiki K, 1999). Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau des K⁺-Cl⁻-Kanals KCC3.

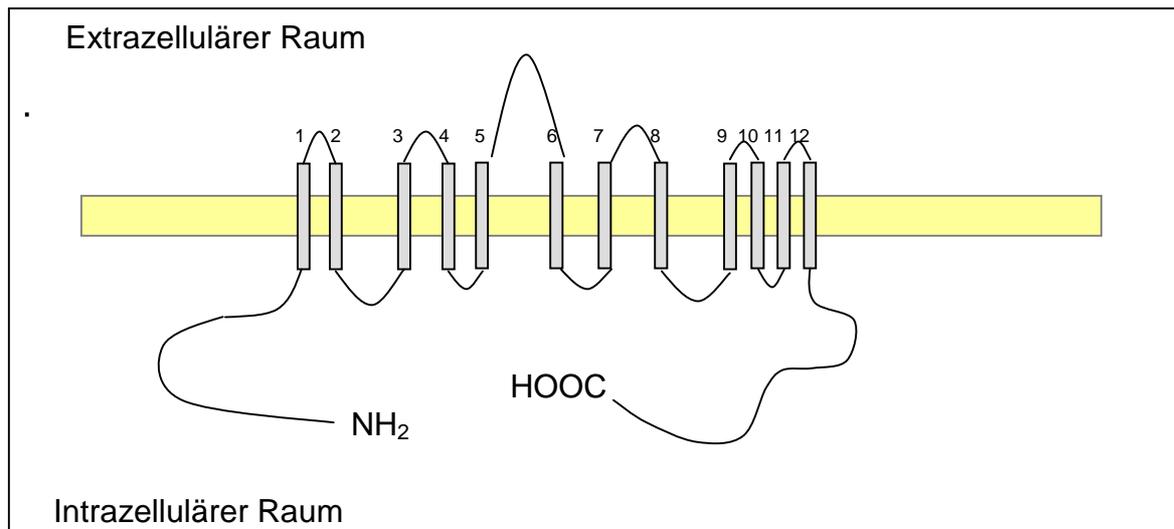


Abbildung 4: Das KCC3 Protein mit 12 transmembranären Domänen und intrazellulären Amino- und Carboxy-Termini. Die große extrazelluläre Schleife liegt zwischen der transmembranären Domäne 5 und 6 (Delpire E, 2002; Dupré N, 2003).

Das KCC3a-Protein (1150 Aminosäuren) mit einem Molekulargewicht von etwa 128 kDa ist ca. 10- 20 kDa größer als KCC3b-Protein (1099 Aminosäuren) (Hiki K, 1999; Mount DB, 1999; Pearson MM, 2001; Race JE, 1999).

Darüber hinaus zeigten sich kürzlich, wie bereits erwähnt, weitere Transkripte des *SLC12A6*, die durch Beginn der Transkription an verschiedenen Exons oder durch alternatives Spleißen entstehen können (Mercado A, 2005; Moser D, 2008). Abbildung 5 zeigt eine Zusammenfassung der möglichen Transkripte.

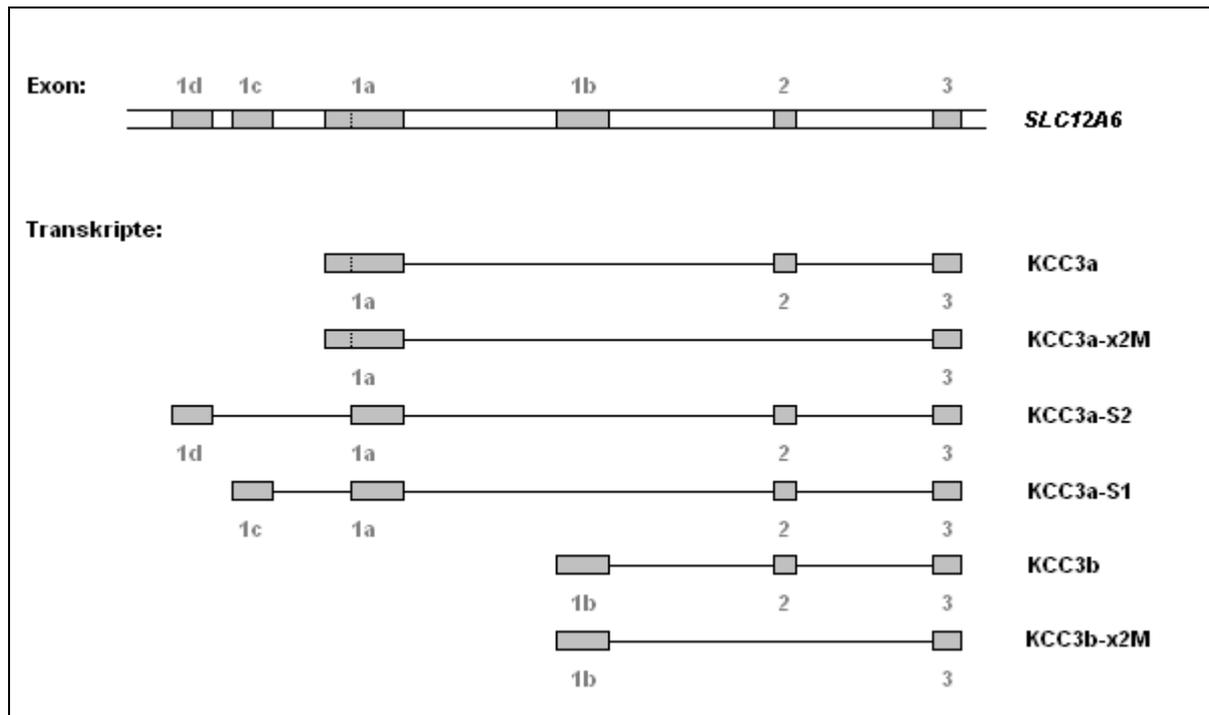


Abbildung 5: Schematische Darstellung von *SLC12A6* bis zu Exon 3 mit Transkripten des *SLC12A6*: KCC3a, KCC3a-x2M (d.h. durch alternatives Spleißen entsteht KCC3a ohne Exon 2), KCC3a-S2, KCC3a-S1, KCC3b, KCC3b-x2M (d.h. durch alternatives Spleißen entsteht KCC3b ohne Exon 2); Aufgeführt sind die Exons 1d, 1c, 1a, 1b, Exon 2 und Exon 3; Exon 1a und 1b sind die ersten codierenden Exons. Exon 1d und 1c sind alternative nicht-codierende Exons (5' von Exon 1a gelegen). Die KCC3a-S1/S2-Transkripte haben den 3' mRNA-Acceptor Bereich des ersten codierenden Exons 1a gemein, so dass ein im Vergleich zum KCC3a-Transkript verkürzter NH₂-terminaler Bereich resultiert (S=short) (Mercado A, 2005).

Expression des K⁺-Cl⁻ Kanals KCC3 im menschlichen Gewebe

Verschiedene Gewebe des menschlichen Körpers können KCC3 exprimieren. Mit Hilfe von *Nothern-blot*-Analysen konnte bereits 1999 gezeigt werden, dass KCC3 im Bereich des Gehirns, des Herzens, des Skelettmuskels, der Lunge und der Niere exprimiert ist (Hiki K, 1999; Mount DB, 1999; Race JE, 1999). Weitere *Nothern-blot*-Analysen ergaben, dass KCC3a im Gehirn, Muskel und der Niere gefunden werden kann, wohingegen KCC3b insbesondere in der Niere stark vertreten ist (Pearson MM, 2001). Dieses Verteilungsmuster konnte mit Hilfe von *Western-blot*-Analysen, die sich die unterschiedlichen Proteingröße von KCC3a und KCC3b zu Nutze machten, bestätigt werden (Delpire E, 2002).

Im Bereich des zentralen Nervensystems konnte KCC3 am basalen Epithel der *Plexus Choroidei* nachgewiesen werden. Hierbei kamen spezifische polyklonale

Antikörper gegen den aminoterminalen Bereich des Kalium-Chlorid-Kanals KCC3 zum Einsatz (Pearson MM, 2001). KCC3 konnte ebenso in Strängen der weißen Substanz der *Capsula interna*, des *Corpus callosum* und des Rückenmarks gefunden werden; des Weiteren in den großen, weit reichenden Neuronen, genauer in CA1-CA3-Neuronen des *Hippocampus*, in pyramidalen Neuronen des *Cortex* und cerebellären *Purkinje*-Zellen. Im Bereich des peripheren Nervensystems konnte keine KCC3-Expression nachgewiesen werden. Immunologische Färbungen zeigten eine Coexpression von KCC3 mit Myelin und 2',3'-zyklischer Nucleotid-3'-Phosphodiesterase, was für eine Expression von KCC3 in Zellen der Oligodendroglia spricht. Interessanterweise ändert sich das Expressionsmuster des K^+ -Cl⁻-Kanals KCC3 im Verlauf der Entwicklung, so dass bei Geburt eine geringere und in der postnatalen Phase eine deutlich höhere Expression mit Hilfe von *Western-blot*-Analysen nachgewiesen werden konnte. Diese Entwicklung verläuft parallel zur Reifung und der Myelinisierung des Nervensystems. Es kann somit die Vermutung geäußert werden, dass der Kalium-Chloridkanal KCC3 mit der Myelinisierung des Nervensystems in Verbindung steht (Pearson MM, 2001).

Mit Hilfe von KCC3-spezifischen Antikörpern konnte der Cotransporter im Bereich der basolateralen Membran des proximalen Tubulus von Segment S₁ bis S₃ nachgewiesen werden (Mount DB, 2000). KCC3 ist hierbei mit KCC4 koexprimiert, wobei KCC4 im Gegensatz zu KCC3 auch in den distal gelegenen Nephronen zu finden ist.

2.2.3 Funktion des K^+ -Cl⁻ Kanals KCC3

Der Na⁺-unabhängige gekoppelte Transport von K⁺- und Cl⁻-Ionen durch die Zellmembran wird primär mit Hilfe von K-Cl-Cotransporter (KCCs) bewerkstelligt. Die treibende Kraft dieser Bewegung ist dabei nach außen gerichtet, so dass es unter physiologischen Bedingungen zu einem Ausstrom von Kalium und Chlorid vom Intrazellulärraum in den Extrazellulärraum kommt. Allgemein gesprochen sind KCCs involviert in den epithelialen Transport, in die Regulation des Zellvolumens und der Ionenhomöostase. Bislang existieren jedoch noch zahlreiche Unklarheiten, was die Funktion der K-Cl-Cotransporter, insbesondere des K-Cl-Cotransporters KCC3 angeht.

Race *et al.* zeigten, dass der Cotransporter KCC3 aktiv ist unter isotonen Bedingungen und des Weiteren durch eine hypotone Zellschwellung aktiviert werden kann (Race JE, 1999).

Die Rolle von KCC3 im Bereich der Niere ist noch unklar. Es wird angenommen, dass KCC3 und KCC4 wichtige Eigenschaften im transepithelialen Salztransport besitzen und im Falle von Zellschwellung eine Ausschleusung von K^+ und Cl^- bewirken (Mount DB, 2001).

Auch im Bereich des zentralen Nervensystems ist die Funktion von KCC3 bislang nicht eindeutig geklärt. Tiermodelle sollten zur Klärung dieser Frage beitragen. So wurden in einer Studie von Delpire E. *et al.* Stammzellen von Mäusen derart präpariert, dass Mäuse mit einem Mangel an KCC3 entstanden. Hierbei war Exon 3 des *KCC3*-Gens Ziel einer Deletion. Heterozygote Mäuse (*KCC3*^{-/+}) konnten kaum vom Wildtyp (*KCC3*^{+/+}) unterschieden werden, wohingegen homozygote *Knock-out*-Mäuse (*KCC3*^{-/-}) zahlreiche Auffälligkeiten aufwiesen. Diese Mäuse waren nur schwerlich in der Lage, ihre Körper in eine aufrechte Stellung zu bringen, sie bewegten sich unkoordiniert und streckten oft unerwartet ihre Glieder. Auch in zahlreichen Tests zeigte sich, dass *Knock-out*-Mäuse Probleme mit ihrer Koordination hatten. Sowohl heterozygote als auch homozygote Mäuse fielen durch eine verminderte spontane Aktivität auf. Bei Untersuchungen der peripheren Nerven stieß man auf nur teilweise myelinisierte Axone, was auf eine Demyelinisierung der Axone schließen lässt (Delpire E, 2001). Auch andere Forschungsgruppen sind der Meinung, dass der K-Cl-Kanal KCC3 mit der **Myelinisierung des Nervensystems** in Verbindung steht (Pearson MM, 2001).

In einer Studie von Boettger *et al.* wurde ebenfalls das *KCC3*-Gen bei Mäusen manipuliert, wodurch es zu einem Verlust des Cotransporters KCC3 bei diesen Mäusen kam. Das erste Exon, welches in beiden *Splice*-Varianten vorkommt, wurde dabei mit β -Galactosidase fusioniert, so dass ein zytoplasmatisches Fusionsprotein entstand, dessen gesamter transmembranärer Anteil und der C-Terminus des KCC3-Proteins zerstört wurde (Boettger T, 2003). Der Verlust des KCC3-Proteins führte zu zahlreichen, zum Teil erstaunlichen Phänotypen.

Es konnte gezeigt werden, dass KCC3 eine wichtige Funktion bei der Regulierung des Zellvolumens erfüllt. Zellschwellung infolge von Hypotonität kann durch regulierte Volumenabnahme rückgängig gemacht werden. Dabei kommt es zu einem zellulären Verlust von organischen Osmolyten, von K^+ und Cl^- . Dieser Ausstrom von K^+ und Cl^-

wird durch K^+ - und Cl^- -Kanäle bewerkstelligt, die durch Zellschwellung aktiviert werden oder durch direkt gekoppelten K^+ - Cl^- Cotransport (O'Neill, 1999). An zwei sehr unterschiedlichen Zelltypen, Neuronen des *Hippocampus* und Zellen des proximalen Tubulus der Niere, konnte nun gezeigt werden, dass KCC3 eine sehr wichtige Aufgabe in dieser **regulierten Volumenabnahme** erfüllt. In beiden Zelltypen führte der Verlust des KCC3-Proteins zu einer ernsten Beeinträchtigung der regulierten Volumenabnahme, wobei KCC3 wichtiger für die neuronale als für die renale Zellvolumenabnahme zu sein scheint (Boettger T, 2003).

Diese Beeinträchtigung der Reaktionsmöglichkeiten der Zelle auf osmotischen Stress im Bereich des ZNS kann schließlich eine **Neurodegeneration** zur Folge haben.

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass bei $KCC3^{-/-}$ -Mäusen die Anfallsschwelle reduziert ist. Mit Hilfe eines Elektrocorticogramms wurden bei sich frei bewegenden Mäusen erhöhte irreguläre elektrische Aktivitäten, d.h. spontane Hoch-Volt-*Spike-Wave*-Komplexe festgestellt. Diese Komplexe sind typisch für bestimmte Formen von Epilepsie, wie z.B. die generalisierten Absences und werden einer abnormalen, synchronisierten Aktivität in thalamocorticalen Bereichen zugeschrieben. Unterschiedliche Modelle der Absence-Epilepsie zeigen, dass Cl^- -abhängige synaptische Hemmung, vermittelt über $GABA_A$ -Rezeptoren in Regionen des *Thalamus* und des *Neocortex*, beteiligt sind an der Entstehung von *Spike-Wave*-Komplexen (Crunelli V, 2002). Da der K^+ - Cl^- -Cotransporter die zytoplasmatische Cl^- -Konzentration regelt, ist er somit beteiligt an der **synaptischen Inhibition**. Die Veränderte ZNS-Erregbarkeit bei $KCC3^{-/-}$ Mäusen könnte somit Folge der verminderten synaptischen Inhibition sein, verursacht durch die Zunahme der neuronalen zytoplasmatischen Cl^- -Konzentration (siehe auch Abbildung 6).

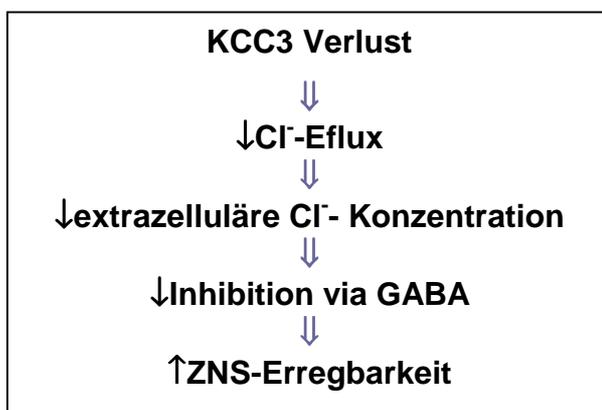


Abbildung 6: Zusammenhang zwischen Mangel an KCC3 und Zunahme der ZNS-Erregbarkeit;
↑=Zunahme; ↓=Abnahme;

Analysen des *Nervus Ischiadicus* und der ventralen und dorsalen Wurzel des Rückenmarks zeigte eine Degeneration des Axons des Motoneurons und des sensorischen Neurons. Neben der bereits erwähnten Beeinträchtigung der regulierten Volumenabnahme bei Zellschwellung, könnte die Degeneration ebenfalls mit der ZNS-Übererregbarkeit im Zusammenhang gebracht werden, da auch bei Epilepsien eine Neurodegeneration beobachtet werden kann. Es ist verständlich, dass Neuronen, die die Fähigkeit verloren haben, ihr Zellvolumen zu regulieren, vulnerabel gegenüber Veränderungen der Ionenkonzentration sind, die bei einer Zunahme der neuronalen Aktivität auftreten.

Eine weitere mögliche Funktion des K-Cl-Kanals KCC3 im ZNS ist die Beteiligung an der K⁺-Resorption im Bereich des *Plexus choroideus*. Mittels Na⁺/K⁺-Pumpen und Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Cotransporter wird Kalium an der apikalen Membran des *Plexus choroideus* resorbiert. Der K⁺-Cl⁻-Cotransporter KCC3 an der basolateralen Membran des *Plexus choroideus* könnte schließlich am Ausstrom des Kaliums in den Blutkreislauf und somit an der Kaliumzusammensetzung der cerebrospinalen Flüssigkeit, die für die elektrische Aktivität innerhalb des ZNS von großer Wichtigkeit ist, mitbeteiligt sein (Pearson MM, 2001).

Neben beschriebener renaler und cerebraler Funktionen konnten auch andere mögliche physiologische Eigenschaften des K-Cl-Kanals KCC3 beobachtet werden. Shen *et al.* (2001) untersuchten die Funktion von KCC3 mit Hilfe von NIH/3T3-Zelllinien, die von NIH/3T3-Fibroblasten (etablierte Zelllinie aus Fibroblasten des *national institute of health*) aus Mäusen gewonnen wurden. Sie zeigten, dass der *Insulin-like growth factor 1* (IGF1) die KCC3-Expression ansteigen lässt und das Zellwachstum anregt, wohingegen der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) die KCC3 Expression vermindert und zu Wachstumsstillstand führt. Des Weiteren gehen Shen und Kollegen davon aus, dass die Aktivierung Cyclin-abhängiger Kinasen, die den Verlauf des Zellzyklus regulieren, empfindlich auf Ionenkonzentrationen reagiert und mit der Aktivität des K⁺-Cl⁻-Kanals KCC3 gekoppelt ist. Dies zeigt, dass KCC3 empfindlich auf Wachstumshormone reagiert und in Verbindung steht mit bestimmten Zytokinen, die wiederum in direkter Verbindung mit dem Zellwachstum stehen. KCC3 scheint somit ebenfalls eine regulierende Funktion in der **Zellproliferation** bestimmter Gewebe einzunehmen. Shen *et al.* gehen weiter davon aus, dass KCC3 im Gegensatz zu anderen K⁺-Cl⁻-Cotransportern keine Funktion in der Regulation des Zellvolumens besitzen (Shen MR, 2001).

Eine weitere Beobachtung bei $KCC3^{-/-}$ -Mäusen war die allmähliche Entwicklung von Taubheit aufgrund einer Degeneration der sensorischen Haarzellen der *Cochlea* (Boettger T, 2003). Des Weiteren litten $KCC3^{-/-}$ Mäuse unter arterieller Hypertension. Die Pathogenese dieser Erkrankung ist bisweilen noch unklar, doch es wird davon ausgegangen, dass KCC3 einen Einfluss auf zelluläre Chloridkonzentration vaskulärer glatter Muskelzellen hat, auf denen der Kanal exprimiert ist. Die Hypertension könnte jedoch auch Folge der Neurodegeneration sein (Boettger T, 2003).

Piechotta *et al.* (2002) zeigten, dass einige Kation-Chlorid-Cotransporter, darunter KCC3 mit SPAK (*Stress-related serine-threonine kinase Ste20-related proline-alanine-rich kinase*) und/oder OSR1 (*oxidative stress respond 1*) interagieren. Sie vermuten, dass diese Interaktion bei der Initiierung der **zellulären Stressantwort** involviert ist (Piechotta K, 2002).

2.2.4 Assoziation von Polymorphismen des *SLC12A6* mit Erkrankungen

SLC12A6 ist, wie bereits erwähnt, zwischen den genetischen Markern D15S1040 und D15S118 auf Chromosom 15 lokalisiert (Mount DB, 1999). Diese Region ist genetisch gekoppelt mit dem sogenannten Andermann Syndrom, sowie zwei Formen idiopathischer Epilepsien, der juvenilen myoklonischen Epilepsie und der familiären rolandischen Epilepsie und schließlich mit der rezessiven familiären spastischen Paraparese (Delpire E, 2002). Versuche, Varianten von *SLC12A6* zu finden, welche für die Entwicklung von Epilepsien verantwortlich sind, waren bislang erfolglos (Steinlein O, 2001). Im Folgenden soll auf das Andermann-Syndrom näher eingegangen werden.

Andermann-Syndrom

Es zeigte sich, dass Mutationen im Bereich des Gens *SLC12A6*, welcher für den Kalium-Chlorid-Kanal KCC3 kodiert, in der Pathogenese von ACCPN (= *Agenesis of the corpus callosum with peripheral neuropathie*, Andermann-Syndrom) involviert sind (Howard HC, 2002; Howard HC, 2003; Howard HC, 2002; Uyanik G, 2006). Bereits im Jahre 1972 wurde diese autosomal rezessive Erkrankung von Andermann und seinen Mitarbeitern beschrieben, weshalb sie auch Andermann-Syndrom genannt

wurde (Andermann F, 1972). Ursprünglich wurde das Andermann-Syndrom einzig in einer Provinz von Quebec, Kanada beobachtet und beschrieben, mittlerweile ist jedoch bekannt, dass sich die Erkrankung auch in anderen Populationen, insbesondere in solchen mit hohen Raten an Konsanguinität finden lässt (Deleu D, 1997). ACCPN ist eine Erkrankung, die sich durch eine progressive sensomotorische Neuropathie mit geistiger Retardierung, psychotischen Episoden, dysmorphen Zügen und variabler Agenesie des *Corpus callosum* gekennzeichnet ist (Casaubon LK, 1996; Filteau MJ, 1991).

Die wichtigsten klinischen Merkmale dieser Erkrankung sind in der folgenden Übersicht (Abbildung 7) zusammengefasst.

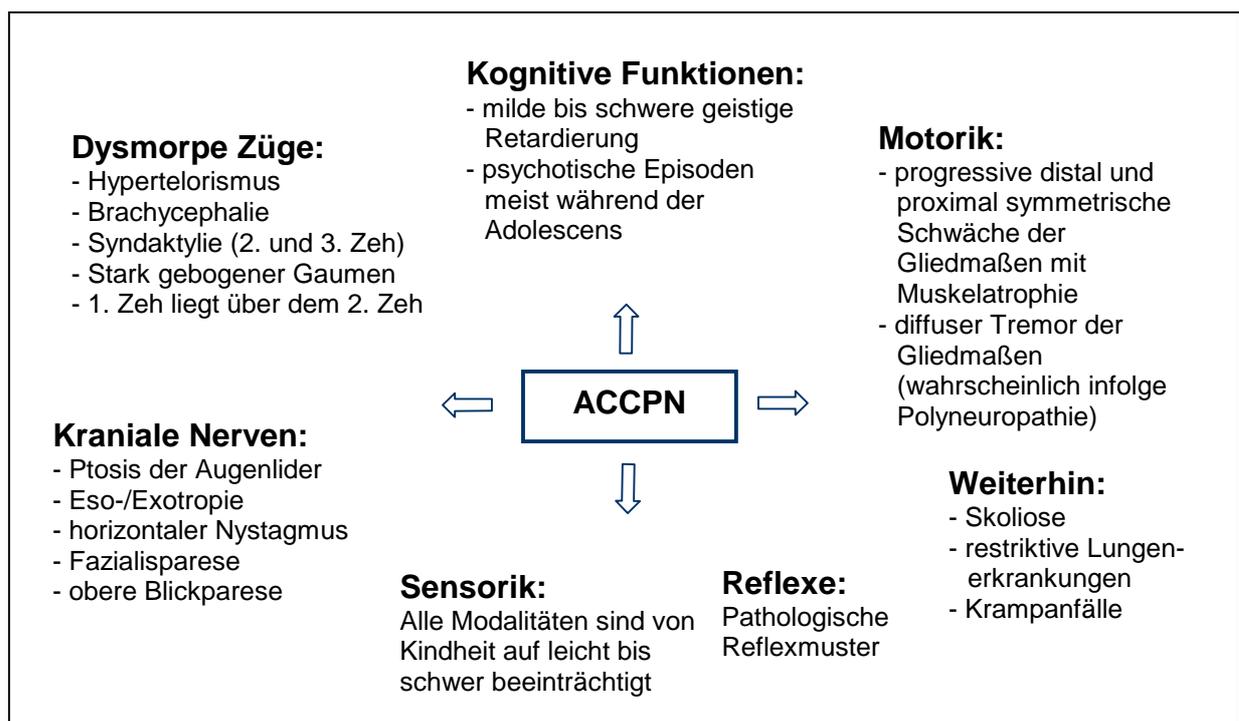


Abbildung 7: Klinische Merkmale der ACCPN

Anhand dieser Erkrankung zeigt sich sehr eindrucksvoll, wie ein Kanaldefekt sowohl zu Entwicklungsstörungen als auch zu neurodegenerativen Problemen führen kann, die neben dem zentralen auch das periphere Nervensystem betreffen. Die Agenesie

des *Corpus callosum* zum einen deutet auf eine Störung der axonalen Migration während der Embryogenese hin, wohingegen die progressive Neuropathie mit geistiger Retardierung und psychotischen Episoden auf eine degenerative Erkrankung hinweist. Durch diese Beobachtungen kann die Vermutung geäußert werden, dass der KCC3 zumindest indirekt in der frühen axonalen Migration durch das *Corpus callosum* involviert ist und in der Erhaltung der Integration des peripheren Nervensystems eine Rolle spielt (Dupré N, 2003). Auch bei Patienten mit Andermann-Syndrom, bei denen makroskopisch keine Agenesie des *Corpus callosum* nachgewiesen werden konnte, fand sich in der Autopsie ein Axonverlust, was darauf hindeutet, dass in den meisten, wenn nicht sogar in allen Fällen des Andermann-Syndroms verschiedene Schweregrade einer *Corpus callosum*-Abnormalität zu finden sind (Dupré N, 2003). Strukturelle Analysen von Nerven- und Muskelgewebe zeigten des Weiteren eine Demyelinisierung mit axonaler Degeneration und eine neurogene Muskelatrophie bei Patienten mit Andermann-Syndrom (Deleu D, 1997).

Ein äußerst wichtiger Aspekt ist die Assoziation von ACCPN mit Psychosen, da Mutationen im Bereich des *KCC3*-Gens auch für Erkrankungen aus dem psychiatrischen Formenkreis verantwortlich sein könnten.

Im Folgenden soll nun der Fokus auf die Assoziationsstudie bzw. die im Rahmen dieser Studie gestellten Fragen und Hypothesen gerichtet werden.

2.3 Assoziationsstudien bei komplex vererbten Erkrankungen

Es zeigte sich in den letzten Jahrzehnten, dass sogenannte Kopplungsanalysen für die Untersuchung von psychischen Erkrankungen meist nicht geeignet sind, da diese Erkrankungen meist einen komplexen Vererbungsmechanismus besitzen, d.h. der Vererbungsmodus ist im Einzelnen unbekannt, und meist findet sich auch kein Gen, welches den Haupteffekt auf den Phänotyp ausüben könnte.

Um komplex vererbte Erkrankungen genetisch untersuchen zu können, verwendet man sogenannte nicht-parametrische Methoden, wie z.B. Assoziationsstudien. Assoziationsstudien können im Falle von komplex vererbten Erkrankungen in Kombination mit plausiblen Kandidatengenomen oder Kandidatenregionen angewendet werden. Um eine statistisch signifikante Häufung des Markerallels bei einer Erkrankung aufzuspüren, wird hierbei eine Gruppe von nicht verwandten Patienten mit einer Kontrollgruppe aus einer ethnisch ähnlichen allgemeinen Bevölkerung verglichen. Kommt das Markerallel in der Fallgruppe signifikant häufiger vor als in der Kontrollgruppe, dann ist ein Markerallel ein Risikoallel für eine bestimmte Erkrankung, d.h. es handelt sich um eine positive Assoziation (Hardy J, 2002).

Der Marker kann dabei direkt eine Anfälligkeit für eine Erkrankung verursachen, da er z.B. als funktionelle Variante des Gens an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt ist. Eine positive Assoziation findet sich jedoch auch bei einem Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*), wodurch der Marker und der Anfälligkeitslokus so eng verbunden ist, dass ihre Verwandtschaft über mehrere Stufen der Rekombination erhalten bleibt (Lander E, 1994).

Aufgrund von Stratifizierungseffekten einer Population können ebenfalls falsch positive Assoziationen entstehen. Mit Hilfe von statistischen Methoden wie z.B. dem *Transmission Disequilibrium Test* (TD-Test) und dem *Haplotype Relative Risk Test* (HRR-Test) kann diesem Problem begegnet werden (Lander E, 1994; Schulze TG, 2002).

3 Fragestellungen und Hypothesen

Im Rahmen einer nicht-parametrischen, genomweiten Kopplungsanalyse wurde die Region 15q14-15 mit einem LOD-Score von 3,57 ($p = 2.6 \times 10^{-5}$; GENEHUNTER-PLUS) als Kandidatenregion für periodische Katatonie ermittelt. Diese chromosomale Region zeigte ebenfalls eine Kopplung zu bipolaren Erkrankungen.

Das Gen *SLC12A6*, welches auf der chromosomalen Region 15q14 zu finden ist, stellt aufgrund seiner Position und der funktionellen Bedeutung seines Genprodukts ein vielversprechendes Kandidatengen für katatone Schizophrenie und bipolare Erkrankungen dar.

Mit Hilfe von Mutationsanalysen wurden zwei seltene Polymorphismen (G/A, G/A) in der Promotor- und der 5'-UTR-Region des *SLC12A6*-Gens und eine Thymidin-Insertion im Intron 4 (IVS4-1008ins(T)) des *SLC12A6*-Gens detektiert. Untersucht wurden hierbei zwei an katatoner Schizophrenie erkrankte Patienten aus einer großen Familie (Familie 11, siehe Abbildung 8) und drei gesunde Individuen (Meyer J, 2005).

Anhand dieser Arbeit soll nun im Rahmen einer Assoziationsstudie geklärt werden, ob diese seltenen Varianten bei Patienten mit katatoner Schizophrenie und/oder bipolaren Erkrankungen gehäuft auftreten.

Wenn dies der Fall ist, müssen weiterhin folgende Hypothesen geklärt werden:

1. Es handelt sich hierbei um falsch positive Ergebnisse, die sich aufgrund der Bevölkerungs-Stratifikation ergeben. Somit ist die Assoziation der Polymorphismen mit katatoner Schizophrenie bzw. bipolarer Erkrankung lediglich Zufall.

2. Die seltenen G-Varianten und das IVS4-1008ins(T)-Allel befinden sich im Kopplungsungleichgewicht mit der eigentlichen, wahren Mutation, welche die Erkrankung erzeugt.

Stöber *et al.* beschrieb und untersuchte im Jahr 2001 und 2002 einen als Familie 9 bezeichneten Stammbaum, von dessen Mitgliedern sechs Personen an katatoner Schizophrenie erkrankt sind. Im Rahmen eines Genom-Scans zeigten sich für die betroffenen Personen gemeinsame Markerallele zwischen D15S1042 und D15S182 (Stöber G, 2001b, 2002b).

Die wahre Mutation würde somit im Falle der periodischen Katatonie distal des *SLC12A6*-Genlocus vermutet werden, da auch der als Familie 9 bezeichnete Stammbaum die Region distal des *SLC12A6*-Genlocus unterstützt, die durch die Marker D15S1042 und D15S182 flankiert wird (Siehe Abbildung 9) (Meyer J, 2003).

3. Die seltenen G-Varianten und das IVS4-1008ins(T)-Allel sind möglicherweise für bipolare Erkrankungen bzw. für katatone Schizophrenie bei Familie 11 verantwortlich, indem sie z.B. die Genexpression direkt beeinflussen.

Trifft diese Annahme zu, würde man im Falle der periodischen Katatonie allerdings ein zweites Kandidatengen distal des *SLC12A6*-Gens erwarten, welches ursächlich für die Erkrankung bei Familie 9 ist (Siehe Abbildung 9).

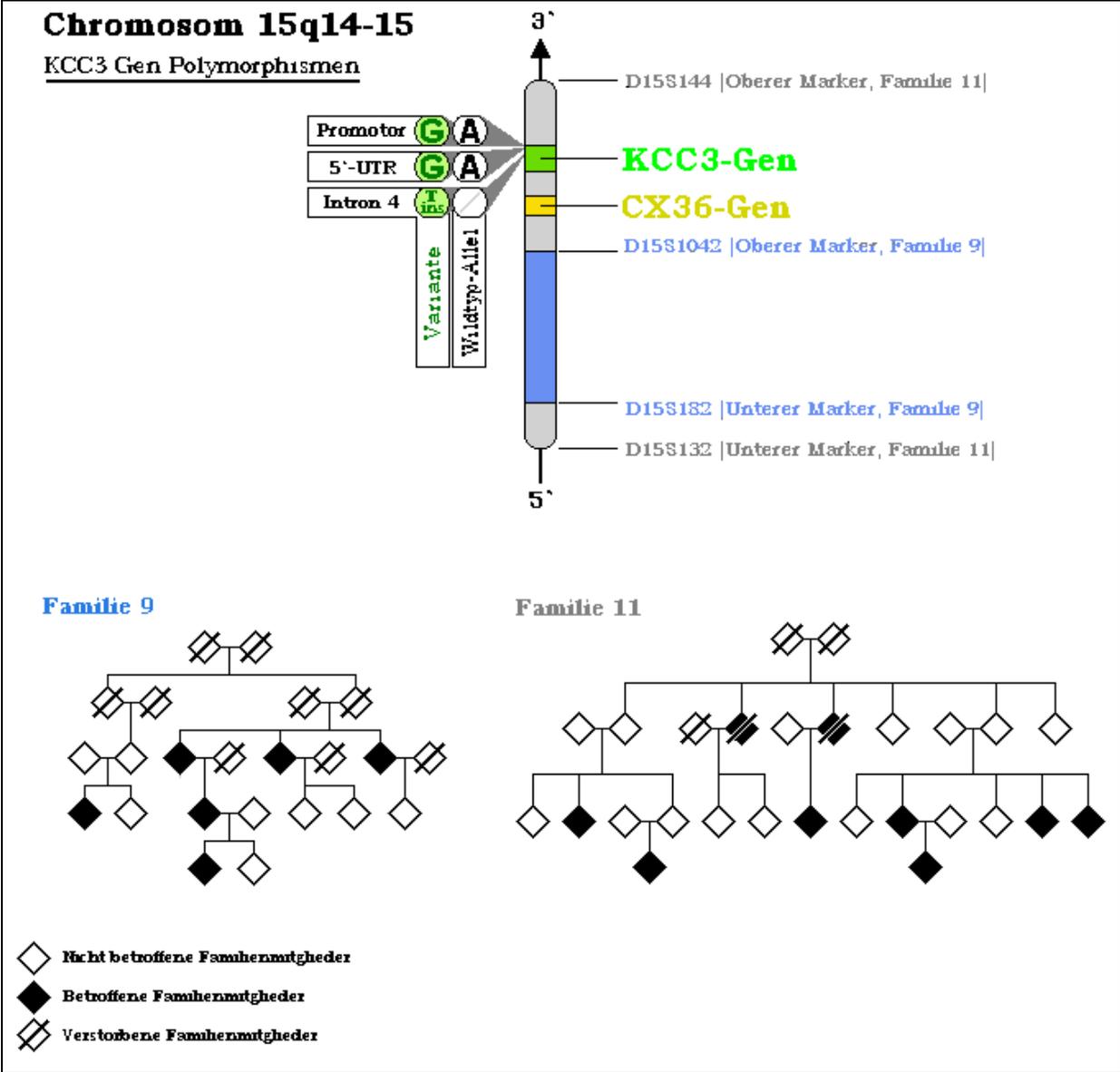


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Chromosoms 15q14-15 und der untersuchten Polymorphismen; schematische Darstellung des Stammbaums der Familie 11 und 9

4 Patienten, Material und Methoden

4.1 Patienten und Kontrollgruppe

Die vorliegende Arbeit knüpft an die Studien von Stöber *et al.* an (Stöber G, 2001; Stöber G, 2000; Stöber G, 2002b) und ist als Fortsetzung der unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Lesch und Herrn Prof. Dr. Meyer bereits begonnenen Assoziationsstudie zu sehen.

Untersucht wurde ein als Familie 11 bezeichneter Stammbaum (3 Generationen), der bereits von Stöber *et al.* und Meyer *et al.* beschrieben wurde (siehe auch Abbildung 9) (Meyer J, 2002b; Stöber G, 2001). Zur Verfügung standen Blutproben von 10 gesunden und 7 an katatoner Schizophrenie erkrankten Mitglieder der Familie 11.

Insgesamt bestand die Patientengruppe aus 186 Individuen, deren Erkrankung durch die Abteilung für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg, zum Teil auch durch die psychiatrische Abteilung des Krankenhauses Werneck diagnostiziert wurde.

114 Personen litten nach den Kriterien des ICD-10 an Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises. Davon litten 31 Individuen an einer paranoiden Form, 14 an einer hebephrenen Form der Schizophrenie, 23 Individuen an einem Residualzustand, 5 an einer undifferenzierten Form der Schizophrenie, 4 Personen an katatoner Schizophrenie, 4 an *Schizophrenia simplex*, 10 an Wahnerkrankung und schließlich 23 Personen an schizoaffektiver Erkrankung.

Eine zweite Gruppe bestehend aus 72 Individuen litten nach den Kriterien des ICD-10 an bipolarer Erkrankung (66 Patienten) oder schwerer Depression mit psychotischen Episoden (6 Patienten).

In der Patientengruppe lag das durchschnittliche Lebensalter bei 46 ± 15 Jahren.

Alle schizophrenen Patienten wurden durch einen erfahrenen Psychiater untersucht. Ausgedehnte semistrukturierte Interviews wurden durchgeführt und, soweit möglich, weitere Informationen über den Patienten mit Hilfe von Familienangehörigen oder Berichten aus anderen Kliniken eingeholt, um ein vollständiges Bild der Erkrankung

zu erhalten und somit eine genaue Diagnose gemäß der ICD-10 und der Leonhard'schen Klassifikation treffen zu können.

Die Patienten mit bipolarer Erkrankung hatten bislang zumindest an einer manischen und einer depressiven Episode gelitten. Patienten mit *Major Depression* sind bislang an mindestens zwei depressiven Episoden erkrankt und zeigten außerdem psychotische Symptome während dieser Episoden. Keines der Individuen litt an einer Epilepsie, angeborenen geistigen Retardierung, einer signifikanten zusätzlichen neurologischen Erkrankung oder einer Drogenabhängigkeit.

Die Kontrollgruppe bestand aus 350 Individuen mit einem durchschnittlichen Lebensalter von $32 \pm 10,5$ Jahren.

Die Blutproben wurden von der Abteilung für Bluttransfusion der Universitätsklinik Würzburg zur Verfügung gestellt.

Die Kontrollgruppe bestand ausschließlich aus gesunden Blutspendern, die hinsichtlich psychiatrischer Erkrankungen nicht untersucht wurden.

Sowohl die Patienten- als auch die Kontrollgruppe sind kaukasischer Abstammung und stammen zudem aus der näheren Umgebung Würzburgs.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt. Die Teilnahme der Personen an dieser Studie erfolgte freiwillig und nach Aufklärung über Ziel und Ablauf der Studie.

4.2 Verwendete Materialien

4.2.1 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von MWG-Biotech (Eberstadt) synthetisiert.

Primer	Primersequenz (5'→3')	T _M (°C)	GC-Anteil (in %)	Produkt-Größe (bp)
PromG/A-F	CCTGAATCAAGAAACCCAGAC	62	47,6	424
PromG/A-R	ATCCATTCCATGTTTTACCA	58	38,1	
g-a /K3-F	TGTGGGGTATTCACCTG	52,8	52,9	157
G-K3-R	TTTCCTGTCGAGGTAGC	52,8	52,9	
A-K3-R	TTTCCTGTCGAGGTAGT	50,4	47,1	
INS-T-F	TTTCTGCTTGGAGGTTAATATGG	64	39,1	145/146
INS-T-R	GAGGTAGACACCCATGAAGG	62	55	
CX36 EX2-4F	ATTGGGAACACTGACCCTTG	60	50	
CX36 EX2-4R	TGTCCAGGGTTGTATGAGTG	64	52,4	

Tabelle 5: Verwendete Primer, Primersequenz, T_m, GC-Anteil und Produktgröße

4.2.2 Enzyme

Restriktionsenzyme:

Enzym	Hersteller	Bezeichnung	Erkennungsstelle	Verwendung
Hinf I	BioLabs® _{Inc}	R0155S	5'...G ANTC ...3' 3'...CTNA G... 5'	PCR: CX36-Ex2

Tabelle 6: Restriktionsenzyme und deren Hersteller, nähere Bezeichnung, Erkennungsstelle(= |) und Verwendung

weitere Enzyme:

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

Tabelle 7: sonstige verwendete Enzyme, deren Hersteller und Verwendung

4.2.3 Chemikalien

Substanz	Hersteller	Verwendung
0,5 M EDTA (pH 8,0)	AppliChem (Darmstadt)	TAE-Puffer, TBE-Puffer
100-Basenpaarleiter (DNA-Längenstandards XIV)	Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)	Gelelektrophorese
2-Propanol	Merck (Darmstadt)	DNA-Extraktion
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)	Herstellung der PAA-Lösung (für PAA-Gele)
Amoniumchlorid (NH ₄ Cl)	AppliChem (Darmstadt)	DNA-Extraktion
Ammoniumpersulfat (10 %)	AppliChem (Darmstadt)	Herstellung der APS-Lösung (für PAA-Gele)
Bromphenolblau	Pharmacia Biotech (Freiburg)	"Blue Buffer"
BSA (bovines Serumalbumin)	New England BioLabs (Schwabach)	PCR-Puffer
dNTP-Mix (je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Promega (Mannheim)	PCR-Reaktionslösung
Eisessig	AppliChem (Darmstadt)	TAE-Puffer
Ethidiumbromidlösung (1%)	Roth (Karlsruhe)	Anfärben der Agarosegele
Formamid	AppliChem (Darmstadt)	Herstellung des Proben-„loading“-Puffers
Glycerol	Sigma (Steinheim)	"Blue Buffer"
H ₂ O (<i>Aqua dest.</i>)	Merck (Darmstadt)	Puffer- und Stammlösungen; molekularbiologische Reaktionsansätze
KCl	AppliChem (Darmstadt)	PCR-Puffer
KHCO ₃ (Kaliumhydrogencarbonat)	AppliChem (Darmstadt)	DNA-Extraktion
MgCl ₂	AppliChem (Darmstadt)	PCR-Puffer
NaCl	Pharmacia Biotech (Freiburg)	Puffer- und Stammlösungen
N´N` - Methylbisacrylamid 2x (BAA)	Merck (Darmstadt)	Herstellung der PAA-Lösung (für PAA-Gele)
QIAquick Gel Extraction Kit (50) ®	Quiagen (Hilden)	DNA-Extraktion
QIAquick PCR-Purification Kit (250) ®	Quiagen (Hilden)	Reinigung des PCR-Produkts
SDS (<i>sodium deodecyl sulfate</i>)10%	Sigma (Steinheim)	DNA-Extraktion
SeaKem LE Agarose	BMA (Bio Whittaker Molecular Applications)	Herstellung der Agarosegele
SYBR-Gold® <i>nucleic acid gel stain</i>	Molecular Probes (Leiden, Niederlande)	Anfärben der PAA-Gele
TEMED	Sigma (Steinheim)	Herstellung der PAA-

(N,N,N',N'-Tetra-methylethyldiamine)		Lösung (für PAA-Gele)
Tris-Base	AppliChem (Darmstadt)	TBE-Puffer, Tae-Puffer
Tris-HCl	AppliChem (Darmstadt)	Puffer- und Stammlösungen
Tween 20	Sigma (Steinheim)	PCR-Puffer
Xylenecyanol	Sigma (Steinheim)	"Blue Buffer"

Tabelle 8: Chemikalien-, Herstellerangabe und Verwendungszweck

4.2.4 Puffer und Lösungen

In Tabelle 9 und 10 werden die angewendeten Puffer und Lösungen aufgeführt und deren Zusammensetzung und Verwendung näher beschrieben. Wurde ein Puffer nicht eigenständig im Labor hergestellt, sondern gebrauchsfertig geliefert, ist statt der Zusammensetzung der Hersteller des Puffers genannt.

Puffer:

Puffer	Zusammensetzung/ Hersteller*	Verwendung
0,5xTBE-Puffer (Tris-Borat)	0,045 M Tris-Borat 0,001M EDTA (pH 8)	Elektrophorese-Puffer
1xTAE-Puffer (Tris-Acetat)	0,04 M Tris-Acetat 0,001 M EDTA (pH 8)	Elektrophorese-Puffer
10 mM MgCl ₂ -Puffer	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 0,25% Tween 20 0,25 mg/ml BSA 10 mM MgCl ₂	PCR-Puffer
7,5 mM MgCl ₂ -Puffer	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 0,25% Tween 20 0,25 mg/ml BSA 7,5 mM MgCl ₂	PCR-Puffer
PB-Puffer	QIAQuick® PCR Purification Kit, Qiagen*	Reinigung des PCR- Produkts
PE-Puffer	QIAQuick® PCR Purification Kit, Qiagen*	Reinigung des PCR- Produkts
EB-Puffer (Elutions-Puffer)	QIAQuick® PCR Purification Kit, Qiagen*	Reinigung des PCR- Produkts
NE Buffer 2	BioLabs® _{Inc.} *	Restriktion mit Enzym Hinfl

Proben- <i>“loading-buffer”</i>	600 µl Formamid 100 µl <i>“Blue-buffer”</i>	SSCP: Elektrophorese
<i>“Blue-buffer”</i>	25 mg Bromphenolblau Xylenecyanol 1,5 ml Glycerol (100%) 10 ml Aqua dest.	Elektrophorese
Lysispuffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA	DNA-Extraktion
Kernlysispuffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8) 400 mM NaCl 2 mM Na ₂ EDTA	DNA-Extraktion
1xTE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH8) 0,1 mM Na ₂ EDTA	DNA-Extraktion

Tabelle 9: Angabe der Puffer, der Zusammensetzung (bzw. des Herstellers*) und der Verwendung.

*=die Hersteller wurden bei Puffern, die nicht eigenständig im Labor produziert wurden angegeben

Lösungen:

Lösung	Zusammensetzung	Verwendung
10 % PAA (Polyacrylamid)- Lösung	1g N`N`-Methylbisacrylamid 2x (BAA) 49 g Acrylamid 2x(AA) [BAA:AA=1:49] 500 µl TEMED mit 0,5xTBE-Puffer auf 500 ml auffüllen	SSCP:Lösung für PAA-Gele
APS-Lösung	4g Amoniumpersulfat 40ml H ₂ O	SSCP: Lösung für PAA-Gele
SYBR-Gold®- Färbelösung	25 µl SYBR-Gold® 250 ml 1xTBE-Puffer	SSCP: Färbebad

Tabelle 10: Angabe der verwendeten Lösungen, des Herstellers und des Verwendungszweckes

4.2.5 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Verwendung
Abstandhalter	Peqlab (Erlangen)	SSCP-Gele
<i>Collection tubes</i>	Qiagen	Reinigung des PCR- Produkts
Glasplatten	Peqlab (Erlangen)	SSCP-Gele
Handschuhe	Sänger Alfatex Nitril, Safeskin	PCR, Restriktion
Kämme	Peqlab (Erlangen)	Agaroseelektrophorese- SSCP-Gele
Messbecher, -zylinder	Marienfeld Superior	Herstellung der Gele, Lösungen, Puffer
Mikrotiterplatten 96-fach	Hartenstein	PCR, Restriktion
Nunc-Röhrchen	Nalgene	DNA-Extraktion

Photometrie-Küvetten	Eppendorf	Konzentrationsbestimmung
Pipettenspitzen	Greiner BioOne, Hartenstein	PCR, Restriktion
Pipettenspitzen mit Filter	Peqlab, Hartenstein	PCR, Restriktion
PCR-Reaktionsgefäße	Hartenstein	PCR
Reaktionsgefäße	Greiner Labortechnik	PCR, Restriktion
SYBR-Gold® Filter	Bio-Rad	Ablichtung der SSCP-Gele
QIAquick <i>spin-columns</i>	Qiagen	Reinigung des PCR-Produkts
Zentrifugen- Rörchen	Sarstedt 50 ml	Zentrifugation

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien

4.2.6 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller(Ort)	Verwendung
Autoklav	Ohne Bezeichnung	MWG Biotech	Sterilisierung
Elektrophoresekammern	Easy Cast (TYP: B2)	OWL Separation Systems (Portsmouth, USA)	Agarosegelelektrophorese
	TYP:P9 DS	peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)	SSCP
	TYP:45-2020-I	peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)	SSCP
Inkubatoren	TYP:1012	GFL (Burgwedel)	Enzymverdau
	TYP: 1083	GFL (Burgwedel)	DNA-Extraktion, Denaturierung der DNA
Kamera	Polaroid Gel Cam Model:EPH7	Polaroid (Offenbach)	Ablichtung der gefärbten Gele
Pipetten	Univapo 150H	Eppendorf	PCR, Restriktion
	Reference 0,5-10	Eppendorf	PCR, Restriktion
	Reference 10-100	Eppendorf	PCR, Restriktion
	Reference 100-1000	Eppendorf	PCR, Restriktion
Spannungsgeräte	Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia (Freiburg)	Agarosegelelektrophorese
	Elektrophorese-Powerpack P24	Biometra (Göttingen)	Agarosegelelektrophorese, SSCP
	E 835	Consort	SSCP
Schüttelwasserbad	VX8	Jahnke & Kunkel	DNA-Extraktion
Thermocycler	Thermocycler	Biometra (Göttingen)	PCR
	T-Gradient	Biometra (Göttingen)	PCR
UV-Transilluminator	Fluo_Link (TFL-20M, 312 nm)	MWG Biotech (Eberstadt)	Betrachtung der gefärbten Gele

Waage	SAC 64	SAC	Herstellung der Gele, Lösungen
	PM 300	Mettler	Herstellung der Lösungen
Zentrifugen	RC5C	Sorvall Instruments	DNA-Extraktion
	TDX Zentrifuge	ABBOTT Diagnostics Division	Reinigung des PCR-Produkts
	IKA- COMBIMAG RG0	IKA-Werk (Staufen)	Agaroseelektrophorese

Tabelle 12: Geräte-, Hersteller-, und Verwendungsangabe

4.2.7 Software

Experimentelle Arbeit: Gene Runner Version 3.05

Statistische Auswertung: FastEHPlus
SAS package 8.1
Finetti

4.3 Methoden

4.3.1 DNA-Extraktion

Allgemein:

Um in einer genetischen Untersuchung mit Nukleinsäuren in Form von DNA arbeiten zu können, müssen diese Moleküle zunächst sicher aus Zellen isoliert werden.

Ein relativ einfaches Verfahren, DNA zu gewinnen, besteht darin, sie aus Vollblut bzw. den darin enthaltenen Leukozyten zu extrahieren.

Den ersten Schritt einer DNA-Extraktion stellt das Aufbrechen des Zellmaterials dar. Wichtig ist hierbei, dass dieser Schritt vorsichtig vollzogen wird, um die DNA-Moleküle nicht zu zerstören. Durch Zentrifugieren können nun die gelösten Zellbestandteile entsprechend ihrer Größe und ihres Gewichtes voneinander getrennt werden. Größere und schwerere Komponenten, wie z.B. Kerne oder nicht aufgebrochene Zellen wandern durch die Wirkung der Zentrifugalkraft schneller zum Boden des Zentrifugalröhrchens und bilden dort einen Niederschlag, das Sediment. Leichtere Komponenten, wie kleine freie Proteine und das Zytoplasma bleiben hingegen im Überstand zurück, welcher verworfen werden kann. Die Zellproteine können mit Hilfe von Enzymen gespalten und durch eine Salzlösung ausgefällt werden. Durch Zentrifugation können die Proteine von den Nukleinsäuren, die überwiegend in der oberen wässrigen Phase zurückbleiben, getrennt werden. Der Überstand, der die Nukleinsäuren enthält wird mit Propanol versetzt, wodurch der DNA-Faden kondensiert und sichtbar wird. Zuletzt wird der DNA-Faden in einem geeigneten Puffer gelöst und kann, nachdem eine photometrische Konzentrationsbestimmung und eine anschließende Verdünnung durchgeführt wurde, für analytische Zwecke genutzt werden.

Durchführung:

Die DNA-Isolation erfolgt aus Leukozyten nach der Aussalzungsmethode von Miller (1988). Verarbeitet wird peripheres venöses Blut, welches mit EDTA vermischt wird um eine Koagulation des Blutes zu verhindern.

Zunächst mischt man in einem Falconröhrchen ca. 10 ml frisches Vollblut mit 30 ml Lysispuffer, wodurch die Zellen lysiert werden. Das Gemisch wird nun 15 Minuten auf Eis gelegt und im Anschluss 15 Minuten bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Sediment, in dem sich unter anderem die Zellkerne

und die DNA-haltigen Mitochondrien befinden, wird mit 10 ml Kernlysispuffer versehen und vermischt, anschließend mit 650 µl 10 % SDS und schließlich mit 500µl Pronase E versehen, welche die in dem Gemisch befindlichen Proteine abbaut. Nachdem das Gemisch bei 37°C in einem Schüttelwasserbad über Nacht inkubiert worden ist, werden 3,5 ml gesättigte NaCl-Lösung hinzugefügt und das Falconröhrchen 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Im Anschluss zentrifugiert man das Gemisch bei Raumtemperatur 2-4 mal je 20 Minuten bei 4000rpm, wobei der Überstand jeweils umgefüllt und erneut zentrifugiert wird. Dadurch werden die im Sediment befindlichen Proteinen, die durch die Salzlösung ausgefällt wurden, von den im Überstand befindlichen DNA-Molekülen getrennt. Der Überstand wird nun in einem neuen Falconröhrchen mit ca. 7,5 ml 2-Propranol versetzt. Mit Hilfe von 2-Propranol kann die Nukleinsäure ausgefällt werden und der DNA-Faden wird sichtbar. Dieser DNA-Faden wird mit einer 10 µl Pipette in ein autoklaviertes Nuncröhrchen gegeben, wobei der Deckel des Röhrchens nicht völlig geschlossen werden darf, damit die verbleibenden Reste des Propranols verdunsten können und der DNA-Faden trocknen kann.

Die DNA-Extraktion ist schließlich durch Hinzufügen von 500 µl 1xTE-Puffer abgeschlossen. Die Nukleinsäure liegt nun in gelöster Form vor.

DNA-Konzentrationsbestimmung

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

4.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Allgemein:

Im Jahre 1985 entwickelte Kary Mullis das Verfahren der Polymerasenkettenreaktion (PCR = engl.: *polymerase chain reaction*), mit dessen Hilfe die *in vitro* Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen möglich ist. Mittlerweile gehört diese Technik zu den Standardmethoden der Molekularbiologie.

Folgende Schritte werden bei der PCR durchlaufen:

Zunächst wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf ca. 90°C denaturiert, wobei er sich in seine beiden Einzelstränge aufspaltet. Im Anschluss erfolgt eine Abkühlung des Ansatzes auf eine Temperatur, die eine komplementäre Bindung zweier

synthetischer Oligonukleotide, sogenannter *Primer*, an je ein 5`-Ende der Nukleinsäureeinzelstränge ermöglicht. Eine DNA-Polymerase verlängert in Gegenwart von Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTP) unter richtigen Reaktionsbedingungen die *Primer* entlang der einzelsträngigen, denaturierten DNA-Matrix und lässt somit neue DNA-Stänge entstehen, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist.

Dieser Reaktionszyklus bestehend aus

- Denaturierung des DNA-Doppelstranges durch Erhitzung auf 90°C,
- *Primer*-Anlagerung bei ca. 50°C,
- Extension zu neuen Doppelsträngen mit Hilfe einer DNA-Polymerase unter erneuter Erwärmung auf ca. 70°C

wird nun mehrfach wiederholt. Es ergibt sich daraus eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle. Mit Hilfe hitzestabiler DNA-Polymerasen und der Entwicklung von Geräten, die für einen zyklischen Temperaturwechsel sorgen, wurde es möglich, die PCR zu automatisieren, was den Arbeitsaufwand erheblich reduziert und entscheidend zum Erfolg der PCR beigetragen hat.

Standard-PCR

Der Standard-PCR-Reaktionsansatz zur Vervielfältigung des IVS4-1008ins(T)/del(T) tragenden Abschnittes im Rahmen enthielt folgende Reagenzien:

Reagenzien	Menge:
7,5 mM MgCl ₂ -Puffer	2,5 µl
dNTPs (je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	1 µl
Taq-Polymerase (0,5 U)	1 µl
<i>Primer forward</i> : K-T ins 4F (10 pmol/µl)	0,7 µl
<i>Primer reverse</i> : K-T ins 4R (10 pmol/µl)	0,7 µl
DNA	2 µl
H ₂ O	17,1 µl

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

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	1x
95°C	45 sec	
59°C	45 sec	35x
72°C	45 sec	
72°C	3 min	1x

Der PCR-Reaktionsansatz zur Vervielfältigung des 304192G/A tragenden Abschnittes lautete folgendermaßen:

Reagenzien	Menge:
7,5 mM MgCl ₂ -Puffer	2,5 µl
dNTPs (je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	1 µl
Taq-Polymerase (0,5 U)	1 µl
<i>Primer forward</i> : PromG/A-F (10 pmol/µl)	1 µl
<i>Primer reverse</i> : PromG/A-R (10 pmol/µl)	1 µl
DNA	2 µl
H ₂ O	16,5 µl

Das Temperaturprofil im *Thermocycler* wurde folgendermaßen ausgewählt:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	1x
94°C	45 sec	
60,6°C	45 sec	35x
72°C	45 sec	
72°C	3 min	1x

Der PCR-Reaktionsansatz zur Vervielfältigung des Cx36 Ex2 tragenden Abschnittes enthielt folgende Reagenzien:

Reagenzien	Menge:
7,5 mM MgCl ₂ -Puffer	2,5 µl
dNTPs (je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	1 µl
Taq-Polymerase (0,5 U)	1 µl
<i>Primer forward</i> : Ex2 -4F (10 pmol/µl)	1 µl
<i>Primer reverse</i> : Ex2- 4R (10 pmol/µl)	1 µl
DNA	1 µl
H ₂ O	17,5 µl

Das Temperaturprofil im *Thermocycler* wurde folgendermaßen ausgewählt:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	1x
95°C	45 sec	
58,4°C	45 sec	35x
72°C	45 sec	
72°C	3 min	1x

ARMS (*amplification refractory mutation system*)-PCR:

Die ARMS-PCR stellt eine Möglichkeit dar, eine bereits bekannte Mutation zu analysieren. Dieselbe DNA wird in zwei getrennten Reaktionen amplifiziert, wobei jeweils ein *Primer* für eines von zwei Allelen spezifisch ist, d.h. die 3'-Nukleotide dieser *Primer* sind nur zu je einem Allel komplementär.

Die PCR-Produkte werden anschließend in einer Agaroseelektrophorese aufgetrennt und durch eine Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht. Auf diese Weise lässt sich ohne Anwendung aufwendiger Verfahren erkennen, welche Allele in den DNA-Proben vorhanden sind.

Der Reaktionsansatz der ARMS-PCR zur Detektierung der Punktmutation 306377G/A lautete folgendermaßen:

Reagenzien	Menge:
7,5 mM MgCl ₂ -Puffer	2,5 µl
dNTPs (je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	1 µl
Taq-Polymerase (0,5 U)	1 µl
<i>Primer forward</i> : UTR-F (10 pmol/µl)	1 µl
<i>Primer reverse</i> : UTR-C-R (10 pmol/µl)	1 µl
UTR-T-R (10pmol/µl)	1 µl
DNA	1 µl
H ₂ O	17,5 µl

Der *reverse Primer* UTR-C-R enthielt am Ende der Sequenz ein C, wohingegen der UTR-T-R *reverse Primer* am Ende ein T enthielt.

Die Temperatureinstellung im *Termocycler* wurde wie unten beschrieben gewählt:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	1x
95°C	45 sec	
52,2°C	45 sec	35x
72°C	45 sec	
72°C	3 min	1x

4.3.3 Reinigung des PCR-Produkts

Allgemein:

Mit Hilfe verschiedener Waschpuffer werden die amplifizierten DNA-Fragmente von Puffersalzen und anderen Zusätzen, die sich ebenfalls im PCR-Endprodukt befinden, befreit.

Die DNA-Fragmente bleiben schließlich an einem Filter, der sich innerhalb sogenannter Spinsäulen befindet, gebunden und werden dann in ein Sammelgefäß eluiert.

Durchführung:

Die Reinigung der Amplikons erfolgte unter Verwendung des Quiaquick PCR-Purification Kit® der Firma QIAGEN. Das PCR-Endprodukt wird mit 125 µl (5faches Volumen des PCR-Ansatzes) PB-Puffer (Bindungspuffer) vermischt, der Ansatz auf eine Spinsäule gegeben und bei 13000 rpm für 60 sec zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen. 750 µl PE-Puffer (Waschpuffer) werden dem Sediment hinzugegeben und bei 13000 rpm für 60 sec zentrifugiert. Nachdem das Eluat erneut verworfen wurde, wird die scheinbar leere Säule bei 13000 rpm für 2-3 min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Nun trägt man vorsichtig 30 µl EB-Puffer (Elutionspuffer) auf die Membran der Spinsäule auf und lässt den Puffer ca. 60 sec bei Raumtemperatur wirken. Die Elution der gereinigten DNA-Fragmente erfolgt durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 60 sec in ein sauberes Sammelgefäß.

4.3.4 Restriktion

Allgemein:

Ein wichtiger Fortschritt für die Analyse von DNA war die Entdeckung von Restriktionsenzymen. Mittlerweile sind über 100 derartiger Enzyme bekannt. Es handelt sich hierbei um aus Bakterien isolierte Endonukleasen, die als Teil eines Schutzmechanismus eingedrungene, artfremde DNA zerstören. Jedes Enzym erkennt dabei eine spezifische DNA-Zielsequenz. Die Erkennungssequenzen verschiedener Restriktionsenzyme können unterschiedliche Längen besitzen, wobei sie meist aus 4-8 Basen bestehen. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen ist es möglich, Punktmutationen zu detektieren. Eine Punktmutation kann entweder eine neue Schnittstelle erzeugen oder eine zerstören, indem sie die Erkennungsregion des Enzyms verändert. Nach Restriktion und anschließender Agaroseelektrophorese lassen sich folglich unterschiedlich große DNA-Fragmente auftrennen, die einen Rückschluss auf das Vorhandensein einer Mutation erlauben.

Für die Analyse der jeweiligen Punktmutationen mit Hilfe der Restriktionsenzyme ist es somit wichtig zu wissen, ob ein Enzym bei Vorliegen einer Mutation bzw. des jeweiligen Wildtyps das PCR-Produkt schneidet. Somit ist die Kenntnis der durch den Enzymverdau entstehenden Fragmentgrößen nötig, um nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente beurteilen zu können, ob eine bestimmte Punktmutation vorliegt.

Die jeweiligen Fragmentgrößen des durch die Endonukleasen geschnitten bzw. nicht geschnittenen PCR-Produkts werden in folgender Tabelle aufgezeigt:

Untersuchter Polymorphismus		CX36 Ex2
Restriktionsenzym		Hinf I
Fragmentgröße	Ungeschnittenes PCR-Produkt	256 bp
	Homozygoter Wildtyp	220 bp 36 bp
	Heterozygot	256 bp 220 bp 36 bp
	Für Mutation homozygot	256 bp

Tabelle 13: Fragmentlängen in Basenpaaren

Durchführung:

Für den jeweiligen Restriktionsansatz wird das Enzym und das zu untersuchende PCR-Produkt auf Eis gelegt. Folgende, in Tabelle 14 dargestellten Substanzen werden für die Restriktion verwendet. Im Anschluss wird der Restriktionsansatz in einem Wasserbad inkubiert.

Polymorphismus	CX36 Ex2
Enzym	Hinf I
Enzymmenge	1 µl
PCR Menge des PCR-Produktes	CX36 Ex2-PCR 10 µl
Puffer	NE-Buffer 2
Puffermenge	2 µl
<i>Aqua dest.</i>	7 µl
Inkubations-temperatur	37°C
Inkubationsdauer	1 h

Tabelle 14: Für Restriktion verwendete Substanzen, Inkubationstemperatur und -dauer. Die Mengenangaben beziehen sie jeweils auf einen 20 µl-Reaktionsansatz.

4.3.5 Elektrophoretische Auftrennung und Nachweis von DNA- Fragmenten

4.3.5.1 Agarosegelelektrophorese

Allgemein:

Die Agarosegelelektrophorese ist eine der einfachsten Möglichkeiten, die per PCR amplifizierten und bei Bedarf im Anschluss restringierten DNA-Fragmente aufzutrennen und mit Hilfe bestimmter Farbstoffe und UV-Bestrahlung direkt sichtbar zu machen, um ihre Größe zu beurteilen.

Prinzipiell macht sich die Elektrophorese die Eigenschaft geladener Substanzen zunutze, die in einem elektrischen Feld zum Pol entgegengesetzter Ladung wandern. Das elektrische Feld wird in einer Elektrophoresekammer zwischen zwei Elektroden erzeugt. Die DNA-Fragmente, welche durch PCR und eventuell durch eine anschließende Restriktion gewonnen wurden, werden auf das Trägermaterial, das Agarosegel aufgetragen. DNA-Moleküle sind bei neutralem pH-Wert negativ geladen, da jedes Nukleotid eine negativ geladene Phosphatgruppe trägt, und bewegen sich somit im elektrischen Feld zur Anode. Die Agarose, ein pflanzliches Polysaccharid, bildet im Gel netzartige Strukturen und setzt somit den wandernden DNA-Fragmenten einen Widerstand entgegen. Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld ist daher auch von verschiedenen Faktoren, wie Größe der DNA-Fragmente, molekulare Eigenschaften des Elektrophoresesystems (z.B. Porengröße der Agarose-Gelmatrix) und Ladungsstärke abhängig.

Da bei der Gelelektrophorese eine gerichtete Diffusion der Moleküle stattfindet, bilden sich Banden aus DNA-Fragmenten gleicher Größe, die mit Hilfe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Anhand sogenannter DNA-Leitern, welche zeitgleich mit den DNA-Proben aufgetragen werden, wird die Größe der jeweiligen DNA-Fragmente beurteilt. Um bereits während der Elektrophorese zu erkennen, wie weit die DNA-Fragmente auf dem Agarosegel gewandert sind, und um die DNA-Produkte zu „beschweren“, damit sie in den Geltaschen bleiben, gibt man bereits vor Beginn der Elektrophorese den DNA-Proben einen sogenannten „*loading-buffer*“ hinzu.

Bromphenolblau bewegt sich 2,2 mal schneller, Xylenecyanolblau etwa genauso schnell wie ein 200bp-DNA-Fragment.

Durchführung:

Die Elektrophorese der per PCR amplifizierten, bzw. durch Restriktion gewonnenen DNA-Fragmente wird in 1,5%-igen Agarosegelen durchgeführt.

1,5 g Agarose wird mit 100 ml 1xTAE-Puffer gekocht, bis sich die Agarose vollständig auflöst. Das entstandene Agarosegel wird auf ca. 50°C abgekühlt und mit 2 µl Ethidiumbromid versehen. Nun wird das Gel in eine Gießwanne mit eingesetztem Kamm gegeben, bis eine Schichthöhe von 1 cm erreicht ist. Bei Raumtemperatur kühlt das Gel weiter ab und erstarrt nach ca. 30 min. Die Kämmen werden nun entfernt und die Agarosegele können in eine Gel-Elektrophoresekammer die mit 1x TAE-Puffer gefüllt ist gelegt werden. 25 µl PCR-Produkt werden mit 5 µl *Gel-loading-buffer* versehen und 17 µl dieses Gemisches in die nach Entfernung des Kammes entstandenen Taschen gefüllt. Ein Fragmentgrößenmarker, die sogenannte DNA-Leiter, wird in je eine Tasche pro Taschenreihe aufgetragen, um die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente am Ende der Elektrophorese beurteilen zu können. Bei einer Spannung von 110 V werden die DNA-Fragmente ca. 60 min elektrophoretisch aufgetrennt.

Dokumentation:

Das mit Ethidiumbromid versetzte Gel wird nach Abschluss der Elektrophorese auf den UV-Transilluminator gelegt und die entstandenen Banden durch UV-Bestrahlung sichtbar gemacht. Eine Photographie des Gels dokumentiert die experimentellen Ergebnisse.

4.3.5.2 SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*)-Analyse

Allgemein:

Der Nachweis von Punktmutationen und Polymorphismen in der DNA einzelner Gene ist eine wichtige Technik der Molekularbiologie.

Durch die SSCP-Analyse, die einen weiteren Typ der Gelelektrophorese darstellt, ist es möglich, Punktmutationen und Polymorphismen nachzuweisen, ohne sie näher zu beschreiben.

Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass sich ein Molekül in einer Gelmatrix in Abhängigkeit von seiner Größe, Ladung und Form elektrophoretisch bewegt. Einzelsträngige DNA wandert durch ein nicht denaturierendes Polyacrylamidgel,

wobei der DNA-Einzelstrang unter nativen, d.h. nicht denaturierenden Bedingungen durch intramolekulare Basenpaarung eine Konformation ausbildet, die durch ihre Primärstruktur bestimmt ist. Eine Änderung der Primärstruktur durch eine einzelne Punktmutation, in diesem Fall eine Insertion der Base Thymin, bedingt eine unterschiedliche Faltung des DNA-Einzelstranges und somit auch eine Änderung seiner Wanderungseigenschaften im Gel.

Die SSCP-Methode wird in Kombination mit der PCR-Technik durchgeführt, wobei die Amplikons eine Länge von 400 bp nicht überschreiten sollten und sie – vor der Durchführung der Elektrophorese - mit sogenannten „*loading-buffer*“ versetzt und denaturiert werden müssen.

Da die Konformation eines DNA-Einzelstranges von der Temperatur, der Ionen- und Lösungsmittelkonzentration abhängig ist, müssen die Bedingungen für die SSCP-Analyse während der Elektrophorese konstant bleiben. Besonders wichtig ist, dass die Temperatur während des Vorgangs nicht ansteigt, was z.B. durch die Verwendung dünner Gele, die nur geringe Strommengen durchlassen, sowie eine Kühlung während der Elektrophorese möglich ist.

Durchführung:

Bei der Herstellung der PAA-Gele werden N,N-Bisacrylamid- und Acrylamidmonomere mit Hilfe von Amoniumpersulfat und TEMED quervernetzt, wobei Gele mit definierter Porengröße entstehen. Durch Variation der Anteile von Bisacrylamid und Acrylamid kann die Porengröße beeinflusst werden. In diesem Fall wurden ausschließlich 10-prozentige PAA-Gele (40 ml) mit einem Verhältnis von Bisacrylamid:Acrylamid von 1:49 verwendet.

Diese Lösung für die PAA-Gele wird zwischen zwei durch sogenannten *Spacer* auseinandergehaltenen Glasplatten gegossen, und ein Kamm zur Erzeugung von Taschen für die PCR-Produkte zwischen die Glasplatten geklemmt. Nach c.a.1 h sind die Gele polymerisiert, die Glasplatten können in das Elektrophoresesystem gespannt und die Elektrophoresekammer kann mit 0,5xTBE-Puffer gefüllt werden.

8 µl PCR-Produkts wird nun mit 12 µl „*loading-buffer*“ versetzt und bei einer Temperatur von 95°C 10 min denaturiert und anschließend auf Eis gelegt. Nun können die entstandenen DNA-Einzelstränge in die Taschen der getrockneten Gele aufgetragen werden, nachdem die eingesetzten Kämmen entfernt worden sind. Als

Referenzwert dient eine DNA-Probe, welche sicher die zu untersuchende Insertion aufweist.

Die Elektrophorese läuft bei einer Spannung von 70 V und einer konstanten Temperatur von 4°C (im Kühlraum). Nach Ablauf von ca.14 h löst man die Gele von den Glasplatten und färbt sie mit SYBR-Gold®, einem Farbstoff der sich an die einzelsträngige DNA bindet und sensitiver als Ethidiumbromid ist.

Dokumentation:

Im UV-Licht des UV-Transilluminators werden die Gele unter Verwendung eines speziellen Farbfilters fotografiert und die entstandenen Banden mit dem Referenzwert verglichen. Auf diese Weise kann beurteilt werden, welche Probe die Insertion ebenfalls aufweist.

4.4 Statistische Methoden

Mit Hilfe des Programmes **FastEH** (*estimated haplotype*), welches auf einem Permutationstest basiert, wurden Genotypfrequenzen geschätzt (Zhao JH, 2000; Zhao JH und Sham PC, 2002). Nachdem anhand von Allelfrequenzen Genotypfrequenzen geschätzt wurden, wurde mittels Simulation kalkuliert, ob ein Genotyp signifikant häufiger in der Fallgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe vorkommt.

Bei der Einzelanalyse aller Allele kam der **Chi²-Test** und der **Armitage Trend Test** zur Anwendung. Bei beiden Tests wurde das *SAS statistical package SAS/STAT*, version 8.1 (*SAS Institute Inc., Cary, NC, USA*) verwendet.

Chi²-Tests dienen zur Analyse von Häufigkeitsunterschiede bezüglich der Ausprägung eines oder mehrerer Merkmale. So kann mit Hilfe einer logistischen Regression ermittelt werden, wie stark das Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein bestimmter Faktoren die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung- bzw. Nicht-Erkrankung beeinflusst.

Der *Cochran-Armitage-Test* prüft einen Trend für eine binominal verteilte Variable (ja/nein- Variable) über die Levels einer zweiten Variable (Freidlin B, 2002; Slager SL, 2001).

Um das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der Genotypen in der Fall- und Kontrollgruppe zu bestimmen, kam das **Programm Finetti** (Wienker TF, persönliche Mitteilung) zur Anwendung. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde für alle Varianten bei Patienten- und Kontrollgruppe bestimmt. Ein p-Wert < 0,0042 gilt hierbei als signifikant.

5 Ergebnisse

Mutationsanalysen des Gens *SLC12A6* führten zur Detektion zweier seltener G-Varianten im Bereich des Promotors und der 5'-UTR-Region, sowie einer Thymidininsertion in Intron 4 des Gens (Meyer J, 2005). Im Rahmen dieser Assoziationsstudie wurden diese Varianten an Patienten- und Kontrollgruppe untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die aufgeführten Ergebnisse sind eingebettet in den Forschungsergebnissen unserer gesamten Arbeitsgruppe (Meyer J, 2005), da sie auch in der Gesamtheit zu beurteilen und zu verstehen sind.

5.1 Promotor- und 5'-UTR-Variante

Die durch Mutationsanalysen gefundenen zwei seltenen Varianten 32416574G ([CTTTAC(A/G)TTAGGA], 5'-UTR)* und 32418760G ([TAAAGG(A/G)CTACCT], Promotor)* fanden sich bei allen betroffenen Familienmitgliedern der Familie 11 (siehe Abbildung 8). Weiterhin wurde je ein an katatoner Schizophrenie erkranktes Mitglied der restlichen 11 Familien, die an der im Jahre 2000 und 2001 durch Stöber *et al.* durchgeführten Genomuntersuchung teilnahmen, bezüglich dieser Varianten genotypisiert (Stöber G, 2001; Stöber G, 2000). Die zwei seltenen Varianten konnten jedoch bei keinem Patienten der übrigen 11 Familien gefunden werden.

Insgesamt wurden hinsichtlich 32416574G 186 Patienten und 346 Kontrollpersonen, hinsichtlich 32418760G 186 Patienten und 318 Kontrollpersonen genotypisiert.

5.2 Thymidininsertion im Intron 4

Die seltene Thymidininsertion IVS4+1008ins(T) wurde bei sieben erkrankten Mitgliedern der Familie 11 nachgewiesen, weshalb wir davon ausgingen, dass sie neben den genannten Varianten 32416574G und 32418760G eine mögliche funktionelle Relevanz bei der Entstehung der Erkrankung besitzen könne.

* Nummerierung nach UCSC Browser Golden Path 05.2004, Gen Bank *accession number* AF108831;

Insgesamt wurden 181 Patienten und 266 Kontrollpersonen bezüglich der seltenen Thymidininsertion untersucht.

5.3 Zusammenfassung

Die Varianten 32416574G, 32418760G und die seltene Thymidininsertion IVS4+1008ins(T) weisen ein starkes Kopplungsungleichgewicht (LD=*linkage disequilibrium*) auf. Somit wurde vermutet, dass eine Assoziation zwischen den Haplotypen und beiden Erkrankungen existiert.

Tabelle 15 fasst die Ergebnisse des paarweise berechneten Kopplungsungleichgewichtes zwischen allen 3 Polymorphismen des *SLC12A6* zusammen.

Marker	32418760G	32418760G	32416574G
In LD mit	32416574G	IVS4+1008ins(T)	IVS4+1008ins(T)
Anzahl der Patienten und Kontrollen	503	410	416
Standardisierte Messung für LD, D' (S.E)	1.0000 (±0.0002)	0.7884 (±0.1061)	0.9056 (±0.0875)
Test für LD χ^2, d.f., p- Wert	$\chi^2=706.55, 1d.f.$, p=0,0000	$\chi^2=146.79, 1d.f.$, p=0.0000	$\chi^2=143.88, 1d.f.$, p=0.0000
χ^2-Statistik für Marker-Marker Assoziation LR χ^2, p- Wert	$\chi^2=92.92, 1 d.f.$, p=0,0000	$\chi^2=41.66, 1d.f.$, p=0.0000	$\chi^2=40.52, 1 d.f.$, p=0.0000

Tabelle 15: Das paarweise berechnete Kopplungsungleichgewicht (LD=*linkage disequilibrium*) zwischen allen 3 Polymorphismen des *SLC12A6*; D', Standardisierte Messungen des Kopplungsungleichgewichtes; Wahrscheinlichkeitsrate (LR=*likelihood ratio*), χ^2 -Statistik für Marker- Assoziation aller drei Marker: LR $\chi^2=135.13$, d.f.=4, p- Wert=0.0000

Tabelle 16 fasst die Assoziationen des Haplotyps der *SLC12A6*-Polymorphismen mit Schizophrenie und bipolaren Erkrankungen zusammen.

Haplotypen	32418760G(G/A)- 32416574G(G/A)	32418760G(G/A)- IVS4+1008ins(T)/del(T)	32416574G(G/A)- IVS4+1008ins(T)/del(T)	32416574G(G/A)- 32418760G(G/A)- IVS4+1008ins(T)/del(T)
Assoziation mit <u>schizophrenen</u> <u>Psychosen</u>	Patienten (n=114) Kontrollen (n=317) P=0.2467	Patienten (n=111) Kontrollen(n=229) P=0.075	Patienten (n=111) Kontrollen(n=235) P=0.2176	Patienten (n=111) Kontrollen(n=228) P=0.1382
Test für Heterogenität. Empirischer p-Wert				
Assoziation mit <u>bipolaren Erkrankungen</u>	Patienten (n=72) Kontrollen (n=317) P=0.0016	Patienten (n=70) Kontrollen (n=229) P=0.0017	Patienten (n=70) Kontrollen (n=235) P=0.0175	Patienten (n=70) Kontrollen(n=228) P=0.0022
Test für Heterogenität. Empirischer p- Wert				
Assoziation mit <u>schizophrenen</u> <u>Psychosen und mit</u> <u>bipolaren Erkrankungen</u>	Patienten (n=186) Kontrollen(n=317) P=0.0064	Patienten (n=181) Kontrollen(n=229) P=0.0042	Patienten (n=181) Kontrollen(n=235) P=0.0266	Patienten (n=181) Kontrollen(n=228) P=0.0118
Test für Heterogenität. Empirischer p-Wert				

Tabelle 16: Assoziation der oben genannten Haplotypen mit schizophrenen Psychosen und bipolaren Erkrankungen. n= Anzahl der Individuen

Der Haplotyp bestehend aus allen drei Varianten ist assoziiert mit der untersuchten Untergruppe bestehend aus Patienten mit bipolaren Erkrankungen.

Für die Haplotypen, die 2 Varianten beinhalten wurde eine Assoziation mit bipolaren Erkrankungen gefunden, wenn die Variante 32418760G beinhaltet ist (in Tabelle 16 dick gedruckt). Weiterhin zeichnet sich eine Assoziation dieses Haplotyps mit beiden Gruppen, d.h. der Gruppe bestehend aus Patienten, die an schizophrener Psychose erkrankt sind und der Untergruppe bestehend aus Patienten, die an bipolaren Erkrankungen leiden ab.

Tabelle 17 und 18 zeigt die Assoziation der Allele und Genotypen der *SLC12A6*-Polymorphismen mit Schizophrenie und bipolaren Erkrankungen.

Allele	Kontrollen n (%)	Schizophrenie n(%)	Statistik Schizophrenie vs. Kontrollen	Bipolare Erkrankungen n(%)	Statistik Bipolare Erkrankungen v.s. Kontrollen	Alle Fälle n(%)	Statistik Alle Fälle v.s. Kontrollen
32418760A	632 (99,4)	223 (97,8)	Exakter Test, p= 0,0596 <i>Odds ratio</i>	136 (94,4)	Exakter Test, p<0,0001 <i>Odds ratio</i>	359 (96,5)	χ^2 Test, 1d.f., $\chi^2=11,63$; p=0,0007 <i>Odds ratio</i>
32418760G	4 (0,6)	5 (2,2)	3,54 (0,94-13,31)	8 (5,6)	9,29 (2,76-31,31)	13 (3,5)	5,72 (1,85-17,68)
32416574A	686 (99,6)	224 (98,2)	Exakter Test, p= 0,0678 <i>Odds ratio</i>	139 (96,5)	Exakter Test, p= 0,0051 <i>Odds ratio</i>	363 (97,6)	Exakter Test, p= 0,0053 <i>Odds ratio</i>
32416574G	3 (0,4)	4 (1,8)	4,10 (0,91-18,46)	5 (3,5)	8,26 (1,95-34,97)	9 (2,4)	5,69 (1,53-21,16)
IVS4+1008 del(T)	505 (94,9)	205 (92,3)	χ^2 Test, 1d.f., $\chi^2=1,90$; p=0,1680 <i>Odds ratio</i>	125 (89,3)	χ^2 Test, 1d.f., $\chi^2=6,02$; p=0,0142 <i>Odds ratio</i>	330 (91,2)	χ^2 Test, 1d.f., $\chi^2=4,95$; p=0,0260 <i>Odds ratio</i>
IVS4+1008ins(T)	27 (5,1)	17 (7,7)	3,54 (0,94-13,31)	15 (10,7)	2,24 (1,16-4,35)	32 (8,8)	1,81 (1,07-3,08)

Tabelle 17: Assoziation der Allele der *SLC12A6*-Polymorphismen mit Schizophrenie und bipolaren Erkrankungen
Odds ratio, Heterozygotie als Risiko v.s. Homozygotie (95% Konfidenzintervall) .

Genotypen	Kontrollen n (%)	Schizophrenie n(%)	Statistik Schizophrenie vs. Kontrollen	Bipolare Erkrankungen n(%)	Statistik Bipolare Erkrankungen v.s. Kontrollen	Alle Fälle n(%)	Statistik Alle Fälle v.s. Kontrollen
32418760A/A	314 (98,7)	109 (95,6)	Exakter Test, p= 0,0586	64 (88,9)	Exakter Test, p= 0,0000	173 (93,0)	<i>Armitage trend test</i> , Z=-3,44 / p=0,0006
32418760A/G	4 (1,3)	5 (4,4)	<i>Odds ratio</i> 3,60 (0,95-13,65)	8 (11,1)	<i>Odds ratio</i> 9,81 (2,87-33,57)	13 (7,0)	<i>Odds ratio</i> 5,9 (1,89-18,37)
32418760G/G	0 (0,0)	0 (0,0)		0 (0,0)		0 (0,0)	
32416574A/A	343 (99,1)	110 (96,5)	Exakter Test, p= 0,0671	67 (93,1)	Exakter Test, p= 0,0049	177 (95,2)	Exakter Test, p= 0,0051
32416574A/G	3 (0,9)	4 (3,5)	<i>Odds ratio</i>	5 (6,9)	<i>Odds ratio</i>	9 (4,8)	<i>Odds ratio</i>
32416574G/G	0 (0,0)	0 (0,0)	4,12 (0,92-18,86)	0 (0,0)	8,53 (1,99-36,56)	0 (0,0)	5,81 (1,55-21,74)
IVS4+1008ins(T)/ins(T)	0 (0,0)	0 (0,0)	<i>Armitage trend test</i> , Z=-1,42	0 (0,0)	<i>Armitage trend test</i> , Z=-2,54	0 (0,0)	<i>Armitage trend test</i> Z=-2,31
IVS4+1008ins(T)/del(T)	27 (10,1)	17 (15,3)	p=0,1546 <i>Odds ratio</i>	15 (21,4)	p=0,0111 <i>Odds ratio</i>	32 (17,7)	p=0,0210
IVS4+1008del(T)/del(T)	239 (89,9)	94 (84,7)	1,6 (0,83-3,07)	55 (78,6)	2,41 (1,20-4,84)	149 (82,3)	1,90 (1,10-3,30)

Tabelle 18: Assoziation der Genotypen der *SLC12A6*-Polymorphismen mit Schizophrenie und bipolaren Erkrankungen
Odds ratio, Heterozygotie als Risiko v.s Homozygotie (95% Konfidenzintervall).

Wie Tabelle 17 und 18 zeigen, sind die beiden G- Varianten seltener vertreten als die Thymidininsertion IVS4+1008ins(T), was wiederum zu einem selteneren Auftreten eines kombinierten Haplotyps führt.

Aufgrund der unterschiedlichen Häufigkeit der Varianten wurde weiterhin eine Einzelmarkeranalyse durchgeführt.

Diese zeigte eine Assoziation der Variante 32418760G mit bipolaren Erkrankungen und der Gruppe der schizophrenen Psychosen und bipolaren Erkrankungen (Tabelle 17 und 18). Weiterhin zeigte sich ein Tendenz für eine Assoziation zwischen diesen Gruppen und der Variante 32416574G.

Zur Überprüfung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes, wurde zusätzlich ein stiller *SNP*-Marker (GAG/GAA) in Codon 296 des *Connexin 36*-Gens (*CX36*) (gemäß Gene Bank *accession number* XM_007605), der von Meyer *et al.* im Jahre 2002 bereits ausführlich beschrieben wurde, bei 82 Patienten und 80 Kontrollpersonen untersucht. Das *Cx36*-Gen ist distal von *SLC12A6* gelegen (siehe auch Abbildung 9) und wurde von Meyer *et al.* bereits als Kandidatengen für katatone Schizophrenie ausgeschlossen (Meyer J, 2002).

Es zeigte sich eine nahezu identische Verteilung beider Allele des *CX36* bei Patienten (G/G: 65, G/A: 16, A/A: 1) und Kontrollpersonen (G/G: 63, G/A: 16, A/A: 1), so dass ein perfektes Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bei der Patienten- und Kontrollgruppe resultiert (unveröffentlichte Daten).

6 Diskussion

Die Ergebnisse zahlreicher Forschungsgruppen lassen schizophrene Psychosen als genetisch komplexe Erkrankungen erscheinen, die keinem monogenen Vererbungsmodus folgen. Neben genetischen Faktoren scheinen darüber hinaus auch Umweltfaktoren bei der Entstehung dieser Psychosen eine Rolle zu spielen (Riley BP, 2000; Risch, 1990; Tsuang, 1993).

Die periodische Katatonie, ein Subtyp schizophrener Psychosen, scheint hingegen in einem autosomal dominantem Modus vererbbar zu sein (Stöber, 2001). Aufgrund des dominierender Einflusses hereditärer Faktoren bei der Ausbildung des Krankheitsbildes ist die periodische Katatonie von besonderem Interesse, da es nun möglich erscheint, mit Hilfe molekulargenetischer Untersuchungen die Pathogenese dieser Erkrankung aufzudecken.

In einer von Stöber *et al.* durchgeführten genomweiten, nicht-parametrischen Kopplungsanalyse wurde die Region 15q14-15 zwischen den Markern D15S144 und D15S1028 mit einem LOD-Score von 3,57 ($p = 2.6 \times 10^{-5}$) (GENEHUNTER-PLUS) als Kandidatenregion für periodische Katatonie ermittelt (Stöber G, 2000). Desweiteren ergab sich in dieser Studie ein zweiter Locus auf Chromosom 22q13 mit einem LOD-Score von 1,85 ($p = 1.8 \times 10^{-3}$), was für eine genetische Heterogenität spricht (Stöber G, 2000). Nach den strengen Kopplungskriterien von Lander und Kruglyak ist somit eine Kopplung zu Chromosom 15q signifikant (LOD-score ≈ 3.6 oder nominaler p-Wert ≈ 0.00002), wohingegen sie zu Chromosom 22q nur zu vermuten ist (Lander E, 1995; Lander E, 1994). Parametrische Kopplungsanalysen unter einem autosomal dominanten Model bestätigten die Ergebnisse der nicht-parametrischen Kopplungsanalyse auf Chromosom 15q. Der Vorteil bei nicht-parametrischen Kopplungsanalysen ist die Tatsache, dass diese nicht die Kenntnis des Vererbungsmodus voraussetzen, sie sind somit modellfrei. Da auch bei der Schizophrenie kein klassischer Vererbungsmodus bekannt ist, sind nicht-parametrische Kopplungsanalysen für die Untersuchung dieser Erkrankung sehr gut geeignet.

Auch andere Forschungsgruppen gehen davon aus, dass der Bereich des Chromosoms 15q13-15 eine Suszeptibilitätsregion für erbliche schizophrene Psychosen und Schizophrenien in Verbindung mit dem Defizit, das akustisch

evozierte Potential P50 zu inhibieren, darstellt (Freedman R, 1997; Gejman PV, 2001; Riley BP, 2000).

Darüber hinaus gilt die chromosomale Region 15q14 als Kandidatenregion für bipolare Erkrankungen, die positiv auf das Psychopharmakon Lithium reagieren (Turecki G, 2001). Auch Ferreira *et al.* betrachten die chromosomale Region 15q14 als eine Kandidatenregion für bipolare Erkrankungen (Ferreira M, 2008).

Bereits im Jahre 2000 hatte Berrettini gezeigt, dass zahlreiche überlappende chromosomale Regionen existieren, die sowohl für schizophrene Psychosen als auch für bipolare Erkrankungen als Suszeptibilitätsregionen gelten (Berrettini W, 2000). Hierzu gehört neben der chromosomalen Region 18p11.2, 22q11-13, 13q32 und 10p14 auch der chromosomale Abschnitt 15q14-15 (Berrettini W, 2000; Freedman R, 1997; Gejman PV, 2001; Riley BP, 2000; Stöber G, 2000; Turecki G, 2001; Ferreira M, 2008).

Es finden sich auch weitere Gemeinsamkeiten zwischen schizophrenen Psychosen und bipolaren Erkrankungen, wie z.B. ein nahezu gleiches Manifestationsalter (Berrettini W, 2000). Weiterhin stellt die Bipolarität sowohl bei bipolaren Erkrankungen als auch bei der periodischen Katatonie ein charakteristisches klinisches Merkmal dar (Taylor MA, 2003).

Aufgrund der zahlreichen Gemeinsamkeiten zwischen bipolaren Erkrankungen und der periodischen Katatonie (siehe auch 2.1.7.2) ist es durchaus denkbar, dass im Bereich der gemeinsamen Kandidatenregion auf Chromosom 15q14-15 Polymorphismen existieren, die in der Pathogenese beider Erkrankungen involviert sind.

Auf der chromosomalen Region 15q14 befindet sich das Gen *SLC12A6* (Hiki K., 1999; Mount D.B., 1999; Race JE, 1999). Mutationsanalysen des Gens *SLC12A6* führten zur Detektion zweier seltener G-Varianten (32416574G, 32418760G) im Bereich der 5'-UTR-Region und des Promotors, sowie einer Thymidininsertion IVS4+1008ins(T) in Intron 4 des Gens. Untersucht wurden hierbei 2 an periodischer Katatonie erkrankte Patienten, die von einer großen Familie (Familie 11, siehe Abb.8) abstammen und 3 gesunde Kontrollpersonen (Meyer J, 2005).

Mit Hilfe dieser Assoziationsstudie soll nun aufgedeckt werden, ob diese Polymorphismen des *KCC3*-Gens in der Pathogenese der Schizophrenie oder/und bipolarer Erkrankungen involviert sind.

Da schizophrene Psychosen und bipolare Störungen Erkrankungen mit komplexen Vererbungsmodus sind, sind vor allem Assoziationsstudien zur Erforschung der genetischen Grundlagen sehr gut geeignet.

Im Folgenden soll das *KCC3*-Gen im Hinblick auf seine Rolle als Kandidatengen für schizophrene Psychosen und bipolare Erkrankungen beleuchtet werden. Anschließend werden die Ergebnisse dieser Assoziationsstudie, deren Deutung und schließlich die Einschränkungen dieser Studie diskutiert.

6.1 *SLC12A6* als Kandidatengen

Das Gen *SCL12A6* kodiert für den Kaliumchloridkanal *KCC3* und ist für den Na^+ -unabhängigen Transport von K^+ - und Cl^- -Ionen durch die Zellmembran verantwortlich. Der Kaliumchloridkanal *KCC3* ist u.a. im Bereich des zentralen Nervensystems, insbesondere des *Hippocampus*, in pyramidalen Neuronen des *Cortex* und cerebellären *Purkinje*-Zellen, des *Plexus choroideus*, der weißen Substanz der *Capsula interna*, des *Corpus callosum* und des Rückenmarks exprimiert.

Somit scheint das Gens nicht nur aufgrund seiner Lokalisation auf Chromosom 15q14, sondern auch aufgrund der Position seines Genproduktes im Bereich des zentralen Nervensystems ein sehr vielversprechendes Kandidatengen für bipolare Erkrankungen und schizophrene Psychosen darzustellen.

In einer von Howard *et al.* durchgeführten Studie zeigte sich, dass Mutationen des *KCC3*-Gens in der Pathogenese des sogenannten Andermann-Syndroms, einer progressiven sensomotorischen Neuropathie mit Agenesie des *Corpus callosum* involviert sind (Howard HC, 2002). Diese Erkrankung geht oft einher mit geistiger Retardierung und psychotischen Episoden (Casaubon LK, 1996; Filteau MJ, 1991; Howard HC, 2002).

Auch bei schizophrenen Patienten konnte eine Abnahme der Größe des *Corpus callosum* nachgewiesen werden (Highley JR, 1999; Innocenti GM, 2003).

Das *Corpus callosum* stellt eine Verbindungsstruktur zwischen den Hemisphären des Großhirns dar und dient dem Informationsaustausch und damit der Koordination

zwischen den beiden Hemisphären. Somit unterstreicht die beobachtete Größenreduktion des *Corpus callosum* bei schizophrenen Patienten die Hypokonnektivitätstheorie als Erklärungsmodell für die Entstehung schizophrener Psychosen (siehe 2.1.4.2). Da auch die Agenesie des *Corpus callosum* im Rahmen des Andermann-Syndroms mit Psychosen assoziiert ist, liegt die Vermutung nahe, dass Varianten des *KCC3*-Gens möglicherweise auch zu einer isolierten Entstehung einer Psychose, wie der Schizophrenie beitragen könnten.

Die beschriebene Größenreduktion des *Corpus callosum* bei Patienten mit Schizophrenie könnte infolge eines Verlustes interhemisphärischer Axone oder auch infolge einer Reduktion des Axondurchmessers bzw. des Durchmessers der Myelinscheide, z.B. aufgrund von Demyelinisierung aufgetreten sein (Innocenti GM, 2003). Der Verlust interhemispherischer Axone wiederum ist möglicherweise infolge einer Neurodegeneration verursacht worden.

Auch Funktionsstörungen des Kalium-Chloridkanals *KCC3* können eine Neurodegeneration zur Folge haben.

Es konnte gezeigt werden, dass *KCC3* eine wichtige Funktion bei der Regulierung des Zellvolumens erfüllt. Eine Zellschwellung infolge Hypotonität kann mit Hilfe einer regulierten Volumenabnahme durch K^+ - und Cl^- -Kanäle rückgängig gemacht werden. Hierbei kommt es zu einem Ausstrom von organischen Osmolyten, von K^+ und Cl^- aus der Zelle. (O'Neill WC, 1999). Unter anderem an Neuronen des *Hippocampus* konnte gezeigt werden, dass *KCC3* eine sehr wichtige Rolle in dieser regulierten Volumenabnahme erfüllt. Ein Verlust des *KCC3*-Proteins führt zu einer Beeinträchtigung der regulierten Volumenabnahme und somit zu einer Reduktion der Reaktionsmöglichkeit der Zelle auf osmotischen Stress, was eine Neurodegeneration zur Folge haben kann (Boettger T, 2003).

DNA-Microarray-Untersuchungen von *post mortem* Gewebe des dorsolateralen präfrontalen *Cortex* von schizophrenen Patienten zeigten, dass die Expression von bestimmten Genen verändert ist. Vor allem bei Genen, die involviert sind in neuronalen Myelinisierungsprozessen, neuronaler Entwicklung, Signaltransduktion, und Neurotransmission fand sich eine veränderte Expression in diesem Gewebe (Hakak Y, 2001). Gene, die in neuronalen Myelinisierungsprozessen involviert sind, werden vor allem in Oligodendrozyten exprimiert, so dass die Vermutung geäußert

wurde, dass möglicherweise Oligodendrozyten bei schizophrenen Patienten einen funktionellen Defekt aufweisen (Davis KL, 2003; Hakak Y, 2001). Oligodendrozyten vergrößern durch ihre isolierende Eigenschaften die neuronale Fortleitungsgeschwindigkeit und liefern des Weiteren trophische Faktoren, welche die neuronale Reifung und das Überleben der Axone gewährleisten. Da die myelinisierende Glia das axonale Zytoskelett reguliert, ist es möglich, dass Veränderungen der myelinisierenden Glia zu Abnormitäten im Bereich des Zytoskeletts führen, wie sie bereits bei Schizophrenen beschrieben sind (Hakak Y, 2001; Harrison PJ, 1999).

Unterstrichen wird die Vermutung einer Assoziation von schizophrenen Psychosen mit Myelinisierungsstörungen durch eine von Leegwater *et al.* durchgeführte Studie. Hierbei zeigte sich unter anderem, dass die Erkrankung der Megalenzephalischen Leukoenzephalopathie mit subcorticalen Zysten mit einer Demyelinisierungsstörung in Verbindung steht. Kennzeichen dieser autosomal rezessiven Erkrankung sind neben der Makrozephalie und motorischer Dysfunktion in Form von Ataxie und Spastik auch Schizophrenie-ähnliche Symptome (Leegwater PAJ, 2001).

Erst kürzlich konnte bestätigt werden, dass sich bei Patienten, die an schizophrenen Psychosen litten, Störungen im Bereich der Mikrostrukturen der weißen Substanz nachweisen lassen, die mit einer Dysfunktion von Genen die im Myelinisierungsprozess involviert sind, verbunden sein könnten (Andreone N, 2007). Die Vorstellung, dass es sich bei schizophrenen Psychosen um eine durch eine Myelinisierungsstörung verursachte Erkrankung handelt, wird durch folgende Beobachtung untermauert. Die Myelinisierung des präfrontalen *Cortex* findet im frühen Erwachsenenalter und später Jugend statt, dem Alter in dem sich auch die Schizophrenie manifestiert (Hakak Y, 2001).

Auch bei Patienten mit bipolaren Erkrankungen konnten Demyelinisierungsstörungen festgestellt werden, die möglicherweise in der Pathogenese dieser Erkrankung involviert sind (Chambers JS, 2004; Tkachev D, 2003).

Interessanterweise scheint auch der Kaliumchloridkanal KCC3 in Myelinisierungsprozessen des zentralen Nervensystems involviert zu sein. Im Rahmen einer Studie mit *Knock-out*-Mäusen wurden Stammzellen von Mäusen derart präpariert, dass Mäuse mit einem Defizit an KCC3 entstanden. Es zeigte sich,

dass die Nervenfasern der *Knock-out*-Mäuse nur teilweise myelinisierte Axone aufwiesen, was auf eine Demyelinisierung der Axone schließen lässt (Delpire E, 2001). Auch Pearson *et al.* gehen davon aus, dass der K-Cl-Kanal KCC3 mit der Myelinisierung des Nervensystems in Verbindung steht (Pearson MM, 2001).

Im Rahmen der von Delpire *et al.* initiierten Studie an *Knock-out*-Mäusen zeigten sich neben dem Nachweises der nur teilweise myelinisierten Axone auch motorische Auffälligkeiten bei den homozygoten *Knock-out*-Mäusen ($KCC3^{-/-}$). Diese Mäuse konnten ihre Körper kaum in eine aufrechte Stellung zu bringen. Ihre Koordination war durch unerwartete Extensionsbewegungen der Extremitäten stark eingeschränkt. Bei heterozygoten als auch bei homozygoten Mäusen fiel eine verminderte spontane Aktivität auf (Delpire E, 2001).

Auch Patienten, die an katatoner Schizophrenie leiden, zeigen eine Reihe von motorischer Auffälligkeiten, wie z.B. psychomotorische Verlangsamung, Verlust des harmonischen Ablaufs einer Bewegung und Haltungstereotypien, die sich durch das Einnehmen und Beibehalten verzerrter Haltungen auszeichnen.

Bislang ist die Ursache dieser motorischen Auffälligkeiten unbekannt, jedoch ist ein Kanaldefekt der diese motorischen Störungen auslösen könnte, wie von Delpire *et al.* an *Knock-out*-Mäusen gezeigt, durchaus denkbar.

Weiterhin scheint der Kaliumchloridkanal KCC3 in der Regulation der Zellproliferation eine wichtige Rolle zu spielen.

Shen *et al.* zeigten, dass der *Insulin-like growth factor 1* (IGF1) die KCC3-Expression ansteigen lässt und das Zellwachstum anregt, wohingegen der Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) die KCC3-Expression vermindert und zu Wachstumsstillstand führt. Des Weiteren wird vermutet, dass die Aktivierung Cyclin-abhängiger Kinasen, die den Verlauf des Zellzyklus regulieren, empfindlich auf Ionenkonzentrationen reagiert und mit der Aktivität des K-Cl-Kanals KCC3 gekoppelt ist.

Somit kann angenommen werden, dass KCC3 zum einen empfindlich auf Wachstumshormone reagiert und zum anderen in Verbindung steht mit bestimmten Zytokinen, die wiederum in direkter Verbindung mit dem Zellwachstum stehen (Shen MR, 2001).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Zellproliferation neuronaler Stammzellen bei schizophrenen Patienten gestört ist, so dass möglicherweise diese Veränderung zur Entwicklung einer schizophrenen Psychose führt (Reif A, 2006). Da bislang

unklar bleibt, welche Ursache die veränderte Zellproliferation bei neuronalen Stammzellen bewirkt, ist es möglich, dass hierbei auch Kanalproteine in der Pathogenese involviert sind, die, wie der Kalium-Chloridkanal KCC3 über Cyclin-abhängige Kinasen die Zellproliferation regulieren können.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass sich im Rahmen der Studie von Reif *et al.* auch zeigte, dass die Zellproliferation neuronaler Stammzellen bei affektiven Erkrankungen nicht gestört ist, wobei, wie der Autor selbst einwendet, eine Replikation seiner Ergebnisse notwendig ist, da die Studie moderate Veränderungen der Zellproliferation neuronaler Stammzellen nur zum Teil aufdecken konnte (Reif A, 2006). Gaughan *et al.* zeigten im Rahmen einer *post mortem* Studie, dass die Menge bestimmter Wachstumsfaktoren, die insbesondere die neuronale Stammzellproliferation regulieren und für das Wachstum und das Überleben adulter Neuronen wichtig sind, bei Patienten mit bipolaren Erkrankungen und schizophrenen Psychosen reduziert ist (Gaughran F, 2006). Auch andere Autoren gehen davon aus, dass bei affektiven Erkrankungen die Proliferation neuronaler Zellen beeinträchtigt ist (Duman, 2004), was wiederum die Bedeutung des *KCC3*-Gens in der Pathogenese bipolarer Erkrankungen unterstreicht.

6.2 Varianten des *KCC3*-Gens und deren Assoziation mit bipolaren Erkrankungen/ schizophrenen Psychosen

Die im Rahmen dieser Assoziationsstudie untersuchten Patientengruppen, die zum einen aus Individuen mit schizophrenen Psychosen und zum anderen aus Patienten mit bipolaren Erkrankungen bestanden, wurden hinsichtlich zweier seltenen G-Varianten 32416574G ([CTTTAC(A/G)TTAGGA], 5'-UTR)*, 32418760G ([TAAAGG(A/G)CTACCT], Promotor)*, sowie der seltenen Thymidininsertion IVS4+1008ins(T) untersucht, wobei die zwei Patientengruppen im Einzelnen und in der Gesamtheit mit einer Kontrollgruppe, bestehend aus nicht erkrankten Individuen verglichen wurden.

* Nummerierung nach UCSC Browser Golden Path 05.2004 Gen Bank *accession number* AF108831;

Es zeigte sich, dass der Haplotyp, bestehend aus allen drei Varianten, assoziiert ist mit bipolaren Erkrankungen. Der Haplotyp, der aus 32418760G und einer zweiten Varianten besteht, ist ebenfalls mit bipolaren Erkrankungen assoziiert. Ferner zeichnet sich eine Assoziation dieses Haplotyps mit der aus bipolaren Erkrankungen und schizophrenen Psychosen bestehenden Gruppe ab.

Der Promotor-Polymorphismus oder die Haplotypen die den Promotor-Polymorphismus beinhalten, könnten somit die Pathogenese bipolarer Erkrankungen direkt beeinflussen.

Der 5'-UTR-SNP zeigt einen Trend in Richtung einer Assoziation mit bipolaren Erkrankungen. Dies könnte jedoch durch ein Kopplungsungleichgewicht zu beiden G-Varianten bedingt sein.

Im Rahmen der Einzelmarkeranalyse zeigte sich die stärkste Assoziation zwischen bipolaren Erkrankungen und dem Polymorphismus 32418760G/A. Weiterhin fand sich eine Assoziation dieses Polymorphismus mit der aus bipolaren Erkrankungen und schizophrenen Psychosen bestehenden Gruppe (siehe auch Tabelle 17 und 18). Ein Tendenz für eine Assoziation zeichnete sich zwischen diesen Gruppen und der Variante 32416574G ab.

Betrachtet man die Ergebnisse der Assoziationsstudie, so können die in Kapitel 3 bereits aufgeführten Hypothesen wie folgt diskutiert werden.

Diskussion der Hypothesen:

Im Rahmen von Assoziationsstudien können falsch positive Ergebnisse, die sich aufgrund der Bevölkerungsstratifikation ergeben auftreten, d.h. die Assoziation der Polymorphismen mit bipolarer Erkrankung bzw. katatoner Schizophrenie ist lediglich Zufall (Lander E, 1994). Gegen diesen Einwand spricht, dass sowohl die Patienten als auch die Kontrollgruppe aus einer Region um Würzburg stammen, die für eine niedrige Migrationsrate bekannt ist. Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit ein zusätzlicher Marker im Bereich des Gens CX36, welches distal von SLC12A6 gelegen ist, untersucht (siehe auch Abbildung 9). Hierbei zeigte sich ein perfektes Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bei Patienten und Kontrollgruppe, so dass von keiner Verfälschung der Ergebnisse aufgrund der Bevölkerungsstratifikation ausgegangen werden kann (Meyer J *et al.*, unveröffentlichte Daten).

Weiterhin könnten sich die beiden seltenen G-Varianten und die Thymidininsertion im Kopplungsungleichgewicht mit der eigentlichen, wahren Mutation, welche die Erkrankung erzeugt, befinden.

Unter Kopplungsungleichgewicht versteht man die nicht zufällige Assoziation von Allelen, die auf Kopplung der Loci im Chromosom zurückgeführt werden kann.

Stöber *et al.* fanden im Rahmen eines Genom-Scans 2001 und 2002 für sechs Familienmitglieder eines als Familie 9 bezeichneten Stammbaumes, welche an periodischer Katatonie erkrankt waren, gemeinsame Markerallele zwischen D15S1042 und D15S182 (Stöber G, 2001b, 2002b).

Bezogen auf die periodische Katatonie würde somit - im Falle des Vorhandenseins eines Kopplungsungleichgewichtes - die wahre Mutation distal des *SLC12A6*-Genlocus vermutet werden, da auch der als Familie 9 bezeichnete Stammbaum, eine Region distal des *SLC12A6*-Genlocus unterstützt, welche proximal durch den Marker D15S1042 und distal durch den Marker D15S182 flankiert wird (Meyer J., 2003) (siehe auch Abbildung 9).

Die Ausdehnung von *SLC12A6* bis zum proximalen Grenzmarker D15S1042 entspricht ca. 1,6 Megabasen. Ein Kopplungsungleichgewicht ist jedoch zwischen einer Länge von 3 bis 100 Kilobasen zu erwarten (Kruglyak L, 1999; Ott J, 2000; Reich DE, 2001). Somit erscheint die Vermutung eines Kopplungsungleichgewichtes der G-Varianten mit einer distal, zwischen den Markern D15S1042 und D15S182 gelegenen Mutation unwahrscheinlich.

Die dritte und wahrscheinlichste Hypothese ist, dass das *KCC3*-Gen möglicherweise in der Pathogenese schizophrener Psychosen, insbesondere der periodischen Katatonie involviert ist. Zwar zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse, die für eine Assoziation zwischen den untersuchten Varianten des *KCC3*-Gens und schizophrenen Psychosen sprechen würden, jedoch zeichnete sich ein Trend in Richtung Assoziation in der Patientengruppe, die sowohl Patienten mit bipolaren als auch schizophrene Erkrankungen beinhaltet ab, wodurch das *KCC3*-Gen als Suszeptibilitätsgen bei schizophrenen Psychosen möglich erscheint.

Hinsichtlich der periodischen Katatonie existiert möglicherweise neben beschriebenem *KCC3*-Gen ein zweites Suszeptibilitätsgen, das in der Pathogenese der Erkrankung bei Familie 9 involviert ist und zwischen den genetischen Markern D15S1042 und D15S182 gelegen ist.

Aufgrund des signifikanten Ergebnisses und somit positiven Assoziation des Haplotyps bestehend aus allen 3 Varianten (den zwei seltenen G-Varianten und der Thymidininsertion) und 2 Varianten (der seltenen G-Variante im Bereich des Promotors und einer weiteren Variante) zu bipolaren Erkrankungen, scheint das *KCC3*-Gen in der Pathogenese bipolarer Erkrankungen involviert zu sein.

Somit haben die periodische Katatonie und bipolare Erkrankungen neben dem wesentlichen klinischen Merkmal der Bipolarität (Taylor MA, 2003) auch *SLC12A6* als Kandidatengen gemein.

Diese Erkenntnis unterstreicht die Hypothese, dass zwischen bipolaren Erkrankungen und der periodische Katatonie eine enge Verwandtschaft besteht, wie bereits Karl Leonhard postulierte (Leonhard K, 2003).

Die Rolle der seltenen Promotor-G-Variante des *SLC12A6* bei der Entstehung bipolarer Erkrankungen bzw. schizophrener Psychosen wurde kürzlich in einer Studie von Moser *et al.* bestätigt. Es zeigte sich, dass durch die seltene G-Variante im Bereich des Promotors des *SLC12A6* eine zusätzliche Methylierungsstelle entsteht. Durch die DNA-Methylierung zeigte sich eine reduzierte Genexpression des *KCC3*. Interessanterweise ist die Methylierung von Umweltfaktoren, wie z.B. Lebenskrisen beeinflussbar, so dass die Entstehung einer bipolaren Erkrankung bzw. schizophrenen Psychose, die ebenfalls von Umweltfaktoren abhängig ist, durchaus mit der Entstehung einer zusätzlichen Methylierungsstelle, in diesem Fall durch die seltene G-Variante im Bereich des Promotors in Zusammenhang zu bringen ist (Moser D, 2008).

Mit Hilfe eines SNP, in diesem Fall der seltenen Promotor-G-Variante, ist somit nicht nur eine Beeinflussung der Genexpression auf Genebene durch Veränderung der Primärstruktur des Gens möglich, sondern ebenfalls eine epigenetische Beeinflussung durch die Entstehung einer zusätzlichen Methylierungsstelle, so dass auch Umweltfaktoren die Genexpression beeinflussen können.

6.3 Einschränkungen der Studie

Wie anhand der Zahlenangabe der jeweils untersuchten Patienten und Kontrollgruppen ersichtlich ist, sind die Gruppen, insbesondere die Gruppe der bipolaren Erkrankungen, relativ klein. Es bedarf einer Replikation der Ergebnisse durch weitere Forschungsgruppen, insbesondere auch aufgrund der grenzwertigen Assoziation der G-Varianten im Bereich des *KCC3*-Gens zu schizophrenen Psychosen.

In die Gruppe der schizophrenen Psychosen wurden zahlreiche Erkrankungen, die gemäß der Diagnosekriterien des ICD-10 nahezu das gesamte Spektrum der schizophrenen Psychosen umfassen, eingeschlossen. Möglicherweise wäre die Untersuchung einer Patientengruppe mit Patienten, die ausschließlich an periodischer Katatonie erkrankt sind, in Anbetracht der Sonderstellung dieses Erkrankungsbildes mit einem eindeutigerem Ergebnis verbunden, was die Assoziation der G-Varianten bzw. der Thymidininsertion des *KCC3*-Gens zur periodischen Katatonie anbelangt. Da die Erkrankung jedoch relativ selten im Formenkreis der schizophrenen Psychosen zu finden ist, und darüber hinaus es einer großen klinisch-psychiatrischen Erfahrung bedarf, um die Erkrankung diagnostizieren zu können, fehlen hierzu die entsprechend große Patientenzahlen.

Kritisch muss auch die Rolle des *KCC3*-Gens im Hinblick auf die Dynamik bipolarer Erkrankungen bzw. schizophrener Psychosen gesehen werden. Eine Mutation des Gens kann, wie bereits beschrieben eine strukturelle cerebrale Veränderung, z.B. eine Agenesie des *Corpus callosum* oder eine Myelinisierungsstörung nach sich ziehen. Die Symptome der Schizophrenie bzw. bipolarer Erkrankungen sind nicht konstant, sondern können zyklisch verlaufen, d.h. im Verlauf der Erkrankung an Intensität zu- bzw. abnehmen. Diese Tatsache lässt sich nur schwerlich mit der Vorstellung einer strukturellen kortikalen Veränderungen in Einklang bringen, wie z.B. der Hypo- bzw. Miskonnektivität als pathophysiologisches Erklärungsmodell der Schizophrenie (Innocenti GM, 2003). Im Einklang mit der zyklisch verlaufenden Symptomatik wären unter anderem Änderungen auf Neurotransmitterebene, die z.B. mit unterschiedlicher Transmitterkonzentration einhergehen und damit die zyklisch verlaufende Symptomatik erklären könnten.

Interessanterweise bestehen jedoch die Psychosen, die bei dem bereits beschriebenen Andermann Syndrom beobachtet werden können nicht kontinuierlich, sondern verlaufen in Episoden. Somit können Mutationen im Bereich des *KCC3*-Gens auch zyklisch verlaufende Symptome, wie sie bei schizophrenen Psychosen und bipolaren Erkrankungen vorkommen, nach sich ziehen. Dies unterstreicht wiederum die Rolle des *KCC3*-Gens als mögliches Kandidatengen für schizophrene Psychosen und bipolare Erkrankungen, auch wenn das pathophysiologische Korrelat der zyklisch verlaufenden Symptomatik bislang im Unklaren liegt.

Eine mögliche Erklärung der zyklisch verlaufenden Symptomatik könnten die wechselnden osmotischen Bedingungen auf zellulärer Ebene darstellen, da diese einen Einfluss auf die Aktivierung des *KCC3*-Cotransporters besitzen. Diese Vermutung bedarf jedoch weiterer molekulargenetischer Untersuchungen.

Denkbar sind weiterhin neben oben bereits erwähnter Entstehung einer zusätzlichen Methylierungsstelle durch einen SNP (Moser D, 2008) auch weitere Veränderungen der DNA auf epigenetischer Ebene, die zur Entstehung des Krankheitsbildes und der zyklischen Symptomatik beitragen könnten.

7 Ausblick

In den letzten Jahrzehnten konnten zahlreiche Suszeptibilitätsgene ausfindig gemacht werden, die möglicherweise in der Pathogenese schizophrener Psychosen involviert sind (Badner JA, 2002; Crow TJ, 2007; Harrison PJ, 2005; Kirov G, 2005; Lewis CM, 2003; Owen M, 2000; Riley BP, 2000; Suarez BK, 2006). Es zeigte sich jedoch, dass die Ergebnisse zum Teil stark untereinander differieren (siehe auch Tabelle 4). Eine Ursache der zum Teil äußerst unterschiedlichen Forschungsergebnisse scheinen die geläufigen diagnostischen Kriterien zu sein, die sehr breit gefasst sind, so dass eine Reihe von Erkrankungen, denen möglicherweise unterschiedliche molekulargenetische Pathomechanismen zugrunde liegen, unter dem Begriff „Schizophrenie“ zusammengefasst werden (Owen M, 2000).

Hier zeigt sich, dass die psychiatrische Forschung auch in der Zukunft präziser Diagnosekriterien bedarf, um anhand genau definierter nosologischer Entitäten die Basis erfolversprechender molekulargenetischer Untersuchungen schaffen zu können. Aufgrund seiner präzisen Einteilung hat sich hierbei Leonhards Klassifikationssystem endogener Psychosen als valide herausgestellt (Leonhard, 2003; Pfuhlmann B, 1997; Tolna J, 2001).

Anhand dieses Klassifikationssystems wird es möglich sein, unterschiedliche Subgruppen endogener Psychosen, wie z.B. die periodische Katatonie abzugrenzen, um so mit Hilfe molekulargenetischer Untersuchungen replizierbare Ergebnisse zu gewinnen und damit den zugrundeliegenden Pathomechanismus aufzudecken.

Im Rahmen dieser Studie wurde ein besonderes Augenmerk auf die Verwandtschaft bipolarer Erkrankungen und periodischer Katatonie gerichtet (siehe Kapitel 2.1.7.2).

Mit Hilfe des gemeinsamen Kandidatengens *SLC12A6* und weiterer gemeinsamen Kandidatengene, die in der Pathogenese beider Erkrankungen eine Rolle spielen, wird es möglich sein, einen Beitrag zu einem neuen nosologischen Verständnis zu leisten, in dem der Verwandtschaft bipolarer Erkrankungen und schizophrener Psychosen Rechnung getragen wird.

In diesem Zusammenhang erscheinen z.B. die Gene *RasGRP1* (G-Protein regulierender Faktor) und *MEIS2* (Inhibitionsfaktor in der Entwicklung des Telencephalons) als Kandidatengene für bipolare Erkrankungen und periodische

Katatonie interessant, da sie auf Chromosom 15q14-15 lokalisiert sind und ihr Genprodukt im Bereich des zentralen Nervensystems exprimiert wird. Weiterhin stellen Gene, die in Myelinisierungsprozessen des zentralen Nervensystems involviert sind, vielversprechende Kandidatengene für beide Erkrankungen dar.

Mittels genauer Diagnosekriterien und groß angelegter, auch internationaler Assoziationsstudien wird schließlich anhand der Untersuchung geeigneter Gene ein Zugang zu einem besseren Verständnis der Ätiologie bipolarer Erkrankungen und schizophrener Psychosen eröffnet.

Das langfristige Ziel, eine neue, möglicherweise auch kausale Therapie bipolarer Erkrankungen bzw. schizophrener Psychosen zu entwickeln, scheint somit in die nahe Zukunft gerückt zu sein.

8 Zusammenfassung

Mutationen im Bereich des *KCC3*-Gens (Kalium-Chlorid-Kanal 3; *SLC12A6*) führen zur Entwicklung des sogenannten Andermann-Syndroms, einer progressiven sensomotorischen Neuropathie, die assoziiert ist mit einer Agenesie des *Corpus callosum* und psychotischen Episoden (Casaubon LK, 1996; Filteau MJ, 1991; Howard HC, 2002; Howard HC, 2003; Uyanik G, 2006).

Das Gen ist lokalisiert auf Chromosom 15q14 und kodiert für den Kalium-Chloridkanal KCC3, der für eine elektroneutrale Bewegung von Ionen durch die Zellmembran zuständig ist (Hiki K, 1999; Mount DB, 1999; Race JE, 1999). Weiterhin zeigte sich, dass dieser Kanal, dessen Isoform KCC3a hauptsächlich im ZNS exprimiert ist, in der Regulation der Zellproliferation eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Shen M-R, 2001).

In einer von Stöber *et al.* durchgeführten genomweiten, nicht-parametrischen Kopplungsanalyse wurde die Region 15q14-15 zwischen den Markern D15S144 und D15S1028 mit einem LOD-Score von 3,57 ($p = 2.6 \times 10^{-5}$) (GENEHUNTER-PLUS) als Kandidatenregion für periodische Katatonie ermittelt (Stöber G, 2000).

Auch andere Forschungsgruppen gehen davon aus, dass der Bereich des Chromosoms 15q13-15 eine Suszeptibilitätsregion für erbliche schizophrene Psychosen und Schizophrenien in Verbindung mit neurophysiologischem Defizit (d.h. mit einem Defizit, das akustisch evozierte Potential P50 zu inhibieren) darstellt (Freedman R, 1997; Gejman PV, 2001; Riley BP, 2000).

Chromosom 15q14 gilt weiterhin als Kandidatenregion für bipolare Erkrankungen, die positiv auf das Psychopharmakon Lithium reagieren (Turecki G, 2001). Auch im Rahmen einer aktuellen Studie von Ferreira *et al.* wird die chromosomale Region 15q14 als eine Kandidatenregion für bipolare Erkrankungen angesehen (Ferreira M, 2008).

Aufgrund der Position des *SLC12A6* im Bereich der Kandidatenregion für Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis und bipolarer Erkrankungen und aufgrund der physiologischen Rolle des Genprodukts im zentralen Nervensystem erscheint *SLC12A6* als ein äußerst interessantes Kandidatengen sowohl für katatone Schizophrenie, als auch für bipolare Erkrankungen.

Im Rahmen von Mutationsanalysen des *KCC3*-Gens konnten zwei seltenen G-Varianten im Bereich des Promotors und der 5'-UTR, sowie eine seltene

Thymidininsertion in Intron 4 des Gens detektiert werden. Untersucht wurden hierbei 2 an periodischer Katatonie erkrankte Individuen eines als Familie 11 bezeichneten Stammbaums und 3 gesunde Individuen.

Mit Hilfe dieser Assoziationsstudie sollte nun gezeigt werden, ob diese Polymorphismen in der Pathogenese schizophrener Psychosen und/oder bipolarer Erkrankungen involviert sind.

Es zeigte sich, dass der Haplotyp bestehend aus allen drei Varianten, den zwei seltenen G-Varianten und der Thymidininsertion, und der Haplotyp bestehend aus 2 Varianten mit bipolaren Erkrankungen assoziiert ist, für den Fall, dass die seltene G-Variante im Bereich des Promotors beinhaltet ist. Im Rahmen der Einzelmarkeranalyse zeigte sich eine Assoziation der G-Variante im Bereich des Promotors mit bipolaren Erkrankungen.

Hinsichtlich der schizophrenen Psychosen zeichnete sich bei nicht-signifikanten Ergebnissen ein Trend in Richtung Assoziation zwischen den untersuchten Varianten des *KCC3*-Gens und der Patientengruppe, die aus Patienten mit bipolaren und schizophrenen Erkrankungen bestand, ab.

Zusammenfassend kann schließlich behauptet werden, dass *SLC12A6* ein mögliches Risiko-Gen darstellt, welches die Entwicklung bipolarer Erkrankungen begünstigt.

Die Rolle des *SLC12A6*-Gens für die Entwicklung einer schizophrenen Psychose scheint hingegen nicht eindeutig geklärt zu sein. Es ist jedoch durchaus denkbar, dass das *SLC12A6*-Gen möglicherweise in der Pathogenese schizophrener Psychosen, insbesondere der katatonen Schizophrenie involviert ist.

9 Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

ACCPN	Agenesie des <i>Corpus callosum</i> mit peripherer Neuropathie
<i>Akt1</i>	<i>V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 gene</i>
°C	Grad Celsius
CC	<i>Corpus callosum</i>
<i>COMT</i>	<i>Catechol-O-methyl transferase gene</i>
µl	Mikroliter
A	Adenin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalzium
<i>CHRNA7</i>	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, alpha 7 gene</i>
cM	Zentimorgan
<i>DAO</i>	<i>D-amino acid oxidase gene</i>
<i>DAOA</i>	<i>D-amino acid oxidase activator gene</i>
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
<i>DISC1</i>	<i>Disrupted in schizophrenia 1 gene</i>
DSM-IV	Diagnostisches und Statistisches Handbuch Psychischer Störungen, Version IV
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>DRD3</i>	<i>Dopamine receptor D3 gene</i>
dsDNA	Doppelstrang-DNA
<i>DTNBP1</i>	<i>Dystrobrevin binding protein 1 gene</i>
EEG	Elektroenzephalogramm
G	Guanin
<i>GRM3</i>	<i>Metabotropic glutamate receptor type 3 gene</i>
ICD-10	Internationale Klassifikation der Krankheiten, 10. Revision
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
K+	Kalium
kb	Kilobasen (1000bp)

KCC	Kalium-Chlorid-Cotransporter
kDa	Kilo Dalton
LOD	<i>logarithm of the odds</i>
m	Männlich
M	Mol
mA	Milliampere
MBq	Mega-Becquerel
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
mtDNA	Mitochondriale DNA
Na+	Natrium
NIH/3T3-Fibroblasten	Etablierte Fibroblastenzelllinie des <i>national institute of health</i>
<i>NRG1</i>	<i>Neuregulin 1 gene</i>
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Nitroxid
OR	<i>Odds ratio</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
<i>PPP3CC</i>	<i>Protein phosphatase 3 catalytic subunit gene</i>
<i>PRODH2</i>	<i>Proline dehydrogenase 2 gene</i>
RACE	<i>Rapid amplification of conserved ends</i>
<i>RGS4</i>	<i>Regulator of the G-protein signaling 4 gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>Rounds per minute</i>
Sek	Sekunden
<i>SLC12A6</i>	<i>Solute carrier family 12 member 6</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>

SSCP	<i>Single Straint Conformation Polymorphism</i>
ssDNA	Einzelstrang-DNA
STS	<i>Sequence tagged site</i>
T	Thymin
TA	<i>Annealing-Temperatur</i>
TC	<i>Threshold cycle</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine
tRNA	Transfer-RNA
UTR	<i>Untranslated region</i>
V	Volt
VEGF	<i>Vascular endothelial cell growth factor</i>
w	Weiblich
W	Watt
ZNS	Zentrales Nervensystem
<i>5HT_{2A}</i>	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A gene</i>

9.2 Literaturverzeichnis

- Abi-Dargham A, Gil R, Krystal J, Baldwin RM, Seibyl JP, Bowers M (1998) Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. *Am J Psychiatry*, 155, 761-767.
- Andermann F, Andermann E, Joubert M, Karpati G, Carpenter S, Melancon D (1972) Familial agenesis of the corpus callosum with anterior horn cell disease: a syndrome of mental retardation, areflexia and paraparesis. *Trans. Am. Neurol. Assoc.*, 97, 242-244.
- Andreone N, Tansella M, Cerini R, Versace A, Rambaldelli G, Perlini C, Dusi N, Pelizza L, Balestrieri M, Barbui C, Nose M, Gasparini A, Brambilla P (2007) Cortical white-matter microstructure in schizophrenia: Diffusion imaging study. *Br J Psychiatry*, 191, 113-119.
- Badner JA, Gershon ES (2002) Meta-analysis of whole-genom linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 7, 405-411.
- Baer R (1998) Themen der Psychiatriegeschichte. *Enke*, Stuttgart.
- Beckmann H, Franzek E, Stöber G (1996) Genetic heterogeneity in catatonic schizophrenia: a family study. *Am J Med Gen*, 67, 289-300.
- Berrettini W (2000) Are schizophrenic and bipolar disorders related? A review of family and molecular studies. *Biol. Psychiatry*, 48, 531-538.
- Boettger T, Rust MB, Maier H, Seidenbecher T, Schweizer M, Keating DJ, Faulhaber J, Ehmke H, Pfeiffer C, Scheel O, Lemcke B, Horst J, Leuwer R, Pape HC, Völkl H, Hübner CA, Jentsch TJ (2003) Loss of K-Cl cotransporter KCC3 causes deafness, neurodegeneration and reduced seizure threshold. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 22, 5422-5434.
- Bogerts B, Falkai P, Hapts M, Greve B, Ernst S, Tapernon-Franz U (1990) Post-mortem volume measurements of limbic system and basal ganglia structures in chronic schizophrenics. Initial results from a new brain collection. *Schizophr Res*, 3, 295-301.
- Bogerts B, Meertz E, Schonfeldt-Bausch R (1985) Basal ganglia and limbic system pathology in schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 42, 784-791.
- Boyle M (2002) Schizophrenia: a scientific delusion? *Taylor & Francis Inc*, New York.
- Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, De Bartolomeis A (1997) Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic

- dopamine concentrations:evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 2569-2574.
- Brown R, Colter N, Corsellis JA, Crow TJ, Frith CD, Jagoe R (1986) Postmortem evidence of structural brain changes in schizophrenia. Differences in brain weight, temporal horn area, and parahippocampal gyrus compared with affective disorder. *Arch. Gen. Psychiatry*, 43, 36-42.
- Casaubon LK, Melanson M, Lopes-Cendes I, Marineau C, Andermann E, Andermann F, Weissenbach J, Prevost C, Bouchard JP, Mathieu J, Rouleau GA (1996) The gene responsible for a severe form of peripheral neuropathy and agenesis of the corpus callosum maps to chromosome 15q. *Am J Hum Genet*, 58, 28-34.
- Chambers JS, Perrone-Bizzozero NI (2004) Altered Myelination of the Hippocampal Formation in Subjects with Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Neurochem Res.*, 29, 2293-2302.
- Crocq MA, Mant R, Asherson P, Williams J, Hode Y, Mayerova A, Collier D, Lannfelt L, Sokoloff P, Schwartz JC, Gill M, Macher JP, McGuffin P, Owen MJ (1992) Association between schizophrenia and homozygosity at the dopamine D3 receptor gene. *J. Med. Gen.*, 29, 858-860.
- Crow TJ, Ball J, Bloom SR, Brown R, Bruton CJ, Colter N (1989) Schizophrenia as an anomaly of development of cerebral asymmetry. *Arch. Gen. Psychiatry*, 46, 1145-1150.
- Crow TJ, MB PhD (2007) How and why genetic linkage has not solved the problem of psychosis: review and hypothesis. *Am J Psychiatry*, 164, 13-21.
- Crunelli V, Leresche N (2002) Childhood absence epilepsie; genes, channels neurons and networks. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3, 371-382.
- Davis KL, Stewart DG, Friedman JI, Buchsbaum M, Harvey PD, Hof PR, Buxbaum J, Haroutunian V. (2003) White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction. *Arch Gen Psychiatry.*, 60(65):443-456.
- Deleu D, Bamanikar SA, Muirhead D, Louon A (1997) Familial progressive sensorimotor neuropathy with agenesis of the corpus callosum (Andermann syndrome): a clinical, neuroradiological and histopathological study. *Eur. Neurol.*, 37, 104-109.
- Delpire E, Mount DB (2002) Human and murine phenotypes associated with defects in cation-chloride cotransport. *Annual Review Physiol.*, 64, 802-843.

- Delpire E, Mount DB, Lu J, England R, Kirby M, McDonald MP (2001) Locomotor defects associated with disruption of the K-Cl cotransporter KCC3 gene. *FASEB J*, 15, A440.
- Duman R (2004) Depression: a case of neuronal life and death? *Biol. Psychiatry*, 56, 140-145.
- Dupré N, Howard H, Mathieu J, Karpati G, Vanasse M, Bouchard JP, Carpenter S, Rouleau GA (2003) Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Annals of Neurology*, 54, 9-18.
- Ferreira MAR, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR, Ruderfer DM, Jones L, Fan J, Kirov G, Perlis RH, Green EK, Smoller JW, Grozeva D, Stone J, Nikolov I, Chambert K, Hamshere ML, Nimgaonkar VL, Moskvina V, Thase ME, Caesar S, Sachs GS, Franklin J, Gordon-Smith K, Ardlie KG, Gabriel SB, Fraser C, Blumenstiel B, Defelice M, Breen G, Gill M, Morris DW, Elkin A, Muir WJ, McGhee KA, Williamson R, MacIntyre DJ, MacLean AW, St Clair D, Robinson M, Van Beck M, Pereira ACP, Kandaswamy R, McQuillin A, Collier DA, Bass NJ, Young AH, Lawrence J, Ferrier IN, Anjorin A, Farmer A, Curtis D, Scolnick EM, McGuffin P, Daly MJ, Corvin AP, Holmans PA, Blackwood DH, Wellcome Trust Case Control Consortium, Gurling HM, Owen MJ, Purcell SM, Sklar P & Craddock N (2008) Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nature Genetics*, 40, 1056-1058.
- Filteau MJ, Pourcher E, Bouchard RH, Baruch P, Mathieu J, Bedard F, Simard N, Vincent P (1991) Corpus callosum agenesis and psychosis in Andermann syndrome. *Arch. Neurol.*, 48, 1275-1280.
- Freedman R, Coon H, Myles-Worsley M, Orr-Urtreger A, Olincy A, Davis A, Polymeropoulos M, Holik J, Hopkins J, Hoff M, Rosenthal J, Waldo MC, Reimherr F, Wender P, Yaw J, Young DA, Breese CR, Adams C, Patterson D, Adler LE, Kruglyak L, Leonard S, Byerley W (1997) Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *PNAS*, 94, 587-592.
- Freidlin B, Zheng G, Li Z, Gastwirth JL (2002) Trend tests for case-control studies of genetic markers: power, sample size and robustness. *Hum Hered*, 53, 146-52.
- Gaughran F, Payne J, Sedgwick PM, Cotter D, Berry M. (2006) Hippocampal FGF-2 and FGFR1 mRNA expression in major depression, schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Res Bull*, 70, 221-227.

- Gejman PV, Alan RS, Badner JA, Cao Q, Zhang J (2001) Linkage analysis of schizophrenia to chromosome 15. *American Journal of Medical Genetics*, 105, 789-793.
- Gottesman II (1991) Schizophrenia genesis. *Springer Verlag*, Heidelberg.
- Gottesman II (1993) Schizophrenie. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
- Hakak Y, Walker JR, Li C, Wong WH, Davis KL, Buxbaum JD, Haroutunian V, Fienberg AA (2001) Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination related genes in chronic schizophrenia. *PNAS*, 98, 4746-4751.
- Hardy J (2002) The real problem in association studies. *Am J Med Genet*, 114, 253.
- Harrison PJ (1999) The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*, 122, 593-624.
- Harrison PJ, Weinberger DR (2005) Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Molecular Psychiatry*, 10, 40-68.
- Hashimoto K, Iyo M (2002) Glutamate hypothesis of schizophrenia and targets for new antipsychotic drugs. *NSSYZ*, 22, 3-13.
- Heckers S, Heinsen H, Heinsen Y, Beckmann H (1991) Cortex, white matter and basal ganglia in schizophrenia: a volumetric postmortem study. *Biol. Psychiatry*, 29, 556-566.
- Highley JR, Esiri MM, McDonald B, Cortina-Borja M, Herron B, Mand Crow TJ (1999) The size and fibre composition of the corpus callosum with respect to gender and schizophrenia: a post-mortem study. *Brain*, 122, 99-110.
- Hiki K, D'Andrea RJ, Furze J, Crawford J, Woollatt E, Sutherland GR, Vadas MA, Gamble JR (1999) Cloning, Characterisation, and Chromosomal Location of a Novel Human K^+ - Cl^- Cotransporter. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 10661-10667.
- Howard HC, Dupre N, Mathieu J, Bouchard JP, Rouleau GA (2003) Severe neuropathy with agenesis of the *corpus callosum*. *Med Sci*, 19, 414-416.
- Howard HC, Mount DB, Rocheford D, Byun N, Dupre N, Lu J, Fan X, Song L, Riviere JB, Prevost C, Horst J, Simonati A, Lemcke B, Welch R, England R, Zhan FQ, Mercado A, Siesser WB, George AL, McDonald MP, Bouchard JP, Mathieu Jpierre E., Rouleau GA. (2002) The K-Cl cotransporter KCC3 is a mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nature Genetics*, 32, 384-392.

- Innocenti GM, Ansermet F, Parnas J (2003) Schizophrenia, neurodevelopment and corpus callosum. *Molecular Psychiatry*, 8, 261-274.
- Jakob H, Beckmann H (1986) Prenatal developmental disturbances in the limbic allocortex in schizophrenics. *J Neural Transm*, 65, 303-326.
- Jakob H, Beckmann H (1994) Circumscribed malformation and nerve cell alterations in the entorhinal cortex of schizophrenics. *J Neural Transm*, 98, 83-106.
- Karayioridou M, Gogos JA (1997) Dissecting the genetic complexity of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 2, 211-223.
- Kendler KS, Diehl SR (1993) The genetics of schizophrenia: A current, genetic-epidemiologic perspective. *Schizophr Bull*, 19, 261-285.
- Kirov G, O'Donovan MC, Owen MJ (2005) Finding schizophrenia genes. *J Clin Invest.*, 115, 1440-1448.
- Kruglyak L (1999) Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nature Genetics*, 22, 139-144.
- Lander E, Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*, 11, 241-247.
- Lander E, Schork N (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science*, 265(5181), 2037-2048.
- Leegwater PAJ, Yuan BQ, van der Steen J, Mulders J, Könst AAM, Boor PKI, Mejaski-Bosnjak V, van der Maarel SM, Frants RR, Oudejans CBM, Schutgens RBH, Pronk JC, van der Knaap MS (2001) Mutations of MLC1 (KIAA0027), Encoding a Putative Membrane Protein, Cause Megalencephalic Leukoencephalopathy with Subcortical Cysts. *Am J Hum Genet*, 68, 831-838.
- Leonhard K (2003) *Aufteilung der endogenen Psychosen und ihre differenzierte Ätiologie* (8 edn). Stuttgart, New York: Thieme-Verlag.
- Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE, Straub RE, Hovatta I, Williams NM, Schwab SG, Pulver AE, Faraone SV, Brzustowicz LM, Kaufmann CA, Garver DL, Gurling HM, Lindholm E, Coon H, Moises HW, Byerley W, Shaw SH, Mesen A, Sherrington R, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS, Ekelund J, Paunio T, Lönngqvist J, Peltonen L, O'Donovan MC, Owen MJ, Wildenauer DB, Maier W, Nestadt G, Blouin JL, Antonarakis SE, Mowry BJ, Silverman JM, Crowe RR, Cloninger CR, Tsuang MT, Malaspina D, Harkavy-Friedman JM, Svrakic DM, Bassett AS, Holcomb J, Kalsi G, McQuillin A, Brynjolfson J, Sigmundsson T, Petrusson H, Jazin E, Zoega T, Helgason T (2003) Genome scan meta-

- analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet*, 73, 34-48.
- Marenco S, Weinberger DR (2000) The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: following a trail of evidence from cradle to grave. *Dev Psychopathol.*, 12, 501-557.
- McGuffin P, Owen MJ (1995) Genetic basis of schizophrenia. *Lancet*, 346, 678-682.
- Mercado A, Vazquez N, Song L, Cortes R, Enck AH, Welch R, Delpire E, Gamba G, Mount DB (2005) NH₂-terminal heterogeneity in the KCC3 K⁺-Cl⁻ cotransporter. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 289, F1246-F1261.
- Meyer J, Johannssen K, Freitag CM, Schraut K, Teuber I, Hahner A, Mainhardt C, Mössner R, Volz HP, Wienker TF, McKeane D, Stephan DA, Rouleau G, Reif A and Lesch KP (2005) Rare variants of the gene encoding the potassium chloride co-transporter 3 are associated with bipolar disorder. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 9, 1–10.
- Meyer J, Mai M, Ortega G, Mössner R, Lesch KP (2002a) Mutational analysis of the connexin 36 gene (*Cx36*) and exclusion of the coding sequence as a candidate region for catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Schizophrenia Research*, 58, 87-91.
- Meyer J, Ortega G, Schraut K, Nürnberg G, Rüschemdorf F, Saar K, Mössner R, Wienker TF, Reis A, Stöber G, Lesch KP (2002b) Exclusion of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene as a candidate for catatonic schizophrenia in a large family supporting the chromosome 15q13-22 locus. *Molecular Psychiatry*, 7, 220-223.
- Meyer J, Rüschemdorf F, Lesch KP (2003) A second large family with catatonic schizophrenia supports the region distally of *CHRNA7* on chromosome 15q14-15. *Molecular Psychiatry*, 8, 259-260.
- Möller HJ, Müller N (1998) Schizophrenie - Moderne Konzepte zu Diagnostik, Pathogenese und Therapie. *Springer- Verlag*, Wien, New York.
- Moises H (2001) Human Genome data analyzed by an evolutionary method suggests a decrease in protein synthesis rate as cause of schizophrenia and an increase as antipsychotic mechanism. ArXiv.org e-Print archive, <http://xxx.arxiv.cornell.edu/abs/cond-mat/0110189>.
- Moser D, Ekawardhani S, Kumsta R, Palmason H, Bock C, Athanassiadou Z, Lesch KP and Meyer J (2008) Functional Analysis of a Potassium-Chloride Co-

- Transporter 3 (SLC12A6) Promoter Polymorphism Leading to an Additional Methylation Site. *Neuropsychopharmacology*.
- Mount DB, Gamba G (2001) Renal K-Cl cotransporters. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.*, 10, 685-691.
- Mount DB, Mercado A, Song L, Xu J, George AL, Delpire E, Gamba G (1999) Cloning and Characterization of KCC3 and KCC4, New Members of the Cation-Chloride Cotransporter Gene Famil. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 16355-16362.
- Mount DB, Song L, Mercado A, Gamba G, Delpire E (2000) Basolateral localization of renal tubular K-Cl cotransporters. *J.Am.Soc.Nephrol.*, 11, 35A.
- Müller P (1999) Therapie der Schizophrenie. *Georg Thieme Verlag*, Stuttgart.
- O'Neill WC (1999) Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am J Physiol.*, 276, C995-C1011.
- Ott J (2000) Predicting the range of linkage disequilibrium. *PNAS*, 97, 2-3.
- Owen M (2000) Molecular genetic studies of schizophrenia. *Brain Research Reviews*, 31, 179-186.
- Pakkenberg B (1987) Post- mortem study of chronic schizophrenic brains. *Br J Psychiatry*, 151, 744-752.
- Pearson MM, Lu J, Mount DB, Delpire E (2001) Localization of the K⁺-Cl⁻ cotransporter, KCC3, in the central and peripheral nervous systems: Expression in the choroid plexus, large nervous and white matter tracts. *Neuroscience*, 103, 481-491.
- Pfuhlmann B, Franzek E, Stober G, Cetkovich-Bakmas M, Beckmann H (1997) On interrater reliability for Leonhard's classification of endogenous psychoses. *Psychopathology*, 30, 100-105.
- Piechotta K, Lu J, Delpire E (2002) Cation chloride cotransporters interact with the stress- related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 50812-50819.
- Race JE, Makhlof FN, Logue PJ, Wilson FN, Dunham PB, Holtzman EJ (1999) Molecular cloning and functional characterisation of KCC3, a new K-Cl- cotransporter. *Am J Physiol. Cell Physiol.*, 277, C1210-1219.

- Reich DE, Cardill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadian SF, Ward R, Lander ES (2001) Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature*, 411, 199-204.
- Reif A, Fritzen S, Finger M, Strobel A, Lauer M, Schmitt A, Lesch KP (2006) Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Molecular Psychiatry*, 11(5), 514-522.
- Riley BP, Makoff A, Mogudi-Carter M, Jenkins T, Williamson R, Collier D, Murray R (2000) Haplotype transmission disequilibrium and evidence for linkage of the CHRNA7 gene region to schizophrenia in south african bantu families. *American Journal of Medical Genetics*, 96, 196-201.
- Riley BP, Mc Guffin P (2000) Linkage and associated studies of schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics*, 97, 23-44.
- Risch N (1990) Genetic linkage and complex diseases, with special reference to psychiatric disorders. *Genet. Epidemiol.*, 7, 3-16.
- Roberts GW, Royston MC, Weinberger DR (1997) Schizophrenia. In *Greenfield's neuropathologie* (ed L. P. Graham DI), pp. 896-929. London: Edward Arnold.
- Sasieni PD (1997) From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics*, 53, 1253-61.
- Saß H, Wittchen HU, Zaudig M, Houben I (2003) *Diagnostisches und statistisches Manual Psychischer Störungen -Textversion-DSM-IV-TR*. Göttingen- Bern- Toronto- Seattle: Hogrefe -Verlag für Psychiatrie.
- Schenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW (2001) A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res*, 49, 1-52.
- Schneider K (2007) *Klinische Psychopathologie* (15 edn) Stuttgart: Thieme-Verlag
- Schulze TG, McMahon FJ (2002) Genetic association mapping at the crossroads: which test and why? Overview and practical guidelines. *Am J Med Genet*, 114, 1-11.
- Segurado R, Detera-Wadleigh SD, Levinson DF, Lewis CM, Gill M, Nurnberger JI Jr, Craddock N, DePaulo JR, Baron M, Gershon ES, Ekholm J, Cichon S, Turecki G, Claes S, Kelsoe JR, Schofield PR, Badenhop RF, Morissette J, Coon H, Blackwood D, McInnes LA, Foroud T, Edenberg HJ, Reich T, Rice JP, Goate A, McInnis MG, McMahon FJ, Badner JA, Goldin LR, Bennett P, Willour VL, Zandi PP, Liu J, Gilliam C, Juo SH, Berrettini WH, Yoshikawa T, Peltonen L, Lönnqvist J, Nöthen MM, Schumacher J, Windemuth C, Rietschel M, Propping

- P, Maier W, Alda M, Grof P, Rouleau GA, Del-Favero J, Van Broeckhoven C, Mendlewicz J, Adolfsson R, Spence MA, Luebbert H, Adams LJ, Donald JA, Mitchell PB, Barden N, Shink E, Byerley W, Muir W, Visscher PM, Macgregor S, Gurling H, Kalsi G, McQuillin A, Escamilla MA, Reus VI, Leon P, Freimer NB, Ewald H, Kruse TA, Mors O, Radhakrishna U, Blouin JL, Antonarakis SE, Akarsu N. (2003) Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part III: Bipolar disorder. *Am J Hum Genet*, 73, 49-62.
- Shen MR, Chou CY, Hsu KF, Liu HS, Dunham PB, Holtzman EJ, Ellory JC (2001) The KCl cotransporter isoform KCC3 can play an important role in the cell growth regulation. *PNAS*, 98, 14714-14719.
- Slager SL, Schaid DJ (2001) Case-control studies of genetic markers: power and sample size approximations for Armitage's test for trend. *Hum Hered*, 52, 149-53.
- Steffanson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, (2002) Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet*, 71, 877-892.
- Steinlein OK, Neubauer BA, Sander T, Song L, Stoodt J, Mount DB (2001) Mutation analysis of the potassium chloride cotransporter KCC3 (SLC12A6) in rolandic and idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Research*, 44, 191-195.
- Stöber G (2001a) Genetic predisposition and environmental causes in periodic and systematic catatonia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 251, 1/21-1/24.
- Stöber G, Franzek E, Beckmann H, Schmidtke A (2002a) Exposure to prenatal infections, genetics and the risk of systematic and periodic catatonia. *J Neural Transm*, 109, 921-929.
- Stöber G, Franzek E, Haubitz I, Pfuhlmann B, Beckmann H (1998) Gender differences and age of onset in the catatonic subtypes of schizophrenia. *Psychopathology*, 31, 307-312.
- Stöber G, Franzek E, Lesch KP, Beckmann H (1995) Periodic Catatonia: a schizophrenic subtype with major gene effect and anticipation.
- Stöber G, Lauer M, Mersdorf U, Pfuhlmann B (2003) Manic-Depressive Disorder and Cycloid Psychoses: Psychopathology and Differential Diagnosis of the Phase Psychoses. *Krankenhauspsychiatrie*, 14, 7-13.

- Stöber G, Pfuhlmann B, Nürnberg G, Schmidtke A, Reis A, Franzek E, Wienker TF (2001b) Towards the genetic basis of periodic catatonia: pedigree sample for genome scan I and II. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 251, 25-30.
- Stöber G, Saar K, Rüschenndorf F, Meyer J, Nürnberg G, Jatzke S, Franzek E, Reis A, Lesch KP, Wienker TF, Beckmann H (2000) Splitting schizophrenia: periodic catatonia-susceptibility locus on chromosome 15q15. *Am. J. Hum. Genet.*, 67, 1201-1207.
- Stöber G, Seelow D, Rüschenndorf F, Ekici A, Beckmann H, Reis A (2002b) Periodic catatonia: confirmation of linkage to chromosome 15 and further evidence for genetic heterogeneity. *Human Genetics*, 111, 323-330.
- Straub RE, Jiang Y, MacLean CJ, Ma Y, Webb BT, Myakishev MV, Harris-Kerr C, Wormley B, Sadek H, Kadambi B, Cesare AJ, Gibberman A, Wang X, O'Neill FA, Walsh D, Kendler KS (2002) Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum Genet*, 71, 337-348.
- Suarez BK, Duan J, Sanders AR, Hinrichs AL, Jin CH, Hou C, Buccola NG, Hale N, Weilbaecher AN, Nertney DA, Olincy A, Green S, Schaffer AW, Smith CJ, Hannah DE, Rice JP, Cox NJ, Martinez M, Mowry BJ, Amin F, Silverman JM, Black DW, Byerley WF, Crowe RR, Freedman R, Cloninger CR, Levinson DF, Gejman PV (2006) Genomewide linkage scan of 409 European-ancestry and African American families with schizophrenia: suggestive evidence of linkage at 8p23.3-p21.2 and 11p13.1-q14.1 in the combined sample. *Am J Hum Genet*, 78, 315-333.
- Taylor MA, Fink M (2003) Catatonia in psychiatric classification: a home of its own. *American Journal of Psychiatry*, 160, 1233-1241.
- Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, Wayland M, Freeman T, Jones PB, Starkey M, Webster MJ, Yolken RH, Bahn S (2003) Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *The Lancet*, 362, 798-805.
- Tolna J, Petho B, Farkas M, Vizkeleti G, Tusnady G, Marosi J (2001) Validity and reliability of Leonhard's classification of endogenous psychoses: preliminary report on a prospective 25- to 30-year follow-up study. *J Neural Transm*, 108, 629-636.

- Trichard C, Paillere-Marinot ML, Attar-Levy D, Blind J, Feline A, Martinot JL (1998) No serotonin 5-HT_{2A} receptor density abnormality in the cortex of schizophrenic patient studied with PET. *Schizophr Res*, 31, 13-17.
- Tsuang M (1993) Genotypes, phenotypes, and the brain. A search for connections in schizophrenia. *Br J Psychiatry*, 163, 299-307.
- Turecki G, Grof P, Grof E, D'Souza V, Lebus L, Marineau C, Cavazzoni P, Duffy A, Betard C, Zvolsky P, Robertson C, Brewer C, Hudson TJ, Rouleau GA, Alda M (2001) Mapping susceptibility genes for bipolar disorder: a pharmacogenetic approach based on excellent response to lithium. *Molecular Psychiatry*, 6, 570-578.
- Uyanik G, Elcioglu N, Penzien J, Gross C, Yilmaz Y, Olmez A, Demir E, Wahl D, Scheglmann K, Winner B, Bogdahn U, Topaloglu H, Hehr U, Winkler J (2006) Novel truncating and missense mutations of the KCC3 gene associated with Andermann syndrome. *Neurology*, 66, 1044-1048.
- Volk DW, Lewis DA (2002) Impaired prefrontal inhibition in schizophrenia: relevance for cognitive dysfunction. *Physiol Behav*, 77, 501-505.
- Weinberger D (1987) Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 44, 660-669.
- Williams J, Spurlock G, McGuffin P, Mallet J, Nothen MN, Gill M, Aschauer H, Nylander PO, Macciardi F, Owen MJ (1996) Association between schizophrenia and the T102C polymorphism of 5-hydroxytryptamine type 2a receptor gene. *Lancet*, 347, 1294-1296.
- Zhao JH, Curtis D, Sham PC (2000) Model-free analysis and permutation tests for allelic associations. *Hum Hered*; 50: 133-9.
- Zhao JH and Sham PC (2002) Faster haplotype frequency estimation using unrelated subjects, *Hum Hered* 53, 36–41.

Danksagung

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

Besonders herzlich danken möchte ich weiterhin Herrn Prof. Dr. Meyer für seine umfassende, konstruktive und kritische Betreuung; hervorheben möchte ich hierbei die ausführlichen Erläuterungen zu den komplexen molekulargenetischen Hintergründen, die große Unterstützung bei der Durchführung des praktischen Abschnitts meiner Arbeit, und die geduldige Korrektur des schriftlichen Abschnittes.

Bei Herrn Prof. Dr. med. T. Grimm möchte ich mich herzlich bedanken für die Übernahme des Korreferats, trotz engen Terminplanes.

Ein großer Dank gilt weiterhin Gabriela Ortega für Ihre stets gutgelaunte, optimistische Art das praktische Know-how zu vermitteln und so manches scheinbar unlösbare Problem zu lösen.

Und schließlich einen unendlich großen Dank an Michi und an meine Eltern, die stets geduldig an meiner Seite standen und mich unterstützt und motiviert haben.