

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

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

**Feinkartierung eines Schizophrenielocus auf Chromosom 15q und
Assoziationsstudien seltener Mutationen des Kandidatengens *SLC12A6*
mit psychiatrischen Erkrankungen**

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

vorgelegt von
Kirsten Anke Johannssen
aus Göttingen

Würzburg, März 2010

Referent: Prof. Dr. med. Klaus-Peter Lesch

Koreferent: Prof. Dr. med. Andreas Warnke

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29. November 2010

Die Promovendin ist Ärztin

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

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, Lesch KP (2005):

Rare variants of the gene encoding the potassium chloride co-transporter 3 are associated with bipolar disorder.

Int J Neuropsychopharmacol. 8(4):495-504.

Meyer J, Schraut K, Johannssen K, Ortega G., Reif A, Lesch KP (2002):

Positional cloning of schizophrenia-related genes on chromosome 15q14-15.

Am J Med Genet 114, 860, Abstract

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Schizophrenie	1
1.1.1	Definition und historischer Überblick	1
1.1.2	Klinik, Klassifikation und Diagnostik	2
1.1.3	Epidemiologie	4
1.1.4	Pathophysiologie	5
1.1.5	Periodische Katatonie	9
1.2	Bipolare Erkrankungen	11
1.2.1	Definition und historischer Überblick	11
1.2.2	Klinik, Klassifikation und Diagnostik	11
1.2.3	Epidemiologie	13
1.2.4	Pathophysiologie	13
1.3	Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien bei komplex-vererbten Erkrankungen	16
1.4	Die Region 15q13-22 als Kandidatengenregion für psychiatrische und neurologische Erkrankungen	19
1.5	<i>SLC12A6</i> und seine Bedeutung für psychiatrische und neurologische Erkrankungen	24
2.	Fragestellung	26
3.	Material und Methoden	27
3.1.	Material	27
3.1.1	Patienten und Kontrollpersonen	27
3.1.2	Enzyme	28
3.1.3	Synthetische Oligonukleotide	28
3.1.4	Radionukleotide	29
3.1.5	Nukleotide	29
3.1.6	Chemikalien	29
3.1.7	Lösungen und Puffer	31
3.1.8	Geräte	33
3.1.9	Verbrauchsmaterialien	34
3.1.10	Software	34

3.2.	Methoden	35
3.2.1	Kultur lymphoblastoider Zellen	35
3.2.2	Isolierung und Aufreinigung von DNA	35
3.2.2.1	DNA-Extraktion aus lymphoblastoiden Zellen	35
3.2.2.2	DNA-Extraktion aus Vollblut	36
3.2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	36
3.2.3.1	Standard-PCR	38
3.2.3.2	Allelspezifische PCR (ARMS)	39
3.2.3.3	Radioaktiv-PCR	39
3.2.4	DNA-Aufreinigung	40
3.2.5	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse mittels Restriktionsverdau	40
3.2.6	Elektrophoretische Auftrennung und Nachweis von DNA- Fragmenten	41
3.2.6.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Nachweis mittels Autoradiographie	42
3.2.6.2	Agarose-Gelelektrophorese und Nachweis mittels Ethidiumbromid	43
3.2.7	Statistische Methoden	44
4.	Ergebnisse	46
4.1.	Feinkartierung Chromosom 15q 14-15	46
4.2.	Fall-Kontroll-Studie zur Assoziation seltener <i>SLC12A6</i> -Polymorphismen mit Schizophrenie und bipolarer Erkrankung	50
5.	Diskussion	57
6.	Zusammenfassung	63
7.	Literaturverzeichnis	64
8.	Abbildungsverzeichnis	80
9.	Abkürzungsverzeichnis	81

1. Einleitung

1.1 Schizophrenie

1.1.1 Definition und historischer Überblick

Unter dem Oberbegriff der Schizophrenie werden psychische Erkrankungen mit einer Störung des Denkens, der Wahrnehmung und der inadäquaten oder verflachten Affektivität zusammengefasst. Die Bezeichnung leitet sich aus dem Griechischen *schizo* = ich spalte und *phren* = Geist ab.

Die wechselhafte Begriffsgeschichte der Schizophrenie beginnt Ende des 19. Jahrhunderts durch Emil Kraepelins beschreibende Zweiteilung der Psychosen. Der Heidelberger Arzt und Psychiatrieforscher grenzte 1893 das episodisch und eher günstig verlaufende „*manisch-depressive Irrsein*“ von der fortschreitenden und eher ungünstig verlaufenden *Dementia praecox* ab. Mit den Hauptsymptomen Halluzinationen, Wahnvorstellungen, Negativismus, gestörter Aufmerksamkeit und emotionaler Dysfunktion handelt es sich bei letzterer um die Vorläuferin unserer heutigen Schizophrenie.

Der Begriff der „Schizophrenie“ wurde erst 1911 durch den Schweizer Arzt und Forscher Eugen Bleuler eingeführt. In der Kraepelinschen *Dementia praecox* erkannte er gemeinsame Grundsymptome wie Wahn, Halluzinationen und Störungen des Affektes und Denkens und beschrieb die Erkrankung als eine „*spezifisch geartete, sonst nirgends vorkommende Alteration des Denkens und Fühlens und der Beziehung zur Außenwelt*“ (Bleuler 1911). Das zentrale Merkmal hierbei war für Bleuler der gespaltene Geist, der ein zielgerichtetes, effizientes Denken und Kommunizieren nicht mehr zuließ. Aufgrund dieser Spaltung prägte er den heutigen Namen Schizophrenie, hielt jedoch den Begriff *Dementia praecox* für entbehrlich, da er auf zahlreiche Fälle mit spätem Beginn und ohne geistigen Verfall verweisen konnte.

Die Werke Kraepelins und Bleulers führten zu einem umfassenden Schizophrenie-Konzept, von dem sich die heute gängigen Klassifikationssysteme in wesentlichen Aspekten ableiten. Ergänzt wurden die Vorschläge durch Kurt Schneiders akzessorische Symptome des ersten und

zweiten Ranges, mit denen er spezifische Manifestationen von Halluzinationen und Wahn beschreibt.

1.1.2 Klinik, Klassifikation und Diagnostik

Treffend beschreibt Asmus Finzen die Schizophrenie als „*die schillernde aller psychischen Erkrankungen*“ (Finzen 1993). Gemeinsam ist den vielfältigen klinischen Erscheinungsbildern der Schizophrenien eine Störung des Ich-Erlebens, des Denkens, der Realitätsauffassung und Wahrnehmung sowie des Affektes. Hingegen sind Bewusstseinsklarheit und intellektuelle Fähigkeiten in der Regel nicht beeinträchtigt, obwohl sich im Krankheitsverlauf gewisse kognitive Defizite entwickeln können.

Basierend auf Kraepelins erstem systematischem Ansatz zur Ordnung der vielfältigen Erscheinungsbilder der Schizophrenie werden vier große klinische Subtypen mit allerdings fließenden Übergängen differenziert, bei denen jeweils unterschiedliche Hauptsymptome führend sind.

Im Vordergrund der Hebephrenie, die vor allem junge Erwachsene betrifft, stehen affektive Veränderungen, Auffälligkeiten des Verhaltens und des formalen Denkens mit flüchtig und bruchstückhaft auftretenden Wahneinfällen und Halluzinationen.

Bei der am häufigsten vorkommenden paranoid-halluzinatorischen Schizophrenie herrschen eindrucksvolle Wahnvorstellungen und vielfältige Halluzinationen vor, das formale Denken hingegen ist weniger beeinträchtigt. Sie manifestiert sich typischerweise etwas später im Lebensalter und hat eine recht gute Prognose ohne die Ausbildung schwerer Residuen.

Im Gegensatz hierzu ist die Schizophrenia simplex durch sich langsam und chronisch entwickelnde Negativsymptome mit Antriebsminderung und Affektverflachung gekennzeichnet.

Charakteristisch für die katatone Schizophrenie ist ein eindrucksvolles Bild mit ausgeprägten psychomotorischen Störungen wie Stupor und Erregungszuständen, Haltungstereotypen, Negativismus und Kataplexie.

Von einer undifferenzierten Schizophrenie spricht man bei Vorherrschen uncharakteristischer Symptome, die sich keinem der beschriebenen Subtypen zuordnen lassen.

Einige dieser Krankheitsverläufe enden in einem so genannten schizophrenen Residuum, welches klinisch der Schizophrenia simplex ähnelt.

Die weit verbreitete ICD-10-Klassifikation unterscheidet insgesamt acht Symptomgruppen, denen für die Diagnose der Schizophrenie eine besondere Bedeutung zukommt (siehe Tabelle 1). Zur Diagnosestellung wird das Vorliegen mindestens eines Symptoms aus den Symptomgruppen 1 - 4 oder mindestens zweier Symptome aus den Gruppen 5 - 8 gefordert. Zwecks Abgrenzung zur schizophreniformen Störung müssen diese Symptome für mindestens einen Monat bestehen. Hierbei ist eine zugrunde liegende organische Ursache wie zum Beispiel eine akute Intoxikation auszuschließen.

Tabelle 1: Diagnostische Kriterien der Schizophrenie nach ICD-10.

1.	Gedankenlautwerden, -eingebung, -entzug, oder -ausbreitung
2.	Kontrollwahn, Beeinflussungswahn oder Gefühl des Gemachten, Wahnwahrnehmungen
3.	kommentierende oder dialogische Stimmen
4.	Anhaltender, kulturell unangemessener, bizarrer Wahn
5.	Anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität
6.	Zerfahrenheit oder Danebenreden (Neologismen, Gedankenabreißen)
7.	Katatone Symptome
8.	Negativsymptome (= Minussymptome) wie Apathie, Sprachverarmung, verflachte oder inadäquate Affekte

Gemäß der eher im angloamerikanischen Raum verwendeten DSM-IV-Klassifikation ist zur Diagnose einer Schizophrenie eine mindestens sechsmonatige Phase mit schizophrenen Symptomen notwendig. Hierbei muss eine aktive Phase von mindestens einem Monat eingeschlossen sein, die übrige Zeit kann aus einer Prodromal- oder Residualphase bestehen.

Obwohl die Wernicke-Kleist-Leonard-Klassifikation international weniger verbreitet ist, handelt es sich bei der von Karl Leonard Mitte des 20. Jahrhunderts weiterentwickelten Systematik der endogenen Psychosen um eine sehr präzise Beschreibung der Erkrankungen nach nosologischen Kriterien, nach der sowohl Verlauf, Genetik als auch therapeutisches Ansprechen vorausgesagt werden können. Nach Leonard unterteilen sich die endogenen Psychosen in die als prognostisch günstig einzustufenden phasischen und zyklischen Psychosen auf der einen Seite, und die Gruppe der Schizophrenien auf der anderen Seite. Hierbei grenzt Leonard die systematischen Schizophrenien mit schleichender Progredienz, geringer erblicher Komponente und eher ungünstiger Prognose von den unsystematischen Schizophrenien mit phasischem Verlauf, hoher genetischer Belastung und eher günstigem Verlauf ab. Zu letzteren gehört unter anderem auch die periodische Katatonie.

Eine diagnostische Herausforderung stellt die differentialdiagnostische Abgrenzung der reinen Schizophrenie von organischen Störungen und schizophreniformen Störungen mit teils sehr ähnlicher klinischer Präsentation dar. Die ausführliche Anamnese inkl. Familienbefragung und klinisch-neurologische Untersuchung wird hierzu durch Laboruntersuchungen, testpsychologische Verfahren und geeignete bildgebende Untersuchungen ergänzt.

1.1.3 Epidemiologie

Das Vorkommen der Schizophrenie ist altersabhängig und unterscheidet sich in verschiedenen ethnischen Gruppen und sozialen Gefügen.

Mit einem Erstmanifestationsalter zwischen 17 und 30 Jahren handelt es sich um eine Erkrankung des frühen Erwachsenenalters. Obwohl Männer und Frauen bei einer Lebenszeitprävalenz von ca. 1% etwa gleich häufig erkranken (McGue *et al.* 1983), liegt das Ersterkrankungsalter bei Männern im Mittel zwei Jahre früher als bei Frauen (Franzek und Beckmann 1992).

Interessanterweise zeigte sich bei Untersuchungen zum sozioökonomischen Status von Schizophrenie-Patienten ein gehäuftes Erkrankungsvorkommen in unteren sozialen Schichten. Kontrovers diskutiert wird die Drifthythese, nach der man davon ausgeht, dass Schizophrene im Verlauf ihrer Erkrankung einen beruflichen und sozialen Abstieg erfahren und so aus ihrer bisherigen sozialen Umgebung herausfallen (Silverton und Mednick 1984, Cooper 2005). Auch in Abhängigkeit der geographischen Region finden sich unterschiedliche Prävalenzraten (Jablensky *et al.*, 1992). Ähnlich wie zum Beispiel bei der Multiplen Sklerose ist eine höhere Erkrankungsprävalenz mit zunehmender Entfernung vom Äquator zu beobachten (Torrey 1980). Des Weiteren konnte in verschiedenen Studien, insbesondere bei in der Großstadt geborenen und aufgewachsenen Schizophrenie-Patienten, eine Häufung der Geburtenrate in Frühjahrs- und Wintermonaten nachgewiesen werden (Torrey *et al.* 1997). Ursächlich für dieses Phänomen werden gehäuft vorkommende virale Infektionen während der Schwangerschaft diskutiert, die mit einer erhöhten Rate gestörter Hirnentwicklung verbunden sind.

1.1.4 Pathophysiologie

Trotz intensiver Anstrengungen zahlreicher Forschergruppen und in zunehmendem Maße auch großer internationaler Konsortien über die letzten Jahrzehnte hinweg, ist eine vollständige Aufklärung der Ursachen der Schizophrenie bislang nicht gelungen (Baron 2001, Owen *et al.* 2005). Während dieser Bemühungen wurden vielfältige Erklärungsmodelle für ein präzises pathophysiologisches Verständnis dieser facettenreichen Erkrankung aufgestellt, von denen einige mittlerweile widerlegt, andere hingegen vielfach bestätigt werden konnten.

Weitgehende Einigkeit besteht mittlerweile jedoch darüber, dass es sich um eine multifaktoriell bedingte Erkrankung handelt, bei der komplexe genetische, neurobiologische, psychosoziale und weitere Umwelteinflüsse in unterschiedlicher Gewichtung zusammenwirken.

Nach dem bereits früh formulierten Vulnerabilitäts-Streß-Modell (Zubin 1977) wird eine genetisch angelegte Krankheitsprädisposition durch neuropathologische und biochemische Veränderungen so moduliert, das unter bestimmten Umständen das Hinzutreten weiterer, beispielsweise psychosozialer Stressoren ausreicht, um zum Ausbruch der Erkrankung zu führen.

Im Gegensatz zu früheren Überlegungen, nach denen Faktoren wie Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen (Cannon *et al.* 2002, Clarke *et al.* 2006), Geburten in Frühjahrs- und Wintermonaten, gehäufte Infektionen (Torrey *et al.* 1997) oder toxische Einflüsse wie zum Beispiel Cannabis-Konsum (Moore *et al.* 2007) eine große Bedeutung in der Krankheitsentstehung zugeschrieben wurden, ist heute bekannt, dass diese Umweltfaktoren nur zu einem geringen Prozentsatz zur Pathogenese der Schizophrenie beitragen (McGuffin *et al.* 1994).

Hingegen räumen Cardno und Gottesman den genetischen Einflüssen einen ursächlichen Anteil am Erkrankungsrisiko von mindestens 80% ein (Cardno und Gottesman 2000). Ausgehend von der Beobachtung einer familiären Häufung schizophrener Erkrankungsfälle, aber auch anderer psychiatrischer Krankheiten und Persönlichkeitsvarianten in den Familien Schizophrener (Kety *et al.* 1994, Kendler *et al.* 1995) wurden zahlreiche systematische Familienuntersuchungen sowie Zwillings- und Adoptionsstudien durchgeführt. So besteht bei erstgradigen Verwandten Schizophrener ein ca. 10-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko im Vergleich zur Normalbevölkerung. Auch die höhere Konkordanzrate für Schizophrenie bei eineiigen Zwillingen von ca. 50% im Vergleich zu ca. 15% bei zweieiigen Zwillingspaaren belegt eindeutig die Relevanz genetischer Faktoren (Kendler *et al.* 1993a, Wong *et al.* 2005). Familiäre Umgebungsfaktoren scheinen hingegen keine wesentliche Rolle zu spielen (Kendler *et al.* 1994).

Obwohl Böök bereits 1953 einen dominanten Erbgang für die Schizophrenie mit katatonen Elementen und der Neigung zur Periodizität postulierte und hierfür eine einzelne Mutation verantwortlich machte (Böök 1953), ließ sich bis heute kein eindeutiger monogener Vererbungsmodus für die Schizophrenie nachweisen. Eine Ausnahme scheint die unten näher beschriebene familiäre

periodische Katatonie darzustellen, die laut Beckmann und Mitarbeitern einem dominanten Erbgang folgt (Beckmann *et al.* 1996).

Das derzeit favorisierte Übertragungsmodell nimmt, ähnlich wie beispielsweise beim Diabetes mellitus, einen komplexen heterogenen Übertragungsmodus an (Gottesman und Shields 1967, Risch und Baron 1984). Hierbei tragen mehrere gleichzeitig vorliegende genetische Veränderungen als sog. Risikoallele an verschiedenen Genorten mit einem jeweils nur kleinen Einfluss zum Erkrankungsrisiko bei (Risch 1990). Je nach Zusammenwirkungen der einzelnen genetischen Veränderungen untereinander, kommt es unter dem Einfluss anderer ungünstiger Faktoren zur Krankheitsmanifestation.

Im Rahmen intensiver Forschung mit Fortschritten auf dem Gebiet der genetischen Diagnostik konnten in genomweiten Kopplungsanalysen zunächst zahlreiche chromosomale Regionen identifiziert werden, die mutmaßliche Suszeptibilitäts- oder Dispositionsgene für die Schizophrenie enthalten (Berretini 2001, O'Donovan *et al.* 2003, Riley und McGuffin 2000, Owen *et al.* 2005). Durch mehrere Studien bestätigte Befunde fanden sich insbesondere für Kandidatengenregionen auf den Chromosomen 1, 6, 8, 13 und 22 (Badner und Gershon 2002, Lewis *et al.* 2003), wobei die meisten der anfangs Erfolg versprechenden Befunde jedoch nicht repliziert werden konnten. Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich ein sehr geringer Beitrag der einzelnen Gene zum Krankheitsrisiko oder eine zu kleine untersuchte Stichprobe (Suarez *et al.* 1994).

Aufgrund ihrer chromosomalen Lage sowie der mutmaßlichen pathophysiologischen Funktion, insbesondere an Wirkorten bestimmter, zur Therapie eingesetzter Pharmaka, wurden mittlerweile zahlreiche krankheitsbegünstigende Suszeptibilitätsgene identifiziert. Als aussichtsreichste Kandidatengene seien an dieser Stelle das auf Chromosom 6 gelegene Dysbindin-Gen (*DTNBP1*) (Straub *et al.* 2002, Riley und Kendler 2006) sowie das auf Chromosom 8 lokalisierte Neuregulin 1 (*NRG1*) (Stefansson *et al.* 2002, Riley und Kendler 2006) genannt. Ebenso wie viele weitere interessante Suszeptibilitätsgene, kodieren diese Gene für Proteine, die eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung insbesondere der glutamatergen Synapse im reifen Gehirn bzw. vielfältigen Prozessen der Hirnentwicklung spielen. So

konnte unter anderem gezeigt werden, dass Neuregulin 1 eine Schlüsselposition in der neuronalen Differenzierung und Migration, der Synaptogenese und der Myelinisierung einnimmt (Buonanno und Fischbach 2001, Harrison und Weinberger 2005). Des Weiteren weisen Träger bestimmter Risikoallele des Neuregulin 1 ein signifikant kleineres Hippokampusvolumen im Vergleich zu Personen auf, die dieses Allel nicht tragen (Stefansson *et al.* 2002).

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts veröffentlichte Alzheimer erste Studien über hirnstrukturelle Veränderungen bei Schizophrenie und anderen psychiatrischen Erkrankungen (Alzheimer 1897). Im Rahmen des Fortschritts der Forschung in den Bereichen der Neuroanatomie und der funktionellen Bildgebung konnten mittels histologischer post-mortem Untersuchungen sowie durch fMRT Studien zahlreiche hirnstrukturelle Veränderungen nachgewiesen werden (Lawrie und Abukmeil 1998). So findet sich bei Schizophreniepatienten und teilweise auch bei deren gesunden Angehörigen eine Reduktion des Neuropils insbesondere im präfrontalen Kortex, dem Temporallappen und der Hippokampusregion, welches sich in den Bildgebungen unter anderem in einer Erweiterung des Ventrikelsystems und der äußeren Liquorräume widerspiegelt. Aus diesen Beobachtungen leitet sich zum Beispiel die pathogenetische Hypothese der fronto-temporo-limbischen Netzwerkstörung und lokalen Dyskonnektivität ab (Vogelely und Falkai 1998). Passend hierzu konnten in biochemischen Befunden komplexe Störungen verschiedener Transmittersysteme nachgewiesen werden (z. B. Konradi und Heckers 2003), die ebenso wie die zahlreichen neuroanatomischen und funktionellen Untersuchungen letztlich auf die genetische Grundlage der Schizophrenie verweisen.

Insbesondere bei komplexen genetischen Erkrankungen wie auch der Schizophrenie stellt die Suche nach Suszeptibilitätsgenen eine schwierige Herausforderung dar. In Anlehnung an die erfolgreichen Bemühungen bei vielen monogen vererbten Erkrankungen, wird auch bei der Schizophrenie eine mehrstufige Strategie zur Risikoallelsuche verfolgt. Mittels genomweiter Kopplungsanalysen an Multiplexfamilien erfolgt im ersten Schritt die Identifizierung von Kandidatengenregionen, die dann im Rahmen

anschließender systematischer Feinkartierungen weiter eingegrenzt werden. Die nun in überschaubarer Anzahl vorliegenden Kandidatengene können mittels Mutationsanalysen, Assoziationsstudien oder funktionellen Untersuchungen weiter analysiert werden. Ziel dieses Prozesses ist am Ende die Identifizierung einer oder mehrerer krankheitsverursachender Genvarianten.

1.1.5 Periodische Katatonie

Einige Autoren vermuten, dass sich hinter der übergeordneten Erkrankung „Schizophrenie“ eine heterogene Gruppe zahlreicher eigenständiger Krankheitsentitäten verbirgt (Mirnics und Lewis 2001). Wie oben beschrieben, unterschied bereits Leonard verschiedene Untergruppen der Schizophrenien in Abhängigkeit ihrer Symptome, der Prognose und des Therapieansprechens. Seine Klassifikation und die insbesondere auf klinischen Beobachtungen basierende Differenzierung zwischen systematischer Katatonie und der zu den unsystematischen Schizophrenien gehörenden periodischen Katatonie (SCZD10, OMIM %605419) konnten von mehreren Forschergruppen als diagnostisch valide bestätigt werden (Stöber *et al.* 1995, Peralta *et al.* 2001).

Die klinische Unterform der periodischen Katatonie zeichnet sich durch einen meist akuten Beginn mit schubförmigem bipolarem Verlauf aus. Bei im Vordergrund stehenden psychomotorischen Beeinträchtigungen kommt es zu einem oft abrupten Wechsel mit Episoden eines hyperkinetischen Erregungszustands und Phasen eines akinetischen Stupors, wobei beide Pole auch parallel vorliegen können. Hyperkinetische Krankheitsphasen sind durch psychomotorische Erregung, Bewegungsstereotypien und Iterationen, d. h. sich wiederholende motorische und sprachliche Entäußerungen, gekennzeichnet. Des Weiteren finden sich eindrucksvolle Manierismen mit teils bizarrem Grimassieren und sprachliche Stereotypien (Echolalie). Das Bewegungsspiel kann steif und ruckartig wirken (Parakinesen). Während akinetischer Phasen imponiert hingegen ein antriebsgeminderter bis stuporöser Patient mit einer eindrücklichen wächsernen Biegsamkeit unter passiver Bewegung (Flexibilitas cerea), die den Kranken oft stundenlang in einer unbequemen bizarren

Körperposition verharren lässt (Katalepsie). Das Krankheitsbild kann zusätzlich mit vermehrter Aggressivität sowie mit psychotischen Elementen wie Halluzinationen und Wahn vergesellschaftet sein. Obwohl Leonard eine eher günstige Prognose beschreibt, mündet die Erkrankung meist in einem akinetischen Defektzustand (Leonard 1995).

Für die psychiatrische Genetik ist das Krankheitsbild von besonderer Bedeutung, da eine deutliche familiäre Häufung mit starker genetischer Determination beobachtet wurde. Stöber und Beckmann postulieren für die periodische Katatonie einen dominanten Mendelschen Erbgang mit einem gesteigerten Erkrankungsrisiko für Verwandte ersten Grades von 26,9% (Stöber *et al.* 1995, Beckmann *et al.* 1996). Auf dem Boden dieser Erkenntnisse wurden mehrere genomweite Kopplungsanalysen durchgeführt (Stöber *et al.* 2000 und 2001).

Das klinische Bild der Katatonie, welches bislang üblicherweise eng mit der Schizophrenie verbunden wurde, ist nach aktuellen Beobachtungen jedoch keinesfalls auf diese Erkrankungsgruppe beschränkt, sondern kommt weit häufiger insbesondere auch bei den bipolaren Erkrankungen vor. Von Taylor und Fink wird daher ein übergreifender und eigenständiger Eintrag in der Klassifikation psychiatrischer Erkrankungen gefordert (Taylor und Fink 2003).

1.2. Bipolare Erkrankungen

1.2.1 Definition und historischer Überblick

Bereits in der Antike wurden affektive Erkrankungen präzise beschrieben. Hippokrates unterschied im 4. Jahrhundert v. Chr. zwischen der Melancholie und der Manie, die er auf humorale Störungen der schwarzen und gelben Galle zurückführte. Erst mit Kahlbaum wurde Ende des 19. Jahrhunderts der Begriff der Zyklothymie eingeführt, um zu verdeutlichen, dass es sich bei den beiden Polen Melancholie und Manie um unterschiedliche Zustände der gleichen Erkrankung handelte (Kahlbaum 1874). Wie bereits anfangs erwähnt (s. 1.1.1), stellte Kraepelins wenige Jahre später beschriebenes „*manisch-depressives Irrsein*“ den Gegenpol der *Dementia praecox*, der späteren Schizophrenie, dar. Unter dieser großen Gruppe der affektiven Psychosen fasste er nicht nur die unipolaren Depressionen zusammen, sondern auch Mischzustände, bei denen sowohl manische als auch depressive Symptome in Erscheinung treten. Lange Zeit wurde diese heterogene Erkrankungsgruppe nicht weiter unterteilt.

Im Zuge von Verlaufsbeobachtungen erfolgte erst im 20. Jahrhundert unter anderem durch Karl Leonard eine weitere Differenzierung der phasischen und zykloiden Psychosen in unipolare rein melancholische oder manische Krankheitsbilder oder die manisch-depressive Erkrankung, die beide Symptompole in sich vereint (Leonard 1979). Diese differenzierten Überlegungen bilden die Grundlage für die heute verwendeten Klassifikationen.

1.2.2 Klinik, Klassifikation und Diagnostik

Psychische Erkrankungen mit im Vordergrund stehender Beeinträchtigung der Stimmung und der Affektivität werden übergeordnet als affektive Störungen bezeichnet. In den meisten Fällen lassen sich depressive, manische, hypomanische oder auch gemischte Krankheitsphasen abgrenzen.

Während bei der depressiven Phase eine gedrückte Stimmung mit Antriebsminderung und Interessensverlust, oft verbunden mit vegetativen

Störungen und vermindertem Selbstwertgefühl im Vordergrund stehen, ist die Manie durch eine inadäquat gehobene euphorische bis gereizte Stimmung sowie eine starke Antriebssteigerung gekennzeichnet. Hinzutreten oft ein gesteigertes Selbstwertgefühl und Größenideen. In deutlich abgeschwächter Form finden sich diese Charakteristika auch bei der Hypomanie. Je nach Ausprägung können in Analogie zur Schizophrenie zu beiden Polen auch psychotische Symptome wie Wahn oder Halluzinationen hinzutreten.

Die Unterform der bipolaren Störung, die synonym auch als manisch-depressive Erkrankung bezeichnet wird, ist durch einen Verlauf mit rezidivierenden depressiven, manischen oder hypomanischen Phasen gekennzeichnet. Unterbrochen werden diese in der Regel durch Episoden ausgeglichener Stimmungslage.

Gemäß der ICD-10-Klassifikation werden zur Diagnose einer bipolaren Störung mindestens zwei in Dauer und Ausprägung definierte Episoden gegensätzlicher Stimmungslagen, entweder Depression oder Manie, gefordert. Zusätzlich wird unterschieden, ob die gehobene Stimmungslage das Vollbild der Manie (bipolar I) erreicht, oder als Hypomanie (bipolar II) zu bezeichnen ist.

Eine besondere Verlaufsform der bipolaren Störung stellt das *rapid cycling* dar. Hierbei handelt es sich um eine Spielart, bei der ein rascher Wechsel mit mindestens vier Stimmungsumschwüngen in einem Jahr zu verzeichnen ist.

Ähnlich wie auch die Schizophrenie, ist die bipolare Störung häufig mit Komorbiditäten wie Alkohol- und Drogenabhängigkeit, aber auch mit Angst- und Persönlichkeitsstörungen vergesellschaftet (Evans 2000).

Durch die oft mehrmonatige Episodendauer mit starker psychosozialer Beeinträchtigung, hoher Tendenz zur Chronifizierung und beträchtlicher Suizidrate von ca. 15 bis 20% je nach Verlaufsform (Jamison 2000) erhält diese Krankheitsgruppe zusammen mit den Schizophrenien eine wichtige gesundheitsökonomische Bedeutung.

1.2.3 Epidemiologie

Interessanterweise finden sich im Vergleich der epidemiologischen Fakten der bipolaren Erkrankung deutliche Parallelitäten mit der Gruppe der Schizophrenien (Craddock und Jones 1999). Bei einer identischen Lebenszeitprävalenz von ca. 1 % und einer Erstmanifestation im frühen Erwachsenenalter meist zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr bestehen auch hier – anders als bei den unipolaren Depressionen- keine Unterscheide in der Erkrankungshäufigkeit zwischen den Geschlechtern. Eine Ausnahme jedoch stellt die prognostisch ungünstigere Verlaufsform der *rapid cycler* dar, die überzufällig häufig bei Frauen gefunden wird. In Analogie zur Schizophrenie ist auch bei der manisch-depressiven Erkrankung eine Geburtenhäufung im Winter und Frühjahr (Boyd *et al.* 1986) zu verzeichnen, was ähnliche pathophysiologische Prozesse der Krankheitsentstehung vermuten lässt.

Die seltener vorkommende bipolare Verlaufsform manifestiert sich im Vergleich zur unipolaren Störung früher, verläuft oft schwerer und ist mit einer höheren Suizidrate assoziiert (Jamison 2000).

1.2.4 Pathophysiologie

Ähnlich wie auch bei der Gruppe der Schizophrenien ist das Wissen um die Pathogenese der bipolaren Störung trotz intensiver Forschungsbemühungen noch lückenhaft. Auch hier wird ein multifaktoriell bedingtes Krankheitsmodell aus einem Zusammenspiel komplexer genetischer, neurobiologischer und nicht zuletzt psychosozialer Faktoren angenommen. Anders als bei den unipolaren Depressionen, wo psychosozialen Umgebungsfaktoren wie zum Beispiel traumatischen Lebens- oder Kindheitserinnerungen eine größere ätiologische Bedeutung zukommt (Kendler *et al.* 1993c), stehen insbesondere bei den bipolaren Verlaufsformen genetische Faktoren im Vordergrund.

Bereits der frühen psychiatrischen Forschung war eine erhöhte familiäre Belastung bipolarer Störungen bekannt. In älteren und aktuellen Familienuntersuchungen konnte ein 5- bis 10-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko

für bipolare Erkrankungen bei Verwandten ersten Grades im Vergleich zur Normalbevölkerung nachgewiesen werden. Zwillings- und Adoptionsstudien belegen eine höhere Konkordanzrate für bipolare Störungen bei eineiigen Zwillingen zwischen 40-70% im Vergleich zu ca. 15-20% bei zweieiigen Zwillingspaaren (Bertelsen *et al.* 1977, Craddock und Jones 1999).

Auch wenn die Datenlage zur Ursachenerforschung bipolarer Störungen im Vergleich zu den Bemühungen bei der Schizophrenie etwas geringer ist, konnten mittels genomweiter Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien mehrere chromosomale Regionen mit einer Vielzahl möglicher Suszeptibilitätsgene identifiziert werden (Berrettini 2003, Kato 2007, Craddock und Sklar 2009). Durch mehrere Studien und Metaanalysen bestätigte Regionen wurden insbesondere auf den langen Armen der Chromosomen 6, 13, 18 und 22 (Badner und Gershon 2002, Lewis *et al.* 2003) identifiziert. Trotz allem finden sich in Folgeuntersuchungen auch konträre Ergebnisse (Segurado *et al.* 2003), was die genetische Komplexität der Erkrankungsgruppe mit einer wahrscheinlich individuellen Kombination verschiedener Risikoallele, die in Wechselwirkung miteinander treten (Epistasie) und in einzelnen Familien zur Erkrankungsprädisposition beitragen, unterstreicht. Insbesondere aufgrund ihrer neurobiologischen Funktion rückten mehrere viel versprechende Suszeptibilitätsgene in das Zentrum des Forschungsinteresses. Augenmerk sei an dieser Stelle exemplarisch auf den auf Chromosom 13q gelegenen Genort *G72/DAOA* gerichtet, der für einen D-Aminosäure-Oxidase-Aktivator codiert und indirekt den Glutamat-Stoffwechsel beeinflusst (Schumacher *et al.* 2004). Auch bei den bereits im Zusammenhang mit der genetischen Grundlage der Schizophrenie erwähnten Genen Dysbindin (*DTNBP1*) und Neuregulin 1 (*NRG1*) handelt es sich um interessante Kandidatengene (Green *et al.* 2005, Raybould *et al.* 2005).

Interessanterweise finden sich - passend zu den bereits beschriebenen klinischen Parallelitäten - auch deutliche Überlappungen in der genetischen Grundlage der Schizophrenie und der bipolaren Störungen (Berrettini 2003, Craddock *et al.* 2006), so dass von verschiedenen Forschergruppen unter der Annahme pleiotroper Geneffekte eine Überarbeitung der bislang gültigen

Einteilung psychiatrischer Krankheiten gefordert wird (Taylor und Fink 2003, Craddock *et al.* 2006). Auch die bei Schizophrenen beschriebenen anatomisch-morphologischen Hirnveränderungen finden sich teilweise, wenn auch in milderer Form, bei vielen bipolar Erkrankten wieder (Manji und Lenox 2000).

Erst kürzlich wurde in mehreren genomweiten Assoziationsstudien eine signifikante Assoziation bestimmter Allele des auf Chromosom 10 gelegenen Gens *ANKK3* sowohl mit bipolaren Störungen als auch mit Schizophrenien gefunden (Ferreira *et al.* 2008, Green *et al.* 2009). Dieses Gen kodiert für das axonale Adapterprotein Ankyrin G, welches unter anderem die Struktur von spannungsabhängigen Natrium-Kanälen reguliert (Poliak und Peles 2003). Des Weiteren fand sich in den gleichen Studien auch eine starke Assoziation der beiden Erkrankungen mit Varianten des Gens *CACNA1C* für die alpha-Untereinheit des ebenfalls spannungsabhängigen langsamen Calcium-Kanals *CACNA1C*. Einen dritten wichtigen Genlocus stellt zusätzlich die unter Punkt 1.4 näher beleuchtete Region 15q14 dar.

Vor dem Hintergrund dieser nachgewiesenen Varianten in Ionenkanal-codierenden Genen, deren Untereinheiten oder Ionenkanal-assoziierten Proteinen u. a. bei bipolar Erkrankten, wurde die interessante Hypothese aufgestellt, insbesondere bei der bipolaren Erkrankung handele es sich mindestens teilweise um eine Ionen-Kanalerkrankung. So wurden u. a. auch Veränderungen in den Kanal-codierenden Genen *KCNQ5* und *SK3* bei bipolaren Störungen und bei der Schizophrenie gefunden (Gargus 2006). Ähnliche Erkenntnisse konnten bereits hinsichtlich der Pathogenese anderer neurologischer Erkrankungen wie z. B. besonderer Formen der Migräne, der Epilepsie oder der Ataxien gewonnen werden (Montagna 2000).

1.3 Kopplungsanalysen und Assoziationsstudien bei komplex-vererbten Erkrankungen

Insbesondere bei komplexen genetischen Erkrankungen wie auch der Schizophrenie stellt die Suche nach Suszeptibilitätsgenen eine schwierige Herausforderung dar (Baron 2001). In Anlehnung an die erfolgreichen Bemühungen bei vielen monogen vererbten Erkrankungen, wird auch bei der Schizophrenie eine mehrstufige Strategie zur Risikoallelsuche verfolgt. Mittels genomweiter Kopplungsanalysen an Multiplexfamilien erfolgt im ersten Schritt die Identifizierung von Kandidatengenregionen, die dann im Rahmen anschließender systematischer Feinkartierungen weiter eingegrenzt werden. Die nun in überschaubarer Anzahl vorliegenden Kandidatengene können mittels Mutationsanalysen, Assoziationsstudien oder funktionellen Untersuchungen weiter analysiert werden. Ziel dieses Prozesses ist am Ende die Identifizierung einer oder mehrerer krankheitsverursachender Genvarianten (McGuffin 1999, van Camp 1999).

Im Rahmen genomweiter Kopplungsanalysen wird die gemeinsame Vererbung polymorpher genetischer Marker mit einer Erkrankung untersucht. Hierzu werden meist große Familien mit mehreren Erkrankten herangezogen. Basierend auf dem Prinzip des *Crossing Over* in der Meiose, spricht man von Kopplung, wenn ein polymorpher Marker und der gesuchte Krankheitsgenort gemeinsam vererbt und nicht im Rahmen von meiotischen Rekombinationsereignissen voneinander getrennt werden. Die Wahrscheinlichkeit einer gekoppelten Vererbung ist abhängig vom Abstand zwischen Marker- und Genort und sinkt, je weiter diese voneinander entfernt liegen. Ausgedrückt wird die Wahrscheinlichkeit für Kopplung im sog. *LOD score*, dem Logarithmus der Wahrscheinlichkeit von Kopplung gegenüber Nichtkopplung. Ein Wert über 3,0 gilt hierbei als beweisend für Kopplung, ein Wert zwischen 2,0 und 3,0 lediglich als Hinweis für Kopplung (Lander und Kruglyak 1995). Als Marker werden meist polymorphe Marker, zum Beispiel Mikrosatellitenmarker mit repetitiven Basensequenzen von 2-10 bp, verwendet, die in regelmäßigen Abständen von 5-20 cM über das gesamte Genom verteilt liegen, so dass eine verhältnismäßig geringe Anzahl von 300-400 Markern für

die genomweite Analyse des ca. 3300 cM umfassenden menschlichen Genoms ausreicht (Holmans und Craddock 1997). Als parameterabhängige Methode müssen bei Kopplungsanalysen jedoch Angaben über den zu Grunde liegenden Erbgang, die Penetranz und die Frequenz der Marker- und Krankheitsallele in der Bevölkerung vorliegen.

Sind diese wie in vielen Fällen nicht bekannt, stellt beispielsweise eine parameterfreie Untersuchungsmethode wie die *Affected-Sib-Pair* Analyse eine sinnvolle Alternative dar (Weeks und Lathrop 1995). Hierbei werden die genetischen Marker erkrankter Geschwisterpaare miteinander verglichen und eine Abweichung der zu erwarteten Verteilung analysiert.

Da sich bei komplexen Erkrankungen mit mehreren zu erwartenden additiven Geneffekten selten sehr hohe LOD scores erzielen lassen, kommt Replikationsstudien eine besondere Bedeutung zu. Hierbei ist die Bestätigung eines falsch-positiven Befundes sehr unwahrscheinlich, so dass die Aussage einer solchen Bestätigungsstudie hoch einzustufen ist (Plomin *et al.* 1994).

Eine ergänzende Methode zur Identifizierung krankheitsverursachender genetischer Varianten stellen Assoziationsstudien dar. Hierbei wird die Frequenz eines bestimmten Allels in einer Gruppe von Erkrankten mit der in einer gesunden Kontrollgruppe verglichen und statistisch ausgewertet. Unter Assoziation versteht man in diesem Zusammenhang das überzufällig häufige Auftreten eines Risikoallels in einem der Kollektive. Meistens werden im Rahmen von Fall-Kontroll-Studien verschiedene SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) eines Kandidatengens auf Assoziation mit einer Erkrankung analysiert. Besondere Bedeutung haben hierbei SNPs, die über eine Veränderung der Genexpression eine funktionelle Auswirkung haben.

Dem Nachweis einer positiven Assoziation können unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen. Zum einen kann das gefundene Risikoallel selbst durch eine Veränderung der Aminosäuresequenz oder Genexpression zum erhöhten Erkrankungsrisiko beitragen. Denkbar ist auch eine sehr eng benachbarte Lage des Risikoallels zu einem bislang noch unbekanntem krankheitsverursachenden Allel, mit dem es im Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*) steht. In Folge der räumlichen Nähe zueinander werden diese Allele nicht durch Rekombinationsereignisse voneinander getrennt. Auch Stratifikationseffekte

aufgrund einer unterschiedlichen ethnischen und geographischen Herkunft der untersuchten Kollektive können zu einem falsch-positiven Assoziationsergebnis führen. Letztlich ist auch eine rein zufällige Assoziation des Risikoallels mit der untersuchten Erkrankung denkbar (McGuffin 1999, van Camp 1999).

Obwohl Assoziationsstudien aus genannten Gründen anfällig für falsch-positive Ergebnisse sind, gelingt im Gegensatz zu den Kopplungsanalysen mit ihnen auch der Nachweis von Risikoallelen mit nur geringerem Beitrag zur Krankheitsentstehung wie bei polygenen und komplex-vererbten Erkrankungen der Fall (Risch und Merikangas 1996).

Seit einigen Jahren lassen sich im Rahmen genomweiter Assoziationsstudien unter Verwendung neuer Analyseverfahren und sog. *SNP arrays* eine große Anzahl verschiedener Allele gleichzeitig und zeitsparend untersuchen (Psychiatric GWAS Consortium Coordinating Committee 2009).

1.4 Die Region 15q13-22 als Kandidatengenregion für psychiatrische und neurologische Erkrankungen

Im Rahmen einer genomweiten Kopplungsanalyse der Würzburger Arbeitsgruppe (Stöber *et al.* 2000) konnten anhand einer Sammlung von DNA-Proben von Familien mit periodischer Katatonie zwei mögliche chromosomale Loci für periodische Katatonie gefunden werden. Basierend auf einem autosomal-dominanten Vererbungsmodus wurden 12 Multiplexfamilien mit insgesamt 135 Individuen, davon 57 an periodischer Katatonie Erkrankte, mittels 354 Mikrosatellitenmarkern genotypisiert. Neben einem Locus auf Chromosom 22q13, der in der Folge ebenfalls durch die Arbeitsgruppe weiter untersucht wurde (Meyer *et al.* 2001, Devaney *et al.* 2002), konnte unter anderem eine 40 cM umfassende Region auf Chromosom 15 identifiziert werden (GENEHUNTER PLUS *lod score* bei Koordinate 35.3 cM: 3.57; $p = 0,000026$), die durch jeweils mehrere große Familien unterstützt wurde.

Insbesondere dieser Region auf dem langen Arm von Chromosom 15 wurde von mehreren Arbeitsgruppen bereits eine besondere Bedeutung in der Pathogenese verschiedener psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen beigemessen. Unter anderem liegen positive Kopplungsbefunde für hereditäre Schizophrenien (Riley *et al.* 2000, Gejman *et al.* 2001) sowie für Schizophrenien mit neurophysiologischen Auffälligkeiten (Freedman *et al.* 1997, 2000, 2001) vor. So konnten beispielsweise Freedman und Kollegen über eine positive Kopplung der verminderten Unterdrückung der Antwort auf einen zweiten von zwei identischen auditorischen Stimuli (P50-Defizit) bei Schizophrenen mit dem Marker D15S1360 berichten. Insbesondere aufgrund seiner Lage in unmittelbarer Nähe dieses Markers, wurde das Gen *CHRNA7*, welches für die $\alpha 7$ -Untereinheit des neuronalen nikotinischen Achetylcholinrezeptors codiert, von dieser Arbeitsgruppe als viel versprechendes Kandidatengen für die Pathogenese der Schizophrenie gehandelt. Interessanterweise wiesen Turecki und Mitarbeiter eine positive Kopplung des Therapieansprechens bipolar Erkrankter auf die Behandlung mit Lithium mit dem ebenfalls in dieser Region von Chromosom 15 gelegenen Marker ACTC nach (Turecki *et al.* 2000, 2001).

Auch für die Pathogenese mehrerer neurologischer Erkrankungen spielt die genannte chromosomale Region eine bedeutende Rolle. So konnte auf Chromosom 15q14 einerseits ein Suszeptibilitätslocus für die juvenile myoklonische Epilepsie, eine Unterform der generalisierten idiopathischen Epilepsie, gefunden und andererseits ein positiver Zusammenhang mit der ebenfalls im Kindesalter auftretenden Rolando-Epilepsie festgestellt werden (Sander *et al.* 2000, Steinlein *et al.* 2001).

Durch Genotypisierung weiterer polymorpher Marker im Rahmen einer vorangegangenen medizinischen Doktorarbeit unserer Arbeitsgruppe wurde die ursprünglich ca. 40 cM umfassende Kandidatengenregion auf 20,3 cM zwischen den Markern D15S144 und D15S132 weiter eingeengt, so dass unter anderem das oben genannte viel versprechende Kandidatengen *CHRNA7* als Risikogen für die periodische Katatonie definitiv ausgeschlossen werden konnte (Meyer *et al.* 2002a). Die verbleibende Kandidatengenregion 15q13-15 ist schematisch in Abb. 1 dargestellt. Nahezu zeitgleich zur praktischen Durchführung der vorliegenden Arbeit konnten Stöber und Mitarbeitern die Kandidatengenregion weiter auf 11 cM zwischen den Markern D15S1042 und D15S659 (Stöber *et al.* 2002) verkleinern.

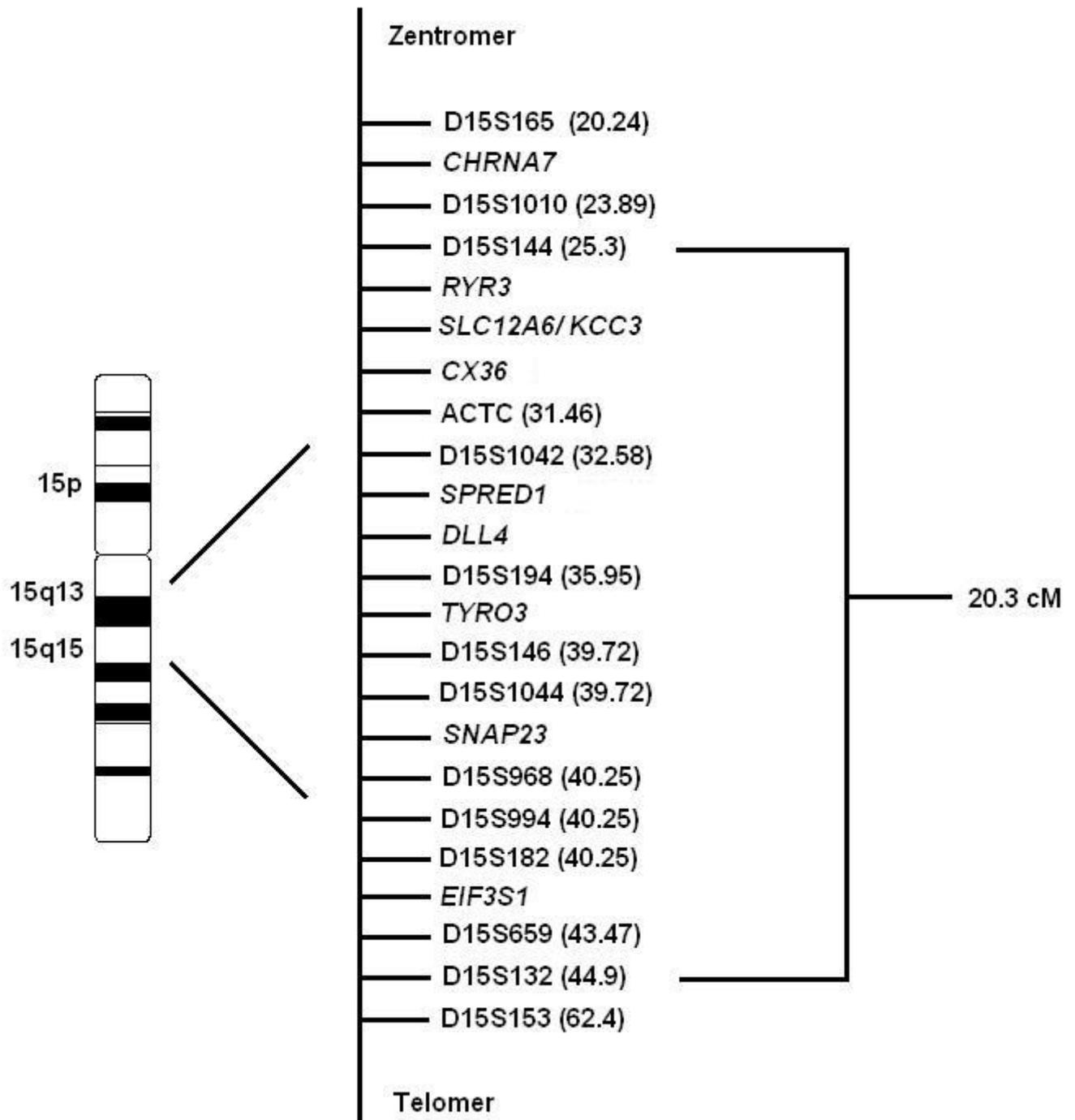


Abb. 1: Schematische Darstellung ausgewählter polymorpher Marker und potentieller Krankheitsgene (kursiv) der Kandidatengenregion 15q13-15. Die Angaben in Klammern geben die Position in cM gemäß Marshfield Map, 2001 an. Der markierte Bereich von 20.3 cM kennzeichnet die in Meyer *et al.* 2002a beschriebene Kandidatengenregion zwischen den Markern D15S144 und D15S132.

Ferner gelang mittels Mutationsanalyse auch der Ausschluss des Gens *CX36* (Meyer *et al.* 2002b), welches als Mitglied der Familie der Connexine für ein kanalbildendes *gap junction* Protein codiert und so unter anderem an der neuronalen elektrischen und metabolischen Signalübertragung beteiligt ist (Teubner *et al.* 2000, Güldenagel *et al.* 2001). Wie auch *CHRNA7*, wird *CX36* vor allem im Gehirn und zusätzlich in der Retina exprimiert (Rash *et al.* 2000, Teubner *et al.* 2000).

Interessanterweise überlappt die auf 20,3 cM verkleinerte Region, in der noch ca. 140 Gene verbleiben, um ca. 15 cM mit dem von Turecki *et al.* (2001) beschriebenen chromosomalen Abschnitt. Aufgrund ihrer chromosomalen Lage, ihrer Expression vor allem im Gehirn sowie ihrer Funktion stellen einige dieser Gene besonders interessante Kandidaten dar.

Ähnlich wie auch *CX36*, spielt die vor allem im Gehirn aktive Tyrosinkinase 3, für die das Gen *TYRO3* codiert, eine wichtige Rolle in der neuronalen Differenzierung und Zell-Zell-Interaktion (Prieto *et al.* 2000) und fungiert daher ebenso als potentielles Kandidatengen.

Ebenfalls auf Chromosom 15q14, jedoch etwas weiter zentromerisch als *TYRO3*, liegt das Gen *DLL4*, welches dem Delta-Gen von *Drosophila* homolog ist und, für einen NOTCH1/NOTCH4-Liganden codierend, eine wichtige Rolle im NOTCH-Signaltransduktionsweg spielt. Shutter und Mitarbeiter konnten zeigen, dass *DLL4* nicht nur im Endothel arterieller Gefäße exprimiert wird, sondern auch in Strukturen des sich entwickelnden Frontalhirns nachweisbar ist (Shutter *et al.* 2000) und somit ebenfalls für die Pathogenese der Schizophrenie von Interesse sein könnte. Auch bei der autosomal-dominant vererbten CADASIL-Erkrankung, einer cerebralen Arteriopathie, die mit subcortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie einhergeht, wurde eine *missense* Mutation in einem *NOTCH* Gen nachgewiesen (Joutel *et al.* 1997). Eine positive Assoziation von *NOTCH4*-Varianten mit Schizophrenie konnte bereits von einigen Forschergruppen gezeigt werden (Wei und Hemmings 2000). Obwohl nicht alle Arbeitsgruppen diese Befunde bestätigen konnten (Sklar *et al.* 2001), bleibt *DLL4* aufgrund seiner Position und Funktion viel versprechend.

Das Protein SNAP23, codiert durch das Gen *SNAP23*, bildet zusammen mit anderen Membranfusionsproteinen den SNARE Komplex (Low *et al.* 1998), der eine zentrale Rolle beim vesikelvermittelten Transport von Transmittern durch

Zellmembranen spielt und insbesondere auch durch sein Vorkommen in verschiedenen Neuronen eine Bedeutung für die Pathogenese verschiedener neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen einnimmt. So wiesen Saito und Mitarbeiter zum Beispiel eine positive Assoziation eines Polymorphismus in *SNAP29*, einem Mitglied der SNARE-Familie, mit Schizophrenie nach (Saito *et al.* 2001). Nicht zuletzt die Pathogenese der Tetanus- und Botulismus-Erkrankung, hervorgerufen durch verschiedene, den SNARE-Komplex zerstörende bakterielle Toxine, verdeutlicht die zentrale Bedeutung dieser Genfamilie.

Die obere Grenze der 20,3 cM messenden Kandidatengenregion wird durch das *RYR3* Gen gebildet, welches für den vor allem im Gehirn und der glatten Muskulatur exprimierten Ryanodinrezeptor 3 codiert. Als Ionenkanal, der an der intrazellulären Kalziumfreisetzung beteiligt ist, spielt RYR3 eine entscheidende Rolle in verschiedenen Signalübertragungswegen (Nakashima *et al.* 1997).

Neben den exemplarisch beschriebenen Genen ist in dieser chromosomalen Region noch eine Vielzahl weiterer möglicher Kandidatengene lokalisiert, deren Expressionsmuster und funktionelle Bedeutung noch Gegenstand weiterer Forschung ist.

1.5 **SLC12A6 und seine Bedeutung für psychiatrische und neurologische Erkrankungen**

Wegen seiner grundlegenden Bedeutung für die Fragestellung dieser Arbeit sei das im Folgenden beschriebene Gen *SLC12A6* (OMIM *604878) detaillierter beleuchtet.

Ähnlich wie auch bei *RYR3*, handelt es sich bei *SLC12A6* um ein auf 15q13-14 gelegenes Gen, welches ebenfalls für einen Ionenkanal codiert, nämlich den Kalium-Chlorid Kotransporter 3 (Mount *et al.* 1999). Die alternative Bezeichnung des Gens, welches sich aus insgesamt zwölf Exons zusammensetzt, lautet *KCC3*.

Als wichtiges Mitglied der Familie der Kationen-Chlorid Kotransporter, auch *solute carrier family 12* genannt, weist *SLC12A6* zwölf Transmembrandomänen, fünf N-Glykosilierungsstellen und eine große extrazelluläre Schleife auf, die unter anderem die Bindungseigenschaften für unterschiedliche Ionen bestimmt (Race *et al.* 1999). Erstmals 1999 durch drei Forschergruppen unabhängig voneinander kloniert (Hiki *et al.* 1999, Mount *et al.* 1999, Race *et al.* 1999), wurden zunächst nur zwei Isoformen von *KCC3* beschrieben, die als *KCC3a* und *KCC3b* durch alternatives Spleißen entstanden sind (Mount *et al.* 1999). Hierbei findet sich das 1150 Aminosäure große *KCC3a* vor allem im Gehirn, aber auch in Niere, Muskel, Herz und Lunge. Die 1099 Aminosäure messende Isoform *KCC3b* hingegen kommt nahezu ausschließlich in der Niere und in peripheren Geweben vor (Pearson *et al.* 2001). Darüber hinaus sind mittlerweile weitere Transkripte von *SLC12A6* bekannt (Moser *et al.* 2009). Die Expression von *KCC3* im Gehirn lässt sich insbesondere in den Zellen des *Plexus choroideus*, Kleinhirns, Hirnstamms, Hypothalamus sowie der weißen Substanz nachweisen (Pearson *et al.* 2001).

Neben den weiteren drei bislang identifizierten Mitgliedern der Kalium-Chlorid Kotransporter (*SLC12A4-7;KCC1-4*), ist *SLC12A6* insbesondere am elektroneutralen Transport von Ionen durch Plasmamembranen beteiligt und gewährleistet so eine osmotische Homöostase in verschiedenen Zelltypen (Hiki *et al.* 1999, Mount *et al.* 1999, Race *et al.* 1999). Shen und Mitarbeiter konnten

ferner nachweisen, dass die Expression von *SLC12A6* eine Steigerung der Proliferationsrate bestimmter Zellen zur Folge hat (Shen *et al.* 2001).

In Ergänzung zu den bereits unter 1.4 aufgeführten positiven Kopplungsbefunden der Region 15q13-14 mit verschiedenen psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen, weckt der Locus um *SLC12A6* verstärktes Interesse, insbesondere seit Casaubon und Mitarbeiter eine positive Kopplung des Markers D15S971 mit dem autosomal-rezessiv vererbten Andermann Syndrom (ACCPN, OMIM 218000) nachgewiesen haben (Casaubon *et al.* 1996). In der Folge konnte gezeigt werden, dass rezessive Mutationen im *SLC12A6* Gen in der Tat ursächlich für diese 1972 in Quebec erstbeschriebene neurologische Erkrankung sind (Howard *et al.* 2002). Beim Andermann Syndrom handelt es sich um eine meist schwer verlaufende hereditäre sensomotorische Neuropathie mit oder ohne Agenesie des Corpus callosum. Neben Dysmorphien und Entwicklungsverzögerungen sind bei den betroffenen Patienten typischerweise auch schizophrenieähnliche psychotische Störungen beschrieben (Filteau *et al.* 1991, Dupré *et al.* 2003). Ähnliche morphologische Auffälligkeiten des *Corpus callosum* mit messbar veränderter Konnektivität fanden Narr und Mitarbeiter auch bei vielen Schizophrenie-Patienten (Narr *et al.* 2002), des weiteren sind monozygote Zwillinge beschrieben worden, die beide an Schizophrenie erkrankt sind und gleichzeitig eine Agenesie des Balkens aufweisen (Motomura *et al.* 2002). Uyanik und Mitarbeiter konnten 2006 weitere *missense* Mutationen in *SLC12A6* bei Patienten mit Andermann Syndrom nachweisen (Uyanik *et al.* 2006).

Auch der strukturell ähnliche Kalium-Chlorid Kotransporter *SLC12A5/ KCC2* wird fast ausschließlich im Gehirn exprimiert und übt im Tiermodell eine wichtige Rolle bei der GABA-vermittelten Informationsweiterleitung zwischen Neuronen aus. Die weiteren Mitglieder der *KCC*-Familie werden vorzugsweise außerhalb des Gehirns gefunden (Mercado *et al.* 2004).

2. Fragestellung

Von mehreren Arbeitsgruppen (u. a. Freedman *et al.* 1997, 2000, 2001, Riley *et al.* 2000, Gejman *et al.* 2001, Sander *et al.* 2000, Steinlein *et al.* 2001, Howard *et al.* 2002) wurde eine besondere Bedeutung der chromosomalen Region 15q13-15 sowohl für Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises als auch für bipolare Störungen und verschiedene neurologische Erkrankungen beschrieben. Im Rahmen einer genomweiten Kopplungsanalyse der Würzburger Arbeitsgruppe sowie einer weiteren medizinischen Doktorarbeit konnte die Kandidatengenregion bereits auf 20,3 cM zwischen den Markern D15S144 und D15S132 verkleinert werden, durch Stöber und Mitarbeiter nahezu zeitgleich zur praktischen Durchführung der vorliegenden Arbeit wiederum auf eine Region von ca. 11 cM zwischen den Markern D15S1042 und D15S659.

Ziel des ersten Teils dieser Arbeit ist die weitere Einengung des Genlocus für periodische Katatonie durch Feinkartierung einer weiteren großen Familie mit familiärer katatoner Schizophrenie (Familie 9) mittels Genotypisierung zusätzlicher polymorpher Marker.

Das für den Kalium-Chlorid-Kotransporter 3 codierende Gen *SLC12A6* ist aufgrund seiner Lage in der Region 15q14 sowie bei Nachweis einer positiven Assoziation von Mutationen dieses Gens mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen und auch der periodischen Katatonie ein vielversprechendes Kandidatengen. Im Rahmen einer vorangegangenen Mutationsanalyse wurden unter anderem zwei seltene Varianten von *SLC12A6*, zwei SNPs (G/A, G/A), gefunden, die eine Kosegregation mit periodischer Katatonie in einer anderen großen Familie 11 zeigten.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen diese seltenen Varianten anhand einer Fall-Kontroll-Studie auf Assoziation mit Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises und bipolaren Störungen untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patienten und Kontrollpersonen

Patienten (Feinkartierung):

Die bereits bei Stöber *et al.* 2001 beschriebene und hier weiter untersuchte Familie 9 umfasst drei Generationen mit elf gesunden und sechs an periodischer Katatonie erkrankten Familienmitgliedern. Die Diagnose periodische Katatonie wurde nach ausführlicher klinischer Exploration der Patienten durch einen erfahrenen Psychiater sowie unter Einbeziehung von Krankenunterlagen, medizinischer Vorgeschichte, Fremd- und Familienanamnese gemäß der Diagnosekriterien nach ICD-10 bzw. der Klassifikation nach Leonhard (Leonhard 1995) gestellt.

Patienten (Assoziationsstudie):

In die Fall-Kontroll-Studie wurden 186 unterfränkische Patienten eingeschlossen, bei denen in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg bzw. dem Psychiatrischen Bezirkskrankenhaus Werneck die Diagnose einer Erkrankung des schizophrenen Formenkreises oder eine bipolare Störung diagnostiziert wurde. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 46 ± 15 Jahre.

Gemäß ICD-10-Diagnosekriterien ließen sich die 114 Patienten mit Schizophrenie-Spektrum-Erkrankungen folgenden Unterformen zuordnen: Paranoid-halluzinatorische Schizophrenie (31), hebephrene Schizophrenie (14), katatone Schizophrenie (4), undifferenzierte Schizophrenie (5), residuelle Schizophrenie (23), Schizophrenia simplex (4), schizotype Störung (1), wahnhaftige Störung (9) und schizoaffektive Störung (23).

Eine zweite Untergruppe bestand aus 72 Patienten, die nach ICD-10-Kriterien entweder an einer bipolaren Störung (66) oder einer schweren depressiven Störung mit psychotischen Symptomen (6) litten.

Bei keinem der Patienten waren relevante Vor- oder Begleiterkrankungen bekannt.

Kontrollpersonen:

Die Kontrollgruppe bestand aus insgesamt 317 gesunden unterfränkischen Blutspendern, deren Durchschnittsalter bei $32 \pm 10,5$ Jahren lag. Eine Anamnese insb. bezüglich psychiatrischer Vorerkrankungen wurde nicht erhoben.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt. Alle beteiligten Personen nahmen informiert und freiwillig teil.

3.1.2 Enzyme

Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)

EUROGENTEC, Seraing, Belgien

Pronase E

APPLICHEM, Darmstadt

Hpy CH4 IV (5 U/ μ l)

BIOLABS, Beverly, USA

3.1.3 Synthetische Oligonukleotide

3.1.3.1 *Primer* für Mikrosatelliten-Marker Chromosom 15

(basierend auf Marshfield Map, Stand 21.03.2001, Synthese durch MWG-BIOTECH AG, Eberstadt)

Marker-bezeichnung	Koordinaten (cM)	Produktgröße (pb)	T _m (°C)	Primersequenzen
D15S194	35.95	251	58,8 55,9	5'-GCA CTC TAG CCT GGG CTA T-3' 5'-ATG ACA CTG CAA ATT GCA CAG-3'
D15S146	39.72	198	58,0 62,0	5'-TTT ATC CCA AAT CCC TGG TG-3' 5'-GGC CAT TTG TAT GTC TTC TTT G-3'
D15S1044	39.72	181	60,0 62,0	5'-CAG GAA CAA GGC AAA GGT TC-3' 5'-AAT TTC CGA TGC AAA CAA TTA C-3'
D15S968	40.25	198	62,0 60,0	5'-TCA GCC ACA GTG CTT ACC TG-3' 5'-GGA GCA GTT TTT CCC CTT TC-3'
D15S994	40.25	167	62,0 60,0	5'-TCC AGG AAG TAG TGC AGG TG-3' 5'-TGC ATC TCC TAA GGG CAA AG-3'
D15S182	40.25	289	58,8 57,3	5'-GGT GAC AGA GTA AGG TCC C-3' 5'-TCA CCT TGT TGC TCA GAC TG-3'

3.1.3.2 Primer für Assoziationsstudie:

(Nukleotid-Positionen basierend auf UCSC *browser* (Golden Path)

Stand März 2006, Synthese durch MWG-BIOTECH AG, Eberstadt)

Bezeichnung	Produktgröße (pb)	T _m (°C)	Primersequenzen
SLC12A6 Promotor 32418760 G/A	424	60,6	5'-CCT GAA TCA AGA AAC CCA GAC-3' 5'-ATC CAT TCC CAT GTT TTC ACC A-3'
SLC12A6 5'-UTR 32416574 G/A	157	52,2	5'-TGT GGG GTA TTC ACC TG-3' 5'-TTT CCT GTC GAG GTA GC-3' (UTR-C-r) 5'-TTT CCT GTC GAG GTA GT-3' (UTR-T-r)

3.1.4 Radionukleotide

[α ³² P]-Desoxycytidintriphosphat (10 MBq/ml) HARTMAN ANALYTIC,
Braunschweig

3.1.5 Nukleotide

Desoxy-Ribonukleosid-5'-Triphosphate GENE CRAFT, Münster
(100 Mm; dGTP, dATP, dTTP, dCTP)

3.1.6 Chemikalien

Agarose	BIOZYM, Rockland, USA
Ammoniumpersulfat (10 %)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Acrylamid	APPLICHEM, Darmstadt
AgNO ₃	APPLICHEM, Darmstadt
BSA (N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid)	APPLICHEM, Darmstadt
Bromphenolblau	MERCK, Darmstadt
DMSO	MERCK, Darmstadt
DNA-100 bp Molekulargewichtsstandard	PEQLAB, Erlangen

Essigsäure	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Ethanol	BAKER, Deventer, Holland
Ethidiumbromid	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Formamid deionisiert	APPLICHEM, Darmstadt
FBS	INVITROGEN GmbH, Karlsruhe
Formaldehyd	APPLICHEM, Darmstadt
Gel Slick Solution	BIOZYM SCIENTIFIC GmbH, Oldendorf
Gentamycin	INVITROGEN GmbH, Karlsruhe
Glycerol	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
HCl	APPLICHEM, Darmstadt
HNO ₃	APPLICHEM, Darmstadt
Isopropanol	MERCK, Darmstadt
KCl	APPLICHEM, Darmstadt
KHCO ₃ (Kaliumhydrogencarbonat)	APPLICHEM, Darmstadt
L- Glutamin	INVITROGEN GmbH, Karlsruhe
MgCl ₂	APPLICHEM, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	APPLICHEM, Darmstadt
Natriumcarbonat	APPLICHEM, Darmstadt
NH ₄ CL (Ammoniumchlorid)	APPLICHEM, Darmstadt
Neopress HC® (Entwickler)	TETANAL PHOTOWERK GmbH &Co, Norderstedt
N',N'-Methylbisacrylamid	APPLICHEM, Darmstadt
Protease	APPLICHEM, Darmstadt
PBS	APPLICHEM, Darmstadt
QIAamp® Blood Midi Kit	QIAGEN, Hilden

QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
RPMI 1640-Medium	INVITROGEN GmbH, Karlsruhe
SDS (sodium deodecyl sulfat)	APPLICHEM, Darmstadt
Sequenziergel Konzentrat	ROTH, Karlsruhe
Sequenziergel Puffer	ROTH, Karlsruhe
Sequenziergel Verdünner	ROTH, Karlsruhe
Superfix® (Fixierer)	TETANAL PHOTOWERK GmbH & Co, Norderstedt
Silikon	BMA, Rockland ME, USA
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Tris-Acetat, Tris-Borat, Tris-HCl	MERCK, Darmstadt
Tween 20	APPLICHEM, Darmstadt
Wasser zur Chromatographie	MERCK, Darmstadt
Xylen Cyanol FF	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim

3.1.7 Lösungen und Puffer

<u>APS Lösung 10 %</u>	4 g Ammoniumpersulfat, aufgefüllt mit H ₂ O auf 40 ml
<u>PAA Lösung 10 %:</u>	1 g N',N'-Methylbisacrylamid 49 g Acrylamid 500 µl TEMED aufgefüllt auf 500ml mit 0,5 x TBE
<u>Nährmedium:</u>	100 ml RPMI-1640 15 ml 15% FBS 200 mM 1% L-Glutamin 1 % Gentamycin (50 mg/ml)

<u>TAE-Puffer (1 x):</u>	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA (pH 8,0)
<u>TBE-Puffer (1 x):</u>	89 mM Tris-Borat 2 mM EDTA (pH 8,0)
<u>TE-Puffer:</u>	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA
<u>TE⁻⁴-Puffer:</u>	10 mM Tris-HCl pH 8,0 0,1 mM EDTA
<u>Ladepuffer für native Gele:</u>	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylen Cyanol FF 30 % Glycerol in Wasser
<u>Ladepuffer für denaturierende Gele:</u>	97,5 % deionisiertes Formamid 0,03 % Bromphenolblau 0,03 % Xylen Cyanol FF 10 mM EDTA (pH 7,5)
<u>PCR-Puffer:</u>	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 0,25 % (v/v) Tween 20 0,25 mg/ml BSA 10 mM oder 15 mM MgCl ₂
<u>Lysispuffer:</u>	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA (pH 7,4)

Kernlysispuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
 400 mM NaCl
 2 mM Na₂EDTA (pH 8,2)

3.1.8 Geräte

Autoklav Typ 3850 ELV	TUTNAUER SYSTEC, Darmstadt
Biometra T-Gradient Thermocycler	BIOMETRA, Göttingen
Biometra UNOII Thermoblock	BIOMETRA, Göttingen
Geiger-Müller-Zählrohr	MORGAN, Burnham-on-Crouch, UK
Geiger-Müller-Zählrohr	BERTHOLD TECHNOLOGIES, Bad Wildbad
Heizrührplatte	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Hybridisierungsöfen	HERAEUS INSTRUMENTS GmbH, Osterode
Pipetten	EPPENDORF, Hamburg
Pipetten serologisch	SARSTEDT, Nümbrecht
Photometer	EPPENDORF, Hamburg
Polaroid Kamera	POLAROID, Offenbach
Reagenzglas mixer	SCIENTIFIC INDUSTRIES, Inc. USA
Röntgenfilmkassetten	KODAK, Stuttgart
Schüttelgerät	IKA-LABORTECHNIK, Staufen
Spannungsgerät Power Supply	LKB, Bromma, Schweden
Ultraviolett Transluminator	UVP, Upland, USA
Vakuumtrockner	BIOTEC FISCHER GmbH, Reiskirchen
Waagen: Toledo	METTLER, Gießen
PM 300	METTLER, Gießen
Wasserbad	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Zentrifugen: Mikroliter	HETTICH, Tuttlingen
Megafuge	HERAEUS INSTRUMENTS GmbH, Osterode
Rotanda 96 RS	HETTICH, Tuttlingen
Vakuumzentrifuge	UNIEQUIP, Martinsried

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

Filterspitzen	GREINER LABORTECHNIK, Frickenhausen
Fließpapier (0,3mm)	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Fuji Medical X-Ray Film	FUJI, Düsseldorf
Gelkammern, Kämme, Kammern, Spacer, Spatel	PEQLAB, Erlangen
Haushaltsfolie	WENTUS KUNSTSTOFF GmbH, Höxter
Kulturflaschen 25cm ² und 75cm ²	INVITROGEN GmbH, Karlsruhe
Polaroid Film 667	POLAROID, Offenbach
Reaktionsgefäße	BIOZYM, Oldendorf EPPENDORF, Hamburg APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA
Spitzbodenröhrchen 15ml und 50ml	SARSTEDT, Nümbrecht

3.1.10 Software

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, Sequenzanalyse)

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

PRIMER3 (Oligonukleotidkonstruktion)

http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html

MARSHFIELD MAP (Marker Chromosom 15)

http://research.marshfieldclinic.org/getics/MAP_Markers/maps/IndexMapFrames.html

FastEH (Zhao et al. 2000, Zhao and Sham 2002) (Haplotypen-Analyse)

SAS/STAT, Version 8.1, Cary, NC: SAS Institute Inc. 1999 (statistische Auswertung)

FINETTI (Wienker TF, unpublished) (statistische Auswertung)

3.2. Methoden

3.2.1 Kultur lymphoblastoider Zellen

Von einem Teil der Patienten mit periodischer Katatonie existierten aus der Zeit der Blutprobensammlung lymphoblastoide Zelllinien, welche durch Transformation der Lymphozyten mit Epstein-Barr-Virus angelegt wurden.

Zwecks anschließender DNA-Extraktion wurden diese Zellen kultiviert. Hierzu wurden die in 1 ml Kryoröhrchen gefrorenen Zellen vorsichtig aufgetaut und bei +4 °C in 40 ml Nährmedium, bestehend aus RPMI-1640, FBS, L-Glutamin und Gentamycin, gegeben. Nach Zentrifugation bei 1000 *rpm* für 5 min erfolgte die Trennung des Überstands von den pelletierten Zellen und die Überführung der Zellen in eine 25 cm² Kulturflasche unter Zugabe von 6 ml Nährmedium.

Die Zellen wurden bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. In Abhängigkeit der Zellvermehrung erfolgte alle 24 bis 48 Stunden ein Wechsel des Nährmediums. Hierzu wurde ein Großteil des alten Mediums vorsichtig entfernt und durch frisches ersetzt. Bei schrittweiser Erhöhung der Menge an Nährmedium im Verlauf der Zellvermehrung konnten die Zellen nach einigen Wochen in 75 cm² Kulturflaschen überführt werden.

3.2.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Proben wurden entweder aus den beschriebenen lymphoblastoiden Zelllinien oder aus EDTA-Vollblutproben isoliert. Die DNA-Extraktion aus Vollblut sowie die Betreuung der Zellkulturen erfolgten größtenteils durch Frau Gabriela Ortega.

3.2.2.1. DNA-Extraktion aus lymphoblastoiden Zellen

Zur Extraktion von DNA aus den kultivierten lymphoblastoiden Zellen wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und bei 1000 *rpm* zentrifugiert. Gemäß

Herstellerprotokoll erfolgte die weitere Extraktion mittels *QIAamp® Blood Midi Kit*.

3.2.2.2 DNA-Extraktion aus Vollblut

Die DNA-Gewinnung aus kleineren Mengen venösen EDTA-Blutes erfolgte ebenfalls mittels *QIAamp® Blood Midi Kit* gemäß Herstellerprotokoll.

Größere Mengen DNA wurden aus Frischblut entsprechend der durch Miller *et al.* 1988 beschriebenen Methode der Proteinaussalzung isoliert. Hierzu wurden 10 ml Vollblut mit 30 ml Lysispuffer (+4 °C) in ein 50 ml Röhrchen überführt und unter vorsichtigem Mischen 15 min auf Eis inkubiert. Nach Pelletierung der Leukozyten für 15 min bei 1500 *rpm* und +4 °C wurden die Zellen durch Zugabe von 10 ml Kernlysispuffer lysiert. Zur Proteolyse wurde die Suspension unter Zugabe von 660 µl 10 % SDS und 500 µl Pronase E (20 mg/ml, -20 °C) über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden am Folgetag 3,4 ml gesättigte 6 M NaCl-Lösung hinzugegeben, das Gemisch für 15 s kräftig geschüttelt und anschließend für 20 min bei 4000 *rpm* und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Überführung des Überstandes in ein neues Röhrchen erfolgte die Fällung mit 7,5 ml Isopropanolol. Das entstandene DNA-Präzipitat wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach vollständiger Trocknung mit 400-500 µl TE⁻⁴-Puffer vermischt und erneut über Nacht geschüttelt. Die isolierte DNA wurde gekühlt oder gefroren aufbewahrt.

3.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Genotypisierung des im Promotor gelegenen Polymorphismus 32418760 G/A (Nukleotidpositionen gemäß UCSC *browser* (Golden Path), Stand März 2006, keine rs-Nummer verfügbar) wurde zunächst eine Standard-PCR (s. 3.2.3.1) durchgeführt, bei der 424 bp große PCR-Produkte amplifiziert wurden. Nach Aufreinigung (s. 3.2.4) erfolgte mittels RFLP-Analyse und Restriktionsverdau (s. 3.2.5) eine Spaltung der PCR-Produkte in unterschiedliche Restriktionsfragmente, die dann in einer Agarose-

Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht wurden (s. 3.2.6.1).

Die Genotypisierung des in der 5'-UTR-Region gelegenen Polymorphismus 32416574 G/A (Nukleotidpositionen gemäß UCSC *browser* (Golden Path), Stand März 2006, keine rs-Nummer verfügbar) erfolgte mit Hilfe einer allelspezifischen PCR (s. 3.2.3.2), in der in Abhängigkeit der spezifischen *reverse Primer* je nach polymorpher Nukleotidsequenz PCR-Produkte einer Größe von 157 bp amplifiziert wurden. Auch hier schloss sich die elektrophoretische Auftrennung und Färbung mit Ethidiumbromid (s. s. 3.2.6.1) an.

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte, die anschließend für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. Es handelt sich um ein durch Mullis *et al.* erstmals 1985 beschriebenes zyklisches Verfahren, welches mit Hilfe definierter Oligonukleotid-*Primer* die Vermehrung spezifischer DNA-Sequenzen *in vitro* selbst bei Vorliegen geringer DNA-Ausgangsmengen ermöglicht.

Jeder sich wiederholende Zyklus setzt sich aus drei Schritten zusammen, die in Dauer und Temperatur aufeinander abgestimmt sind. Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die DNA-Doppelstränge bei 95 °C voneinander getrennt, um in Form von Einzelsträngen als Matrize zu dienen. Anschließend binden im zweiten Schritt, dem *Annealing*, kurze einzelsträngige komplementäre DNA-Sequenzen, die sogenannten *Primer*, an die zu amplifizierenden DNA-Abschnitte. Das Temperaturoptimum dieses *Annealings* richtet sich nach der Basenzusammensetzung der Oligonukleotid-*Primer*, für die eine individuelle Schmelztemperatur T_M berechnet werden kann. Ausgehend von den Oligonukleotid-*Primern* erfolgt im dritten Schritt, der Extension, die DNA-Synthese in 5'→3'-Richtung durch das hitzestabile Enzym *Taq* DNA Polymerase. Hierbei handelt es sich um ein bis ca. 95 °C stabiles Enzym, welches aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird und bei einem Temperaturoptimum von 72 °C am besten wirkt. Entscheidend für die Polymerasewirkung ist neben der Temperatur auch die Mg^{2+} -Konzentration. Sie

hat Einfluss auf die Spezifität der Polymerase. Die *Taq* DNA Polymerase hat ihr Syntheseoptimum bei einer Mg^{2+} -Konzentration von 1,5 mM.

Diese beschriebenen drei Teilschritte wurden wie folgt 35 Mal wiederholt:

1. Denaturierung	95 °C	45 s
2. <i>Annealing</i>	T_A	45 s
3. Extension	72 °C	45 s

Zu Beginn des ersten Zyklus erfolgte ein einmaliger Denaturierungs-Schritt von 3 min bei 95 °C. Die PCR wurde mit einer abschließenden Extension von 3 min bei 95 °C beendet. Nach n-facher Wiederholung der Zyklen erhält man theoretisch eine Anzahl von 2^n neusynthetisierten DNA-Abschnitten, in der Praxis jedoch beträgt die tatsächliche Ausbeute nur ca. 85 %.

3.2.3.1 Standard-PCR

Der PCR-Ansatz für die Assoziationsstudie der hier untersuchten seltenen *SLC12A6*-Polymorphismen 32418760 G/A und 32416574 G/A enthielt folgende Komponenten:

DNA	2 µl	(80-100 ng)
<i>Primer forward</i>	1 µl	(10 pmol/ml)
<i>Primer reverse</i>	1 µl	(10 pmol/ml)
Nukleotide	1 µl	(je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
MgCl ₂ -Puffer	2,5 µl	(7,5 mM)
dH ₂ O	16,5 µl	
<i>Taq</i> - Polymerase	1 µl	(0,5 U/µl)

Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 25 µl. Die *Annealing*-Temperatur war spezifisch für jeden *Primer*. Als PCR-Maschine wurde der Biometra T-Gradient Thermocycler verwendet.

3.2.3.2 Allelspezifische PCR (ARMS)

Für die Amplifikation der den 5'-UTR-Polymorphismus 32416574 G/A tragenden DNA-Sequenzen wurde eine spezielle PCR-Technik, eine allelspezifische PCR, angewandt, die insbesondere auch zum Mutationsnachweis geeignet ist (Newton *et al.* 1989). Bei dem auch ARMS-PCR (*amplification refractory mutation system*) genannten Verfahren werden allelspezifische *Primer*, die sich in nur einem Nukleotid am 3'-Ende voneinander unterscheiden, verwendet. Für jeden spezifischen Primer wird pro DNA-Probe eine getrennte PCR-Reaktion angesetzt. Nur bei exakt komplementären Basen am 3'-Ende kann eine Amplifikation stattfinden, bei Vorliegen einer Fehlpaarung, zum Beispiel in Folge einer polymorphen Nukleotidsequenz, erfolgt hingegen keine Vervielfältigung. Im vorliegenden Fall des Polymorphismus 32416574 G/A ([CTTTAC(A/G)TTAGGA]) wurden zwei unterschiedliche *reverse Primer* (s. 3.1.3.2) benutzt, die je nach Nukleotidsequenz des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts binden.

Nach Auftrennung der amplifizierten DNA mittels unten beschriebener Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid (s. 3.2.6.1) lassen sich so die beiden polymorphen Abschnitte zuverlässig unterscheiden.

Der verwendete Reaktionsansatz entsprach dem Standard-PCR-Ansatz (s. 3.2.3.1).

3.2.3.3 Radioaktiv-PCR

Für die Feinkartierung des Genlocus für periodische Katatonie auf Chromosom 15 mit Hilfe polymorpher Marker wurden dem Standard-PCR-Ansatz (s. 3.2.3.1) zwecks radioaktiver Markierung der zu amplifizierenden DNA pro 25 ml Reaktionsvolumen 0,2 µl [α -P³²]dCTP mit einer Aktivität von 10 MBq/ml hinzugefügt. Als PCR-Maschine diente das Modell Biometra UNOII Thermoblock von Biotron.

Anschließend erfolgte wie unten beschrieben die Auftrennung mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und Darstellung durch Autoradiographie (s. 3.2.6.2).

3.2.4 DNA-Aufreinigung

Bevor die den Promotor Polymorphismus 32418760 G/A tragenden DNA-Abschnitte im Rahmen der RFLP-Analyse weiterverwendet wurden, erfolgte eine Aufreinigung der amplifizierten DNA mit dem *QIAquick® PCR Purification Kit* der Firma QIAGEN gemäß Herstellerprotokoll. Nach einem säulenchromatographischen Prinzip bindet hierbei die DNA als Anion selektiv an eine Silikatsäule, während kleinere Moleküle keine Bindung eingehen und abgetrennt werden. Eine Lösung der DNA von der Säule erfolgt nach Zugabe eines Lösungspuffers. Zur Überprüfung von Länge und Reinheit der amplifizierten und gereinigten DNA wurden 2-4 µl DNA und 4 µl Ladepuffer zusammen mit einer 100 bp-DNA-Leiter als Längenstandard elektrophoretisch aufgetrennt.

Ohne diesen zusätzlichen Aufreinigungsschritt der im Rahmen der RFLP-Analyse verwendeten DNA erschwerte ein unscharfes Bandenmuster in der Gelelektrophorese die anschließende Auswertung.

3.2.5 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse mittels Restriktionsverdau

Die weitere Analyse der den Promotor Polymorphismus 32418760 G/A tragenden amplifizierten und gereinigten DNA-Sequenzen erfolgte mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Analyse mit Restriktionsverdau durch das Restriktionsenzym *Hpy* CH4 IV.

Mithilfe eines Restriktionsverdaus lassen sich Rückschlüsse auf die genaue Nukleotidsequenz innerhalb eines DNA-Abschnittes ziehen. Die zu untersuchenden PCR-Produkte werden hierzu mit spezifischen Restriktionsendonukleasen versetzt. Hierbei handelt es sich um DNA-schneidende Enzyme, die in Abhängigkeit des Vorhandenseins spezifischer Erkennungssequenzen Restriktionsfragmente unterschiedlicher Größe erzeugen. Im Falle des im Promotor gelegenen Polymorphismus 32418760 G/A entsteht durch die geänderte Nukleotidsequenz (A→G) eine zusätzliche Erkennungssequenz für das aus *Helicobacter pylori* isolierte Restriktionsenzym

Hpy CH4 IV, so dass das ursprünglich 424 bp große PCR-Produkt in zwei Fragmente von 58 bp und 366 bp Größe geschnitten wird. Bei Fehlen dieser Schnittstelle erhält man den ungeschnittenen DNA-Abschnitt von 424 bp.

Die Restriktionsspaltung erfolgte nach folgendem Ansatz:

DNA	18 µl	
10 x NE-Puffer	2 µl	(mitgelieferter Reaktionspuffer)
<i>Hpy</i> CH4 IV	1 µl	(5 U/µl)

Das Volumen des Reaktionsansatzes betrug 21 µl. Dieser wurde gemäß Herstellerangaben über Nacht bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Die Auftrennung der Restriktionsprodukte erfolgte mittels unten beschriebener Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid.

3.2.6 Elektrophoretische Auftrennung und Nachweis von DNA-Fragmenten

Eine elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren ist aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungseigenschaften im elektrischen Feld möglich. Als Trägersubstanzen dienen meist Agarose- oder Polyacrylamidgele, die sich in Konzentration und Vernetzungsgrad unterscheiden. Hierdurch sowie durch Ladung, Molekülgröße, Stromstärke und Pufferbedingungen werden die Wanderungseigenschaften der Nukleinsäuren beeinflusst. Aufgrund ihrer negativen Ladung bewegen sich die DNA-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Geschwindigkeit der Wanderung umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Über die Konzentration der Gele lassen sich ihre Trenneigenschaften beeinflussen. Höher konzentrierte Gele eignen sich insbesondere zur Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente. Eine Sichtbarmachung der aufgetrennten DNA-Fragmente erfolgt entweder mittels Autoradiographie oder Anfärbung (Sambrook und Russell 2001).

3.2.6.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Nachweis mittels Autoradiographie

Die PCR-Produkte der polymorphen Marker für die Genotypisierung der Familie 9 mit einer Fragment-Größe von ca. 200 bp wiesen teils nur sehr geringen Längenunterschiede auf und wurden daher mit Hilfe eines hochauflösenden denaturierenden Polyacrylamidgels aufgetrennt.

Durch Polymerisation von Acrylamid und Methylenbisacrylamid entsteht hierbei ein stabiles dreidimensionales engmaschiges Netzwerk, welches wie ein Molekularsieb die DNA-Fragmente weniger nach ihrer Ladung, sondern vielmehr nach ihrer Größe auftrennt. Die Polymerisation wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED katalysiert. Das Verhältnis der Gel-Bestandteile beeinflusst die Porengröße, welche wiederum die Trenneigenschaften bestimmt.

Um die ca. 200 bp großen PCR-Produkte der polymorphen Marker für die Genotypisierung der Familie 9 aufzutrennen, wurde ein 6 %iges Gel verwendet. Bei einem Ansatzvolumen von 100 ml, einer Größe von 37 x 41 cm und einer Dicke von 0,4 mm enthielt es folgende Bestandteile:

24 ml Sequenziergel-Konzentrat	(Acrylamid 237,5 g, Harnstoff 500 g, Methylenbisacrylamid 12,5 g)
66 ml Sequenziergel-Verdünner	(50% (g/v; 8,3 M) Lösung von Harnstoff in Wasser)
10 ml Sequenziergel-Pufferkonzentrat	(50% (g/v; 8,3 M) Harnstoff in (1 M TRIS-Borat + 20 mM EDTA Puffer) pH 8,3 (10 x TBE)
700 µl APS Lösung 10 %	
100 µl TEMED	

Die Gellösung wurde zügig und luftblasenfrei zwischen zwei ethanolgesäuberte, silikonisierte und mit Abstandshaltern versehene Glasplatten gegossen. Nach vollständig erfolgter Polymerisation wurde die Gelkammer mit 1 x TBE-Puffer befüllt und das Gel bei 1500 V vorgewärmt. Die mittels [α -P³²] radioaktiv markierten PCR-Produkte wurden mit denaturierendem Ladepuffer versetzt und

in die Geltaschen gefüllt. Die Auftrennung erfolgte bei 1500 V für ca. drei Stunden. Im Anschluss wurde das Gel auf Fließpapier transferiert, mit Klarsichtfolie bedeckt und bei 80 °C für drei Stunden auf einem Vakuumtrockner getrocknet. Für ca. 24 Stunden erfolgte eine Exposition des Gels mit einem Röntgenfilm in einer Röntgenkassette bei -70 °C. Nach erfolgter Autoradiographie mit Schwärzung des Röntgenfilms durch den β -Strahler α -P³² konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente als Banden lokalisiert werden.

3.2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese und Nachweis mittels Ethidiumbromid

Die Auftrennung der PCR-Produkte für die Assoziationstudie seltener *SLC12A6*-Polymorphismen erfolgte mithilfe von nicht-denaturierender Agarose-Gelelektrophorese. Die Größen der amplifizierten DNA-Fragmente lagen etwa zwischen 50 und 450 bp, so dass die Agarosekonzentration je nach Fragmentgröße zwischen 2-4 % betrug. Hierfür wurden 2-4 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer gegeben und unter Erhitzen gelöst. Während des Abkühlungsprozesses wurden zusätzlich 10 µg/ml des interkalierenden Farbstoffs Ethidiumbromid hinzugefügt. Nach Befüllung der Geltaschen mit den DNA-Proben und 1/5-Volumen Ladepuffer erfolgte nach Anlegen einer Gleichspannung von 80-100 V die elektrophoretische Auftrennung über ca. 30-60 min. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE-Laufpuffer verwendet. Da sich Ethidiumbromid als interkalierende Substanz während der Elektrophorese in die DNA einlagert, ließen sich die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 365 nm als fluoreszierende Banden lokalisieren. Als Längenstandard diente eine 100 bp DNA-Leiter. Die Ergebnisse wurden auf Polaroidfotos dokumentiert.

3.2.7 Statistische Methoden / Datenauswertung

Mit Hilfe verschiedener statistischer Testverfahren wurden die ermittelten Varianten der beiden seltenen *SLC12A6*-Polymorphismen 32418760 G/A und 32416574 G/A im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie auf Assoziation mit Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises bzw. mit bipolaren Erkrankungen überprüft.

Miteinander verglichen wurden die Allel-, Genotypen- bzw. Haplotypenfrequenzen der beiden Stichproben (Patientengruppe und Kontrollgruppe). Hierbei erfolgte einerseits eine getrennte Auswertung für jede einzelne Patienten-Untergruppe (Schizophrenie-Patienten und bipolar erkrankte Patienten) und separat auch eine Analyse für das zusammengefasste Patientenkollektiv, jeweils im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Da es sich bei den untersuchten *SLC12A6*-Polymorphismen um *SNPs* (*single nucleotide polymorphisms*) handelt, die durch einfache Basensubstitution gekennzeichnet sind und demnach je zwei verschiedene Allele aufweisen, gilt für die Allelhäufigkeiten dieser biallelischen Loci das Hardy-Weinberg-Äquilibriumsprinzip. Hierbei ergeben sich die Allelhäufigkeiten aus der Formel $(p + q)^2 = 1$, wobei p der Häufigkeit des Allels A und q der Häufigkeit des Allels a entspricht. Abweichungen dieser in großen Populationen konstanten Allelverteilung können entweder eine zu kleine Population, eine Änderung der Mutationsfrequenz, Selektion oder Migration zugrunde liegen.

Diese Abweichungen lassen sich mittels χ^2 -Test-basierter Methoden statistisch untersuchen und die Allelhäufigkeiten verschiedener Populationen untereinander vergleichen. Die statistischen Auswertungen der Assoziationsstudie wurden von Frau Christine Freitag vom Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Universität Bonn durchgeführt.

Mit Hilfe des durch Zhao und Mitarbeiter in mehreren Fassungen weiterentwickelten Programms FastEHPLUS (Zhao et al. 2000, Zhao et al. 2002) wurden anhand der ermittelten Allelfrequenzen die Haplotypenfrequenzen auf der Basis von Permutationstests geschätzt (EH = *estimating haplotypes*). Es wurde errechnet, ob bestimmte

Haplotypen in einer der untersuchten Populationen signifikant häufiger vorkommen. Das Programm ist insbesondere für die Analyse hochpolymorpher Marker bei komplex vererbten Erkrankungen geeignet (Sasieni 1997). Ein p-Wert kleiner 0,0042 wurde als signifikant gewertet.

Für die Analyse der einzelnen Allelfrequenzen wurden χ^2 -Tests, für kleine Stichproben der Exact-Test und der Trend-Test nach Cochran-Armitage herangezogen. Dabei wurde das Programm SAS/STAT *package* 8.1 verwendet. Mit Hilfe dieser Tests lässt sich analysieren, ob die Unterschiede der Allelfrequenzen der einzelnen Stichproben zufällig entstanden sind und ob durch das Vorliegen bestimmter Allele die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Erkrankung beeinflusst wird bzw. ob ein Zusammenhang zum wahrscheinlichen Auftreten einer Erkrankung besteht.

Die ermittelten Genotypen wurden mit Hilfe des Programms FINETTI (Wienker TF, unveröffentlicht, persönliche Mitteilung) auf Vorliegen des Hardy-Weinberg-Äquilibrium untersucht. Unter Verwendung so genannter de Finetti-Diagramme lassen sich dabei die Allelhäufigkeiten in einem trilinearen Koordinatensystem darstellen und die Genotypenfrequenzen ablesen.

4. Ergebnisse

4.1. Feinkartierung Chromosom 15q 14-15

Im Rahmen einer genomweiten Kopplungsanalyse sowie einer weiteren medizinischen Doktorarbeit wurde der Genlocus für periodische Katatonie auf Chromosom 15q 13-15 bereits auf eine Region von 20,3 cM eingeeengt, nahezu parallel zur praktischen Durchführung der vorliegenden Arbeit erfolgte eine weitere Verkleinerung der Kandidatengenregion auf ca. 11 cM durch die Arbeitsgruppe Stöber.

Mittels Feinkartierung einer weiteren, drei Generationen umfassenden Familie mit insgesamt sechs an periodischer Katatonie erkrankten Familienmitgliedern durch Genotypisierung zusätzlicher polymorpher Marker konnte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die chromosomale Kandidatenregion auf 7,7 cM zwischen den Markern D15S1042 und D15S182 verkleinert werden. Hierzu wurden die radioaktiv markierten PCR-Produkte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend mittels Autoradiographie nachgewiesen und die Auswertungen in den Stammbaum eingetragen.

Abb. 2 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Genotypisierung der Mitglieder der Familie 9 mit dem polymorphen Marker D15S194.

Im Stammbaum (siehe Abb. 3) sind die gemeinsamen Haplotypen aller erkrankten Familienmitglieder aufgeführt. Das zentromerisch gelegene Ende der Krankheitsregion wird durch ein Rekombinationsereignis zwischen den Markern D15S1042 und D15S194 bei Patientin 568 und deren Nachkommen gebildet. Eine Rekombination zwischen den Markern D15S994 und D15S182 bei Patientin 653 begrenzt die Krankheitsregion in Richtung Telomer.

Die verkleinerte Kandidatengenregion mit den verbleibenden Genen ist in Abb. 4 schematisch dargestellt (siehe Abb. 4).

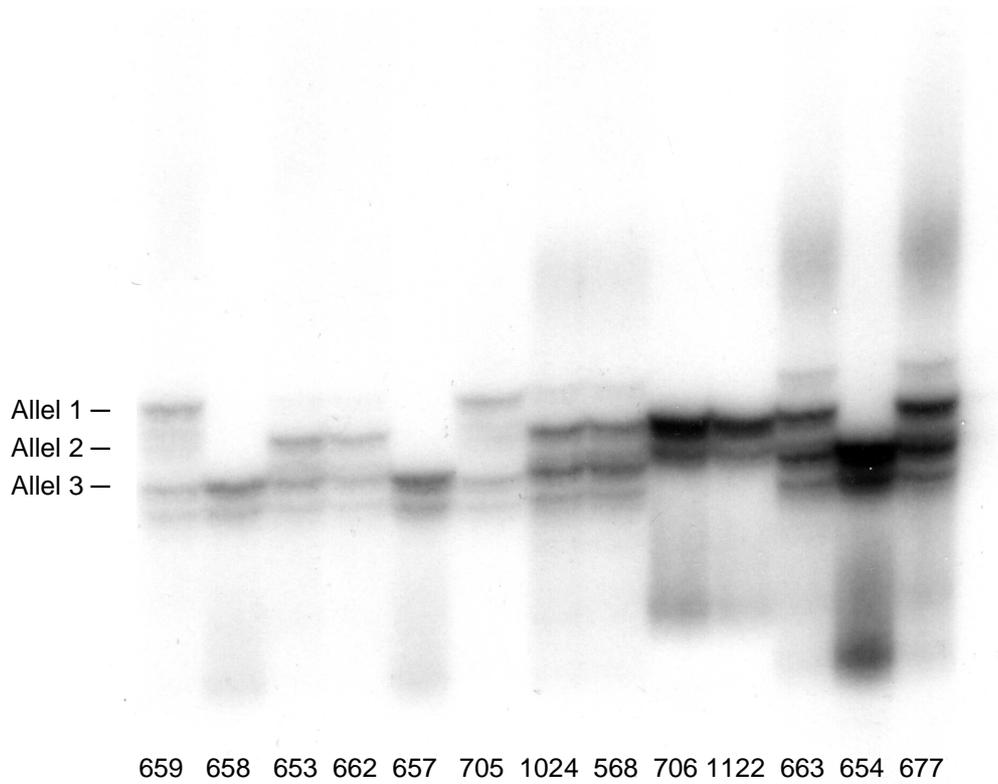


Abb. 2: Autoradiogramm der Genotypisierung von 13 Mitgliedern der Familie 9 für den Marker D15S194. Dieser weist aufgrund unterschiedlicher Nukleotid-Wiederholungen drei verschiedene Allele 1 - 3 auf, die aufgrund ihres unterschiedlichen Wanderungsverhaltens im Gel voneinander unterschieden werden können.

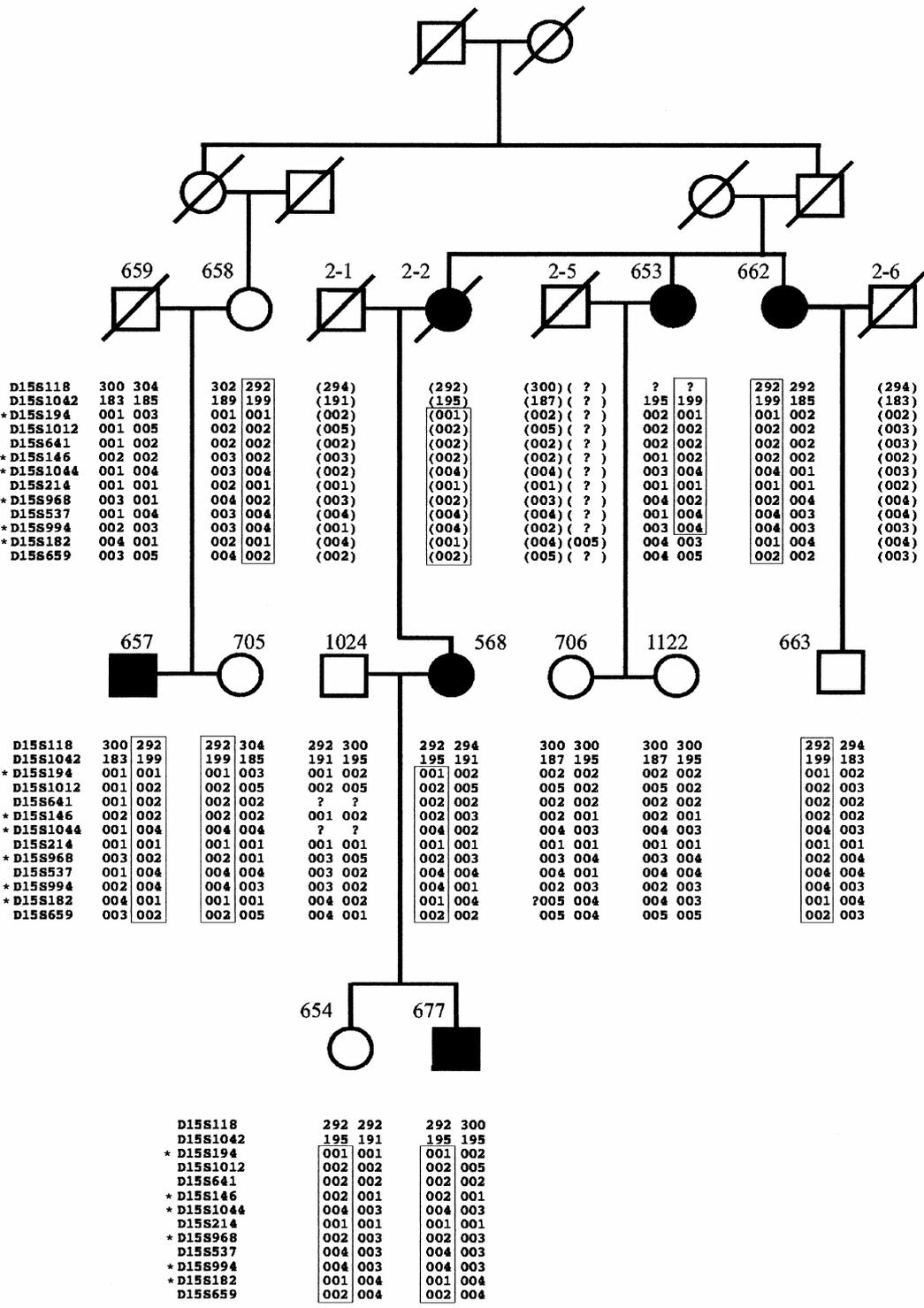


Abb. 3: Stammbaum der Familie 9 mit sechs erkrankten Familienmitgliedern. Die schwarz eingefärbten Symbole kennzeichnen erkrankte Familienmitglieder, die durchgestrichenen Symbole weisen bereits verstorbene Personen aus. Die links aufgelisteten polymorphen Marker basieren auf Marshfield Map, Stand 21.03.2001. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Marker sind durch * gekennzeichnet. Die Haplotypen der Krankheitsregion sind eingerahmt dargestellt. Durch Rekombinationsereignisse zwischen den Markern D15S1042 und D15S194 bei Patient 568 und deren Nachkommen bzw. zwischen den Markern D15S994 und D15S182 bei Patient 653 wird die Krankheitsregion in beide Richtungen begrenzt.

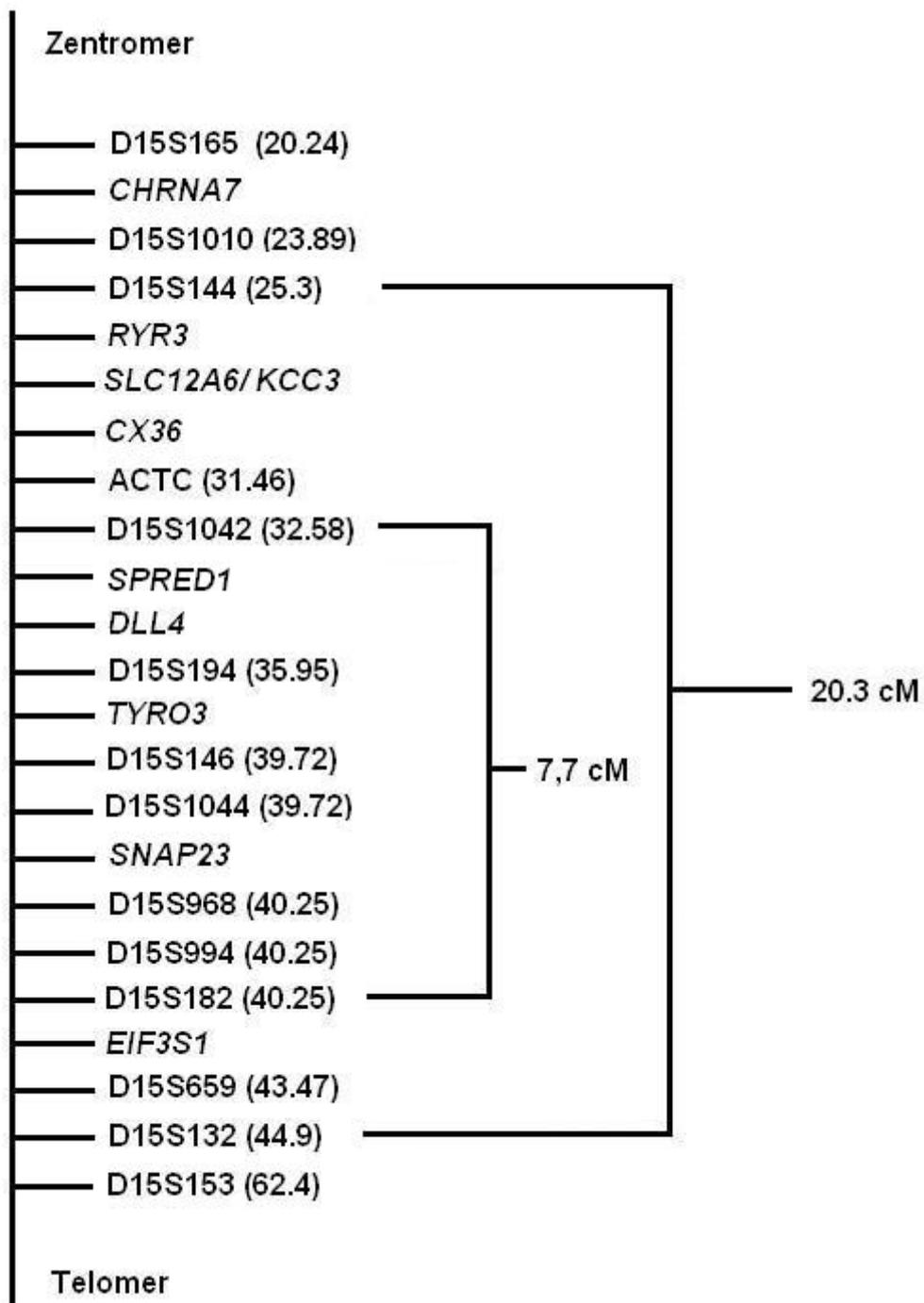


Abb. 4: Schematische Darstellung ausgewählter polymorpher Marker und potentieller Krankheitsgene (kursiv) der im Rahmen dieser Arbeit verkleinerten Kandidatengenregion 15q13-15. Die Angaben in Klammern geben die Position in cM gemäß Marshfield Map, 2001 an. Der markierte Bereich von 7,7 cM kennzeichnet die verkleinerte chromosomale Kandidatenregion zwischen den Markern D15S1042 und D15S182.

4.2. Fall-Kontroll-Studie zur Assoziation seltener *SLC12A6*-Polymorphismen mit Schizophrenie und bipolarer Erkrankung

Im Rahmen von Vorarbeiten wurden in einer Mutationsanalyse unter anderem zwei seltene Varianten von *SLC12A6* gefunden, die in einer weiteren großen Familie mit der periodischen Katatonie kosegregierten. Diese im Promotor und der 5'UTR-Region von *SLC12A6* gelegenen Polymorphismen 32418760 G/A und 32416574 G/A wurden im zweiten Teil der Arbeit anhand einer Fall-Kontroll-Studie auf Assoziation mit Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises und bipolaren Störungen überprüft.

Hierzu erfolgte die Genotypisierung von insgesamt 186 Patienten und 346 Kontrollpersonen im Falle des im Promotor gelegenen SNPs sowie die Untersuchung von 186 Patientenproben und 318 Kontrollproben für den in der 5'UTR -Region lokalisierten SNP bezüglich ihrer verschiedenen Allele.

Bei dem Promotor SNP handelt es sich um eine biallelische Variante, die entweder als A- oder G-Variante vorliegt. Zur Genotypisierung wurden die 424 bp großen PCR-Produkte mittels Restriktionsverdau in unterschiedlich große Restriktionsfragmente geschnitten, die dann in einem Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt wurden. Bei Vorliegen der G-Variante wird für das verwendete Restriktionsenzym eine zusätzliche Schnittstelle geschaffen, so dass zwei Fragmente von 58 bp und 366 bp Größe entstehen. Im Falle der A-Variante fehlt diese zusätzliche Erkennungsstelle und das 424 bp große PCR-Produkt bleibt ungeschnitten. Anhand des Bandenmusters im Agarosegel kann so eine Differenzierung der Allele erfolgen. Abb. 5 zeigt exemplarisch das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung für einige der Patienten des Schizophrenie-Kollektivs.

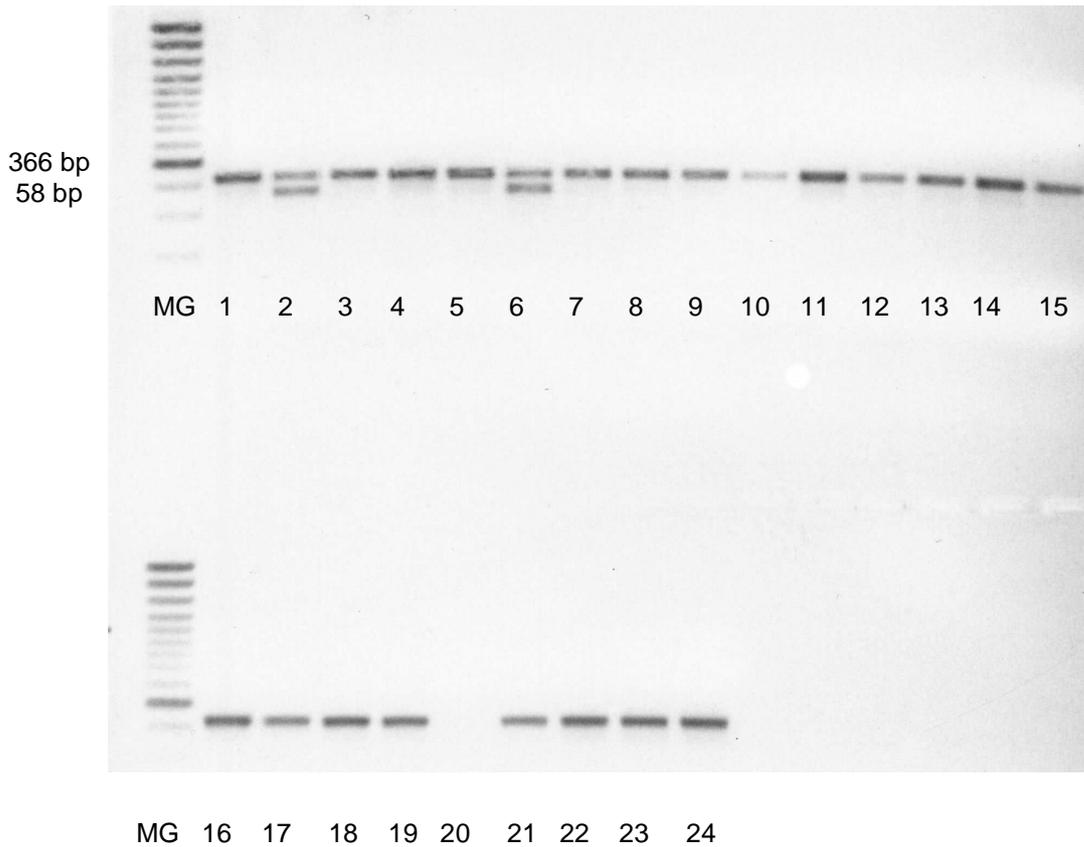


Abb. 5: Varianten des im Promotor von *SLC12A6* gelegenen Polymorphismus 32418760 (G/A) nach elektrophoretischer Auftrennung der Restriktionsprodukte im Agarosegel. Dargestellt sind die Genotypen von n Schizophrenie-Patienten auf den Spuren 3 - 24 mit einem Mitglied der Familie 11 (834) als positive Kontrolle auf Spur 2. Auf Spur 2 und 6 lassen sich zwei Banden, entsprechend 58 bp und 366 bp Größe, zuordnen, so dass hier die G-Variante vorliegt. Auf den restlichen Spuren ist lediglich eine Bande, entsprechend 424 bp Größe (A-Variante), sichtbar. Links wurde ein 100 bp Molekulargewichtsstandard (MG) aufgetragen. Die Größen der Fragmente sind in bp angegeben.

Auch der zweite untersuchte SNP, der sich in der 5'-UTR-Region befindet, liegt als biallelische Variante (G/A) vor. Die Genotypisierung erfolgte mittels allelspezifischer PCR (s. 3.2.3.2). Bei Vorliegen der G-Variante wurde bei Verwendung des spezifischen *Primers* ein 157 bp großes PCR-Produkt amplifiziert, welches nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel nachgewiesen werden konnte. Im Falle der A-Variante fand keine Amplifikation statt. Abb. 6 zeigt exemplarisch das Ergebnis der elektrophoretischen Auftrennung für einige der Patienten des Schizophrenie-Kollektivs.

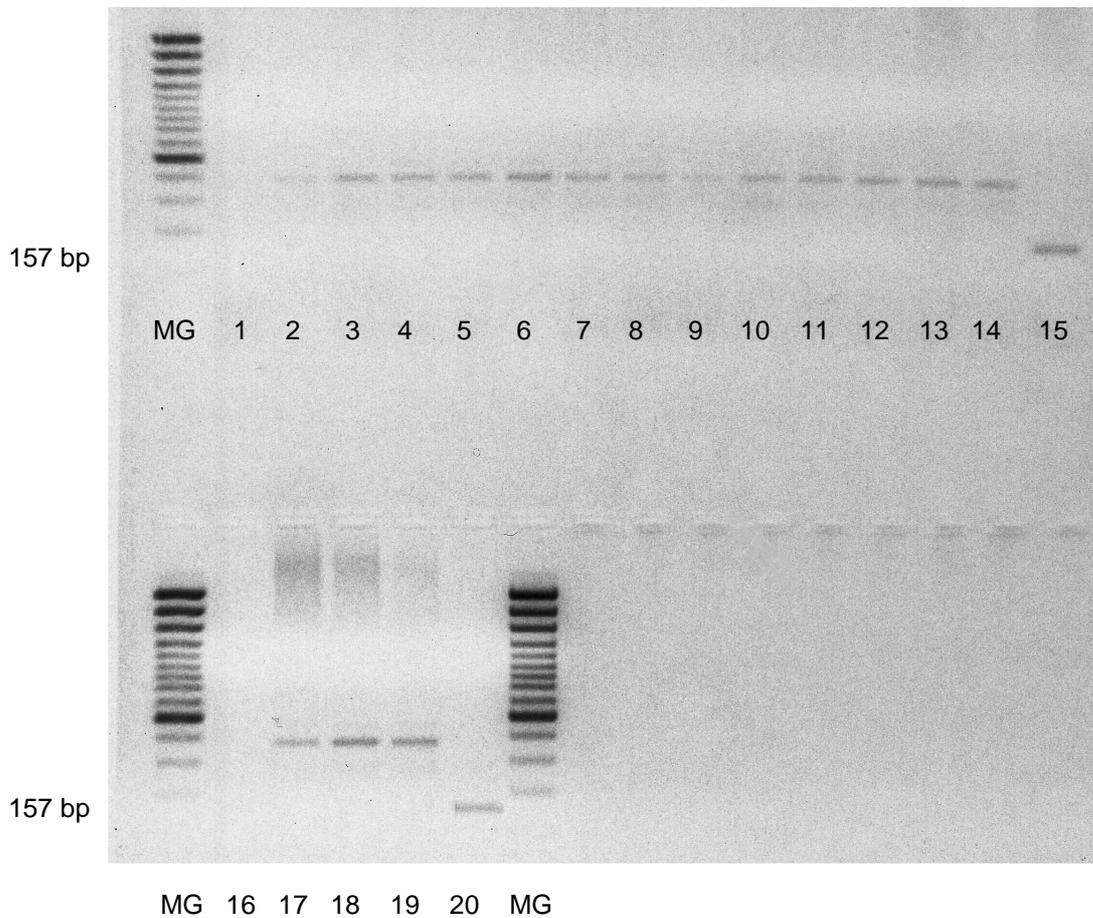


Abb. 6: Varianten des in der 5'-UTR-Region von *SLC12A6* gelegenen Polymorphismus 32416574 (G/A) nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel bei Verwendung des G-Allel-spezifischen Primers. Dargestellt sind die Genotypen von n Schizophrenie-Patienten auf den Spuren 2 - 19 mit einem Mitglied der Familie 11 (834) als positive Kontrolle auf Spur 20. Auf Spur 15 lässt sich eine Bande nachweisen, die 157 bp entspricht, so dass hier die G-Variante vorliegt. Auf den restlichen Spuren ist lediglich die genomische Ausgangs-DNA sichtbar, da hier die A-Variante vorliegt und keine Amplifikation erfolgt ist. Gleichzeitig mit jeder PCR wurde eine zweite PCR mit dem A-Varianten-spezifischen Primer angesetzt, in der bei allen Proben eine entsprechende Amplifikation erfolgte (Ergebnis nicht dargestellt).

In der statistischen Auswertung wurden die beiden Patienten-Kollektive (Schizophrenie-Patienten und bipolar erkrankte Patienten) zunächst getrennt voneinander mit der gesunden Kontrollgruppe verglichen, dann erfolgte eine Auswertung für das Gesamtkollektiv. Miteinander verglichen wurden jeweils die ermittelten Allel-, Genotypen- und Haplotypenfrequenzen, des Weiteren wurden die beiden Varianten auf das Vorliegen eines Kopplungsungleichgewichtes überprüft.

In Tabelle 2 ist die Assoziation der Haplotypen der *SLC12A6*-Varianten mit den verschiedenen Erkrankungen dargelegt, in den Tabellen 3 und 4 sind die Verteilung und Frequenz der Allele und Genotypen der beiden Varianten in den einzelnen Kollektiven aufgeführt. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt hervorgehoben.

Tabelle 2: Assoziation der Haplotypen der *SLC12A6*-Varianten mit Schizophrenie und bipolarer Erkrankung. Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt hervorgehoben.

Haplotypen	Assoziation mit Schizophrenie	Assoziation mit bipolarer Erkrankung	Assoziation mit Schizophrenie und bipolarer Erkrankung
Promotor 32418760 (G/A) 5'-UTR 32416574 (G/A)	n (Schizophrene) = 114 n (Kontrollen) = 317 p = 0,2467	n (Bipolare) = 72 n (Kontrollen) = 317 p = 0,0016	n (Schizophrene + Bipolare) = 186 n (Kontrollen) = 317 p = 0,0064

Tabelle 3: Verteilung und Frequenz der Allele der *SLC12A6*-Varianten bei Schizophrenie und bipolarer Erkrankung.
Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt hervorgehoben.

Allele	Kontrollen n	Schizophrene n	Bipolare n	Gesamtkollektiv (Schizophrene und Bipolare) n	Schizophrene versus Kontrollen (Exact-Test)	Bipolar Erkrankte versus Kontrollen (Exact-Test)	Gesamtkollektiv versus Kontrollen (χ^2 -Test)
Promotor 32418760 A	632	223	136	359	p = 0,0596	p = 0,0000	p = 0,0007
Promotor 32418760 G	4	5	8	13			
5'-UTR 32416574 A	689	224	139	363	p = 0,0678	p = 0,0051	p = 0,0053
5'-UTR 32416574 G	3	4	5	9			

n = Anzahl der Patienten oder Kontrollen

Tabelle 4: Verteilung und Frequenz der Genotypen der *SLC12A6*-Varianten bei Schizophrenie und bipolarer Erkrankung .
Signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt hervorgehoben.

Genotypen	Kontrollen n	Schizophrene n	Bipolare n	Gesamtkollektiv (Schizophrene und Bipolare) n	Schizophrene versus Kontrollen (Exact-Test)	Bipolar Erkrankte versus Kontrollen (Exact-Test)	Gesamtkollektiv versus Kontrollen (Armitage-Trend- Test)
Promotor 32418760 A/A	314	109	64	173	p = 0,0586	p = 0,0000	p = 0,0006
Promotor 32418760 A/G	4	5	8	13			
Promotor 32418760 G/G	0	0	0	0			
5'-UTR 32416574 A/A	343	110	67	177	p = 0,0671	p = 0,0049	p = 0,0051
5'-UTR 32416574 A/G	3	4	5	9			
5'-UTR 32416574 G/G	0	0	0	0			

n = Anzahl der Patienten oder Kontrollen

Die Verteilung der allelischen Varianten in allen Patienten- und Kontrollgruppen entsprach der erwarteten Genotypenverteilung des Hardy-Weinberg-Äquilibriumsprinzips. Die beiden SNPs befanden sich im Kopplungsungleichgewicht zueinander (LR $\chi^2 = 92,92$, $p = 0,0000$). Zuerst erfolgte eine Überprüfung der Haplotypen der beiden SNPs auf mögliche Assoziation mit den verschiedenen Erkrankungen. Es konnte eine positive Assoziation der Haplotypen der SNPs 32418760 G/A und 32416574 G/A mit dem Kollektiv der bipolar Erkrankten nachgewiesen werden ($p = 0,0016$), des weiteren ein Trend zur Assoziation mit dem Gesamtkollektiv ($p = 0,0064$). Keine Assoziation ergab sich hingegen für das Kollektiv der Schizophrenie-Patienten.

In der Einzelanalyse der Allele konnte eine positive Assoziation der G-Variante des im Promotor gelegenen SNP 32418760 mit der bipolaren Störung nachgewiesen werden ($p = 0,0000$, OR 9,29 (2,76 - 31,13) und ebenfalls mit dem Gesamtkollektiv der Schizophrenen und bipolar Erkrankten zusammen ($\chi^2 = 11,63$, $p = 0,0007$, OR 5,72 (1,85 - 17,68)). Erneut keine Assoziation ergab sich für das Kollektiv der Schizophrenie-Patienten. Für die G-Variante des in der 5'-UTR-Region gelegenen SNP 32416574 wurde lediglich ein Trend zur Assoziation mit dem bipolaren Teilkollektiv und dem Gesamtkollektiv gefunden.

5. Diskussion

Die hohe pathogenetische Bedeutung der chromosomalen Region 15q13-15 für zahlreiche psychiatrische und neurologische Erkrankungen, insbesondere für die periodische Katatonie (SCZD10, OMIM %605419), konnte in zahlreichen Untersuchungen der letzten Jahre wiederholt bestätigt werden (Freedman *et al.* 1997, 2001, Riley *et al.* 2000, Gejman *et al.* 2001, Steinlein *et al.* 2001, Howard *et al.* 2002, Stöber *et al.* 2000, Meyer *et al.* 2002a), nicht zuletzt im Rahmen mehrerer Kopplungsanalysen und Mutationsuntersuchungen verschiedener Würzburger Arbeitsgruppen.

Die periodische Katatonie und die bipolare Störung teilen nicht nur eine beträchtliche Anzahl wichtiger Kandidatengene wie zum Beispiel *DTNBP1* und *NRG1* (Craddock *et al.* 2006), darüber hinaus existieren auch erstaunliche klinische Überschneidungen mit Nachweis von Bipolarität und katatonen Elementen bei beiden Erkrankungen, so dass pleiotrope Geneffekte als pathogenetisch relevant diskutiert werden (Taylor und Fink 2003). Hierbei wird vermutet, dass unterschiedliche Mutationen des gleichen Gens verschiedene Erkrankungen hervorrufen.

Obwohl einige interessante Kandidatengene insbesondere für die Entstehung der periodischen Katatonie mittels Genotypisierungsuntersuchungen und Mutationsanalysen bereits erfolgreich ausgeschlossen werden konnten (Stöber *et al.* 2002, Meyer *et al.* 2002a, Meyer *et al.* 2002b), stellt das Gen *SLC12A6*, welches für den Kalium-Chlorid Kotransporter 3 codiert, aufgrund seiner Lage und Funktion ein vielversprechendes Kandidatengen nicht nur für Schizophrenien und bipolare Erkrankungen dar (Delpire und Mount 2002). Auch konnte gezeigt werden, dass rezessive *SLC12A6*-Mutationen eine schwere periphere Neuropathie mit oder ohne Agenesie des Corpus callosum sowie Psychosen hervorrufen (Andermann Syndrom, ACCPN, OMIM 218000) (Howard *et al.* 2002, Filteau *et al.* 1991).

Basierend auf vorangegangenen Arbeiten (Meyer *et al.* 2002a, Stöber 2000 und 2001), wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit die Kandidatengenregion

für periodische Katatonie auf Chromosom 15q13-15 mittels Feinkartierung zusätzlicher polymorpher Marker anhand der großen Familie 9 auf ca. 7.7 cM zwischen den Markern D15S1042 und D15S182 verkleinert (Meyer et al. 2003). Nahezu parallel zum experimentellen Teil dieser Arbeit gelang auch der Arbeitsgruppe von Stöber und Mitarbeitern eine Verkleinerung des Genlocus auf ca. 11 cM (Stöber et al. 2002). Durch die Kartierungsergebnisse konnten bereits mehrere bislang vielversprechende, zuvor beschriebene Kandidatengene wie zum Beispiel *RYR3*, *CX36* und auch *SLC12A6* als krankheitsverursachend in der untersuchten Familie ausgeschlossen werden. Unter den noch verbleibenden, weiterhin interessanten Genen befindet sich unter anderem auch das oben (siehe 1.4) beschriebene *SNAP23*, welches ebenso wie der NOTCH-Ligand *DLL4* eine wichtige Rolle in der neuronalen Signaltransduktion spielt. Zwischenzeitlich konnte *DLL4* jedoch mittels Mutationsanalyse als Kandidatengenen für die periodische Katatonie ausgeschlossen werden (McKeane et al. 2005).

Die beschriebene weitere Verkleinerung der Kandidatengenregion stellt eine wichtige Voraussetzung für eine gezielte und somit effektive Auswahl einzelner, in diesem chromosomalen Abschnitt gelegener Gene als interessante Kandidaten für Mutationsanalysen oder funktionelle Experimente dar.

Obwohl durch obige Feinkartierung unter anderem auch das Gen *SLC12A6* als Kandidat für die periodische Katatonie durch seine Lage außerhalb der Kandidatengenregion formal ausgeschlossen werden konnte, stellt es insbesondere aufgrund der funktionellen Bedeutung weiterhin ein untersuchenswertes Gen dar, nicht zuletzt auch in Bezug auf die Pathogenese der bipolaren Störung.

Auf der Grundlage einer vorangegangenen Mutationsanalyse von *SLC12A6* wurden im zweiten Teil dieser Arbeit zwei seltene, im Promotor und der 5'-UTR-Region gelegene Varianten von *SLC12A6* im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie auf Assoziation mit Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises und bipolaren Störungen hin untersucht. Bemerkenswerterweise konnte insbesondere für die G-Variante des im Promotor gelegenen SNP 32418760 eine positive Assoziation mit der bipolaren Störung und dem Gesamtkollektiv aus bipolar Erkrankten und Schizophrenen nachgewiesen werden, des weiteren

bestand jeweils ein Trend zur Assoziation für die G-Variante des weiter distal gelegenen SNP 32416574 (Meyer *et al.* 2005).

Somit trägt *SLC12A6* als eines von wahrscheinlich mehreren Risikogenen für die bipolare Störung einen Teilbeitrag zum erhöhten Erkrankungsrisiko dieser polygen bedingten und komplex-vererbten Erkrankung bei. In Anlehnung an die Überlegungen von Taylor und Fink (Taylor und Fink 2003) stützen diese Erkenntnisse ebenfalls die Vermutung einer ätiologischen Nähe von Schizophrenie und bipolarer Erkrankung.

Die positiven Assoziationsergebnisse lassen darüber hinaus die Hypothese zu, dass die Veränderungen im weiter proximal gelegenen Promotor-Polymorphismus 32418760 G/A die Pathogenese der bipolaren Erkrankung direkt beeinflussen; die Resultate für den in der 5'-UTR-Region gelegenen Polymorphismus 32416574 G/A lassen nicht nur auf eine funktionelle pathogenetische Bedeutung schließen, sondern wären ebenfalls durch das deutliche Kopplungsungleichgewicht der beiden Polymorphismen zueinander erklärbar.

Obwohl sich gerade Risikoallele, die einen nur geringen Beitrag zur Entstehung einer polygen bedingten Erkrankung leisten, besonders gut mittels Assoziationsstudien nachweisen lassen (Risch und Merikangas 1996, Baron 2001), ist das Ergebnis einer solchen Studie anfällig für falsch-positive Ergebnisse (vgl. 1.5).

Die vorliegende positive Assoziation könnte durch eine enge nachbarschaftliche Lage der untersuchten polymorphen Allele zu einem bislang unentdeckten krankheitsverursachenden Allel begründet sein, bei der sich das wirkliche Risikoallel im Kopplungsungleichgewicht zu den hier untersuchten Polymorphismen befindet. Somit wären weitere Mutationsanalysen und Assoziationsuntersuchungen mit zusätzlichen, insbesondere weiter telomerisch gelegenen potenziellen Risikoallelen vonnöten.

Weiterhin ist ein Missverhältnis bezüglich der Alters- und Geschlechterzusammensetzung von Fall- und Kontrollkollektiv denkbar, welches eine Ergebnisverfälschung zur Folge haben kann. Der Vergleich zwischen den verschiedenen Untergruppen zeigt jedoch ein weitgehend ausgewogenes Alters- und Geschlechterverhältnis der Kollektive untereinander

mit einem lediglich geringfügig erhöhten Alter im Gesamtkollektiv der Patienten gegenüber dem gesunden Kontrollkollektiv.

Auch Stratifizierungsphänomene als Ursache für ein falsch-positives Studienergebnis sind prinzipiell zu erwägen (Lander und Schork 1994), scheinen im vorliegenden Fall jedoch keine Rolle zu spielen, da sowohl Patienten als auch gesunde Kontrollpersonen aus der gleichen geographischen Region Unterfrankens stammen.

Eine ebenfalls denkbare zufällige Assoziation ist nicht wahrscheinlich, zumal für die vorliegende chromosomale Region bereits mehrere positive Kopplungsbefunde für psychiatrische und neurologische Erkrankungen vorliegen und der untersuchte Chromosomen-Abschnitt nicht nur durch die hier untersuchte Familie 9 unterstützt wird, sondern auch durch eine weitere große Mehrgenerationen-Familie (Meyer *et al.* 2002a).

Letztlich handelt es sich bei den untersuchten Kollektiven um eher kleinere Gruppen, so dass eine Wiederholung der Assoziationsstudie anhand größerer Fallzahlen im Sinne einer Bestätigungsuntersuchung notwendig ist.

Da es sich sowohl bei den Schizophrenien und auch den bipolaren Störungen um komplexe, ätiologisch heterogene Erkrankungen mit teils deutlich variabler klinischer Präsentation handelt, setzen sich die untersuchten Patientenkollektive trotz sicherer Diagnose gemäß ICD-10-Klassifikation aller Wahrscheinlichkeit nach aus einer Bandbreite verschiedener Krankheits-Unterformen zusammen, denen möglicherweise unterschiedliche pathogenetische Prinzipien und Risikoallele zugrunde liegen. Die Beschränkung auf bestimmte, klinisch eindeutig definierte so genannte Endophänotypen könnte hierbei ein homogeneres Patientenkollektiv schaffen. Anstelle komplexer klinischer Phänotypen konzentriert man sich dabei auf neurobiologische Krankheitskorrelate wie zum Beispiel neurophysiologische, neuropsychologische oder strukturelle Auffälligkeiten, die einfach zu messen, stabil über die Zeit und ebenfalls genetisch beeinflusst sind (Gottesman und Gould 2003). In Anlehnung an den erfolgreichen Einsatz dieses Endophänotypen-Konzeptes bei der Erforschung genetisch bedingter psychiatrischer Erkrankungen (z. B. Freedman *et al.* 1999, Chen und Faraone 2000) wäre beispielsweise die Beschränkung auf das klinisch zuverlässig zu

diagnostizierende Symptom der Katatonie denkbar, das sich als Gemeinsamkeit sowohl bei der bipolaren Störung als auch bei einigen, aber eben nicht bei allen Schizophrenieformen findet.

Neben der Ausweitung der vorliegenden Studie auf größere Fallzahlen stehen zukünftig vor allen Dingen funktionelle molekulargenetische Ansätze und große genomweite Assoziationsstudien im Mittelpunkt des Forschungsinteresses. Aufbauend auf den im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen, untersuchten Moser und Kollegen mögliche funktionelle Konsequenzen der beiden seltenen Promotor- und 5'-UTR-Polymorphismen (Moser *et al.* 2009). Sie konnten unter anderem eine reduzierte Promotor-Aktivität in Gegenwart der G-Variante des im Promotor gelegenen Polymorphismus 32418760 G/A nachweisen, welche vermutlich durch eine zusätzlich entstandene DNA-Methylierungsstelle im Falle der G-Variante begründet ist. Somit übt diese seltene *SLC12A6*-Varinante eine mutmaßliche regulatorische Funktion aus und stellt einen Brückenschlag zwischen genetischen Veränderungen und epigenetischen Faktoren dar.

In Zusammenschau der bisherigen Untersuchungen und der vorliegenden Ergebnisse stellt *SLC12A6* ein interessantes Risikogen für die Pathogenese der bipolaren Störung und möglicherweise auch der Schizophrenie mit bipolaren Elementen dar. Die Aufschlüsselung der exakten pathogenetischen Mechanismen steht jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch aus.

Interessanterweise häufen sich positive Nachweise, dass insbesondere genetische Varianten in anderen Ionenkanal-codierenden Genen oder deren Untereinheiten eine bedeutende Rolle in der Pathogenese sowohl der bipolaren Erkrankung als auch der Schizophrenien spielen (Ferreira *et al.* 2008, Green *et al.* 2009). Diese Erkrankungen werden möglicherweise weniger durch eine reine Entwicklungs- oder Anlagestörung mit im Vordergrund stehenden hirnstrukturellen Veränderungen hervorgerufen, sondern können, wie viele andere neuropsychiatrische Erkrankungen auch, als eine Art Ionen-Kanalerkrankung verstanden werden. Weitere Untersuchungen werden zeigen, in wie fern sich aus diesen pathophysiologischen Überlegungen heraus vielversprechende alternative Therapieansätze ergeben.

Das von Kraepelin im 19. Jahrhundert favorisierte und lange Zeit aufrechterhaltene Konzept der Dichotomie der Psychosen mit klarer ätiologischer und diagnostischer Trennung der bipolaren Störung und der Schizophrenie muss durch die Erkenntnisse der letzten Jahre kritisch hinterfragt werden (Craddock und Owen 2005), auch die vielfach verwendete Klassifikation nach Leonard stößt mitunter an ihre Grenzen. Stattdessen wäre zum Beispiel die Ablösung durch ein so genanntes Spektrum-Konzept der Psychosen mit Berücksichtigung der variablen klinischen Krankheitsausprägungen bei jedoch gemeinsamer genetischer Grundlage eine sinnvolle Alternative, welche sich mit fortschreitendem pathophysiologischen Krankheitsverständnis entwickeln wird.

6. Zusammenfassung

Sowohl die zu den Schizophrenien zählende periodische Katatonie als auch die bipolare Erkrankung werden gegenwärtig als multifaktoriell polygen bedingte Erkrankungen mit komplexem Vererbungsmodus verstanden.

Für die periodische Katatonie wurden im Rahmen vorangegangener Kopplungsanalysen zwei chromosomale Loci auf Chromosom 15 und 22 bestätigt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Kandidatengenregion auf Chromosom 15q13-15 mittels Feinkartierung einer Mehrgenerationsfamilie mit familiärer katatoner Schizophrenie (SCZD10, OMIM %605419) durch Genotypisierung zusätzlicher polymorpher Marker auf 7,7 cM zwischen den Markern D15S1042 und D15S182 verkleinert. Hierdurch konnten viele interessante Kandidatengene für die periodische Katatonie wie zum Beispiel *RYR3*, *CX36* und auch *SLC12A6* als krankheitsverursachend ausgeschlossen werden.

Trotz Ausschluss in der untersuchten Familie stellt das für den Kalium-Chlorid-Kotransporter 3 codierende Gen *SLC12A6* aufgrund seiner funktionellen Eigenschaften und vermuteten Bedeutung in der Pathogenese einiger neuro-psychiatrischer Erkrankungen wie zum Beispiel dem Andermann Syndrom (ACCPN, OMIM 218000) ein interessantes Kandidatengen für die periodische Katatonie und die bipolare Störung dar. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden zwei seltene *SLC12A6*-Varianten, die im Promotor bzw. der 5'-UTR-Region gelegenen SNPs 32418760 (G/A) und 32416574 (G/A), im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie auf Assoziation mit Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises und der bipolaren Störung hin untersucht. Der Nachweis einer signifikanten Assoziation der G-Variante des proximal gelegenen SNP 32418760 mit der bipolaren Erkrankung und auch dem Gesamtkollektiv einerseits und einem Trend zur Assoziation für die G-Variante des zweiten SNP 32416574 andererseits, unterstützt die Hypothese, dass *SLC12A6* eines von mehreren Risikogenen insbesondere für die bipolare Störung darstellt. In anschließenden funktionellen Untersuchungen als Teil einer naturwissenschaftlichen Doktorarbeit konnte eine mutmaßliche regulatorische Funktion der G-Variante des SNP 32418760 nachgewiesen werden.

Zukünftig ist die weitere Untersuchung der verbleibenden Kandidatengene und deren funktioneller Bedeutung nötig, des weiteren unterstützen die hier erhobenen Ergebnisse die Forderung nach der Weiterentwicklung des gängigen pathophysiologischen Krankheitsverständnisses der endogenen Psychosen und deren aktuell verwendeter Klassifikation.

7. Literaturverzeichnis

Alzheimer A (1897): Beiträge zur pathologischen Anatomie der Hirnrinde und der anatomischen Grundlage einiger Psychosen. *Mtschr Psychiatr Neurol* 2, 82-120

American Psychiatric Association (1994): Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM IV, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association

Badner JA, Gershon ES (2002): Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7(4):405-11

Baron M (2001): Genetics of Schizophrenia and the New Millennium: Progress and Pitfalls. *Am J Hum Genet* 68: 299-312

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

Berrettini WH (2001): The human genome: Susceptibility loci. *Am J Psychiatry* 158: 865

Berrettini WH (2003): Evidence for shared susceptibility in bipolar disorder and schizophrenia. *Am J Med Genet* 123C: 59-64

Bertelsen A, Harvald B, Hauge M (1977): A Danish twin study of manic-depressive disorders. *Br J Psychiatry*. 130:330-51.

Bleuler E (1911): Demetia praecox oder Gruppe der Schizophrenien. Deuticke, Wien, Leipzig

Böök JA (1953): Schizophrenia as a gene mutation. *Acta Genet. Statist. Med.* 4: 133-139

Boyd JH, Pulver AE, Stewart W (1986): Season of birth: schizophrenia and bipolar disorder. *Schizophr Bull.* 12(2):173-86.

Buonanno A, Fischbach GD (2001): Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 11(3):287-96

Cannon M, Jones PB, Murray RM (2002): Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *Am. J. Psychiat.* 159: 1080-1092

Cardno AG, Gottesman II (2000): Twin studies of schizophrenia. *Am J Med Genet* 97:12-17

Casaubon LK, Melanson M, Lopes-Cendes I, Marineau C, Andermann E, Andermann F, Weissenbach J, Prévost 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(1):28-34.

Chen WJ, Faraone SV (2000): Sustained attention deficits as markers of genetic susceptibility to schizophrenia. *Am J Med Genet.* 97(1):52-7.

Clarke MC, Harley M, Cannon M (2006): The role of obstetric events in schizophrenia. *Schizophr Bull.* 32(1):3-8

Cooper B (2005): Schizophrenia, social class and immigrant status: the epidemiological evidence. *Epidemiol Psychiatr Soc.* 14(3):137-44

Craddock N, Jones I (1999): Genetics of bipolar disorder. *J Med Genet.* 36(8):585-94.

Craddock N, Owen MJ (2005): The beginning of the end for the Kraepelinian dichotomy. *Br J Psychiatry.* 186:364-6.

Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ (2006): Genes for Schizophrenia and bipolar disorder? Implications for psychiatric nosology. *Schizophr Bull.* 32(1):9-16

Craddock N, Sklar P (2009): Genetics of bipolar disorders: successful start to a long journey. *Trends Genet.* 25: 99-105.

Devaney JM, Donarum EA, Brown KM, Meyer J, Stöber G, Lesch KP, Nestadt G, Stephan DA, Pulver AE (2002): No missense mutation of WKL1 in a subgroup of probands with schizophrenia. *Mol Psychiatry.* 7(4):419-23.

Dilling H, Mombour W, Schmidt MH (1991) (Hrsg.): Internationale Klassifikation psychischer Störungen: ICD-10, Kapitel V (F). Göttingen, Bern, Toronto: Huber

Dupré N, Howard HC, Mathieu J, Karpati G, Vanasse M, Bouchard JP, Carpenter S, Rouleau GA (2003): Hereditary motor and sensory neuropathy with agenesis of the corpus callosum. *Ann Neurol.* 54(1):9-18. Review.

Ebert D (2005): Psychiatrie systematisch. UNI-MED Verlag, Bremen

Evans DL (2000): Bipolar disorder: diagnostic challenges and treatment considerations. *J Clin Psychiatry* 61 (Supp 13): 26–31.

Ferreira MA, O'Donovan MC, Meng YA *et al.* (2008): Collaborative genome-wide association analysis supports a role for *ANK3* and *CACNA1C* in bipolar disorder. *Nat Genet* 40(9): 1056-1058

Filteau MJ, Pourcher E, Bouchard RH, Baruch P, Mathieu J, Bédard F, Simard N, Vincent P (1991): Corpus callosum agenesis and psychosis in Andermann syndrome. *Arch Neurol.* 48(12):1275-80.

Finzen A (2004): Schizophrenie - Die Krankheit verstehen. 8. Auflage, Psychiatrie-Verlag, Bonn

Franzek E, Beckmann H (1992): Sex differences and distinct subgroups in schizophrenia. A study of 54 chronic hospitalized schizophrenics. *Psychopathology* 25: 90-99

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. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 587-592.

Freedman R, Adler LE, Leonard S (1999): Alternative phenotypes for the complex genetics of schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 45(5):551-8.

Freedman R, Adams CE, Leonard S (2000): The $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor and the pathology of hippocampal interneurons in schizophrenia. *J Chem Neuroanat* 20: 299-306.

Freedman R, Leonard S, Gault JM, Hopkins J, Cloninger CR, Kaufmann CA, Tsuang MT, Farone SV, Malaspina D, Svrakic DM, Sanders A, Gejman P (2001): Linkage disequilibrium for schizophrenia at the chromosome 15q13-14 locus of the $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor subunit gene (CHRNA7). *Am J Med Genet* 105: 20-22.

Gargus JJ (2006): Ion channel functional candidate genes in multigenic neuropsychiatric disease. *Biol Psychiatry* 60(2): 177-185.

Gejman PV, Sanders AR, Badner JA, Cao Q, Zhang J (2001): Linkage analysis of schizophrenia to chromosome 15. *Am J Med Genet* 105(8):789-93.

Gottesman II, Gould TD (2003): The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*. 160(4):636-45

Gottesman II, Shields J (1967): A polygenic theory of schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 58(1):199-205

Güldenagel M, Ammermüller J, Feigenspan A, Teubner B, Degen J, Söhl G, Willecke K, Weiler R (2001): Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin 36. *J. of Neuroscience* 21: 6036-6044

Green EK, Grozeva D, Jones I et al. (2009): The bipolar disorder risk allele at *CACNA1C* also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 21.Juli 2009 (online Publikation)

Green EK, Raybould R, Macgregor S et al. (2005): Operation of the schizophrenia susceptibility gene, neuregulin 1, across traditional diagnostic boundaries to increase risk for bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 62(6):642-648.

Harrison PJ, Weinberger DR (2005): Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10(1):40-68

Hiki K, D'Andrea RJ, Furze J, Crawford J, Woollatt E, Sutherland GR, Vadas MA, Gamble JR (1999): Cloning, characterization, and chromosomal location of a novel human K⁺-Cl⁻ cotransporter. *J Biol Chem.* 274(15):10661-7.

Holmans P, Craddock N (1997): Efficient strategies for genome scanning using maximum-likelihood affected-sib-pair analysis. *Am J Hum Genet.* 60(3):657-66.

Howard HC, Mount DB, Rochefort D, Byun N, Dupré N, Lu J, Fan X, Song L, Rivière JB, Prévost C, Horst J, Simonati A, Lemcke B, Welch R, England R, Zhan FQ, Mercado A, Siesser WB, George AL Jr, McDonald MP, Bouchard JP, Mathieu J, Delpire E, Rouleau GA (2002): The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet.* 32(3):384-92.

Jablensky A, Sartorius N, Ernberg G, Anker M, Korten A, Cooper J E, Day R, Bertelsen A (1992): Schizophrenia: manifestations, incidence and course in different cultures. A World Health Organization ten-country study. *Psychol. Med. Monographs* 20: 1-97

Jamison KR (2000): Suicide and bipolar disorder. *J Clin Psychiatry* 61 (Suppl 9) 47–51

Joutel A, Vahedi K, Corpechot C, Troesch A, Chabriat H, Vayssière C, Cruaud C, Maciazek J, Weissenbach J, Bousser MG, Bach JF, Tournier-Lasserre E (1997): Strong clustering and stereotyped nature of Notch3 mutations in CADASIL patients. *Lancet*. 350(9090):1511-5.

Kahlbaum K (1874): Die Katatonie oder das Spannungsirresein. Eine klinische Form psychischer Krankheit. Berlin: A. Hirschwald

Kato T (2007): Molecular genetics of bipolar disorder and depression. *Psychiatry Clin Neurosci* 61, 3-19.

Kety SS, Wender PH, Jacobsen B, Ingraham LJ, Jansson L, Faber B, Kinney DK (1994): Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Replication of the Copenhagen Study in the rest of Denmark. *Arch Gen Psychiatry* 51(6):442-55

Kendler KS, Diehl SR (1993a): The genetics of schizophrenia: a current, genetic-epidemiologic perspective. *Schizophr Bull.* 19(2):261-85.

Kendler KS, McGuire M, Gruenberg AM, O'Hare A, Spellman M, Walsh D (1993b): The Roscommon Family Study. I. Methods, diagnosis of probands, and risk of schizophrenia in relatives. *Arch Gen Psychiatry* 50(7):527-40

Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ (1993c): The lifetime history of major depression in women. Reliability of diagnosis and heritability. *Arch Gen Psychiatry*. 50(11):863-70.

Kendler KS, Gruenberg AM, Kinney DK (1994): Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 51(6):456-68

Konradi C, Heckers S (2003): Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther* 97(2):153-79

Kraepelin E. (1909): Dementia praecox and paraphrenia, Psychiatrie, 8 Auflage. Barth, Leipzig

Lander ES, Schork NJ (1994): Genetic dissection of complex traits. *Science*. 265(5181):2037-48.

Lander E, Kruglyak L (1995): Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*. 11:241-7.

Lawrie SM, Abukmeil SS (1998): Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 172:110-20

Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, DeLisi LE *et al.* (2003): Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet* 73(1):34-48

Leonard K (1979): The classification of endogenous psychoses. Irvington Publishers, New York

Leonard K (1995): Aufteilung der endogenen Psychosen und ihre differenzierte Ätiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 7. Auflage

Manji HK, Lenox RH (2000): The nature of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry* 61 Supp 13:42-57

McGue M, Gottesmann II, Rao DC (1983): The transmission of schizophrenia under a multifactorial threshold model. *Am J Hum Genet* 35: 1161-1178

McGuffin P, Asherson P, Owen M, Farmer A (1994): The strength of the genetic effect. Is there room for an environmental influence in the aetiology of schizophrenia? *Br J Psychiatry* 164(5):593-9

McGuffin P (1999): Methodology of genetic research in psychiatry. *Acta Neuropsychiatrica* 11:45-47

McKeane DP, Meyer J, Dobrin SE, Melmed KM, Ekawardhani S, Tracy NA, Lesch KP, Stephan DA (2005): No causative DLL4 mutations in periodic catatonia patients from 15q15 linked families. *Schizophr Res.* 75(1):1-3

Mercado A, Mount DB, Gamba G (2004): Electroneutral cation-chloride cotransporters in the central nervous system. *Neurochem Res.* 29(1):17-25.

Meyer J, Huberth A, Ortega G, Syagailo YV, Jatzke S, Mössner R, Strom TM, Ulzheimer-Teuber I, Stöber G, Schmitt A, Lesch KP (2001): A missense mutation in a novel gene encoding a putative cation channel is associated with catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Mol Psychiatry.* 6(3):302-6

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, Lesch KP (2005): Rare variants of the gene encoding the potassium chloride co-transporter 3 are associated with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 8(4):495-504.

Meyer J, Ortega G, Schraut K, Nürnberg G, Rüschen-dorf F, Saar K, Mössner R, Wienker TF, Reis A, Stöber G, Lesch KP (2002a): 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, Mai M, Ortega G, Mössner R, Lesch K.P (2002b): Mutational analysis of the connexin 36 gene (CX 36) and exclusion of the coding sequence as a candidate region for catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Schizophrenia Research* 58 (1): 87-91

Meyer J, Rüschen-dorf F, Lesch KP (2003): A second large family with catatonic schizophrenia supports the region distally of CHRNA7 on chromosome 15q14-15. *Mol Psychiatry*. 8(3):259-60.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 16: 1215

Mirnics K, Lewis DA (2001): Genes and subtypes of schizophrenia. *Trends Mol Med* 7(7):281-3

Montagna P (2000): Molecular genetics of migraine headaches: a review. *Cephalalgia* 20(1):3-14.

Moore TH, Zammit S, Lingford-Hughes A, Barnes TR, Jones PB, Burke M, Lewis G (2007): Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet* 28; 370(9584):319-28

Moser D, Ekawardhani S, Kumsta R, Palmason H, Bock C, Athanassiadou Z, Lesch KP, Meyer J (2009): Functional analysis of a potassium-chloride co-transporter 3 (SLC12A6) promoter polymorphism leading to an additional DNA methylation site. *Neuropsychopharmacology*. 34(2):458-67

Motomura N, Satani S, Inaba M (2002): Monozygotic twin cases of the agenesis of the corpus callosum with schizophrenic disorder. *Psychiatry Clin Neurosci.* 56(2):199-202.

Mount DB, Mercado A, Song L, Xu J, George AL Jr, Delpire E, Gamba G (1999): Cloning and characterization of KCC3 and KCC4, new members of the cation-chloride cotransporter gene family. *J Biol Chem.* 274(23):16355-62.

Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51, 263

Nakashima Y, Nishimura S, Maeda A, Barsoumian EL, Hakamata Y, Nakai J, Allen PD, Imoto K, Kita T (1997): Molecular cloning and characterization of a human brain ryanodine receptor. *FEBS Lett.* 417(1):157-62.

Narr KL, Cannon TD, Woods RP, Thompson PM, Kim S, Asuncion D, van Erp TG, Poutanen VP, Huttunen M, Lönqvist J, Standerksjöld-Nordenstam CG, Kaprio J, Mazziotta JC, Toga AW (2002): Genetic contributions to altered callosal morphology in schizophrenia. *J Neurosci.* 22(9):3720-9.

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF (1989): Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17(7):2503-16.

O'Donovan MC, Williams NM, Owen MJ (2003): Recent advances in the genetics of schizophrenia. *Hum Mol Genet* 15; 12 Spec No 2:R125-33

Owen MJ, Craddock N, O'Donovan MC (2005): Schizophrenia: genes at last? *Trends Genet* 21(9):518-25

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 neurons and white matter tracts. *Neuroscience*. 103(2):481-91.

Peralta V, Cuesta MJ, Serrano JF, Martinez-Larrea JA (2001): Classification issues in catatonia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251 Suppl 1:114-6

Plomin R, Owen MJ, McGuffin P (1994): The genetic basis of complex human behaviors. *Science* 264(5166):1733-9.

Prieto AL, Weber JL, Lai C (2000): Expression of the receptor protein-tyrosine kinases Tyro-3, Axl, and mer in the developing rat central nervous system. *J Comp Neurol* 425(2):295-314.

Psychiatric GWAS Consortium Coordinating Committee, Cichon S, Craddock N, Daly M, Faraone SV, Gejman PV, Kelsoe J, Lehner T, Levinson DF, Moran A, Sklar P, Sullivan PF (2009): Genomewide association studies: history, rationale, and prospects for psychiatric disorders. *Am J Psychiatry* 166(5):540-56.

Race JE, Makhlof FN, Logue PJ, Wilson FH, Dunham PB, Holtzman EJ (1999): Molecular cloning and functional characterization of KCC3, a new K-CL cotransporter. *Am J Physiol* 277: C1210- C1219.

Rash, JE, Staines, WA, Yamsumura, T, Patel, D, Furman CS, Stelmack GL, Nagy, JI (2000): Immunogold evidence that neuronal gap junctions in adult rat brain and spinal cord contain connexin 36 but not connexin 32 or connexin 43 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 20: 7573-8

Raybould R, Green EK, Macgregor S et al. (2005): Bipolar disorder and polymorphisms in the dysbindin gene (DTNBP1). *Biol Psychiatry* 57(7):696-701.

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 Southern African Bantu families. *Am J Med Genet* 96(2):196-201.

Riley B, Kendler KS (2006): Molecular genetic studies of schizophrenia. *Eur J Hum Genet* 14(6):669-80

Riley BP, McGuffin P (2000): Linkage and associated studies of schizophrenia. *Am J Med Genet* 97(1):23-44

Risch N, Baron M (1984): Segregation analysis of schizophrenia and related disorders. *Am J Hum Genet* 36(5):1039-59

Risch N (1990): Genetic linkage and complex diseases, with special reference to psychiatric disorders. *Genet Epidemiol* 7(1):3-16

Risch N, Merikangas K (1996): The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 273(5281):1516-7.

Saito T, Guan F, Papolos DF, Rajouria N, Fann CS, Lachman HM (2001): Polymorphism in SNAP29 gene promoter region associated with schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 6(2):193-201.

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Sander T, Schulz H, Saar K, Gennaro E, Riggio MC, Bianchi A, Zara F, Luna D, Bulteau C, Kaminska A, Ville D, Cieuta C, Picard F, Prud'homme JF, Bate L, Sundquist A, Gardiner RM, Janssen GA, de Haan GJ, Kasteleijn-Nolst-Trenité DG, Bader A, Lindhout D, Riess O, Wienker TF, Janz D, Reis A (2000): Genome search for susceptibility loci of common idiopathic generalised epilepsies. *Hum Mol Genet* 9(10):1465-72.

Sasieni PD (1997). From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 53, 1253-1261

Schumacher J, Jamra RA, Freudenberg J *et al.* (2004): Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 9(2): 203-207.

Segurado R, Detera-Wadleigh SD, Levinson DF *et al.* (2003): Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part III: bipolar disorder. *Am J Hum Genet.* 73(1):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 cell growth regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(25):14714-9

Shutter JR, Scully S, Fan W, Richards WG, Kitajewski J, Deblandre GA, Kintner CR, Stark KL (2000): Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev.* 14(11):1313-8.

Silverton L, Mednick S (1984): Class drift and schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand.* 70(4):304-9

Sklar P, Schwab SG, Williams NM, Daly M, Schaffner S, Maier W, Albus M, Trixler M, Eichhammer P, Lerer B, Hallmayer J, Norton N, Williams H, Zammit S, Cardno AG, Jones S, McCarthy G, Milanova V, Kirov G, O'Donovan MC, Lander ES, Owen MJ, Wildenauer DB (2001): Association analysis of NOTCH4 loci in schizophrenia using family and population-based controls. *Nat Genet.* 28(2):126-8.

Stefansson H, Sigurdsson E, Steinthorsdottir V, Bjornsdottir S, Sigmundsson T, Ghosh S, Brynjolfsson J, Gunnarsdottir S, Ivarsson O, Chou TT, Hjaltason O, Birgisdottir B, Jonsson H, Gudnadottir VG, Gudmundsdottir E, Bjornsson A, Ingvarsson B, Ingason A, Sigfusson S, Hardardottir H, Harvey RP, Lai D, Zhou M, Brunner D, Mutel V, Gonzalo A, Lemke G, Sainz J, Johannesson G, Andresson T, Gudbjartsson D, Manolescu A, Frigge ML, Gurney ME, Kong A,

Gulcher JR, Petursson H, Stefansson K (2002): Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia.

Am J Hum Genet 71(4):877-92

Steinlein OK, Neubauer BA, Sander T, Song L, Stoodt J, Mount DB (2001): Mutationanalysis of the potassium chloride cotransporter KCC3 (SLC12A6) in rolandic und idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Res* 44: 191-195.

Stöber G, Franzek E, Lesch KP, Beckmann H (1995): Periodic catatonia: a schizophrenic subtype with major gene effect and anticipation. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 245(3):135-41

Stöber G, Saar K, Rüschenhoff 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(5):1201-7

Stöber G, Pfuhlmann B, Nürnberg G, Schmidtke A, Reis A, Franzek E, Wienker TF (2001): Towards the genetic basis of periodic catatonia: pedigree sample for genome scan I and II. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 251 Suppl 1:125-30.

Stöber G, Seelow D, Rüschenhoff F, Ekici A, Beckmann H, Reis A (2002): Periodic catatonia: confirmation of linkage to chromosome 15 and further evidence for genetic heterogeneity. *Hum Genet* 111(4-5):323-30.

Strachan T, Read AP (2005). Molekulare Humangenetik, *Spektrum Akademischer Verlag Elsevier GmbH*, München, 3. Auflage

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(2):337-48

Suarez BK, Hampe CL, Van Eerdewegh P (1994): Problems of replicating linkage claims in psychiatry. In: Gershon ES, Cloninger CR: Genetic approaches to mental disorders. Washington, DC: *American Psychiatric Press* 23-46

Taylor MA, Fink M (2003): Catatonia in psychiatric classification: a home of its own. *Am J Psychiatry* 160(7):1233-41

Teubner B, Degen J, Söhl G, Güldenagel M, Bukauskas FF, Trexler EB, Verselis VK, De zeeuw CI, Lee CG, Kozak CA, Petrasch-Parwez E, Dermietzel R, Willecke K (2000): Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for neuronspecific gap junctional protein. *J. Membr. Biol.* 176: 249-262

Torrey EF (1980): Schizophrenia and civilization. *Jason Aronson, New York.*

Torrey EF, Miller J, Rawlings R, Yolken RH (1997) Seasonality of births in schizophrenia and bipolar disorder: a review of the literature. *Schizophr. Res.* 28: 1-38

Turecki G, Grof P, Grof E, D'Souza V, Cavazzoni P, Duffy A, Brewer C, Hudson T, Rouleau GA, Alda M (2000): A genome scan using a pharmacogenetic approach indicates a susceptibility locus for BD on 15q14. *Biol Psychiatry* 47: 69S-70S.

Turecki G, Grof P, Grof E, D'Souza V, Lebus L, Marineau C, Cavazzoni P, Duffy A, Bétard C, Zvolský 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. *Mol Psychiatry* 6(5):570-8.

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(7):1044-8

Van Camp G (1999): Strategies for identification of disease genes. *Acta Neuropsychiatrica* 11:38-41

Vogeley K, Falkai P (1998): The cortical dysconnectivity hypothesis of schizophrenia. *Neurology, Psychiatry and Brain Research* 6, 113-122

Weeks DE, Lathrop GM (1995): Polygenic disease: methods for mapping complex disease traits. *Trends Genet.* 11(12):513-9.

Wei J, Hemmings GP (2000): The NOTCH4 locus is associated with susceptibility to schizophrenia. *Nat Genet.* 25(4):376-7.

Wong AH, Gottesman II, Petronis A (2005): Phenotypic differences in genetically identical organisms: the epigenetic perspective. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1: R11-R18

Zhao JH, Curtis D, Sham PC (2000): Model-free analysis and permutation tests for allelic associations. *Human Heredity* 50, 133-139

Zhao JH, Sham PC (2002): Faster allelic association analysis using unrelated subjects. *Human Heredity* 53, 36-41

Zubin J, Spring B (1977): Vulnerability-a new view of schizophrenia. *J Abnorm Psychol* 86(2):103-26

8. Abbildungsverzeichnis

<u>Abb. 1:</u>	Schematische Darstellung ausgewählter polymorpher Marker und potentieller Krankheitsgene der Kandidatengenregion 15q13-15.	21
<u>Abb. 2:</u>	Autoradiogramm der Genotypisierung von 13 Mitgliedern der Familie 9 für den Marker D15S194.	47
<u>Abb. 3:</u>	Stammbaum der untersuchten Familie 9 mit Ergebnis der Feinkartierung polymorpher Marker.	48
<u>Abb. 4:</u>	Schematische Darstellung ausgewählter polymorpher Marker und potentieller Krankheitsgene der verkleinerten Kandidatengenregion 15q13-15.	49
<u>Abb. 5:</u>	Varianten des im Promotor von <i>SLC12A6</i> gelegenen Polymorphismus 32418760 (G/A) nach elektrophoretischer Auftrennung.	51
<u>Abb. 6:</u>	Varianten des in der 5'-UTR-Region von <i>SLC12A6</i> gelegenen Polymorphismus 32416574 (G/A) nach elektrophoretischer Auftrennung.	52
<u>Tabelle 1:</u>	Diagnostische Kriterien der Schizophrenie nach ICD-10.	3
<u>Tabelle 2:</u>	Assoziation der Haplotypen der <i>SLC12A6</i> -Varianten mit Schizophrenie und bipolarer Erkrankung.	53
<u>Tabelle 3:</u>	Verteilung und Frequenz der Allele der <i>SLC12A6</i> -Varianten bei Schizophrenie und bipolarer Erkrankung.	54
<u>Tabelle 4:</u>	Verteilung und Frequenz der Genotypen der <i>SLC12A6</i> -Varianten bei Schizophrenie und bipolarer Erkrankung.	55

9. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
BSA	<i>bovine serum albumine</i> N,O-Bis-(trimethylsilyl)-acetamid
bp	Basenpaare
Bq	Bequerell
cM	centi-Morgan
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTPs	Didesoxynukleotidtriphosphate
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
dITP	Desoxyinosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
h	Stunde(n)
5-HT	5-Hydroxytryptamin = Serotonin
nm	Nanometer
M	molar
min	Minute(n)
MPP ⁺	1-Methyl-4-Phenylpyridinium-Ion
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NaAc	Natrium-Acetat
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> = Polymerase-Kettenreaktion
rpm	<i>rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> = Einzelnukleotidpolymorphismus
T _A	<i>Annealing</i> -Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquatius</i>

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _M	Schmelztemperatur
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	<i>units</i> = Einheiten
V	Volt
W	Watt
v/v	<i>volume per volume</i> =Volumen/Volumen-Anteil

Ein herzliches Dankeschön an...

... Herrn Prof. Dr. Lesch für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität erstellen zu können.

... Herrn Prof. Dr. Jobst Meyer für die verlässliche theoretische und praktische Betreuung sowie die konstruktive Beratung und engagierte Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

... die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Klinische Psychobiologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre, allen voran Frau Gabriela Ortega für ihre geduldige und kompetente Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit.

... Herrn Prof. Dr. Warnke, Direktor der Klinik und Poliklinik für Kinder- u. Jugendpsychiatrie, Psychosomatik u. Psychotherapie, für die Übernahme des Koreferates.

... meine Familie für die Unterstützung im Studium und allen voran an meinen Mann für die geduldige Motivation und Begleitung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Kirsten Anke Johannssen
geboren am 10. Februar 1977 in Göttingen
verheiratet

Schulbildung

1982 – 1983	Lindenpark-Primary-School, Adelaide, Australien
1983 - 1987	Hölty-Grundschule, Göttingen
1987 - 1997	Edith-Stein-Schule, Gymnasium, Darmstadt
23. Juni 1997	Abitur

Auslandsaufenthalt

Jan 1994 – Dez 1994	Austauschjahr mit dem AFS (American Field Service) Mount-Lawley-Senior-High-School, Perth, Australien
---------------------	--

Hochschulausbildung

Okt 1997 – Nov 2004	Medizinstudium Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Aug 1999	Ärztliche Vorprüfung
Aug 2001	1. Staatsexamen
April 2003	2. Staatsexamen
Nov 2004	3. Staatsexamen
Dez 2004	Approbation als Ärztin

Promotion

seit März 2002	an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie u. Psychotherapie der Universität Würzburg, Direktor Herr Prof. Dr. J. Deckert unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. K. P. Lesch
----------------	---

Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

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, Lesch KP (2005): Rare variants of the gene encoding the potassium chloride co-transporter 3 are associated with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 8(4):495-504.

Meyer J., Schraut K., Johannssen K., Ortega G., Reif A., Lesch KP (2002): Positional cloning of schizophrenia-related genes on chromosome 15q14-15. *American Journal of medical Genetics* 114: 860, Abstract.

Ärztliche Tätigkeit

Seit Sept 2005	Weiterbildungsassistentin an der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg, Direktor Herr Prof. Dr. K.V. Toyka
----------------	--

Würzburg, März 2010