

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Campus Mitte
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von Dynaktin 1 (DCTN1) bei der Pathogenese
schizophrener Erkrankungen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katja Grabowski

aus Potsdam

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. I. Puls
 2. Prof. Dr. med. M. Rietschel
 3. Prof. Dr. med. D. Rujescu

Datum der Promotion: 03.09.2010

Gliederung

I EINLEITUNG	6
1.1 Schizophrenie	6
1.1.1 Diagnostik/Symptome	6
1.1.2 Strukturelle Veränderungen	9
1.1.3 Ätiopathogenese	11
1.1.3.1 Epidemiologische Faktoren und Umwelteinflüsse	11
1.1.3.2 Genetik	12
1.2 Dynaktin	18
1.2.1 Struktur	19
1.2.3 Funktion	20
1.2.3 Dynaktin 1 (DCTN1)	22
1.3 Lis1	23
1.3.1 Aufbau und Funktion	23
1.3.2 Interaktion mit Dynaktin	24
II ARBEITSHYPOTHESE UND ZIELSETZUNG	26
III MATERIAL UND METHODEN	28
3.1 Probanden	28
3.1.1 Klinische Charakterisierung der Stichprobe	28
3.1.2 Bildgebung	29
3.2 Genetische Charakterisierung	30
3.2.1 SNP-Auswahl	30
3.2.2 Primerermittlung	31
3.2.3 DNA-Extraktion	32
3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR – Polymerase chain reaction)	32
3.2.5 Enzymatische Restriktion – Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP)	34
3.2.6 Elektrophoretische Auftrennung	36
3.3 Zellbiologische Untersuchung	36
3.3.1 Tiermodell	36
3.3.2 Gewebeentnahme, Zellkultur	37
3.3.3 Immunfluoreszenzmarkierung	38
3.3.4 Bildgebung	39
3.3.5 Proteinanalyse	39
3.4 Statistische Auswertung	40
3.5 Übersicht weiterer eingesetzter Chemikalien und Geräte	41

IV ERGEBNISSE	42
4.1 Demographische Daten der Probanden	42
4.1.1 Geschlechterverteilung	42
4.1.2 Altersverteilung	43
4.1.3 PANSS	43
4.2 Einfluss der Diagnose auf das Volumen der Gehirnareale	43
4.3 SNP-Einfluss	44
4.3.1 Einfluss der SNPs auf die Diagnose	44
4.3.2 Einfluss der SNPs auf die Volumetrieadaten	46
4.3.2.1 SNP rs3815241	47
4.3.2.2 SNP rs740277	48
4.3.2.3 SNP rs909177	49
4.3.2.4 SNP rs2268246	50
4.4 Haplotyp-Einfluss	51
4.4.1 Einfluss auf die Diagnose	52
4.4.2 Einfluss auf die Volumetrieadaten	53
4.4.2.1 Haplotyp ACCGCCC	54
4.4.2.2 Haplotyp GCTGTCC	54
4.4.2.4 Haplotyp ACCGCAC	55
4.4.2.5 Haplotyp ACCGTCC	56
4.4.2.6 Haplotyp GCCGTCC	57
4.5 Haplotypenkombination	57
4.5.1 Einfluss auf die Diagnose	58
4.5.2 Einfluss auf Volumetrieadaten	58
4.5.2.1 ACCGCCC/ACCGCCC	58
4.5.2.2 ACCGCCC/GCTGTCC	59
4.5.2.3 ACCGCCC/ACTGTCC	59
4.6 Zellbiologische Untersuchung	60
4.6.1 Expressionsanalyse	60
4.6.2 Einfluss des DCTN1-knock-out auf die Zellstruktur	61
4.6.2.1 Zellorganellen	61
4.6.2.2 Proliferation	63
4.6.2.3 Lis 1 Expression	64
V DISKUSSION	66
5.1 Zusammenfassung	66
5.2 Überblick Design und Ergebnisse thematisch ähnlicher Studien im Vergleich zur vorliegenden Arbeit	67
5.2.1 DCTN1-Mutationen bei weiteren Erkrankungen	67
5.2.2 Suszeptibilitätsgene und ihre Assoziation mit Gehirnstrukturveränderungen	69
5.2.3 Interaktion Dynaktin und Lis1	75
5.3 Limitationen der vorliegenden Arbeit	77
5.4 Ausblick	79

VI ZUSAMMENFASSUNG	82
VII ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE	83
VIII LITERATURVERZEICHNIS	86
IX DANKSAGUNG	94
X SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	95
XI LEBENSLAUF	96

I Einleitung

In den vergangenen Jahrzehnten konnte eine große Anzahl von Erkrankungen auf eine genetische Disposition zurückgeführt werden. Viele Krankheitsbilder, die häufig nur ungenügend therapierbar sind und deren Ätiopathogenese nahezu unbekannt war, konnten mithilfe von molekularbiologischen Untersuchungen mit Mutationen in bestimmten Genen in Verbindung gebracht werden. Es wäre eine Idealsituation, wenn alle bisher ungeklärten Erkrankungen mit einem genetischen Defekt erklärt werden könnten und ein frühes Screening auf Mutationen möglich wäre. So ist auch Schizophrenie als psychiatrische Erkrankung noch weitgehend ungeklärt. Auch in der Gegenwart kann weder eine Vorhersage einer Schizophrenie getroffen noch die Ursachen bestimmt werden. Das ist vor allem durch die Komplexität der Erkrankung bedingt, die sowohl durch multiple genetische Varianten wie auch externe Faktoren und deren Interaktion verursacht wird.

1.1 Schizophrenie

1.1.1 Diagnostik/Symptome

Schizophrenie wird den endogenen Psychosen zugeordnet und es besteht eine Wahrscheinlichkeit von etwa 1%, daran zu erkranken. Das breite Spektrum des klinischen Bildes bietet die Möglichkeit, Symptome unterschiedlich zu gruppieren. Zu den klassischen Einteilungen im deutschsprachigen Raum gehören die Lehre Bleulers und Schneiders.

Nach Bleulers Auffassung konnten Grundsymptome von akzessorischen Symptomen abgegrenzt werden. Schneider verfolgte eine ähnliche Strategie, indem er eine Gruppe von Symptomen ersten Rangs und zweiten Rangs bildete (**Tab. 1**).

In der moderneren Diagnostik wird das Symptompektrum in zwei gegenübergestellte Gruppen geteilt: die so genannten Positiv-Symptome und Negativ-Symptome.

Kennzeichnend für die erste Gruppe sind Wahnvorstellungen, Halluzinationen und Ich-Erlebnis-Störungen. Wahnvorstellungen können sich als Wahneinfall oder als Wahnwahrnehmung manifestieren. Der Patient beurteilt seine real existierende Umwelt auf eine falsche Weise, die jeden Lebensaspekt betreffen kann. So können Krankheitswahn, Verfolgungswahn sowie Eifersuchtswahn auftreten.

Halluzinationen sind in 50% der Fälle von auditorischer Natur. Vor allem das Vernehmen von Stimmen ist ein typisches Symptom der Schizophrenie. Dabei können imperative Stimmen, dialogisierende Stimmen und kommentierende Stimmen auftreten. Visuelle und auch taktile Halluzinationen treten jeweils zu 15% und 5% der Fälle auf.

Eine weitere Untergruppe der Positivsymptome sind die Ich-Erlebnis-Störungen. Sie zeichnen sich durch eine scheinbar fehlende Grenze zwischen dem Ich und der Umwelt darin aus, dass das Ich-Erleben verändert ist. Beispiele sind Gedankeneingebung, Gedankenentzug oder Gedankenausbreitung. Es wird vom Patienten das Gefühl des „von außen Gemachten“ beschrieben. Häufig kommt es in diesem Zusammenhang zu einem Rückzug aus der realen Welt. Affektverflachung, Antriebsarmut, Anhedonie, sozialer Rückzug und Aufmerksamkeitsstörungen sind typische Negativsymptome.

Die affektiven Störungen umfassen eine Vielzahl von unterschiedlichen Formen. Der emotionale Ausdruck kann vermindert, aber auch inadäquat sein. Besonders der emotionale Kontakt zu anderen Personen ist verändert und es können sozialer Rückzug und Interessenminderung auftreten. Auch die Sprache kann in Form von Sprachverarmung und Verlängerung der Antwortlatenz beeinträchtigt sein.

Die für die Schizophrenie charakteristischen formalen Denkstörungen lassen sich sowohl den Positiv- als auch den Negativsymptomen zuordnen. Patienten neigen dazu, unpräzise Begriffe zu verwenden oder logische Argumentationen zu verzerren. Auf Fragen können unpassende und im Gedankengang abgebrochene Antworten gegeben werden. Typisch sind auch Neologismen oder der Drang abstrakte Formulierungen konkret zu interpretieren bzw. konkrete Begriffe zu abstrahieren.

	Einteilung nach Bleuler	Einteilung nach Schneider	
Grundsymptome	<ul style="list-style-type: none"> - formale Denkstörung - Störung der Affektivität - Antriebsstörung - Autismus 	<ul style="list-style-type: none"> - Wahrnehmung - dialogisierende akustische Halluzinationen - Gedankenlautwerden, -entzug, -ausbreitung - Beeinflussungserlebnisse mit dem Charakter des Gemachten 	Symptome 1. Rangs
akzessorische Symptome	<ul style="list-style-type: none"> - Wahn - Halluzination - katatone Symptome 	<ul style="list-style-type: none"> - Wahneinfall - sonstige Halluzinationen - Affektveränderung - Ratlosigkeit 	Symptome des 2. Rangs

Tab. 1: Gegenüberstellung der Symptomeinteilung nach Bleuler und Schneider

In der modernen klinischen Praxis werden zwei verschiedene Klassifikationssysteme angewandt, um Schizophrenie zu diagnostizieren: das ICD-10-System, welches von der WHO veröffentlicht wurde, und das DSM-IV-System, das in den USA seinen Ursprung hat.

Sowohl in der ICD-10 als auch im DSM-IV werden verschiedene Subtypen der Schizophrenie beschrieben. Obwohl beide Klassifikationen Ähnlichkeiten in Hinsicht auf Einschluss- und Ausschlusskriterien zeigen, unterscheiden sie sich z.B. hinsichtlich der minimalen Erkrankungsdauer (**Tab. 2**).

	ICD-10 Diagnosekriterien	DSM-IV Diagnosekriterien
Symptome	mindestens 1 von <ul style="list-style-type: none"> - Gedankenlautwerdung - Gedankeneingebung/Gedankenentzug - Beeinflussungserlebnisse - Zerfahrenheit - Gedankenabreißen - Halluzinationen - Kontrollwahn, Beeinflussungswahn, Wahnwahrnehmung - Passivität 2 oder mehr von <ul style="list-style-type: none"> - persistierende Halluzinationen - Negativsymptome - Katatonie - signifikante Verhaltensänderung 	mindestens 1 von <ul style="list-style-type: none"> - Wahn - Stimmenhalluzinationen - kommentierende Stimmen 2 oder mehr von <ul style="list-style-type: none"> - Wahn - Halluzinationen - Zerfahrenheit - Negativsymptome - stark beeinträchtigtes Verhalten
Dauer	<ul style="list-style-type: none"> - mindestens 1 Monat 	<ul style="list-style-type: none"> - mindestens 1 Monat charakteristische Symptome - 6 Monate soziale bzw. berufliche Beeinträchtigung
Ausschlusskriterien	<ul style="list-style-type: none"> - affektive Erkrankungen - schizoaffektive Erkrankungen - offenkundige Gehirnerkrankungen - Drogenmissbrauch, Drogenentzug 	<ul style="list-style-type: none"> - schizoaffektive bzw. affektive Erkrankungen - Folgen einer Wirkstoffeinwirkung - tief greifende Entwicklungsstörung

Tab. 2: Gegenüberstellung der Diagnosekriterien nach ICD-10 und DSM-IV

1.1.2 Strukturelle Veränderungen

Weitere Fortschritte in der Erkennung und Erforschung der Schizophrenie konnten mithilfe der weiterentwickelten bildgebenden Verfahren erzielt werden. Die Computertomographie, ein Röntgenverfahren, das schichtweise Querschnittsbilder anfertigt, erlaubte die erste systematische Untersuchung der Gehirnstruktur, insbesondere von Schizophreniepatienten. Weitere Untersuchungsmöglichkeiten konnten durch die Entwicklung von Magnetresonanztomographie (MRT), Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Single-Photon-Emissionscomputertomographie (SPECT) wahrgenommen werden.

Das MRT basiert auf der Kernmagnetresonanz. Durch ein angelegtes statisches Magnetfeld werden die Atomkerne ausgerichtet. Ein zusätzliches hochfrequentes Wechselstromfeld überführt die Kerne in eine Rotation. Bei der Entfernung des Wechselstromfeldes kehren die Protonen in ihren Ruhezustand zurück und senden dabei eine geringe Energie aus. Diese von Gewebe zu Gewebe unterschiedliche Signalstärke wird empfangen und resultiert in einem Bild mit verschiedenen Helligkeitsstufen. Eine Weiterentwicklung des klassischen MRT-Verfahrens ist das fMRT – das funktionelle MRT. Hier wird eine erhöhte bzw. verringerte Neuronenaktivität anhand von Änderungen des Blutflusses, der Blutmenge und des Sauerstoffgehalts des Bluts und der damit einhergehenden Änderung des lokalen Magnetfelds detektiert. So ist es möglich, Gehirnaktivitäten aufgrund von Informationsverarbeitung bzw. jeglicher Art von mentaler Aktivität zu messen.

Eine Mehrzahl von Studien konnten bisher verschiedene strukturelle Veränderungen bei Schizophrenie-Erkrankten zeigen. Es wurden wiederholt veränderte laterale Ventrikel, kortikale und subkortikale Strukturen beschrieben (**Tab. 3**).

Eine weitere Gehirnanomalie ist eine funktionelle „Hypofrontalität“, die als Ausdruck einer verminderten Durchblutung bzw. eines Hypometabolismus in der funktionellen Bildgebung gefunden wurden. Sie soll Korrelat einer kognitiven Störung sein. Um Störfaktoren wie Medikation und Chronizität auszuschließen, untersuchten Andreasen et al. unmedizierte Patienten hinsichtlich prefrontaler Hypoaktivität. Sie konnten auch bei diesen Patienten weniger intensive Signale im Areal des prefrontalen Kortex detektieren [1]. In einer PET-Studie, die das gleiche Areal bei unmedizierten Patienten und Kontrollprobanden bezüglich D1- bzw. D2-Rezeptoren untersuchte, fiel eine verringerte Anzahl von D1-Rezeptoren auf, die im Zusammenhang mit der Krankheitsschwere und dem Ergebnis im Wisconsin-Card-Sorting-Test stand. Die Arbeitsgruppe proklamierte einen Zusammenhang zwischen dem Dopamin-Transmitter-System und Negativ-Symptomatik [2].

Gehirnareal	Ergebnis	Studie
Gesamtvolumen	Patienten ↓	Lawrie et al. [3]
Ventrikel	Patienten ↑	Johnstone et al. [4] Wright et al. [5] Suddath et al. [6]
Frontallappen	Patienten ↓	Shenton et al. [7]
Amygdala	Patienten ↓	Lawrie et al. [3]
Hippokampus	Patienten ↓	Nelson et al. [8] Velakoulis et al. [9]
Thalamus	Patienten ↓	Lawrie et al. [3] Andreasen et al. [10]
Basalganglien	Patienten ↑	Wright et al. [5]

Tab. 3: Studienübersicht zur makroskopischen Strukturveränderung bei Schizophrenie-Patienten im Vergleich zu anderen Probanden, ↓ entspricht kleiner als bei anderen Probanden, ↑ entspricht größer als bei anderen Probanden

Neuropathologische Untersuchungen von Gehirnen schizophrener Patienten weisen auf pathologisch veränderte Zellanordnung und verringerte Neuronenzahl besonders in zentralen limbischen Strukturen hin. Sehr widersprüchlich erscheinen die Ergebnisse hippokampaler Untersuchungen. So wird eine veränderte Zellanordnung pyramidaler Neurone im Hippokampus, pathologische Clusterbildung sowie Reduktion hippokampaler Neurone beschrieben, die aufgrund aberranter neuronaler Migration entstanden sein sollen [11], [12][13]. Allerdings konnten diese Entdeckungen in anderen Untersuchungen nicht detektiert werden [14], [15][16]. Weitere strukturelle Veränderungen des Hippokampus wurden in Form von verminderter Expression synaptischer Proteine und verringerter Anzahl von dendritischen Ausläufern gefunden [17]. Auch prefrontal wurde eine verringerte Anzahl synaptischer Verbindungen bzw. eine reduzierte Synaptophysin-Expression beschrieben. Weitere Untersuchungen ergaben, dass Projektionsbahnen zwischen Thalamus und prefrontalem Kortex bei Patienten mit Schizophrenie vermindert auftraten [18].

Die beschriebenen Strukturabweichungen sprechen für die Theorie der Neuroentwicklungsstörung als Ursache für die Schizophrenie. Jedoch kann Schizophrenie, eine Erkrankung, die in der Mehrzahl der Fälle im jungen Erwachsenenalter ausbricht, nicht auf ein einfaches Ursache-Wirkungsschema reduziert werden.

1.1.3 Ätiopathogenese

1.1.3.1 Epidemiologische Faktoren und Umwelteinflüsse

Verschiedene Umwelteinflüsse wurden identifiziert, die einen Einfluss auf die Entwicklung und Ausprägung von Schizophrenie haben. Es handelt sich dabei um psychosoziale Risikofaktoren, die in allen Lebensabschnitten auftreten können: pränatale Entwicklung und Geburt, frühe bis späte Kindheit, Adoleszenz und frühes Erwachsenenalter.

Verschiedene Studien zeigten eine Beziehung zwischen Infektionskrankheiten und Mangelversorgung der Mutter während der Schwangerschaft und einem erhöhten Risiko für Schizophrenie der Kinder [19]. Schwerwiegende Lebensereignisse in der Zeit des 1. Trimesters konnten ebenfalls mit einem erhöhten Krankheitsrisiko assoziiert werden [20]. Andere Autoren beschrieben Komplikationen während des Geburtsvorgangs als mögliche Risikofaktoren für die Entwicklung einer Schizophrenie beim Nachwuchs. Als Ursache wird vor allem ein akuter Sauerstoffmangel diskutiert [21]. Interessanterweise scheint auch der Zeitpunkt der Geburt einen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko zu haben. Eine häufig wiederkehrende Assoziation mit dem Geburtszeitpunkt innerhalb der Winter-Frühlings-Periode lässt auf einen Zusammenhang schließen [22]. Es konnte bisher nicht befriedigend geklärt werden, welche Ursachen diesem Zusammenhang zu Grunde liegen. Es wurden unter anderem pränatale Infektionen und Mangelversorgung als Mediatoren angeführt. Verschiedene Gruppen postulierten außerdem Einflussfaktoren während der Kindheit, wie z.B. Kindheitstraumen, Kopfverletzungen, den Verlust eines Elternteils als traumatisierendes Erlebnis oder einen widersprüchlichen Erziehungsstil, deren Echtheit kontrovers diskutiert wurde [23],[24],[25],[26].

In der anschließenden Phase des Heranwachsens scheint vor allem der Missbrauch von Cannabis die Ausprägung einer Psychose aus dem schizophrenen Formenkreis zu beeinflussen [27],[28]. Allerdings sollte beachtet werden, dass die Ursache-Wirkungsbeziehung noch nicht abschließend geklärt worden ist. Es existiert ebenso die Lehrmeinung, dass der Genuss von Cannabis die Entwicklung von Schizophrenie beschleunigt, bzw. dass Frühsymptome der Psychose durch Cannabis „therapiert“ werden [29]. Besonders bei der Frage nach dem Zusammenhang zwischen Cannabis-Missbrauch und Schizophrenie darf man den Einfluss eines weiteren wichtigen Risikofaktors nicht vergessen. Die zunehmende Urbanisierung und das Heranwachsen in Städten scheint aufgrund noch nicht vollständig geklärter Faktoren, z.B. erhöhter Drogenkonsum, ebenfalls die Krankheitsentwicklung zu beeinflussen [30] [31]. Zwei Hypothesen werden

proklamiert: Das Stadtleben verursacht Schizophrenie oder Schizophreniepatienten ziehen vermehrt in Städte, da hier eine relative Anonymität und eine preiswertere Lebensführung möglich sind – die so genannte „breeder-hypothesis“ bzw. „selection hypothesis“. Für beide Thesen fanden sich unterstützende Forschungsberichte[32],[33]. Die Arbeitsgruppe unter Cantor-Graae beschrieb in ihrer 2005 veröffentlichten Meta-Analyse den Zusammenhang zwischen Migrationshintergrund und einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Schizophrenie. Sie konnten ein relatives Risiko von 2,7 in der ersten Generation und 4,5 in der zweiten Generation feststellen. Es ist allerdings noch nicht befriedigend geklärt, ob soziale Isolation, Diskriminierung oder andere Sozialfaktoren, mit denen v.a. Migranten konfrontiert werden, die entscheidenden Ursachen sind [34]. Interessanterweise wurden u.a. 2 Studien veröffentlicht, die das Geschlecht in den Fokus der Schizophrenie-Risikoforschung stellen. Aleman et al. und McGrath et al postulieren ein erhöhtes Risiko für das männliche Geschlecht, in ihrem Leben an Schizophrenie zu erkranken [35],[36].

Es ist deutlich erkennbar, dass Umwelteinflüsse eine nicht zu unterschätzende Rolle in der Pathogenese von Schizophrenie spielen. Allerdings liegen keine Ergebnisse vor, die eine direkte Kausalkette zwischen Schizophrenie, die ungefähr 1 % der Weltbevölkerung betrifft, und einem bzw. mehreren epidemiologischen Faktoren präsentieren.

1.1.3.2 Genetik

Verschiedene Zwillings- und Adoptionsstudien konnten in den letzten Jahrzehnten eine genetische Basis von Schizophrenie bestätigen. Unter anderen konnte bereits 1971 Rosenthal et al. oder 1983 Kety et al. mithilfe von Adoptionsstudien einen Zusammenhang zwischen Schizophrenie und Genetik zeigen [37][38]. In der 2003 veröffentlichten Metaanalyse untersuchten Sullivan et al. 12 veröffentlichte Zwillingsstudien, die von 1941 bis 1999 in Europa, Japan, in den USA durchgeführt wurden. Sie zeigten die genetische Basis der Schizophrenie, aber sie verdeutlichten auch, dass ebenso Umweltfaktoren einen Beitrag zur Krankheitsausprägung leisten [39]. Kendler et al. erfassten in ihrer Studie, dass Verwandte ersten Grades von Schizophrenie-Patienten ein 15fach erhöhtes relatives Risiko haben, eine Schizophrenie zu entwickeln.[40]

Das Ziel genetischer Studien ist die Identifizierung von Genen oder Genabschnitten, die in einem direkten Zusammenhang mit der Erkrankung Schizophrenie stehen.

Die beiden Hauptmethoden zur Lokalisierung von krankheitsverursachenden Genen sind die Kopplungsanalysen und die Assoziationsstudien. Die beiden sich ergänzenden Verfahren untersuchen DNA-Proben, um Genen Krankheiten zu zuordnen.

Kopplungsanalyse

In der Kopplungsanalyse werden vor allem DNA-Proben von Familien genutzt. Mithilfe von bekannten Marker-Loci im Genom wird die Vererbung von Kandidatengen kontrolliert. Liegen Kandidatengen und Marker auf dem Chromosom nahe beieinander, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass der Marker gehäuft bei betroffenen Familienmitgliedern nachgewiesen werden kann. So können Genomabschnitte identifiziert werden, die erkrankte Familienmitglieder teilen, und dementsprechend eine Verbindung zur Krankheit darstellen könnten, wobei davon ausgegangen wird, dass eine Kosegregation von Marker-Lokus und angenommenen Krankheits-Lokus stattfindet. Mögliche Marker sind Mini- und Mikrosatelliten. Bei den Mikrosatelliten handelt es sich sowohl um nicht-kodierende als auch kodierende Genabschnitte, die sich durch das wiederholte Auftreten kurzer Basensequenzen charakterisieren. Die Anzahl der Basen (Di-, Tri- oder Tetranukleotide), die wiederholt werden, und die Länge des „Repeats“ sind unterschiedlich. Am häufigsten treten AC-Wiederholungen auf, durchschnittlich alle 30kB [41]. Da die Ausprägung der Mikrosatelliten individuell verschieden ist, sind sie als Marker sehr gut geeignet.

Die Methode der Kopplungsanalyse detektierte in verschiedenen Schizophrenie-Kopplungsstudien einen Bereich von zusammengefasst ungefähr 4000 Genen, was die Schwierigkeit der Fokussierung auf einen bestimmten Bereich erkennen lässt [42].

Zwei Meta-Analysen von jeweils 20 bzw. 18 veröffentlichten Kopplungsstudien [43][44], konnten verschiedene Chromosomen und Chromosomabschnitte identifizieren, die viel versprechende Kandidatengene beinhalten. Badner and Gershon isolierten die chromosomalen Regionen 8p, 13q und 22q, die stark auf eine kausale Verbindung zur Schizophrenie hinwiesen [43].

Lewis und Mitarbeiter weiteten den Bereich ein Jahr später aus. Sie führten in ihrer Arbeit unter anderem auch die Regionen 2p12 – q22, 16p13 –q12 an [44].

Allerdings muss der Nachteil der Kopplungsanalyse beachtet werden, denn mit dieser Methode können keine direkten Kandidatengene identifiziert werden.

Assoziationsstudien

Anders als bei der Kopplungsanalyse können bei Assoziationsstudien DNA-Proben von sowohl verwandten als auch nicht-verwandten Personen untersucht werden. Häufig handelt es sich bei Assoziationsstudien um Fall-Kontroll-Studien, in die sowohl gesunde Probanden als auch Patienten eingeschlossen werden. Diese Untersuchung hat das Ziel, eine Abhängigkeit zwischen einer bestimmten genetischen Variante und dem Risiko, eine Krankheit zu entwickeln, zu identifizieren. Dabei wird die Ausprägung der genetischen Variation bei einzelnen Proben charakterisiert und festgestellt, ob bestimmte Ausprägungen mit der Erkrankung assoziiert sein könnten. Es werden bei dieser Methode verschiedene Arten dieser Variationen genutzt.

Die am häufigsten eingesetzten Marker sind einzelne Polymorphismen – single-nucleotide-polymorphismus – SNPs. Sie machen ungefähr 90% der genetischen Variationen im menschlichen Genpool aus und kommen durchschnittlich alle 1000 Basen vor, wobei sie nicht gleichmäßig über das Genom verteilt liegen. Es handelt sich dabei um Punktmutationen, die abhängig von ihrer Lage und Art des Basenaustauschs einen unterschiedlichen Effekt haben können.

Veränderungen in der kodierenden Sequenz

<i>synonyme Mutation</i>	der Basenaustausch hat keinen Einfluss
<i>missense Mutation</i>	der Basenaustausch führt zur Aminosäureveränderung
<i>nonsense Mutation</i>	der Basenaustausch führt zu einer Stopmutation Funktionsverlust-Mutation
<i>Deletion Mutation</i>	Verlust einer Base
<i>Frameshift Mutation</i>	die Basenveränderung (Verlust/Einfügung) führt zu einem neuen Aminosäureraster

Veränderungen in der nicht kodierenden Sequenz

<i>Intron</i>	kein direkter Effekt, Kopplungsgleichgewicht mit relevanten SNP möglich
---------------	-------------------------------------------------------------------------

<i>Intron-Exon-Grenze</i>	Beeinflussung des Splice-Vorgangs möglich
<i>Promoter-Bereich</i>	Störung der Transkription möglich
<i>UTR-Region</i>	Stabilitätsverminderung der mRNA möglich

Es ist davon auszugehen, dass gerade bei komplexen Krankheitsbildern, wie es bei der Schizophrenie zutrifft, nicht nur ein einzelner SNP einen Einfluss auf den resultierenden Phänotyp ausübt, sondern dass mehrere SNPs, teilweise sogar in verschiedenen Genen, die Ausprägung der Eigenschaft bewirken. Zur genotypischen Charakterisierung von Individuen können Haplotypen erstellt werden. Ein Haplotyp eines Individuums stellt die Abfolge spezifischer Allele auf einem Chromosom dar. Aufgrund von Kopplungen zwischen den einzelnen SNP-Loci ist die Zahl der möglichen Haplotypen, die theoretisch bei n bi-allelischen SNP 2^n Haplotypen betragen würde, begrenzt. Nach Betrachtung der Genotypdaten des zu untersuchenden Kollektivs können die wahrscheinlichsten Haplotypen erstellt werden.

Assoziationsstudien haben im Vergleich zur Kopplungsanalyse den Vorteil, Gene aufzuspüren, die eventuell nur einen kleinen Effekt haben, dennoch aber für sich oder in Interaktion mit anderen Genen wichtig für die Ausprägung der Erkrankung sein können.

Kandidatengene

Neurotransmittersysteme

Dopaminerges System

Es wird seit längerem ein Zusammenhang zwischen einer gestörten Dopamin-Neurotransmission und pathologischen Dopaminrezeptoren postuliert. Besonders die Wirksamkeit der angewandten Neuroleptika, insbesondere Dopamin-D₂-Antagonisten, sprechen für eine Involvierung des dopaminergen Systems in der Pathogenese. Aus diesem Grund erscheinen zum Beispiel die kodierenden Gene für Dopaminrezeptoren als viel versprechende Ziele, um eine Assoziation mit Schizophrenie zu überprüfen. Zwei gegensätzliche Rezeptoren konnten bisher identifiziert werden: der D1-Rezeptor, der die Adenylatcyclase unterdrückt, und der D2-Rezeptor, der die

Adenylatcyclase aktiviert. Die Gene für den Dopamin-D1-Rezeptor (DRD1), Dopamin-D2-Rezeptor (DRD2), Dopamin-D3-Rezeptor (DRD3) und Dopamin-D4-Rezeptor (DRD4) wurden bisher in Assoziationsstudien untersucht. Unter anderem wurden auch COMT, ein Enzym, das den Transfer einer funktionellen Gruppe auf Katecholamine, u.a. der Neurotransmitter Dopamin, katalysiert mit Schizophrenie assoziiert. Auch DAT, als synaptischer Dopamintransporter und -regulator der Dopamintransmission, konnte in Verbindung mit Schizophrenie gebracht werden.. (Tab. 4).

Serotonerges System

Ein weiteres potentielles Kandidatengen ist das Gen für den 5-HT_{2A}-Rezeptor. Er ist eines der Wirkungsziele für die so genannten atypischen Neuroleptika und spielt auch wegen der engen Kopplung an das dopaminerge System möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der Schizophrenie. Unter anderem konnte in zwei Studien eine Assoziation festgestellt werden, die zwischen bestimmten Genotypen und der Erkrankung an Schizophrenie bestand (Tab. 4).

Glutamerges System

Ein weiteres Neurotransmittersystem, das eine Bedeutung in der Schizophrenieforschung hat, ist das glutamerge System. Glutamat ist der wichtigste excitatorisch wirkende Neurotransmitter des zentralen Nervensystems und aktiviert sowohl ionotrope als auch metabotrope Rezeptoren. Unter anderem wurde das Gen GRM 3 untersucht, das für den metabotropen Glutamatrezeptor 3 kodiert. Ergebnisse über dessen mögliche Assoziation mit Schizophrenie brachten jedoch kontroverse Erkenntnisse (Tab. 4).

Neurotransmittersystem	Gen	Studie
dopaminerges System	DRD1	Allen et al. 2008 [45]
	DRD2	Schindler et al. [46] Arinami et al. [47] Jönsson et al. [48]
	DRD3	Crocq et al 1992 [49]
	DRD4	Nakajima et al. 2007[50]
	COMT	Shifman et al. 2002 [51]
	DAT	Talkowski et al.[52]
serotonerges System	Gen für den 5-HT _{2A} -Rezeptor	Inayama et al. 1996 [53] Williams et al. [54]
glutamerges System	GRM3	Schwab et al.. 2008 [55] Norton et al 2005 [56] Fujii u. a. 2003 [57]

Tab. 4: Kandidatengene aus dem Bereich der Neurotransmittersysteme

Neuronenmigration

Veränderungen in den Neurotransmittersystemen ist nur ein Erklärungsansatz für die Pathogenese von Schizophrenie. Pathologische Abwandlungen in der Zytoarchitektur des Gehirns unterstützen die Annahme, dass Gene und dessen Genprodukte, die in der Kortexformation, beim Synapsenaufbau, bei der Neuronenmigration u.ä. eine Rolle spielen, auf eine Assoziation mit Schizophrenie überprüft werden sollten. Vor allem die drei Gene Neuregulin (NRG1), Dysbindin (DTNBP1) und Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC-1) sind von besonderem Interesse.

DISC 1, erstbeschrieben von St. Clair et al. in einer großen schottischen Familienuntersuchung [58], spielt in der neuronalen Migration eine wesentliche Rolle und konnte als wichtiger Faktor für die korrekte Neuronenausrichtung und Formation insbesondere der hippocampalen Strukturen identifiziert werden. In mehreren Studien wurden SNPs beschrieben, die eine Assoziation mit der Diagnose Schizophrenie aufwiesen.

Das Gen NRG1 kodiert für das Protein Neuregulin, das an den Rezeptor ERB4 bindet. Der NRG1-ERB4-Signalweg soll eine wichtige Rolle in der Neuroentwicklung spielen und unter anderem die Proliferation neuronaler Progenitorzellen sowie Neuronenmigration und Bildung der Synaptogenese beeinflussen. Somit wird auch ein Zusammenhang zwischen einem verändertem NRG1-Gen und Schizophrenie proklamiert. Es konnten bisher über 80 verschiedene

SNPs beschrieben werden, die in unterschiedlichen Populationen eine Assoziation mit Schizophrenie aufwiesen.

Ein weiteres Kandidatengen, das in der Synaptogenese und damit in der Gehirnentwicklung eine führende Rolle spielt, ist DTNBP1. Es kodiert das Protein Dysbindin, das in Neuronen vorkommt, und besonders im Bereich des Hippokampus und Cerebellums expremiert wird. Unter anderem konnte durch Messung der mRNA-Expression in verschiedenen Gehirnarealen bei Schizophrenie-Patienten und gesunden Kontrollen eine signifikant verringerte Expression bei erkrankten Probanden detektiert werden (**Tab. 5**).

Kandidatengen	Studie
DISC-1	St Clair, D. et al. 1990 [58] Hennah, W. et al. 2003 [59] Chubb, J.E. et al. 2008 [60] Callicott, J.H. et al. 2005 [61]
NRG1	Mei, L. & Xiong, W. 2008 [62] Walss-Bass, C. u. a. 2006 [63]
DTNBP1	Weickert, C.S. u. a. 2004 [64] Duan, J. u. a. 2007 [65] Li, D. & He, L. 2007 [66]

Tab. 5: Kandidatengene aus dem Bereich der Neuronenmigration

Zusammenfassend kann man sagen, dass selbst die meistversprechendsten Kandidatengene kaum reproduzierbare Ergebnisse zeigen, so dass weitere Untersuchungen von Genen, die beispielsweise nachweislich im Prozess der Gehirnentwicklung involviert sind, angestrebt werden. So können mögliche Assoziationen mit Schizophrenie gefunden und ein zusätzlicher Beitrag zur Aufklärung von Schizophrenie geleistet werden.

1.2 Dynaktin

Ein solcher Kandidat ist Dynaktin. Das Protein Dynaktin spielt eine Schlüsselrolle im axonalen Transport, in der Neuronenauswanderung und Chromosomenausrichtung während der Mitose und könnte eine genetische Basis für die nachgewiesene neuronale Strukturanomalie bei der Schizophrenie sein.

1.2.1 Struktur

Dynaktin ist ein Proteinkomplex, der aus 11 unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut ist (Abb.1).

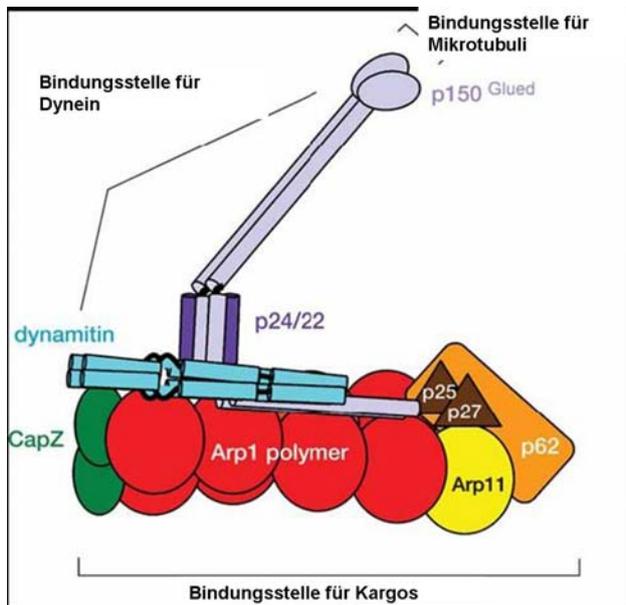


Abbildung 1: Darstellung eines Modells des Dynaktin-Komplex, bestehend aus der Basis mit Arp 1 (actin related protein 1), Arp 11 (actin related protein 11), CapZ (conventional actin-capping protein), p62, p25, p26, Dynamitin als Tetramer und p24/22 sowie der Projektionsarm aufgebaut durch die p150^{glued}-Untereinheit [67]

Die Basis des Proteins wird aus einem Zusammenschluss mehrerer Teilproteine gebildet. Das actin-related protein 1 (Arp1) kommt hier als Polymer vor und bildet den Hauptteil. Es konnte gezeigt werden, dass diese Untereinheit in der Lage ist, ATP zu spalten und Filamente zu bilden, ähnlich dem Aktin [68]. Weitere, den Dynaktin-Komplex bildende Proteine sind CapZ (conventional actin-capping protein) und Arp11, die beide jeweils die Enden der Basis bilden. Die p62-Untereinheit verbindet die Arp11-Untereinheit mit den beiden kleinsten Dynaktin-Teilstücken: der p25- und p27-Untereinheit. Die Proteinbasis scheint insbesondere die Stabilität des Gesamteinkomplexes zu gewährleisten.

Der „Projektionsarm“ von Dynaktin wird größtenteils von den wohl wichtigsten Untereinheiten p150 und Dynamitin gebildet. Das Dynamitintetramer als Verbindungsstück zwischen Proteinbasis und p150-Kopfstück sowie zwei p150-Untereinheiten bilden diesen Dynaktinabschnitt. Sowohl Eckley et al. [69] als auch Karki et al. [70] fanden heraus, dass freilösbliches Dynamitin zu einer Lösung der p150-Untereinheit und der kleinsten Untereinheit

p24/22 von der Dynaktin-Basis führt. Im N-Terminus der Dynamitin-Untereinheit wurden Interaktionsstellen mit einem Kinetochor-Protein, mit Calmodulin und einem Golgi-Apparat assoziiertem Protein nachgewiesen [71], [72][73].

Das p150-Polypeptid ist der größte Bestandteil und ist in 3 Hauptabschnitte gegliedert. Das kodierende Gen ist DCTN1. Bereits 1996 formulierte die Arbeitsgruppe Holzbaur et al. die Annahme, dass die Dynein-Dynaktin-Interaktion über die p150-Untereinheit eine maßgebliche Schlüsselrolle im axonalen Transport spielt [74].

Das glycinreiche n-terminale Ende, das so genannte CAP-Gly-Motiv (cytoskeleton associated protein, glycine-rich) fungiert als Bindungsstelle für Mikrotubuli, Interphasezentrosomen und den Spindelapparat während der Mitose [75], [76][77]. Es handelt sich dabei um eine stark konservierte Aminosäuresequenz, die einen der wichtigsten Aspekte der Dynaktin-Funktion erfüllt. Hier interagieren auch verschiedene Partnerproteine EB1 und CLIP-170, ebenfalls Mikrotubuli bindende Proteine [78][67]. Unter anderem konnten Studien demonstrieren, dass Fehler in diesem Abschnitt z.B. zu einer erblichen Form einer Motoneuronenerkrankung führen kann [79]. Außerdem wurde beschrieben, dass eine Phosphorylierung der Position S19 die Affinität zu Mikrotubuli reduzierte [75].

Die anschließende mittlere Sequenz beinhaltet die Dyneinbindungsstelle. Unterschiedliche Studien konnten mehrere Dynein-Dynaktin-Interaktionsstellen identifizieren. Auch der Protein-Protein-Kontakt mit Kinesin II findet hier statt [80].

Der c-terminale Abschnitt ist weniger intensiv untersucht. Es wurde vermutet, dass dieser Abschnitt die Voraussetzung für eine direkte Verbindung mit Arp1 schafft. Zusätzlich sollte hier das Huntingtin-associated Protein 1 (HAP-1) mit Dynaktin interagieren [81]. Insgesamt scheint die p150-Untereinheit die Hauptfunktion des Dynaktinkomplexes zu vermitteln.

1.2.3 Funktion

Dynaktin fungiert als Bindungspartner für multiple Mikrotubuli-basierte Motorproteine. Das neuronale Netzwerk baut sich aus Aktin, Neurofilamenten und Mikrotubuli auf. Die Mikrotubuli sind für die Stabilität und Ausrichtung des Netzwerks verantwortlich, indem sie mit ihrem langsam wachsenden minusgerichteten Ende in Richtung Zellkörper und mit ihrem schnell wachsenden peripher gerichteten Ende die Neuronenpolarisation vornehmen. Zwei verschiedene Motorproteinkomplexe übernehmen den Cargotransport in der Zelle. Man unterscheidet Kinesin, das als Motorprotein für den anterograden Transport in die Peripherie verantwortlich ist, und

Dynein, ein großes Protein, das sich aus mehreren Untereinheiten zusammensetzt, das den retrograden Transport aus der Peripherie zum Zellkörper vornimmt (**Abb. 2 und 3**).

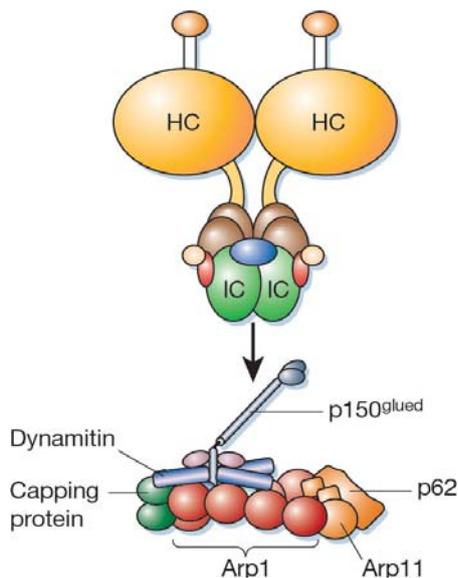


Abbildung 2: Darstellung des Dynein-Dynaktin-Komplexes, HC heavy chain, IC intermediate chain, Arp1 (actin related protein 1), Arp11 (actin related protein 11) [82]

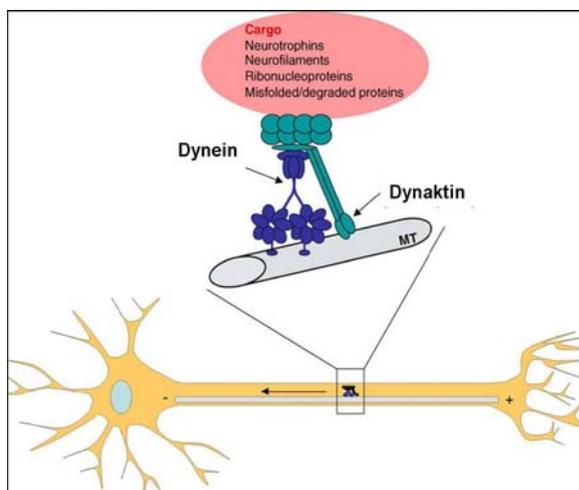


Abbildung 3 Darstellung des Transportsvorgangs von Kargos mit dem Dynaktin-Dynein-Komplex entlang der Mikrotubuli (MT) [83]

Im Gegensatz zu Dynaktin ist Dynein fähig, zelluläre Bestandteile selbstständig zu binden. Trotzdem scheint Dynaktin die Dyneinrekrutierung oder –Zielmarkierung zu regulieren und spielt somit eine Schlüsselrolle im retrograden Transport. Der korrekte Versand von Golgivesikeln, Endozytoseorganellen und Mitochondrien scheint von einer funktionsfähigen Dynein-Dynaktin-Zusammenarbeit abzuhängen. Zusätzlich interagiert Dynaktin mit Kinesin II,

was die Arbeitsgruppe unter Deacon demonstrieren konnte [80]. Somit scheint Dynaktin als Bindungspartner für multiple Mikrotubuli-basierte Motorproteine zu fungieren.

Interessanterweise ist Dynaktin außerdem in der Kernverschiebung integriert. Wie Dujardin & Vallee in ihrem Review beschrieben, scheint der Proteinzusammenschluss von Dynaktin, Dynein, Lis 1, NudE/Nudel und DISC-1 zu einem Komplex die Bewegung von größeren Strukturen, u.a. vom Nukleus zu bewirken. Dieser Prozess spielt bei der Zellreorientierung und Neuronenmigration eine substantielle Rolle [84]. Weitere Studien berichteten von einer verstärkten Präsenz Dynaktins am Spindelpol während der Interphase und sprechen Dynaktin eine wichtige organisatorische Rolle beim Mitosevorgang zu.

Abe et al. konnten nicht nur das Vorhandensein von Dynaktin im neuronalen Wachstumsbereich, dem so genannten "growth cone", zeigen, sondern auch die Voraussetzung einer Funktionalität für das Wachstum der Zelle demonstrieren [85].

1.2.3 Dynaktin 1 (DCTN1)

Das für die p150-Untereinheit kodierende Gen DCTN1 liegt auf dem p-Arm des Chromosoms 2 (**Abb. 4**). Die Arbeitsgruppe Holzbaur et al. lokalisierten bereits 1996 DCTN1 via Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) auf dem Chromosom 2. Es besteht aus 32 Exons und erstreckt sich auf 19,4 kb des Genoms.



Abbildung 4: Darstellung von Chromosom 2 mit der Position von dem Gen DCTN1 (rote Markierung), Bild aus Ensembl Datenbank [86]

Bisher konnten nur im Gen DCTN1 Mutationen gefunden werden, die mit klinischen Symptomen assoziiert werden konnten.

Eine missense-Mutation der Base 957 (C→T), die von der Arbeitsgruppe Puls et al. in einer nordamerikanischen Familie detektieren werden konnte, resultiert in einer G59S-Substitution. Dieser Basenaustausch liegt im Cap-Gly Bereich der p150-Untereinheit, wo die Bindungsstelle zu Mikrotubuli liegt. Die betroffenen Familienmitglieder leiden an einer autosomal dominanten Motoneuronerkrankung, die sich mit früh einsetzender Stimmenlippenlähmung und später hinzutretender Schwäche wie auch Atrophie im Gesichtsbereich, der Hände und der distalen Beinbereiche präsentierte [79].

Die Arbeitsgruppe Münch et al. identifizierte bei einer Patientin mit ALS ähnlichen Symptomen eine heterozygote Ausprägung einer Cytosin/Thymin-Transition der Base 2512, die zu einem Aminosäureaustausch führte. Eine weitere identifizierte Transition der Base 3153 wurde bei einem Patienten, der ebenfalls an einer nicht gesicherten ALS litt, gefunden. Auch hier kam es zu einer Änderung der Aminosäuresequenz. Die Arbeitsgruppe identifizierte zusätzlich bei einem anderen Patienten eine Mutation der Base 4546, die einen Aminosäureaustausch von Threonin zu Isoleucin verursachte. Interessanterweise blieben die Mutter und Schwester bei gleicher Basenausprägung unauffällig, während der Bruder des Patienten andere Symptome zeigte. Die Arbeitsgruppe ging daher von einer unvollständigen Penetranz aus. In einer zusätzlichen Patientenfallstudie mit ALS-Betroffenen wurde eine heterozygote C- zu T-Transition der Base 4102 gefunden, die ebenfalls eine Aminosäuresubstitution verursachte. Der Bruder des ALS-Patienten, der ebenfalls die Sequenzänderung aufwies, litt an einer frontotemporalen Demenz ohne Motoneuronenbeteiligung [87][88].

Lai et al. generierten eine transgene G59S knock-in-Maus, in der sie eine Beeinträchtigung des funktionellen Dynein-Dynaktin-Komplexes demonstrieren konnten. Homozygote Mausnachkommen zeigten eine frühe embryonale Sterblichkeit. Heterozygote Nachkommen wiesen im Vergleich zum Wildtyp pathologische Neuronenveränderungen auf [89]. Eine pathologisch veränderte Untereinheit p150 verursacht nachweislich einen Defekt im Dynaktin-Dynein-Komplex und stört damit den axonalen Transport und die Versorgung des Neurons.

1.3 Lis1

Dynaktin interagiert nicht nur mit dem Motorprotein Dynein. Wie schon beschrieben, kommuniziert Dynactin auch mit weiteren Mikrotubuli bindenden Proteinen, wie z.B. CLIP-170 oder EB1. Ein besonders interessanter Partner ist das Protein Lis1.

1.3.1 Aufbau und Funktion

Lis1 fungiert als alpha-Untereinheit der platelet-activating-factor Acetylhydrolase (PAF-Acetylhydrolase), welche u.a. Dynein positiv reguliert. Lis1 spielt ebenso während der Gehirnentwicklung eine Rolle, indem es die Proliferation neuronaler Precursor-Zellen und die

Wanderung neu geformter Neuronen aus der ventrikulären Zone in Richtung kortikaler Platte beeinflusst.

Mutationen im Lis1-Gen verursachen die klassische Lissenzephalie [90], eine Missbildung des Gehirns, die sich durch eine Verringerung bzw. sogar ein Fehlen der Gyrisierung des Gehirns sowie eine gestörte Laminierung und vergrößerte dysmorphe Ventrikel auszeichnet. Als Ursache wird eine abnorme Neuronenauswanderung diskutiert. Hirotsume et al. konnten sowohl in vivo als auch in vitro Migrationsstörungen in heterozygoten Lis1-knock-out-Mäusen nachweisen [91] (**Abb. 5**).

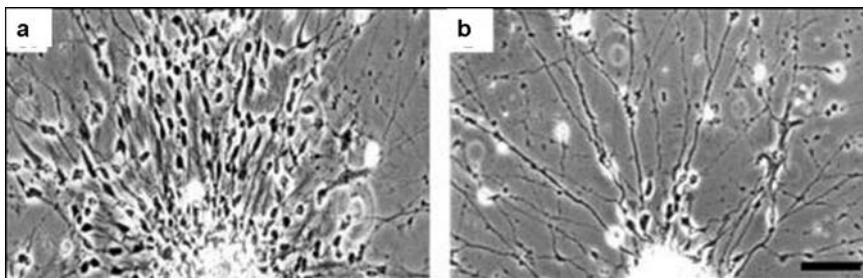


Abbildung 5: In-Vitro-Analyse der neuronalen Migration bei a) Wildtyp-Neuronen und b) heterozygoten Lis1-KO-Neuronen nach 24-h-Zellkultivierung. Erkennbar ist der Unterschied in der Migrationsdistanz, die bei mutierten Lis1-Zellen signifikant kürzer als bei Wildtypzellen ausfiel [91]

1.3.2 Interaktion mit Dynaktin

Die Arbeitsgruppe von Faulkner et al. konnte sowohl die Koimmunoprecipitation von Dynaktin, Dynein und Lis1 als auch eine zeitweise Kolo-kalisierung am Kinetochor demonstrieren. Außerdem beschrieben sie in Zellen mit gesteigerter Lis1-Expression eine veränderte Dynaktin-Verteilung. So erschien Dynaktin in unorganisierter Form und die Untereinheit p150 war von den Mikrotubuli-Enden verdrängt [92]. In der veröffentlichten Studie von Dujardin et al. konnte die Präsenz von Dynein, Dynaktin und Lis1 im Bereich der aussprossenden Zellseite während des Heilungsprozess nachgewiesen werden [93]. (**Abbildung 6 und 7**)

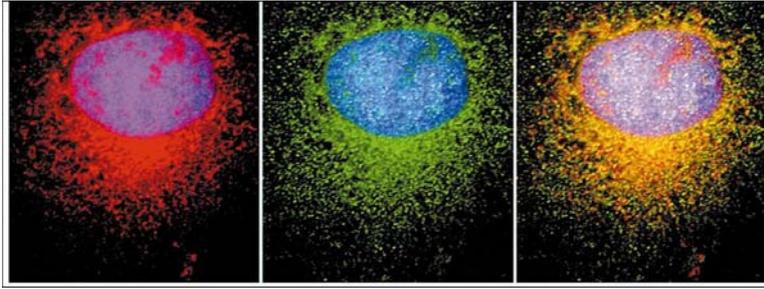


Abbildung 6: Co-Lokalisation von der p150-Untereinheit von Dynaktin und dem Protein Lis1, von links nach rechts: p150-Untereinheit, Lis1, p150-Untereinheit und Lis1 [94]

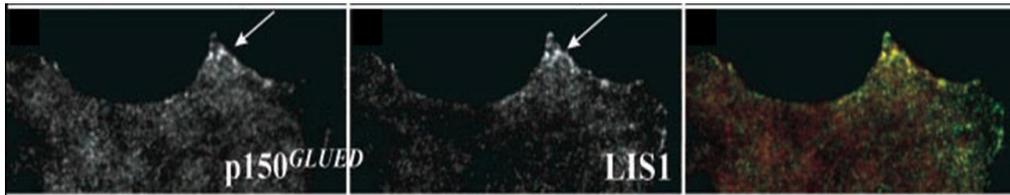


Abbildung 7: Markierung der p150-Untereinheit von Dynaktin und Lis1 per Antikörper im Bereich der auswachsenden Zellspitze während des Heilungsprozesses 1 h nach Zellverwundung; von links nach rechts: p150 markiert, Lis1 markiert, p150 und Lis1 zusammen markiert [93]

Dynaktin und Lis1 scheinen in einem direkten und starken Kontakt miteinander zu stehen. Jede Störung des Gleichgewichts könnte zu Konsequenzen für die Zellorganisation führen.

Die Verbindung von Dynaktin mit Lis1 sowie Dynaktins Rolle im zellulären Kargotransport macht deutlich, dass eine pathologische Veränderung dieses Polypeptids nicht nur die zelluläre Versorgung, sondern auch die Zellteilung und Zellentwicklung beeinträchtigen könnte.

II Arbeitshypothese und Zielsetzung

Mehrere Studien konnten zeigen, dass Schizophrenie möglicherweise aufgrund einer Gehirnentwicklungsstörung entsteht. Veränderte Gehirnstrukturen, die durch bildgebende Verfahren und histologische Untersuchungen detektiert wurden, weisen unter anderem auf eine pathologische Neuronenmigration bzw. allgemeine Neuronenorganisationsstörungen hin. Mehrere Gene, die für in der Synaptogenese oder Neuronenmigration involvierte Proteine kodieren, wurden auf Assoziationen mit Schizophrenie hin geprüft. Trotz positiver Ergebnisse bleiben die Daten widersprüchlich und es fehlen weitere Erkenntnisse, welche die Kausalitätskette schließen könnten.

Dynaktin als wichtiger Proteinkomplex des axonalen Transports spielt nachweislich eine essenzielle Rolle in der Neuronenmigration und Mitoseorganisation. Die Fähigkeit der direkten Bindung von Mikrotubuli und anderen strukturelevanten Proteinen macht Dynaktin zu einem wichtigen Bestandteil der Zellorganisation.

Das Gen DCTN1, das die Untereinheit p150 von Dynaktin kodiert, soll in dieser Studie hinsichtlich genetischer Varianten bei Schizophreniepatienten und gesunden Kontrollen untersucht werden. Zur Ermittlung von Haplotypen sollen 7 SNP innerhalb des DCTN1-Gens bei gesunden Probanden und Patienten genotypisiert werden. Um eine mögliche Assoziation zwischen Genotyp und Erkrankung zu ermitteln, soll sowohl eine mögliche Assoziation zwischen einzelnen SNPs und Krankheit als auch der Einfluss des Haplotypen untersucht werden.

Als weiterer Schritt erfolgt die Untersuchung einer Assoziation zwischen SNPs bzw. Haplotypen mit Volumetriedaten. Es liegen Volumendaten verschiedener Gehirnareale, sowohl kortikale als auch subkortikale Strukturen vor. Volumenabweichungen sollen einerseits auf eine Korrelation mit der Diagnose, andererseits auch mit dem Genotyp analysiert werden.

Zusätzlich stellt sich die Frage, ob ein strukturell verändertes Dynaktin direkt einen Erklärungsansatz für Schizophrenie liefert oder ob die gestörte Interaktion zwischen Partnerproteinen und Dynaktin Ursache für Veränderungen ist. Dafür soll in einem DCTN1-cKO-Mausmodell Veränderungen des Zellaufbaus und der Lis1-Expression ermittelt werden. Die Folgen einer Inaktivierung der p150-Untereinheit-Expression in den genetisch veränderten Mäusen sollen überprüft werden. Dafür werden die Zellorganellen und die Zellproliferation mutierter Zellen mit Wildtypzellen verglichen. Die Lis-Expression und Lokalisation wird

ebenfalls vergleichend betrachtet, um Veränderungen, die durch die Wirkung der p150-Unterepression erklärt werden könnten, zu beobachten.

Ziel der Studie ist die Entdeckung einer molekulargenetischen und/oder makroskopischen Assoziation zwischen DCTN1 und der Diagnose Schizophrenie.

III Material und Methoden

3.1 Probanden

3.1.1 Klinische Charakterisierung der Stichprobe

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer sowie die Erfassung klinischer Daten, Blutentnahme und Bildgebung erfolgte durch die Arbeitsgruppe „Bildgebung“ aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Charité Berlin. Für diese Studie wurde im Vorfeld ein Ethikvotum eingeholt. Alle Teilnehmer unterschrieben eine Einverständniserklärung.

- Diagnose paranoid halluzinatorische Schizophrenie nach DSM-IV und ICD-10
unmediziert (Erstmanifestation)
mediziert (vorhergehende Episoden) (**Abb. 8**)
- psychopathologische Tests wurden durchgeführt (positive and negative Syndrome Scale (PANSS), Clinical Global Impression Score (CGI))
- Ausschluss bei Konsum psychogener Substanzen aktuell oder in der Vergangenheit
- Ausschluss bei Diagnose weiterer Erkrankungen der Achse I und II

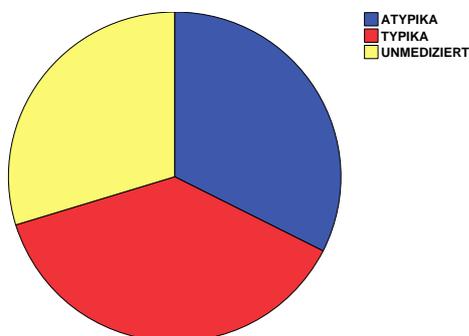


Abbildung 8: Medikamentöse Einstellung der eingeschlossenen Patienten; 24 Patienten mit atypischen Neuroleptika, 28 Patienten mit typischen Neuroleptika, 22 Patienten blieben ohne medikamentöse Behandlung

Kontrollkollektiv:

- keine Diagnose einer psychiatrischen Erkrankung der Achse I und II
- keine Verwandten ersten Grades mit einer Diagnose der Achse I und II
- Ausschluss von aktuellem Drogenkonsum (Kontrolle mittels Urin-Drogen-Screening)

PANSS (positive and negative syndrome scale)

Bei diesem formalisierten psychopathologischen Test werden 30 Symptome, die in 3 Untergruppen eingeteilt sind, bewertet. Die eingesetzte Skala verläuft von 1, was als „nicht vorhanden“ interpretiert wird, aufsteigend bis zur 7, was „extrem ausgeprägt“ bedeutet. Es ergibt sich eine theoretische Summe von mindestens 30 bzw. maximal 210.

Die 3 Symptomgruppen unterteilen sich in „Positivskala“, „Negativskala“ und „Globalskala“. Zur „Positivskala“ zählen Illusionen, formale Denkstörungen, Halluzinationen, Erregung, Größenwahn, Feindseligkeit und Misstrauen/Verfolgungswahn. Negativsymptome wie die Affektverarmung, emotionale Isolation, mangelnde Beziehungsfähigkeit, passiv-apathische soziale Isolation, erschwertes abstraktes Denkvermögen, mangelnde Spontaneität und Gesprächsfähigkeit sowie stereotypes Denken werden in der „Negativskala“ zusammengefasst. Letztendlich enthält die „Globalskala“ Fragen nach Angst, Schuldgefühlen, Gespanntheit, Manieriertheit, Depression, verlangsamter Motorik, Unkooperativität, ungewöhnlichen Denkinhalten, Desorientiertheit, Aufmerksamkeitsschwäche, mangelnder Urteils- und Einsichtsfähigkeit, Störung der Willensbildung, mangelnder Impulskontrolle, Selbstbezogenheit, aktiver sozialer Vermeidung und leiblicher Befindlichkeitsstörung.

3.1.2 Bildgebung

Bei dem größten Teil der Probanden (50 Patienten und 60 gesunde Kontrollpersonen) wurde eine funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT) mit dem Magnetom Vision, 1,5T von Siemens durchgeführt (MPRAGE repetition time (TR) = 9.7 ms; echo time (TE) = 4 ms; $\alpha=12^\circ$; Matrix= 256 x 256 pixels, Voxelgröße $1 \times 1 \times 1 \text{mm}^3$) und volumetrisch erfasst. Es wurden 14 Gehirnareale jeweils links und rechts vermessen, wobei sich die statistischen Berechnungen in dieser Arbeit nur auf bestimmte Areale beschränkten:

- kortikale Strukturen: Gyrus frontalis medius, Gyrus temporalis superior, Insula
- subkortikale Strukturen: Basalganglien (Ncl. Caudatus, Pallidum, Putamen), Thalamus
- limbische Strukturen : Amygdala, Gyrus parahippocampalis, Cingulum

3.2 Genetische Charakterisierung

3.2.1 SNP-Auswahl

Die Sequenz des für die p150-Untereinheit kodierende Gens Dynactin 1 (DCTN1) wurde der Datenbank des UCSC Genome Browser (AC005041.2, UCSC Genome Browser on Human Mar. 2006 Assembly, genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway) entnommen.

Die Auswahl der SNP erfolgte nach verschiedenen Kriterien. Ein allgemeines Ziel war die genomische und physikalische „Abdeckung“ des Gens. Des Weiteren wurden die SNPs rs13420401, rs17721059 und rs17009890 aufgrund ihrer Lage im Exonbereich des Gens ausgewählt. Der Heterozygosity-Index, der eine Aussage über die Verteilung in der Allgemeinbevölkerung trifft, war bei den SNP rs3815241 und rs2268426 ausschlaggebend. Die beiden weiteren Polymorphismen rs740277 und rs909177 wurden als Tagging-SNPs (= repräsentative SNPs für diese genomische Region) mithilfe des SNP-Browsers von ABI identifiziert. Die Lage der SNP wurde der SNP-Übersicht aus der „Entrez-SNP“-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>) entnommen (**Tab. 6**).

SNP	Position	Allel 1	Allel 2 (ancestral)	Heterozygosity Index	Allelverteilung der rekr. Probanden
rs3815241	Intron 2 bp 157531	G	A	A 0,908 G 0,092	A 0,85 G 0,15
rs13420401	Exon 10, missense bp 164489	A	C	A 0,066 C 0,934	A 0,01 C 0,99
rs740277	Intron 11 bp 164899	T	C	C 0,908 T 0,092	C 0,8 T 0,2
rs17721059	Exon 14, missense bp 165899	A	G	G 0,957 A 0,043	G 1 A 0
rs909177	Intron 17 bp 167412	T	C	C 0,9 T 0,1	C 0,79 T 0,21
rs2268426	Intron 29 bp 172529	A	C	A 0,008 C 0,992	A 0,05 C 0,95
rs17009890	Exon 32, 3'UTR bp 174072	C	A	A 0,120 C 0,880	A 0 C 1

Tab. 6: Darstellung der SNPs mit der jeweiligen Position im Gen DCTN1, der Allelausprägung und der Verteilung in europäischer Bevölkerung (dem jeweiligen refSNP Cluster Report www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP entnommen) und innerhalb des untersuchten Kollektivs, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin, A = Adenin, bp = Basenpaar

3.2.2 Primerermittlung

Die Primersequenzen wurden anhand der DCTN1-Sequenzvorlage und des Programms „Blast 2 Sequences“, welches von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) bereitgestellt wird, nicht-automatisiert ermittelt (**Tab. 7**).

Dabei wurden folgende Design-Bedingungen eingehalten:

- Das gesamte PCR-Produkt sollte 18 bis 22 bp lang sein.
- Bevorzugt sollte die Base C oder G am Ende stehen.
- Triplets oder Repeats wie CTCT etc. sollten vermieden werden.
- 50 bis 70% der Basen sollten Cytosin oder Guanin sein.

Die Primer für die SNP rs3815241, rs909177 und 17009890 mussten mutiert werden, damit passende Restriktionsenzyme gefunden werden konnten. In diesen Fällen wurde die Primersequenz des Forward-Primers direkt vor der SNP-Position bzw. des Reverse-Primer direkt hinter der Mutationsstelle ausgewählt und die vorhergehende bzw. folgende Base ausgetauscht. Ziel dieser Sequenzveränderung ist es, eine Restriktionsstelle zu schaffen, die vorher nicht vorhanden war. Durch diese Veränderung verkürzten sich die Gesamtprodukte und es konnten nicht alle Primerdesign-Richtlinien eingehalten werden.

SNP	Sequenz F	Sequenz R	Gesamtlänge des DNA-Fragments (bp)
740277	CggTCAggTgAgAACCATgC	CCTTgAgCTCATCAATggTgC	400
909177	CCTggCAgACTCTAgCCTC C (A)	CTTgTgCAgCAgTTCAATgAgg	152
2268426	CTCgCACCAg CCCTggTATg	gTgAAgTgAgCTCTgCCTgg	393
3815241	CAgCCgTCCTTgATCTggC C (T)	ggACTCCTCCTggCTATgg	189
13420401	CTggAgCAggTgCAggAATg	gTCAgTAgTgAgCTCgTCCAC	405
17009890	CCTCTggTgCCCgCTCTgC	ggACCTCACTTAACCTTTggTg A(g)	258
17721059	CgACCTCATgATCCgCCTgC	gAggTggCTgCTgTTgCCTC	455

Tab. 7: Darstellung der Primersequenzen und Sequenzlängen der Primer für die jeweiligen SNPs. Die mutierten Primer sind herausgestellt. Die ursprüngliche Base steht in Klammern, die neue Base ist fett gedruckt, F (Forward), R (Reverse), G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin, A = Adenin, bp = Basenpaar

Die Primer wurden auf eine Zielkonzentration von (10 µM) gelöst.

3.2.3 DNA-Extraktion

Zur DNA-Extraktion aus den gesammelten Blutproben der Probanden wurde ein Kit der Firma Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) genutzt.

- 15ml Lyse Puffer (FG1) auf 8 ml EDTA-Probandenblut geben
- Zentrifugation der Mischung bei 5000U (Hettich-Zentrifuge)
- Verwerfen des roten Überstands
- nach ca. 2 min Zugabe von 4 ml Puffer-Qiagen-Protease-Lösung (4 ml Puffer FG2 mit 4µl Qiagen-Protease)
- nach Homogenisierung des Pellets Inkubation bei 65°C für 15 min bis zu einem Farbwechsel
- Zugabe von 4 ml Isopropanol und Schwenken bis zum Erscheinen der DNA-Stränge
- Zentrifugation bei 4000U für 3 min
- Abtrennen des Überstands
- Lösung in 4 ml 70%igem Ethanol
- Zentrifugation bei 4000U für 3 min
- Entfernung des Ethanols mit anschließender 1 Stunde Trocknungsphase
- Zugabe von 1 ml Qiagen-Puffer (FG 3)
- Inkubation bei 65°C für 60 min

Die Lösung der DNA erfolgte im Qiagen-Puffer.

3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR – Polymerase chain reaction)

Die Amplifikation des DNA-Abschnitts des entsprechenden SNPs erfolgte mittels Polymerasenkettenreaktion. Bei diesem in-vitro-Verfahren ist es möglich, spezifische Genom-Abschnitte exponentiell zu vervielfältigen.

Als erster Schritt erfolgt die Denaturierung der Doppelstrang-DNA bei 94°C in Einzelstränge (1. in Abb. 9). Anschließend kommt es bei für die jeweiligen Primer optimalen Anlagerungstemperatur zur Hybridisierung (Annealing) der ‚Sense‘ (forward)- und ‚Antisense‘ (reverse)- Primer an die denaturierte Einzelstrang-DNA (ss-DNA) (2. in Abb. 9). Die

Temperatur wird daraufhin auf 72°C erhöht und es werden komplementäre DNA-Stränge von einer Polymerase in Gegenwart aller vier dNTPs neu synthetisiert (Extension) (3. in Abb. 9). Ein Zyklus ist beendet (4. in Abb. 9). Anschließend steigt die Temperatur wieder auf 94°C und es kommt erneut zur Denaturierung. Es beginnt ein neuer PCR-Zyklus (Abb. 9).

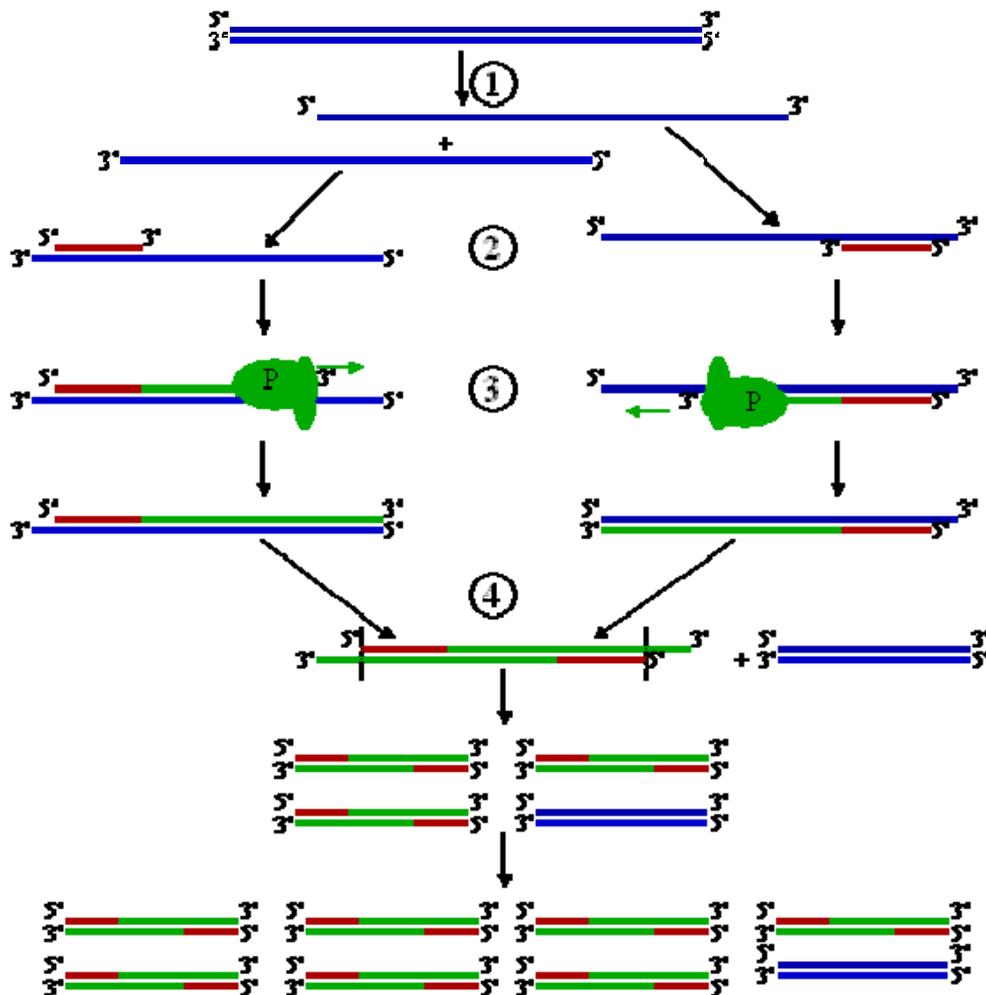


Abbildung 9: Schematische Darstellung eines PCR-Zyklus, P = Polymerase [95]

Auf 1µl DNA wurden 2µl Pufferlösung (10xPCR-Puffer, Gene Craft Lüdinghausen Deutschland), 1µl Desoxy nukleotide (10mM, Rapidozym GmbH) und 0,5µl 5nmolare Primer (TIB Molbiol) hinzugefügt. Die Menge an MgCl₂ (Bio Therm, Gaithersburg USA) variierte von 0,8 bis 1,1µl und Aqua dest. von 14 bis 13,7µl.

Mithilfe einer Gradienten-PCR konnte die optimale Annealing-Temperatur und MgCl₂-Volumen ermittelt werden. Die Temperatur wurde dabei von 53°C bis 73°C abgestuft. Die Temperatur während der Denaturierung betrug 94°C, die Extension-Temperatur wurde auf 72°C eingestellt. Die eingesetzte Menge an MgCl₂ lag bei 0,6, 0,8, 1,0 und 1,2µl. Es erfolgten 35 Zyklen.

Die ermittelten optimalen Bedingungen wurden im PCR-Protokoll der einzelnen SNPs berücksichtigt (**Tab. 8**).

SNP	MgCl ₂ in µl	Denaturierung Temperatur und Dauer	Annealing Temperatur und Dauer	Extension Temperatur und Dauer	Final Extension Temperatur und Dauer
rs74077	0,8	94°C (1 min)	64°C (1 min)	72°C (1min)	72°C (7 min)
rs909177	0,8	94°C (1 min)	62°C (1 min)	72°C (1min)	72°C (7 min)
rs2268426	1	94°C (1 min)	69°C (1 min)	72°C (1min)	72°C (7 min)
rs3815241	1,1	94°C (30 sec)	61°C (30 sec)	65°C (30 sec)	65°C (5 min)
rs13420401	0,8	94°C (1 min)	65°C (1 min)	72°C (1min)	72°C (7 min)
rs17009890	1	94°C (1 min)	65°C (1 min)	72°C (1min)	72°C (7 min)
rs17721059	1,1	94°C (1 min)	70°C (1 min)	72°C (1min)	72°C (7 min)

Tab. 8: Darstellung der PCR-Bedingungen für die einzelnen SNPs.

Die eingesetzte Polymerase war eine Taq-Polymerase (Bio Therm, Gaithersburg USA, 5U/µl).

3.2.5 Enzymatische Restriktion – Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP)

Zur Auswertung der verschiedenen Genotypen wurde die enzymatische Restriktion als Methode der Wahl angewandt. Dabei werden Enzyme – Restriktionsendonukleasen - eingesetzt, die spezifische Basenmuster erkennen und an bestimmten Positionen die Bindung innerhalb des DNA-Strangs enzymatisch auftrennen. Dabei ist entscheidend, welches Allel des Ziel-SNP ausgeprägt ist. (**Abb. 10**)

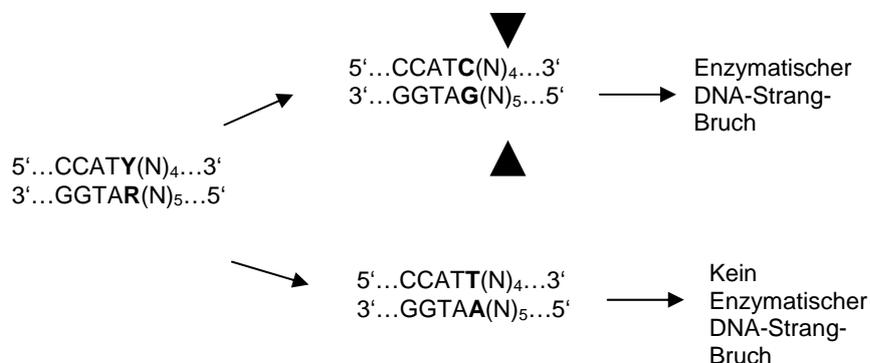


Abbildung 10: Schematische Darstellung der enzymatischen Spaltung am Beispiel Enzym Bcc1. Das Vorhandensein des C-Allels führt zu einer Wiedererkennung des Enzyms und einer DNA-Spaltung 4 Basenpaare entfernt. Ein T-Allel führt zu keiner enzymatischen Spaltung. Pfeile markieren die Schnittstelle

Anhand der dabei entstehenden DNA-Teilstücke kann eine Aussage über die Basenabfolge getroffen werden. Kommt es zu der Bildung von Bruchstücken, war die spezifische Restriktionsstelle, also eine bestimmte Base, genotypisch ausgeprägt. In der vorliegenden Arbeit wurden 5µl des PCR-Produkts mit 1µl Enzym, 2 µl spezifischem Enzypuffer und 7µl Aqua dest. behandelt. Anschließend erfolgte eine Inkubationsphase von 16h bei einer für das Enzym charakteristischen Temperatur (**Tab. 9**).

Die Auswahl der Restriktionsenzyme erfolgte mittels NEBcutter 2.0, einer von New England Biolabs (NEB) angebotenen Suchmaschine für Restriktionsenzyme (tools.neb.com/NEBcutter2/index.php).

SNP	Enzym	Konz.	Puffer	Genotyp mit Bandenmuster (Teilstücke in Bp)
740277	BccI (NEB) schneidet bei C	10000 U/ml	NEB1 (NEB)	TT (homozygot 1): 354/46 CT (heterozygot): 354/205/149/46 CC (homozygot 2): 205/149/46
909177	BsrI (NEB) schneidet bei C	5000 U/ml	NEB3 (NEB)	TT (homozygot 1): 152 CT (heterozygot): 152/132/20 CC (homozygot 2): 132/20
2268426	Cac8I (NEB) schneidet bei C	4000 U/ml	NEB3 (NEB)	AA (homozygot 1): 393 AC (heterozygot): 393/240/153 CC (homozygot 2): 240/153
3815241	MscI (NEB) schneidet bei A	3000 U/ml	NEB4 (NEB)	GG (homozygot 1): 189 AG (heterozygot): 189/173/16 AA (homozygot 2): 173/16
13420401	Hin6I (Fermentas) schneidet bei C	10 U/µl	Tango (Fermentas)	AA (homozygot 1): 343/62 AC (heterozygot): 343/187/156/62 CC (homozygot 2): 187/156/62
17009890	Bcc I (NEB) schneidet bei A	10000 U/ml	NEB1 (NEB)	CC (homozygot 1): 258 AC (heterozygot): 258/242/16 AA (homozygot 2): 242/16
17721059	BspMI (NEB) schneidet bei A	2000 U/ml	NEB3 (NEB)	GG (homozygot 1): 455 AG (heterozygot): 455/256/199 AA (homozygot 2): 256/199

Tab. 9: Darstellung der eingesetzten Enzyme, Enzymkonzentrationen und eingesetzten Puffer für die jeweiligen SNPs. Auflistung der erwarteten Länge der Restriktionsfragmente. Inkubationszeit betrug bei allen Enzymen 16 h. Inkubationstemperatur lag bei 37°C (Enzym Bsr1: 65°C), G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin, A = Adenin, bp = Basenpaar

Nach erfolgreicher Restriktion entstehen in einer Gelelektrophorese identifizierbare unterschiedliche Restriktionsfragmente, deren Längen für die jeweiligen Allele spezifisch sind. Es sind 3 verschiedene Ausprägungen möglich. Es liegt ein homozygoter Genotyp (homozygot 1) vor, wenn die entscheidende Sequenz so ausgeprägt ist, dass das Enzym keine Spaltung vornimmt. Bei einer heterozygot ausgeprägten Wiedererkennungsequenz spaltet das Enzym nur einen DNA-Strang. Die dritte Möglichkeit entsteht, wenn das Restriktionsenzym beide DNA-Stränge „schneidet“. In diesem Fall liegt die spezifische Sequenz homozygot vor.

3.2.6 Elektrophoretische Auftrennung

PCR-Produkte und Restriktionsfragmente lassen sich hinsichtlich der Größe, Konzentration und Spezifität der Amplifikationsreaktion mittels einer Gelelektrophorese überprüfen.

In der Gelelektrophorese wandert die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in einem Gel unter angelegter Spannung in Richtung der Anode. Die zurückgelegte Laufstrecke ist abhängig von der Molekülgröße der applizierten Probe. Aufgrund des Siebeffekts des Agarosegels steigt die Streckenlänge mit Abnahme der Molekülgröße.

Die PCR-Produkte sowie die enzymatisch hergestellten Teilstücke wurden in einem 2%igen bzw. 3%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Agarosegele wurde Agarosepulver (SERVA 11404, SERVA electrophoresis GmbH, Heidelberg Deutschland) in 1xTBE-Puffer (10xTBE-Puffer) durch Aufkochen gelöst. Das flüssige Gel erstarrte in einem horizontalen Gel-Elektrophorese-Schlitten und wurde anschließend in eine mit 1xTBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt. Nun wurde eine Mischung des eingesetzten Laufpuffers und PCR-Produkts bzw. Restriktionsprodukts bei einem Verhältnis von 10µl zu 8-10µl in die Geltaschen appliziert. Zur Einschätzung der DNA-Länge erfolgte die parallele Zugabe eines 50 bp großen Markers (0,5µg/µl, MBI Fermentas GmbH, St. Leon Roth) in einer Extrageltasche.

Die angelegte Spannung lag bei der Auftrennung der PCR-Produkte bei etwa 120 bis 130V. Die Auftrennung erfolgte in 40 bis 60 min. Zur Auftrennung der RFLP-Teilstücke wurde die Spannung auf 100 – 120 V gesenkt und die Auftrennungsdauer auf 80 bis 100 min erhöht.

Anschließend folgte die Anfärbung der Banden mit „SYBR-Gold nucleic acid gel stain“ (Invitrogen molecular probes, Karlsruhe Deutschland) in einem Färbebad für ca. eine Stunde. Zur Geldokumentation wurde ein UV-Licht-Kamerasystem „Gel Imager UST-20M-8E“ (INTAS, Göttingen Deutschland) verwendet.

3.3 Zellbiologische Untersuchung

3.3.1 Tiermodell

Die Arbeitsgruppe unter Dr. Huaibin Cai stellte freundlicherweise das von ihnen generierte conditional Knock-out-DCTN1-Mausmodell (cKO-DCTN1) für die Untersuchungen zur

Verfügung (Aktenzeichen: 06-038, 323-H4C-Mi; Genehmigung am 06.12.2006) Grundlage dieses Mausmodells ist das angewandte LoxP/CRE-System, das zur Entfernung der Exone 2 bis 4 aus dem DCTN1-Gen eingefügt wurde.

Cre (*causes recombination*) ist eine Rekombinase, die zwischen 2 loxP-Sequenzen (*locus of X-ing over*) eine spezifische Rekombination vornimmt. Dafür werden die loxP-Sequenzen beidseits der auszuschneidenden Sequenz eingefügt, das Gen wird „gefloxt“. Durch Anwendung von Fusionsproteinen aus Cre und mutierten Ligandenbindungsdomänen von Steroidrezeptoren kann eine Hinzugabe von Tamoxifen als synthetischen Liganden die Aktivierung der Rekombinase bewirken. Auf diesem Weg ist eine zeitlich kontrollierte und gewebespezifische Deletion möglich [96] (**Abb.11**).

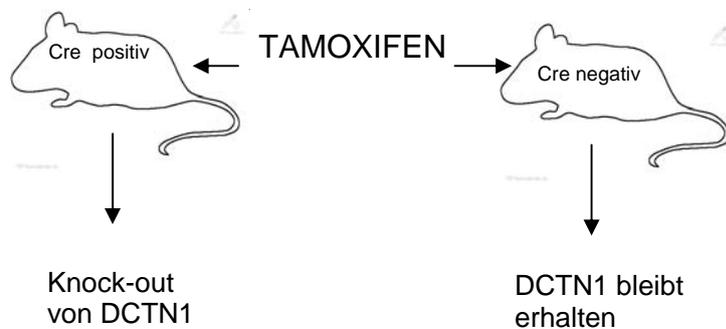


Abbildung 11: Tiere bzw. Zellen, die für Cre positiv sind, zeigten nach Behandlung mit Tamoxifen eine reduzierte DCTN1-Expression. Cre-negative Tiere bzw. Zellen zeigten keine Veränderung.

3.3.2 Gewebeentnahme, Zellkultur

- Entnahme eines Gewebestücks vom Rücken (0,5cm x 0,5cm) am Tag der Geburt (p.p. 0)
- Ausplattierung der Gewebeprobe auf eine unbehandelte 6-well-Platte
- Kultivierung für 3 bis 4 Wochen in DMEM-Lösung (high glucose, Gibco Invitrogen) - angereichert mit 4,5g/l D-Glukose, L-Glutamin, 110mg/l Natriumpyruvat, 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (alles Gibco Invitrogen) und 10% FS
- Inkubation bei 37°C und 5% CO₂
- Wechsel von 75% des Kulturmediums alle 2-3 Tage

Nach der Kultivierungszeit wurden die Zellen mit 4-OH-Tamoxifen (Sigma) 5 Tage lang behandelt. Es wurden 1 μ M an 2 aufeinander folgenden Tagen appliziert.

Am 7. Tag nach der abgeschlossenen 4-OH-Tamoxifen-Behandlung wurden 10 μ M EdU (Click-iT EdU- Zellproliferationsassay, Invitrogen) einmalig hinzugefügt. Die Zellfixierung wurde mit 4%igem PFA für 15 min durchgeführt.

Die primären Neurone wurden ebenfalls von neugeborenen Mäusejungen entnommen. Die Jungtiere wurde dekaptiert, das Kortextgewebe schnell entnommen und anschließend in 35mm Petrischalen mit sterilem Hank-Puffer übertragen. Der Puffer beinhaltet (alle Angaben in mM): 2,5 HEPES, 35 Glukose, 1 CaCl₂, 1 MgSO₄ und 4 NaHCO₃, bei einem pH von 7,4. Die Meningen wurden entfernt. Anschließend erfolgte die Neuronendissoziation per Papain-Digestion (Sigma). Die Zellen wurden mit einer Dichte von 10⁶ pro Well in einer 6-Well-Platte (mit Poly-D-Lysin überzogen, Becton Dickinson, San Jose, CA) ausgebreitet. Das Kulturmedium war ein Basal-Medium-Eagle-Medium (Sigma), das mit B27, N2, 1 mM L-Glutamine und Penicillin/Streptomycin-Lösung (Gibco Invitrogen) angereichert wurde. Arabinosylcytosin bzw. D-Arabinofuranosidcytosin (Sigma) wurde zur Wachstumshemmung von Gliazellen eingesetzt. Diese Versuche wurden unter Anleitung und Betreuung von PhD Lai, Chen (Arbeitsgruppe NIA Cai, NIH Bethesda, USA) durchgeführt.

3.3.3 Immunfluoreszenzmarkierung

Die Markierung mit Immunfluoreszenzfarbstoffen erfolgte in mehreren Schritten:

- 3 mal Spülen der Zellproben mit 1x PBS
- anschließend Inkubation mit 0.1% Triton für 10 min
- Zugabe eines Puffers zur Blockierung unspezifischer Reaktionen (1x PBS plus 10% Ziegenserum (Sigma)) für 1 h
- erneut 3 mal Spülen mit 1x PBS
- Inkubation der Proben mit dem ersten Antikörper (gelöst in Ziegenserum) über Nacht
- 1 h Inkubation bei Raumtemperatur
- 3 mal spülen mit 1xPBS
- Inkubation der Proben mit dem 2.Antikörper (gelöst in Ziegenserum) für 1 h (abgedeckt)
- 3 mal spülen mit 1x PBS

- Spülen mit Aqua dest.

3.3.4 Bildgebung

Die Fluoreszenzbilder wurden mithilfe des Laserscan-Confocal-Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Thornwood, NJ) aufgenommen. Die angewandte Vergrößerung erfolgte mit einem 63x1,4 NA Ölobjektiv. Für eine maximale Auflösung von 100x Bildern wurde ein Zoomfaktor von 2 genutzt.

3.3.5 Proteinanalyse

Zur quantitativen und qualitativen Proteinanalyse wurde ein Westernblot durchgeführt. Dabei werden Proteingemische durch eine Gelelektrophorese in ihre Komponenten aufgetrennt. Anschließend erfolgt der Transfer der Proteine aus dem Gel auf einen weiteren Träger, der dann in den Folgereaktionen eingesetzt wird. Als Träger können Papier, Zellulosenitrat- bzw. Zelluloseacetatfolien benutzt werden. Nun erfolgte die Behandlung mit spezifischen Antikörpern. Diese binden an die gesuchten Antigene und identifizieren so Proteinbanden. Unspezifisch gebundene Antikörper werden aufgrund von Waschschritten mit Puffern wieder entfernt. Anschließend erfolgt die Behandlung mit einem Sekundär-Antikörper, an dem zur Sichtbarmachung der detektierten Antigen-Antikörper-Kombination beispielsweise ein katalytisches Enzym oder Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist.

Für den durchgeführten Westernblot wurden die Fibroblasten durch die Lyse im RiPa-Puffer vorbereitet. Nach der Sonifikation und Zentrifugation (14000rpm für 15 min) wurde der abgetrennte Überstand entnommen und weiterverarbeitet.

Es wurde zu 6 verschiedenen Zeitpunkten Zellen gesammelt: 1. Tag, 3. Tag, 7. Tag, 10. Tag, 14. Tag und 21. Tag nach abgeschlossener 4-OH-Tamoxifen-Behandlung. Die Proteine wurden auf einem 4-12% Bis-Tris-Minigel (NuPage Invitrogen) getrennt und für den Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran (iBlot® Gel Transfer Device, iBlot® Transfer Stack, Invitrogen) übertragen. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Antikörpern.

Diese umfassten den polyklonalen anti-Lis1-Antikörper, den polyklonalen (beide Abcam, Cambridge, UK) als auch monoklonalen anti-p150-Antikörper (BD, Transduction Laboratories, Lexington, KY) und den anti-Actin-Antikörper (Sigma, St. Louis, MS). Für das Anfärben des Golgi-Apparats wurden 2 unterschiedliche primäre Antikörper genutzt: der GM130-Antikörper

sowie der GRG1-Antikörper (beide Sigma-Aldrich, St. Louis USA). Topro3 (Invitrogen) wurde zur Kernfärbung verwendet. Weitere Antikörper waren 104B (DSHB - Developmental studies hybridoma bank) zur Lysosomenmarkierung, pmp70 (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) zur Anfärbung von Peroxisomen sowie anti-p50-Antikörper und anti-Dynein-Antikörper (beide Chemicon, Temecula, CA) für die Darstellung im Westernblot. Die sekundären Antikörper waren ebenfalls von Abcam.

3.4 Statistische Auswertung

Das angewandte Statistikprogramm SPSS lag in der 14.0-Version vor (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, 2007).

Folgende Testverfahren wurden durchgeführt:

- Kolmogorov-Smirnov-Test
- Deskriptive Statistik (Mittelwert, Minimum, Maximum)
- Häufigkeitsvergleich mit dem Chi-Quadrat-Test
- einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)
- t-Test nach Student
- post-hoc-Test nach Bonferroni

Ergebnisse wurden bei allen Untersuchungen als signifikant ab einem p -Wert $< 0,05$ (2-seitig) betrachtet.

Nach Bestimmung der einzelnen genotypischen Ausprägung der SNPs erfolgte die Berechnung der Haplotypen. Dabei wurde das Haplotypen-Analyse-Programm HAP (<http://research.calit2.net/hap>) genutzt.

3.5 Übersicht weiterer eingesetzter Chemikalien und Geräte (soweit nicht im Text aufgeführt)

Gerät/Chemikalie	Typ	Hersteller
PCR-Thermo-Cycler	2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems, Kalifornien USA
Gradienten-Cycler	Mastercycler Gradient	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH Hamburg
Gelkammer für Elektrophorese	Maxi Large 480000 Midi 2	Harnischmacher Carl Roth, Karlsruhe Deutschland
Spannungsquelle	Elite 300 Unipack 250	Wealtec, Johannesburg Südafrika Harnischmacher
Inkubator	Thermocenter Salvis Lab	Salvis Lab, Schweiz
Zentrifuge	Laboratorian Medical centrifuge (LMC 3000)	Lab 4 you, Gessthacht
Mikrozentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Waage	OWA Labor	OWA Labor, Deutschland
Wippschüttler	Unitwist RT	G-Kisker, Steinfurth Deutschland
Pipetten		Eppendorf, Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen		Sarstedt, Nürnberg Deutschland
Mikrowelle, Kühlschrank		Bosch, München Deutschland

Chemikalien	Hersteller
Ethanol absolut	Carl Roth, GmbH Karlsruhe Deutschland
Loading Buffer	BioTherm, Gaithersburg USA

IV Ergebnisse

4.1 Demographische Daten der Probanden

Es standen insgesamt 135 Probanden zur Verfügung, deren genotypische Ausprägung der ausgewählten SNPs des Gens DCTN1 analysiert wurde.

Insgesamt konnten wir zusätzlich auf Volumetrie-Daten von 110 Probanden zugreifen.

4.1.1 Geschlechterverteilung

Probandengruppe	Frauen	Männer
Patienten	20 (30,8%)	45 (69,2%)
Patienten (mit Volumetrie)	16 (32%)	34 (68 %)
gesunde Kontrollen	11 (15,7%)	59 (84,3%)
gesunde Kontrollen (mit Volumetrie)	11 (18,3%)	49 (81,7%)

Tab. 10: Übersicht der Geschlechterverteilung

In der Gesamtgruppe waren die Volumina der Areale Pallidum rechts und links, Putamen rechts und links sowie Thalamus rechts und links unabhängig vom Geschlecht. Die anderen Areale waren bei den männlichen Probanden signifikant größer als bei den weiblichen Probanden (sämtliche $p < 0,05$).

In der Kontrollgruppe zeigten nur die Areale Gyrus temporalis sup., Gyrus parahippokampalis, Insula sowie die Amygdala (alles beidseits) signifikante Geschlecht-Volumen-Korrelationen (männlich > weiblich, sämtliche $p < 0,05$).

In der Patientengruppe waren nur die Areale Pallidum, Putamen und Thalamus unabhängig vom Geschlecht. Alle anderen Gehirnabschnitte zeigten bei männlichen Patienten größere Volumina (sämtliche $p < 0,05$).

4.1.2 Altersverteilung

Probandengruppe	Alter _{min}	Alter _{max}	Alter _{mittel}	Standardabweichung
alle Probanden	18	65	36,09	10,77
alle Probanden (mit Volumetrie)	18	65	36,12	11,09
Patienten	18	65	33,59	10,94
Patienten (mit Volumetrie)	18	65	33,52	11,25
gesunde Kontrollen	22	59	38,48	10,12
gesunde Kontrollen (mit Volumetrie)	22	59	38,28	10,57

Tab. 11: Übersicht der Altersverteilung

Das Alter war im untersuchten Kollektiv normal verteilt.

Als einzige Probandengruppe zeigte die Patientengruppe eine Alter-Geschlecht-Assoziation. Männliche Patienten waren signifikant älter als weibliche Patienten ($p = 0,007$, $df = 63$, $T = -2,78$).

4.1.3 PANSS

Bei 57 Patienten wurde der PANSS erfasst.

	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Positivskala	7	39	19,74	7,798
Negativskala	7	37	21,81	8,09
Skala der generellen Psychopathologie	17	75	38,04	12,578
Gesamt	31	135	79,75	25,825

Tab. 12: Darstellung der erreichten PANSS-Werte. Skala ist eingeteilt von 1 bis 7, wobei 1 „nicht ausgeprägt“ und 7 „sehr stark ausgeprägt“ entspricht. Einteilung der erfassten 30 Symptome in 3 Untergruppen.

4.2 Einfluss der Diagnose auf das Volumen der Gehirnareale

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Probanden und Patienten hinsichtlich der gemessenen Gehirnvolumina festgestellt werden. Es muss die H_0 -Hypothese angenommen werden, d.h. dass keine Diagnose-Struktur-Korrelation besteht.

4.3 SNP-Einfluss

4.3.1 Einfluss der SNPs auf die Diagnose

Die betrachteten SNPs entsprachen dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Mithilfe des Vierfelder- χ^2 -Tests wurde die Hypothese über einen Zusammenhang zwischen der genotypischen SNP-Ausprägung und der Erkrankung an Schizophrenie überprüft. Es konnte kein p-Wert $< 0,05$ ermittelt werden. Somit muss für rs3815240, rs13420401, rs740277, rs17721059, rs909177, rs2268426 und rs17009890 H_0 angenommen werden (**Tab. 13**).

SNP	Probanden	homozygot 1	heterozygot	homozygot 2	p-Wert
rs3815241	Kontrollen	0 GG	13 GA	57 AA	p = 0,53 $\chi^2 = 1,3$ df = 2
	Patienten	1 GG	10 GA	54 AA	
rs13420401	Kontrollen	0 AA	0 AC	70 CC	p = 0,3 $\chi^2 = 1,1$ df = 1
	Patienten	0 AA	1 AC	64 CC	
rs740277	Kontrollen	1 TT	19 TC	50 CC	p = 0,37 $\chi^2 = 2$ df = 2
	Patienten	0 TT	13 TC	52 CC	
rs17721059	Kontrollen	70 GG	0 GA	0 AA	a
	Patienten	65 GG	0 GA	0 AA	
rs909177	Kontrollen	2 TT	20 TC	48CC	p = 0,23 $\chi^2 = 3$ df = 2
	Patienten	0 TT	14 TC	51 CC	
rs2268426	Kontrollen	0 AA	4 AC	66 CC	p = 0,77 $\chi^2 = 0,1$ df = 1
	Patienten	0 AA	3 AC	62 CC	
rs17009890	Kontrollen	70 CC	0 CA	0 CA	a
	Patienten	65 CC	0 CA	0 CA	

Tab. 13: Verteilung der Genotypen innerhalb des Patienten- und Kontrollkollektivs; ermittelte p-Werte – a entspricht der nicht durchführbaren statistischen Berechnung, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin, A = Adenin

Zur Einschätzung der Verteilung der Allele und eines möglichen Einflusses auf die Diagnose wurden SNP-Dominanz-Modelle eingesetzt.

Im ersten SNP-Dominanzmodell wurden die heterozygoten Merkmalsträger den homozygoten Trägern des Allels 1 zugeordnet. Auf diese Weise werden alle Träger des Allel 1 Probanden gegenübergestellt, die dieses Allel nicht aufweisen.

Im zweiten Dominanzmodell erfolgt die Zuteilung der heterozygoten Merkmalsträger zu den homozygoten Trägern des Allel 2, sodass jeweils zwei Gruppen, Träger des Allels 2 und Probanden ohne Allel 2, entstehen. Im Vordergrund dieser Umverteilungen steht die Annahme, dass das Vorhandensein bzw. das Fehlen eines Allels von Bedeutung ist.

Alle Probanden waren homozygot für die SNPs rs17721059 und rs17009890, so dass eine Zuordnung der Probanden nach den beschriebenen SNP-Dominanzmodellen entfällt.

Kein Proband war homozygoter Träger des Allels 1 der SNPs rs13420401(A/A) und rs2268426 (A/A). Daher entfiel hier eine Zuordnung nach dem 2. SNP-Dominanzmodell.

Auch bei Anwendung dieser Modelle konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Allelträgerstatus und Diagnose festgestellt werden (**Tab. 14** und **15**).

SNP	Probanden	Allel 1-Träger (homoz. & heteroz.)	Allel 2-Träger (homozygot)	p-Wert
rs3815241	Kontrollen Patienten	13 G 11 G	57 A 54 A	p = 0,8 $\chi^2 = 0,1$ df = 1
rs13420401	Kontrollen Patienten	0 A 1 A	70 C 64 C	p = 0,3 $\chi^2 = 1,1$ df = 1
rs740277	Kontrollen Patienten	20 T 13 T	50 C 52 C	p = 0,25 $\chi^2 = 1,3$ df = 1
rs909177	Kontrollen Patienten	22 T 14 T	48 C 51 C	p = 0,2 $\chi^2 = 1,7$ df = 1
rs2268426	Kontrollen Patienten	4 A 3 A	66 C 62 C	p = 0,77 $\chi^2 = 0,1$ df = 1

Tab. 14: SNP-Dominanzmodell 1, Verteilung der Merkmalsträger anhand des SNP-Dominanzmodells 1, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin, A = Adenin, homoz = homozygot, heteroz. = heterozygot

SNP	Probanden	Allel 1-Träger (homoz. & heteroz.)	Allel 2-Träger (homozygot)	p-Wert
rs 3815241	Kontrollen	0 G	70 A	p = 0,3 $\chi^2 = 1,1$ df = 1
	Patienten	1 G	64 A	
rs 740277	Kontrollen	1 T	69 C	p = 0,3 $\chi^2 = 1$ df = 1
	Patienten	0 T	65 C	
rs 909177	Kontrollen	2 T	68 C	p = 0,17 $\chi^2 = 1,9$ df = 1
	Patienten	0 T	65 C	

Tab. 15: SNP-Dominanz-Modell 2, Verteilung der Merkmalsträger anhand des SNP-Dominanzmodells 2, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin, A = Adenin, homoz. = homozygot, heteroz. = heterozygot

4.3.2 Einfluss der SNPs auf die Volumetriedaten

Als weiteren analytischen Schritt erfolgte die Berechnung des Einflusses des Genotyps auf das Volumen bestimmter Gehirnareale. 110 Probanden wurden analysiert. Kortikale (Gyrus frontalis medius, Gyrus temporalis superior, Insula), subkortikale (Basalganglien, Thalamus) und zum limbischen System zählende (Amygdala, Gyrus parahippocampalis, Cingulum) Gehirnareale wurden auf eine Assoziation untersucht. Diese Strukturen werden wiederholt in anderen Studien in eine Korrelation mit Schizophrenie gebracht und sind aufgrund ihrer Funktion im Fokus der Schizophrenie-Forschung. Die Volumina waren im untersuchten Probandenkollektiv normal verteilt.

Die Untersuchung auf eine Gen-Volumen-Korrelation erfolgte

- in der Gesamtgruppe (Patienten und gesunde Kontrollpersonen)
- in der Patientengruppe
- in der Kontrollgruppe

Zur Assoziationsüberprüfung zwischen SNP und Volumen sowie Haplotyp und Volumen wurde ANOVA eingesetzt, für die Überprüfung von den SNP-Dominanzmodellen und Volumen sowie Haplotypenkombination und Volumen wurde der T-Test nach Student verwendet.

Aufgrund der Allelverteilung im betrachteten Kollektiv wurde keine Assoziationsüberprüfung zwischen den SNP rs13420401, rs17721059, rs17009890 und ihren jeweiligen Dominanzmodellen durchgeführt, da alle Probanden die gleiche genotypische Ausprägung aufzeigten.

Wiederkehrende signifikante Korrelationen zwischen Gehirnarealen und mehreren SNP sowie Haplotypen sind in Form von farbigen Boxplots dargestellt:

- Gyrus frontalis med. links
- Gyrus frontalis med. rechts
- Pallidum links
- Putamen rechts
- Thalamus links
- Thalamus rechts

4.3.2.1 SNP rs3815241

Für den SNP rs3815241 konnte kein signifikanter Unterschied der Volumina der betrachteten Gehirnareale zwischen den verschiedenen Allelträgern im Gesamtkollektiv und der Patientengruppe allein festgestellt werden ($p > 0,05$).

Es zeigte sich bei der isolierten Betrachtung der gesunden Kontrollpersonen im Bereich des linken Thalamus und mittleren Gyrus frontalis beidseits ein Zusammenhang zwischen der genotypischen Ausprägung des SNP rs3815241 und dem Volumen (**Tab. 16, Abb. 12**).

Bei der Gegenüberstellung der gesunden G-Allel-Träger zu gesunden G-Allel-Nichtträgern, gemäß dem 1. SNP-Dominanzmodell konnten Volumenunterschiede in den gleichen Gehirnarealen bestätigt werden. (**Tab. 16**).

Es konnte kein Unterschied zwischen A-Allel-Trägern und Nicht-A-Allel-Trägern festgestellt werden.

	Gehirnareal	rechts	links	Probanden	p-Wert	p-Wert Dominanzmodell
rs3815241	Thalamus		X	Kontrollen	0,049 (df = 1, F = 4,03)	0,049 (df = 58; T = 2)
rs3815241	Gyrus frontalis med.		X	Kontrollen	0,046 (df = 1, F = 4,16)	0,046 (df = 58; T = 2,04)
rs3815241	Gyrus frontalis med.	X		Kontrollen	0,045 (df = 1, F = 4,2)	0,045 (df = 58; T = 2,05)

Tab. 16: Übersicht der signifikanten rs3815241-Volumen-Korrelationen

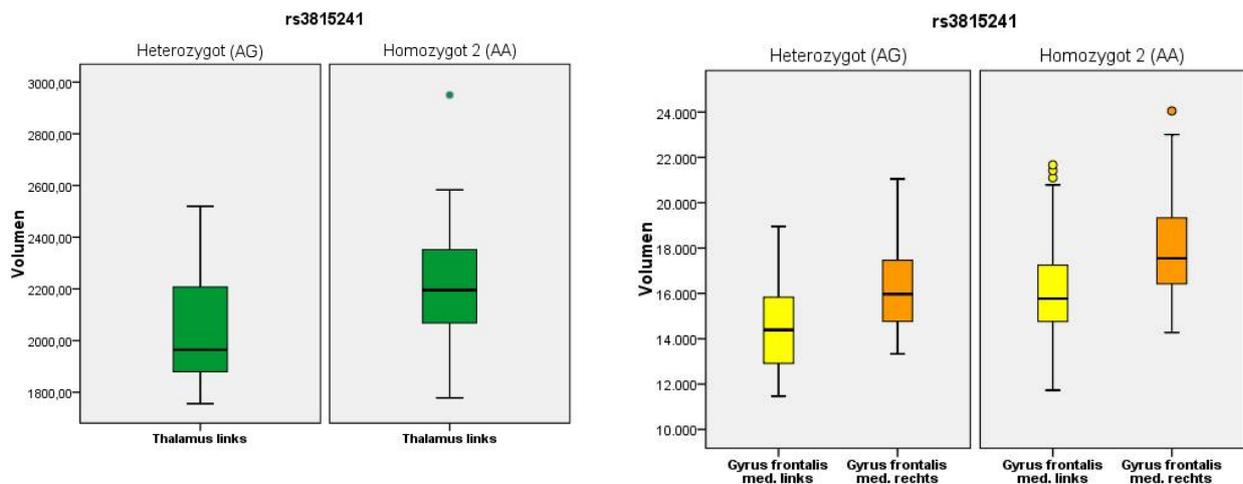


Abbildung 12 Boxplots signifikante SNP-Volumen-Korrelation rs3815241 mit den Arealen Thalamus links und Gyrus frontalis med. beidseits, gesunde 3815241-A/A-Träger > gesunde 3825241-A/G-Träger

4.3.2.2 SNP rs740277

Die verschiedenen Allelträger des SNP rs740277 zeigten bei Betrachtung des Gesamtkollektivs ein signifikant unterschiedliches Pallidum-Volumen (**Tab. 17, Abb. 13**). Auch im rs740277-Dominanzmodell 1 im Gesamtkollektiv bestätigte sich ein signifikanter Volumenunterschied des linken Pallidums. T-Allel-Träger wiesen ein durchschnittlich größeres Volumen auf als Probanden, die kein T-Allel trugen (**Tab. 17**). Der Vergleich zwischen C-Allel-Trägern und Nicht-C-Allel-Trägern zeigte keine Volumenunterschiede. (p-Wert > 0,05)

Im isolierten Patienten- und Kontrollkollektiv konnte bei der SNP-Analyse kein Volumenunterschied in Abhängigkeit vom Genotyp gefunden werden (p-Wert > 0,05).

	Gehirnareal	rechts	links	Probanden	p-Wert	p-Wert Dominanzmodell
rs740277	Pallidum		X	alle Probanden	0,028 (df = 3,69, F = 2)	0,023(df = 108, T = -2,3)

Tab. 17: Übersicht der signifikanten rs740277-Volumen-Korrelationen

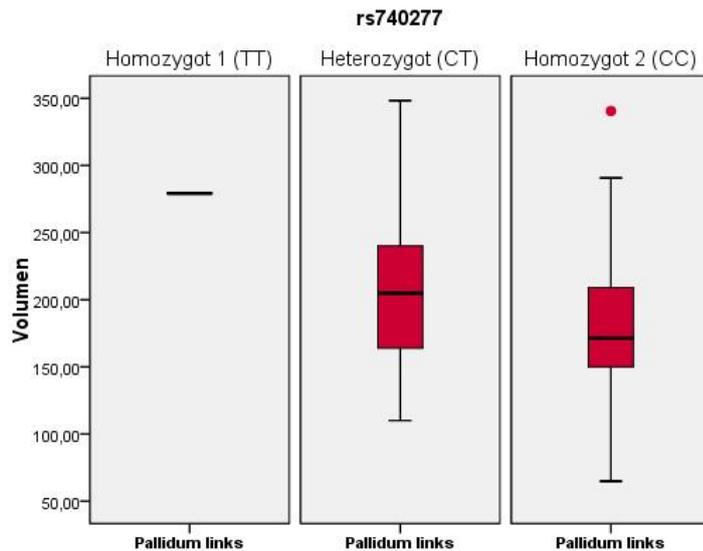


Abbildung 13 Boxplots signifikante SNP-Volumen-Korrelation rs740277 mit dem Areal Pallidum links, rs740277-C/T-Träger > rs740277-CC-Träger

4.3.2.3 SNP rs909177

Innerhalb der Kontrollgruppe konnte ein signifikanter Volumenunterschied des Gyrus frontalis med. auf der linken und rechten Seite und im Bereich des rechten Putamens identifiziert werden (Abb. 14, Tab. 18).

In der Gesamtgruppe bestätigte sich im Bereich des Putamens das Volumendefizit der homozygoten C-Allel-Träger im Vergleich zu homozygoten T-Allel-Trägern (Tab. 18).

Bei Betrachtung des 2. Dominanzmodells waren die gleichen Gehirnareale in der Gesamtgruppe und in der Kontrollgruppe unterschiedlich groß. C-Allelträger wiesen in allen genannten Bereichen kleinere Volumina als Nicht-C-Allel-Träger auf (Tab. 18).

Beim 1. Dominanzmodell zeigte sich in der Gesamtgruppe im Bereich des linken Pallidums ein Volumenunterschied (T-Allel-Trägern > Nicht-T-Allel-Trägern, $p = 0,029$; $df = 108$, $F = -2,21$).

Die Überprüfung auf einen Zusammenhang zwischen dem rs 909177-Genotyp und dem Volumen ausgewählter Gehirnareale blieb bei Betrachtung der Patientengruppe ohne signifikante Assoziation ($p > 0,05$).

	Gehirnareal	rechts	links	Probanden	p-Wert	p-Wert Dominanzmodell
rs909177	Gyrus frontalis med.		X	Kontrollen	0,024 (df = 2, F = 3,96)	0,02 (df = 58, T = 2,45)
			X	alle Probanden		0,02 (df = 108, T = 2,36)
rs909177	Gyrus frontalis med.	X		Kontrollen	0,036 (df = 2, F = 3,53)	0,02 (df = 58, T = 2,33)
		X		alle Probanden		0,03 (df = 108, T = 2,36)
rs909177	Putamen	X		Kontrollen	0,03 (df = 2, F = 3,73)	0,008 (df = 58, T = 2,75)
		X		alle Probanden	0,031 (df = 2, F = 3,45)	0,01 (df = 108, T = 2,36)

Tab. 18: Übersicht der signifikanten rs909177-Volumen-Korrelationen

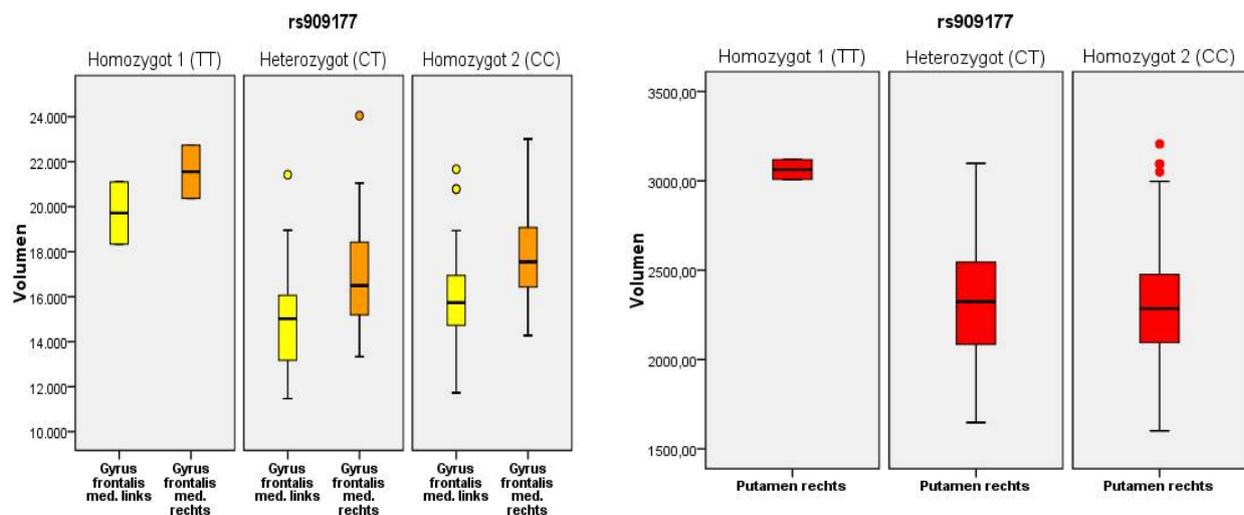


Abbildung 14 Boxplots signifikante SNP-Volumen-Korrelation rs909177 mit den Arealen Putamen rechts, Gyrus frontalis med. beidseits, links: gesunde rs909177T/T-Träger > gesunde rs909177-C/T-Träger, rechts: gesunde rs909177T/T-Träger > rs909177-T/C-Träger, rs909177T/T-Träger > rs909177C/C-Träger

4.3.2.4 SNP rs2268246

Innerhalb der Gesamtgruppe konnte kein Zusammenhang zwischen Genotyp und Gehirnvolumina festgestellt werden ($p > 0,05$).

In der Kontrollgruppe konnte gezeigt werden, dass im Bereich des linken Pallidums und Thalamus beidseits ein signifikanter Volumenunterschied in Abhängigkeit vom Genotyp besteht (Abb. 15, Tab. 19).

Bei Anwendung des Dominanzmodells bestätigten sich diese Assoziationen (rs2268426-A/A-Träger > rs2268426-A-Allel-Nichtträger) (Tab. 19).

	Gehirnareal	rechts	links	Probanden	p-Wert	p-Wert Dominanzmodell
rs 2268426	Pallidum		X	Kontrollen	0,036 (df = 1, F = 4,62)	0,036 (df = 58, T = - 2,15)
rs 2268426	Thalamus		X	Kontrollen	0,023 (df = 1, F = 4,62)	0,023 (df = 58, T = - 2,32)
rs 2268426	Thalamus	X		Kontrollen	0,020 (df = 1, F = 4,62)	0,022 (df = 58, T = - 2,34)

Tab. 19: Übersicht der signifikanten rs2268426-Volumen-Korrelationen

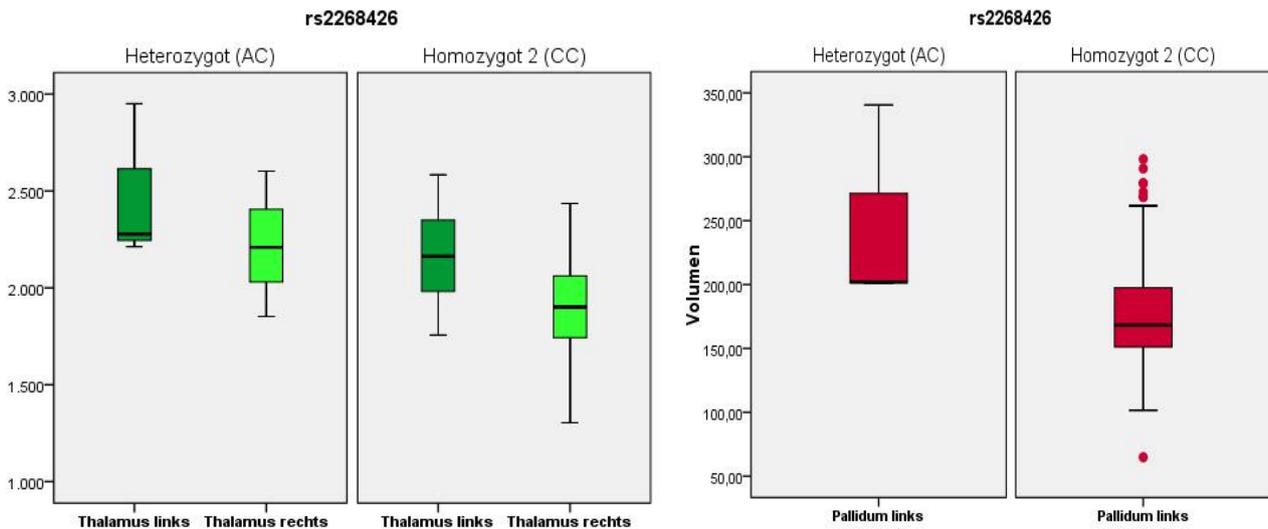


Abbildung 15: Boxplots signifikante SNP-Volumen-Korrelation rs2268426 mit den Arealen Pallidum links, Thalamus beidseits, gesunde rs2268426-A/C-Träger > gesunde rs2268426C/C-Allel-Träger

Unter den Patienten war nur ein Proband Träger des A-Allels, der deutlich verringerte Volumina in den Arealen rechtes Putamen ($p = 0,046$, $df = 1$, $F = 4,2$) und Thalamus beidseits ($p_{links} = 0,042$, $df = 1$, $F = 4,3$; $p_{rechts} = 0,009$, $df = 1$, $F = 7,35$) im Vergleich zu anderen Patienten zeigte.

4.4 Haplotyp-Einfluss

Aus den vorliegenden genotypischen SNP-Daten kann die Abfolge der Allele auf beiden Chromosomen ermittelt werden. Mithilfe des HAP-Tools wurden die wahrscheinlichsten Haplotypen eines jeden Probanden erstellt. Es ergaben sich 8 verschiedene Haplotypen (Tab. 20). Die Allel-Abfolge ergibt sich aus der Position der SNPs innerhalb des Gens (Abb. 16).

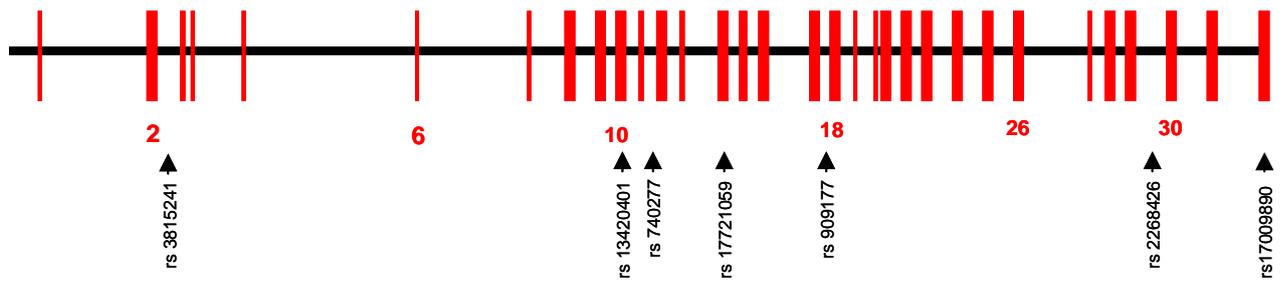


Abbildung 16: Graphische Darstellung des Gens DCTN1 mit Abfolge der untersuchten SNP; rote Zahlen bezeichnen Exons.

	rs3815241 A/G	rs13420401 C/A	rs740277 C/T	rs17721059 G/A	rs909177 C/T	rs2268426 C/A	rs17009890 C/A
Haplotyp 1	A	C	C	G	C	C	C
Haplotyp 2	G	C	T	G	T	C	C
Haplotyp 3	A	C	T	G	T	C	C
Haplotyp 4	A	C	C	G	C	A	C
Haplotyp 5	A	C	C	G	T	C	C
Haplotyp 6	G	C	C	G	C	C	C
Haplotyp 7	G	C	C	G	T	C	C
Haplotyp 8	G	C	T	G	C	C	C

Tab. 20: Aufschlüsselung der Haplotypen; Abfolge der Basen in Abhängigkeit der genotypischen SNP-Ausprägung, G = Guanin, C = Cytosin, T = Thymin, A = Adenin

4.4.1 Einfluss auf die Diagnose

Das quantitative Auftreten eines Haplotyps innerhalb der Patientengruppe war nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p > 0,05$) (Tab. 21).

Haplotyp	Patienten (n = 65)	Kontrollen (n = 70)	Gesamt (n = 135)	p-Wert
ACCGCC	46 homozygot (70%) 18 heterozygot (24,6%)	44 homozygot (62,8%) 23 heterozygot (32,8%)	90 homozygot (66,7%) 41 heterozygot (30,4%)	p = 0,48 $\chi^2 = 1,47$ df = 2
GCTGTCC	0 homozygot 9 heterozygot (13,8%)	0 homozygot 12 heterozygot (17,1%)	0 homozygot 21 heterozygot (15,6%)	p = 0,6 $\chi^2 = 0,28$ df = 1
ACTGTCC	0 homozygot 3 heterozygot (4,6%)	1 homozygot (1,4%) 7 heterozygot (10%)	1 homozygot (0,7%) 10 heterozygot (7,4%)	p = 0,3 $\chi^2 = 2,4$ df = 2
ACCGCAC	0 homozygot 3 heterozygot (4,6%)	0 homozygot 4 heterozygot (5,7%)	0 homozygot 7 heterozygot (5,2%)	p = 0,77 $\chi^2 = 0,1$ df = 1
ACCGTCC	0 homozygot 1 heterozygot (1,5%)	0 homozygot 3 heterozygot (4,2%)	0 homozygot 4 heterozygot (3%)	p = 0,35 $\chi^2 = 0,8$ df = 1
GCCGCC	0 homozygot 1 heterozygot (1,5%)	0 homozygot 1 heterozygot (1,4%)	0 homozygot 2 heterozygot (1,5%)	p = 0,96 $\chi^2 = 0,003$ df = 1
GCCGTCC	0 homozygot 1 heterozygot (1,5%)	0 homozygot 0 heterozygot	0 homozygot 1 heterozygot (0,7%)	p = 0,3 $\chi^2 = 1,1$ df = 1
GCTGCC	0 homozygot 1 heterozygot (1,5%)	0 homozygot 0 heterozygot	0 homozygot 1 heterozygot (0,7%)	p = 0,3 $\chi^2 = 1,1$ df = 1

Tab. 21: Verteilung der erstellten Haplotypen innerhalb der Patienten- und Kontrollgruppe, n entspricht der Probandenzahl

4.4.2 Einfluss auf die Volumetriedaten

Zur Identifizierung einer Haplotyp-Volumen-Korrelation wurde der Einfluss der Haplotypenausprägung auf das Gehirnvolumen untersucht, wobei das einmalige Vorkommen (heterozygote Ausprägung), das zweimalige Vorkommen (homozygote Ausprägung) und das Nichtvorhandensein verglichen wurden.

Die Haplotypen **1, 2, 4, 5** und **7** zeigten dabei einen Einfluss auf bestimmte Arealvolumina. So zeigten sich wie bereits bei der Betrachtung der SNPs auch Korrelationen zwischen Genotyp und

Volumen des mittleren Frontalhirns, Thalamus, Putamens und Pallidums. Die anderen Haplotypen werden daher im Folgenden nicht mehr aufgeführt.

4.4.2.1 Haplotyp ACCGCC

Bei der Betrachtung aller Probanden konnte bei mehreren Arealen auf beiden Hemisphären signifikante Volumenunterschiede festgestellt werden (**Tab. 22**).

Die häufigsten Korrelationen bestätigten sich auch in der Kontrollgruppe (**Tab. 22**).

Die isolierte Untersuchung der Patientengruppe ergab keine Hinweise auf eine Abhängigkeit der Gehirnarealvolumina und der Haplotypenausprägung (p-Wert > 0,05).

Gehirnareal	rechts	links	p-Wert (Gesamt) df = 2	p-Wert (Kontrollen) df = 2	Vergleich
Cingulum anterior		X	0,005 (F =5,49)	0,002 (F = 6,78)	Nicht-Träger > Heterozygote Träger Nicht-Träger > homozygote Träger
Cingulum anterior	X		0,009 (F = 4,88)	0,006 (F = 5,65)	Nicht-Träger > Heterozygote Träger Nicht-Träger > homozygote Träger
Gyrus frontalis med.		X	0,001 (F =6,94)	0,0003 (F = 9,39)	Nicht-Träger > Heterozygote Träger Nicht-Träger > homozygote Träger
Gyrus frontalis med.	X		0,002 (F = 6,74)	0,0003 (F = 9,56)	Nicht-Träger > Heterozygote Träger Nicht-Träger > homozygote Träger
Insel		X	0,017 (F =4,23)	0,002 (F = 6,69)	Nicht-Träger > Heterozygote Träger Nicht-Träger > homozygote Träger
Insel	X		0,013 (F =4,54)	0,005 (F = 5,93)	Nicht-Träger > Heterozygote Träger
Gyrus temporalis sup.		X	p > 0,05	0,009 (F = 5,1)	Nicht-Träger > Heterozygote Träger
Gyrus temporalis sup.	X		p > 0,05	0,012 (F = 4,75)	Nicht-Träger > Heterozygote Träger

Tab. 22 Haplotyp 1 (ACCGCC) Darstellung der signifikanten Haplotyp-Volumen-Korrelation, p-Werte aus dem Gesamtkollektiv und Kontrollgruppe gegenübergestellt.

4.4.2.2 Haplotyp GCTGTCC

Die Untersuchung aller Probanden ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Gehirnvolumina und Haplotypenausprägung (p-Wert > 0,05).

In der Kontrollgruppe waren die Gehirnvolumina des Gyrus frontalis med. links und rechts in Abhängigkeit vom Trägerstatus des 2. Haplotyps GCTGTCC signifikant unterschiedlich (**Abb. 17, Tab. 23**).

In der Gruppe der Patienten konnten keine ähnlichen Assoziationen nachgewiesen werden ($p > 0,05$).

	Gehirnareal	rechts	links	Probanden	p-Wert
Haplotyp GCTGTCC	Gyrus frontalis med.		X	Kontrollen	0,039 (df = 1, F = 4,47)
Haplotyp GCTGTCC	Gyrus frontalis med.	X		Kontrollen	0,048 (df = 1, F = 4,07)

Tab. 23: Haplotyp 2 (GCTGTCC) Darstellung der signifikanten Haplotyp-Volumen-Korrelation

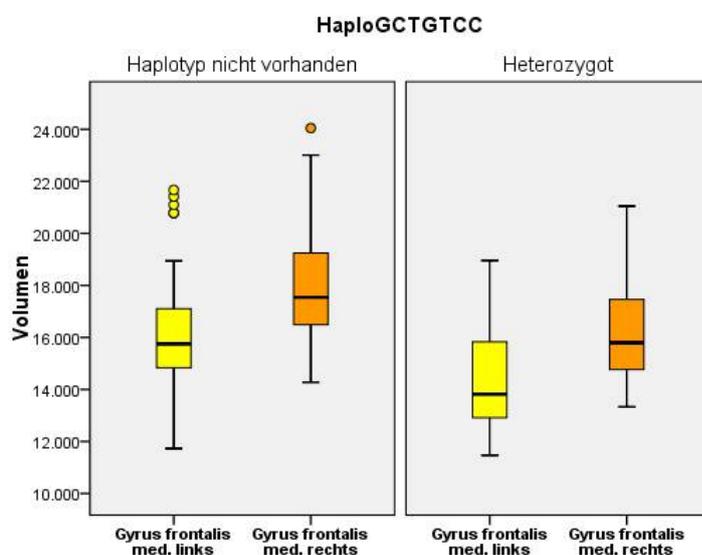


Abbildung 17: Boxplots signifikante Haplotyp-Volumen-Korrelation Haplotyp GCTGTCC mit dem Areal Gyrus frontalis med. beidseits, gesunde HaplotypGCTGTCC-Träger < gesunde HaplotypGCTGTCC-Nicht-Träger

4.4.2.4 Haplotyp ACCGCAC

Wie beim Haplotyp 2 zeigten sich auch in der Gesamtgruppe keine Haplotyp-Volumen-Korrelationen.

Allerdings zeigte sich in der Kontrollgruppe ein signifikanter Volumenunterschied im Bereich des Pallidums links und Thalamus beidseits (**Abb. 18, Tab. 24**).

In der Patientengruppe fanden sich keine Volumenunterschiede.

	Gehirnareal	rechts	links	Probanden	p-Wert
Haplotyp ACCGCAC	Pallidum		X	Kontrollen	0,036 (df = 1, F = 4,62)
Haplotyp ACCGCAC	Thalamus		X	Kontrollen	0,023 (df = 1, F = 5,41)
Haplotyp ACCGCAC	Thalamus	X		Kontrollen	0,022 (df = 1, F = 5,49)

Tab. 24: Haplotyp 4 (ACCGCAC) Darstellung der signifikanten Haplotyp-Volumen-Korrelation

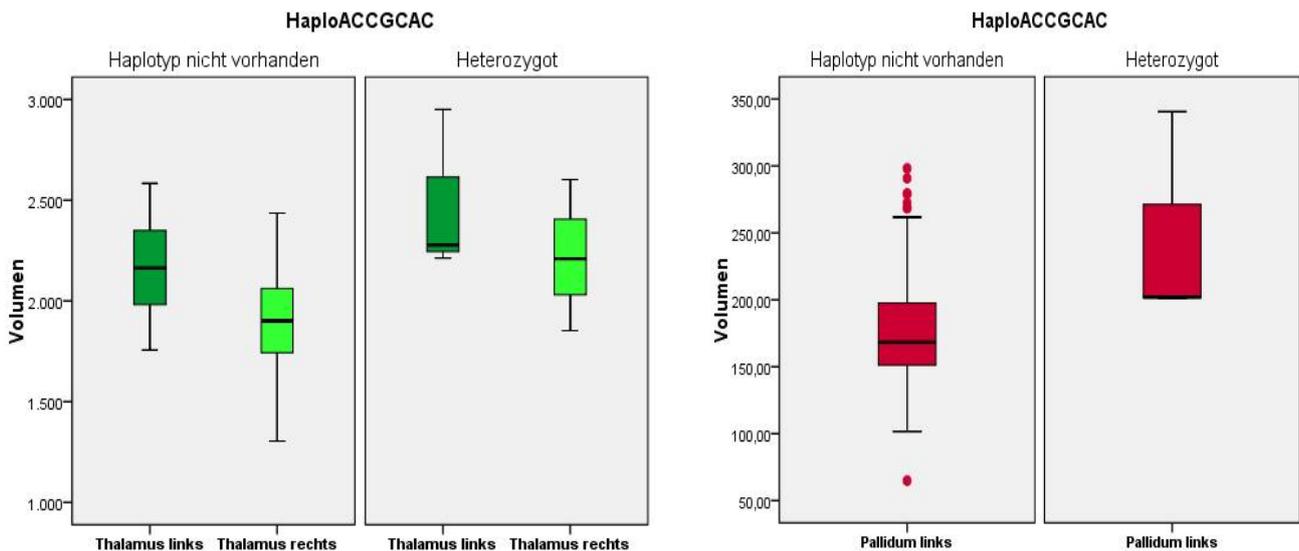


Abbildung 18: Boxplots signifikante Haplotyp-Volumen-Korrelation Haplotyp ACCGCAC mit den Arealen Pallidum links und Thalamus beidseits, gesunde Haplotyp ACCGCAC-Träger > gesunde Haplotyp ACCGCAC-Nichtträger

Ein Patient war heterozygoter Träger des Haplotyp 4 und zeigte deutlich verringerte Volumina in den Arealen Putamen rechts ($p = 0,046$, $df = 1$, $F = 4,2$) und Thalamus beidseits ($p_{\text{links}} = 0,042$, $df = 1$, $F = 4,3$; $p_{\text{rechts}} = 0,009$, $df = 1$, $F = 7,35$) im Vergleich zu anderen Patienten. Es handelte sich dabei um den gleichen Patienten, der bereits mit einer rs2268426-Volumen-Korrelation auffiel.

4.4.2.5 Haplotyp ACCGTCC

Auch bei der Untersuchung von Haplotyp 5 zeigten sich keine Volumenunterschiede zwischen homozygoten und heterozygoten Haplotypenträgern in der Gesamtgruppe.

In der Gruppe gesunder Kontrollprobanden wurde ein signifikanter Volumenunterschied im Bereich des Putamens rechts festgestellt (Abb. 19, Tab. 25).

Innerhalb der Patienten-Gruppe wurde keine Assoziation zwischen dem Genotyp des Haplotyps ACCGTCC und Volumendifferenzen deutlich ($p\text{-Wert} > 0,5$).

	Gehirnareal	rechts	links	Probanden	p-Wert
Haplotyp ACCGTCC	Putamen	X		Kontrollen	0,04 (df = 1, F = 4,33)

Tab. 25: Haplotyp 5 (ACCGTCC) Darstellung der signifikanten Haplotyp-Volumen-Korrelation

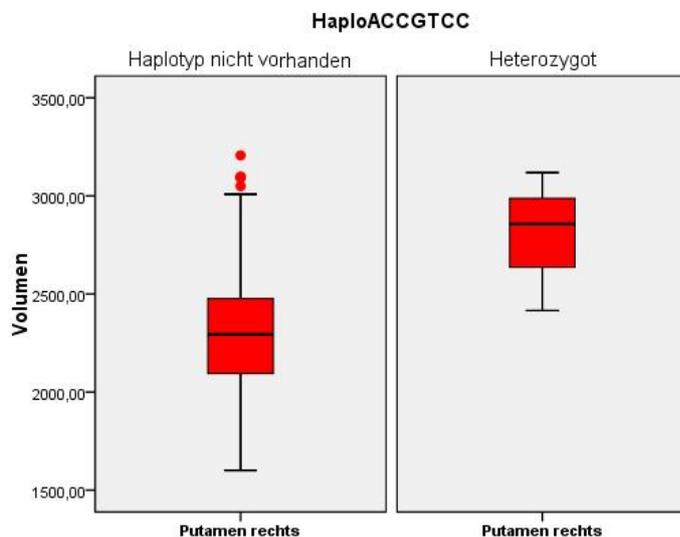


Abbildung 19: Boxplots signifikante Haplotyp-Volumen-Korrelation Haplotyp ACCGTCC mit dem Areal Putamen rechts, gesunde Haplotyp ACCGTCC-Träger > gesunde Haplotyp ACCGTCC-Nichtträger

4.4.2.6 Haplotyp GCCGTCC

Der Haplotyp 7 GCCGTCC kam nur einmal bei einem Patienten vor. Dieser zeigte im Vergleich sowohl zu allen anderen Probanden als auch zu anderen Patienten signifikant höhere Volumina in den Hirnarealen Gyrus parahippocampalis links, Gyrus temporalis sup. links, Thalamus links (alle $p < 0,05$).

4.5 Haplotypenkombination

Die heterozygote Ausprägung von Haplotypen basierte auf unterschiedlichen Haplotypenkombinationen, wobei die meisten heterozygoten Probanden Kombinationen mit dem häufigsten Haplotyp ACCGCC aufwiesen. Zur Einschätzung eines Zusammenhangs zwischen Haplotypenkombination und Diagnose bzw. Haplotypenkombination und Gehirnvolumen wurden Kombinationsträger mit Kombinations-Nichtträgern verglichen.

Aufgrund der geringen Probandenzahl mit bestimmten Haplotypkombinationen wurden nur die 3 häufigsten Kombinationen untersucht.

ACCGCCC/ACCGCCC

ACCGCCC/GCTGTCC

ACCGCCC/ACTGTCC

4.5.1 Einfluss auf die Diagnose

Es wurde kein Zusammenhang zwischen den drei häufigsten Haplotypenkombinationen und der Diagnose Schizophrenie gefunden. Es muss die H_0 -Hypothese angenommen werden (**Tab. 26**).

Haplotypenkombination	Patienten (n=65)	Kontrollen (n=70)	insgesamt (n=135)	p-Wert
ACCGCCC/ACCGCCC	46 (70,7%)	44 (62,8%)	90 (66,67%)	0,21 ($\chi^2 = 1,57$; df = 1)
ACCGCCC/GCTGTCC	8 (12,3%)	12 (18,5%)	20 (14,8%)	0,65 ($\chi^2 = 0,21$; df = 1)
ACCGCCC/ACTGTCC	3 (4,6%)	5 (7,1%)	8 (5,9%)	0,24 ($\chi^2 = 1,37$; df = 1)
ACCGCCC/ACCGCAC	3 (4,6%)	3 (4,2%)	6 (4,4%)	
ACCGCCC/ACCGTCC	1 (1,5%)	2 (2,8%)	3 (2,2%)	
ACCGCCC/AACGCCC	1 (1,5%)	0	1 (0,74%)	
ACCGCCC/GCCGCCC	0	1 (1,4%)	1 (0,74%)	
ACCGCCC/GCCGTCC	1 (1,5%)	0	1 (0,74%)	
ACCGCCC/GCTGCCC	1 (1,5%)	0	1 (0,74%)	
GCTGTCC/GCCGCCC	1 (1,5%)	0	1 (0,74%)	
ACTGTCC/ACTGTCC	0	1 (1,4%)	1 (0,74%)	
ACTGTCC/ACCGCAC	0	1 (1,4%)	1 (0,74%)	
ACTGTCC/ACCGTCC	0	1 (1,4%)	1 (0,74%)	

Tab. 26: Verteilung der Haplotypenkombination auf Patienten und gesunde Kontrollen, n entspricht Probandenzahl

4.5.2 Einfluss auf Volumetriedaten

4.5.2.1 ACCGCCC/ACCGCCC

Die Analyse der Bildgebungsdaten aller Probanden ergab, dass Probanden, die genotypisch die Haplotypenkombination ACCGCCC/ACCGCCC nicht aufwiesen, ein signifikant größeres Volumen im Bereich des Pallidums linkshemisphärisch besaßen als Probanden mit dieser Kombination. Diese Assoziation bestätigte sich auch bei der Betrachtung des Kontrollkollektivs (**Tab. 27**).

	Gehirnareal	rechts	links	p-Wert (alle Probanden)	p-Wert (Kontrollen)
Haplotypenkombination ACCGCCC/ACCGCCC	Pallidum		X	0,029 (df = 108, T = 2,58)	0,039 (df = 108, T = 2,16)

Tab. 27: Haplotypenkombination 1 (ACCGCCC/ACCGCCC) Darstellung der signifikanten Haplotypenkombination-Volumen-Korrelation

Es konnten keine weiteren signifikanten Assoziationen bei der isolierten Betrachtung von Patienten und gesunden Kontrollen festgestellt werden (p-Wert > 0,05).

4.5.2.2 ACCGCCC/GCTGTCC

Die Analyse aller Probanden erbrachte keinen Zusammenhang zwischen Ausprägung der Haplotypenkombination und Gehirnvolumina ($p > 0,05$).

Nur in der Kontrollgruppe zeigte sich, dass gesunde Probanden, die die Kombination aus den Haplotypen ACCGCCC und GCTGTCC besaßen, in den Gehirnarealen Gyrus frontalis med. links und rechts ein geringeres Volumen aufwiesen als Kontrollprobanden, die nicht Träger dieser Kombination waren (**Tab. 28**).

In der Patientengruppe fand sich keine Assoziation ($p > 0,05$).

	Gehirnareal	rechts	links	Probanden	p-Wert
Haplotypenkombination ACCGCCC/GCTGTCC	Gyrus frontalis med.		X	Kontrollen	0,039 (df = 58, T = 2,11)
Haplotypenkombination ACCGCCC/GCTGTCC	Gyrus frontalis med.	X		Kontrollen	0,048 (df = 58, T = 2,01)

Tab. 28: Haplotypenkombination 2 (ACCGCCC/GCTGTCC) Darstellung der signifikanten Haplotypenkombination-Volumen-Korrelation

4.5.2.3 ACCGCCC/ACTGTCC

Es konnte festgestellt werden, dass in keiner Probandengruppe der Trägerstatus der Haplotypenkombination ACCGCCC/ACTGTCC einen Einfluss auf die Volumenausprägung der einzelnen Gehirnareale hat. Es muss die H_0 -Hypothese angenommen werden.

4.6 Zellbiologische Untersuchung

4.6.1 Expressionsanalyse

Es wurde ein Westernblot durchgeführt zur Überprüfung

1. der Expression der Dynaktinuntereinheit p150
2. der Expression weiterer Untereinheiten des Dynaktin-Proteinkomplex und Dyneins
3. der Expression von Lis1

in Gehirnproben von sowohl Cre-positiven als auch Cre-negativen Mäusen.

Wie bereits oben beschrieben, ist die genotypische Ausprägung des Cre-Gens entscheidend, ob eine 4 OH-Tamoxifen-Behandlung die Entfernung der Exone 2 bis 4 von DCTN1, das Knock-Out des Gens DCTN1, aktiviert oder nicht.

Als erstes Untersuchungsmaterial diente Gehirnlysat von Cre-negativen und Cre-positiven Mäusen. Die p150-Untereinheit war in den CRE-positiven Zellen deutlich vermindert. Im Gegensatz dazu erschien Lis 1 leicht verstärkt expremiert zu sein (**Abb. 20 a**).

Weitere Untersuchungen erfolgten anhand von Fibroblasten-Samples, die zur Einschätzung der Abnahme der p150-Untereinheit über einen gewissen Zeitverlauf in Abhängigkeit zur 4 OH-Tamoxifen-Behandlung an verschiedenen Zeitpunkten gesammelt wurden.

In den Cre-negativen Fibroblasten konnte im gesamten Zeitverlauf keine Abnahme der p150-Expression festgestellt werden. Im Gegensatz dazu erschien in den Cre-positiven Zellen schon am ersten Tag nach 4-OH-Tamoxifen-Behandlung die Expression der Dynaktin-Untereinheit deutlich vermindert, bis sie schließlich nach wenigen Tagen nicht mehr expremiert wurde.

Die Untereinheit p50 (Dynamitin) zeigte im gesamten Zeitverlauf eine schwächere Ausprägung in den Cre-positiven Zellen als in den CRE-negativen Zellsample.

Die Untereinheit Dynaktins p25 (kodiert durch DCTN5) zeigte in beiden Fibroblastenvarianten keine Veränderungen in ihrer Expression.

Die beiden Interaktionspartner Dynein und Lis 1 zeigten keine auffälligen Veränderungen in ihrem Expressionsmuster über die Zeit (**Abb. 20 b**).

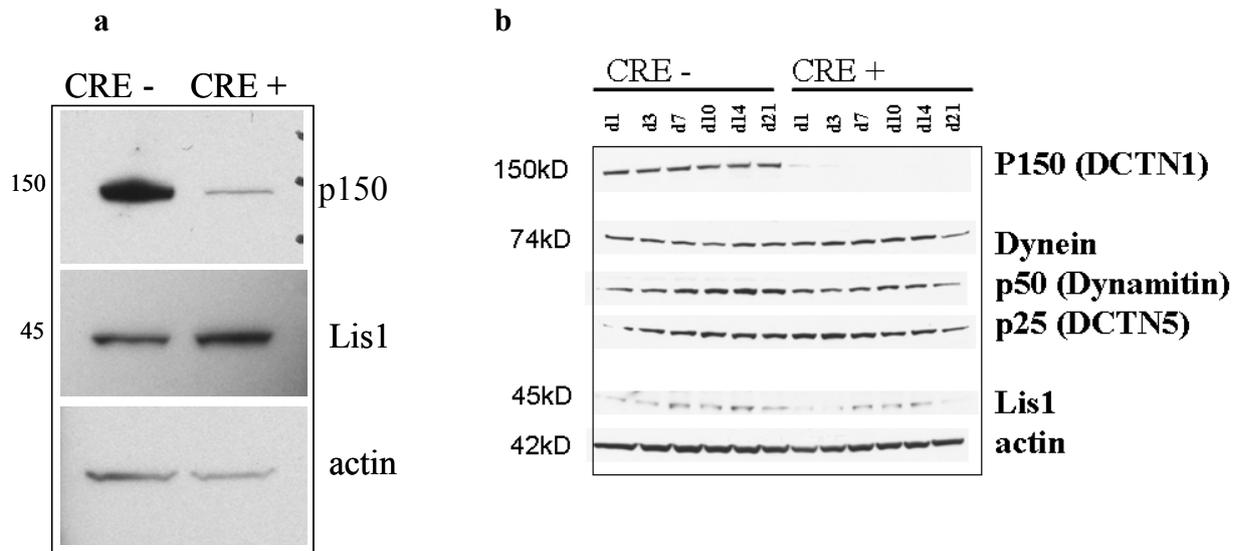


Abbildung 20: Westernblots; a) zeigt die Proteinexpression von p150 und Lis 1 in CRE negativen (links) und CRE positiven (rechts) Proben (Gehirnlysate); b) zeigt die Proteinexpression zu verschiedenen Zeitpunkten nach 4-OH-Tamoxifen-Behandlung in Fibroblasten (links CRE negative Zellen, rechts CRE positive Zellen); Aktin wurde als Ladekontrolle eingesetzt, Dynein repräsentiert durch Dynein intermediate chain, d = Tag

4.6.2 Einfluss des DCTN1-knock-out auf die Zellstruktur

4.6.2.1 Zellorganellen

Nukleus

Die Markierung des Zellkerns der Fibroblasten erfolgte mit Topro3. In keiner Zelldarstellung konnte ein Unterschied der Nuklei der Cre-negativen Zellen bzw. Cre-positiven Zellen festgestellt werden.

Golgiapparat

Die Konfiguration des Golgiapparats war in Cre-positiven Fibroblasten im Vergleich zu den Wildtypzellen (Cre-negativ) verändert. Der Golgikomplex wies in den Cre-positiven DCTN1-cKO-Fibroblasten eine verstärkt diffuse, weniger strukturierte Ausprägung auf. Dieser Effekt konnte nur im reiferen Golgiapparat beobachtet werden, der mit GRG1 angefärbt wurde (**Abb. 21 – 22**). Es konnte keine Strukturunterschiede in jüngeren Zellen mit einem unreiferen Golgisystem, das mit GM130 markiert wurde, gefunden werden (**Abb. 23 – 24**).

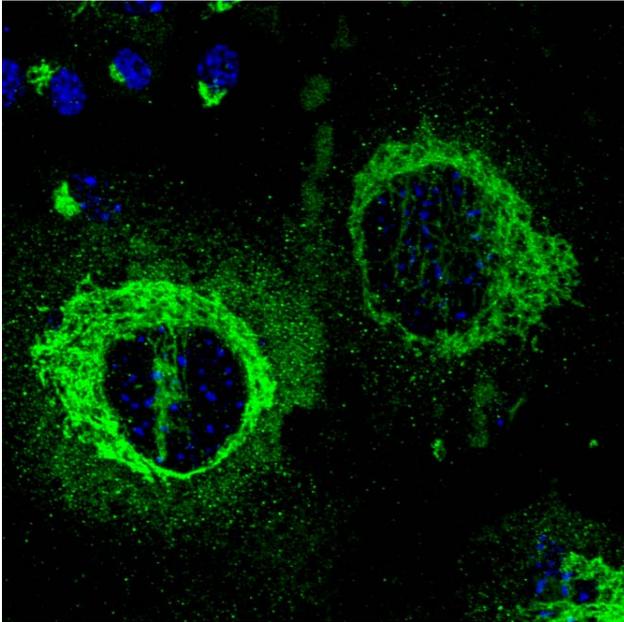


Abbildung 21: CRE-negativer Fibroblast, Kern blau angefärbt mit Topro3, Golgiapparat grün angefärbt mit GRG1

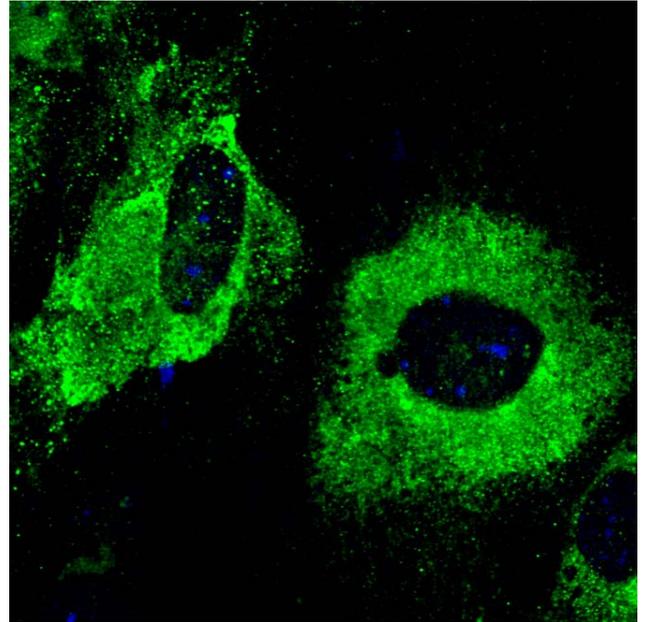


Abbildung 22: CRE-positiver Fibroblast, Kern blau angefärbt mit Topro3, Golgiapparat grün angefärbt mit GRG1

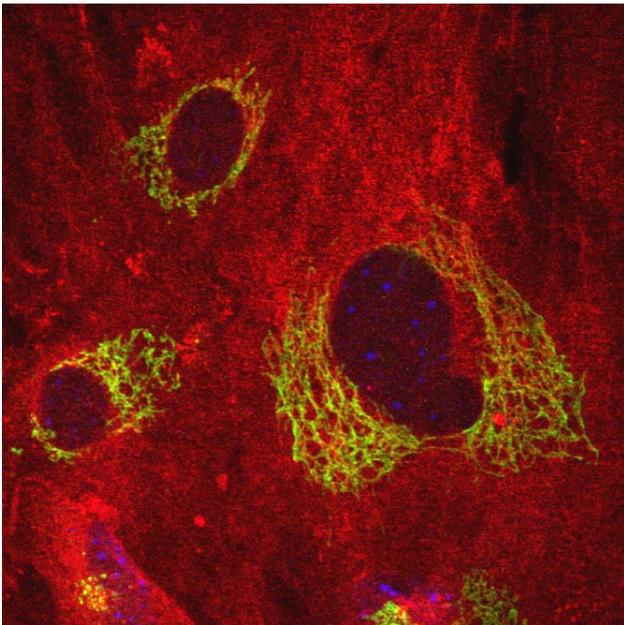


Abbildung 23: CRE-negativer Fibroblast, Kern blau angefärbt mit Topro3, Golgiapparat grün angefärbt mit GM130, p-150 rot

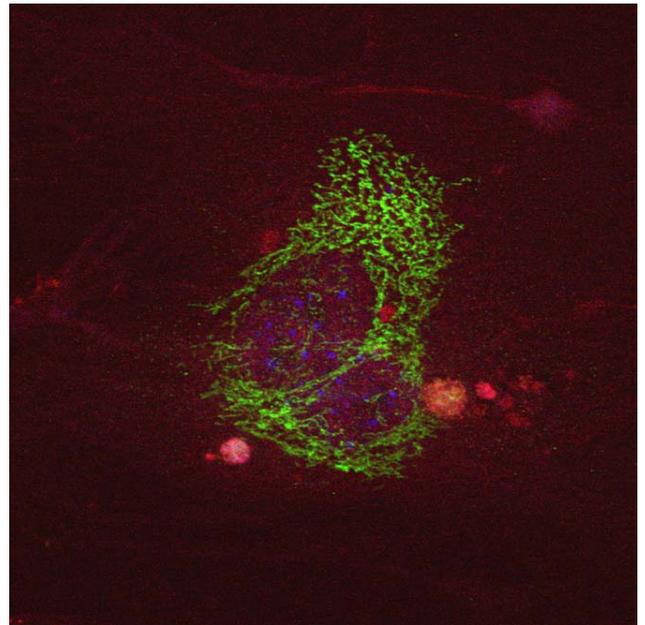


Abbildung 24: CRE-positiver Fibroblast, Kern blau angefärbt mit Topro3, Golgiapparat grün angefärbt mit GM130, p-150 rot

ER

Das ER wurde mit Calnexin in den Cre-negativen und Cre-positiven Fibroblasten markiert. In der Immunfluoreszenzdarstellung zeigten die cKO-Fibroblasten aufgelockertes und scheinbar vermindertes ER im Vergleich zu den Cre-negativen Fibroblasten (**Abb. 25-26**).

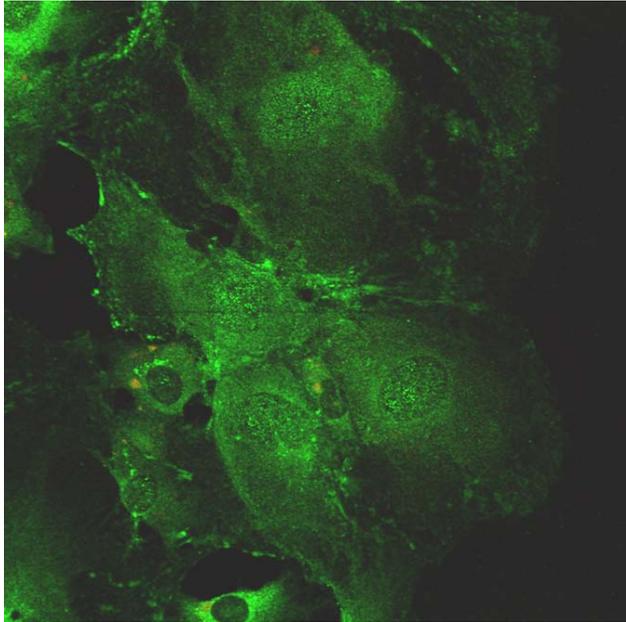


Abbildung 25: CRE-negativer Fibroblast, ER grün angefärbt mit Calnexin

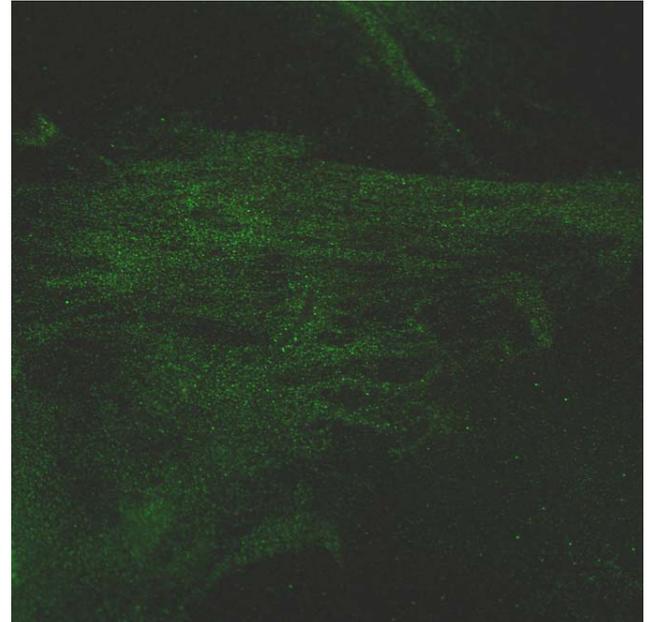


Abbildung 26: CRE-positiver Fibroblast, ER grün angefärbt mit Calnexin

Lysosom

Im Vergleich der CRE-positiven Fibroblasten und CRE-negativen Fibroblasten konnte keine Veränderung der Lysosomenkonfiguration bzw. Konzentration festgestellt werden.

Peroxisom

Es konnte keine Veränderung der Peroxisom-Organisation in CRE-positiven Fibroblasten festgestellt werden.

4.6.2.2 Proliferation

Die Markierung der Zellen mit EdU (*5-ethynyl-2'-deoxyuridine*, Click-iT™ EdU assay kit Invitrogen) erfolgte zur Einschätzung der Zellproliferationsrate. Dabei zeigten sich leichte Unterschiede zwischen CRE-positiven und CRE-negativen Zellen. Die Anzahl EdU-positiver Zellen war in DCTN1-cKO-Fibroblasten niedriger als bei den Wildtypzellen (**Abb. 27 - 28**).

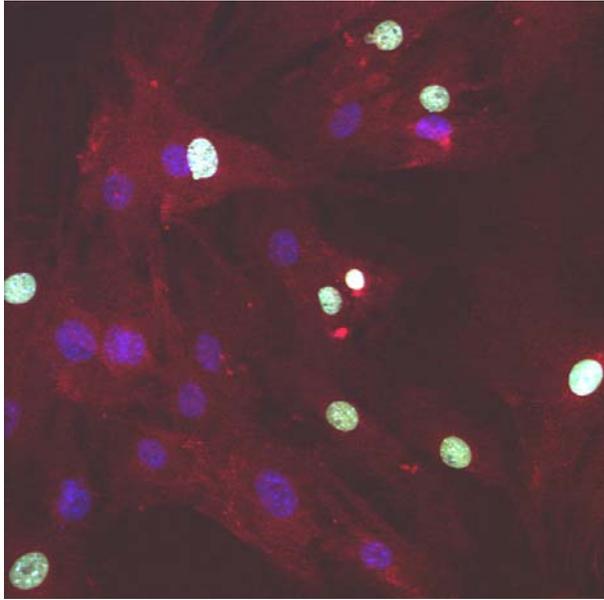


Abbildung 27: CRE-negativer Fibroblast, Kern blau angefärbt mit Topro3, EdU-markierte Kerne grün angefärbt, p-150 rot

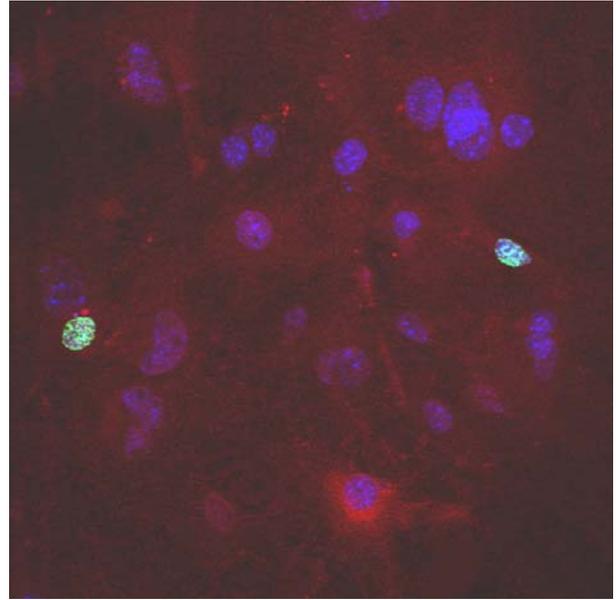


Abbildung 28: CRE-positiver Fibroblast, Kern blau angefärbt mit Topro3, EdU-markierte Kerne grün angefärbt, p-150 rot

4.6.2.3 Lis 1 Expression

Die Lis 1-Verteilung wurde sowohl in CRE-positiven als auch in CRE-negativen Fibroblasten und hippocampalen Neuronen untersucht.

Die Lis 1-Konzentration war in der überwiegenden Zahl der Zellen in CRE-positiven und CRE-negativen Zellen (Fibroblasten und hippocampale Neurone) ähnlich stark.

Vereinzelt zeigten CRE-positiven Fibroblasten ein verstärktes Signal im perinukleären Bereich im Vergleich zu CRE-negativen Zellen, bei denen sich Lis-1 gleichmäßig verteilt markierte (**Abb. 29 – 32**).

In den untersuchten Neuronen konnte keine strukturelle Umverteilung des Lis 1-Proteins in den Cre-positiven Neuronen festgestellt werden.

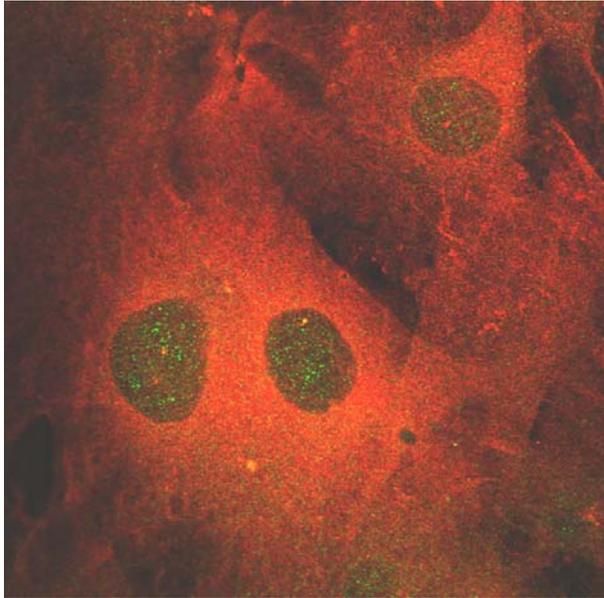


Abbildung 29: CRE-negativer Fibroblast, Lis1 grün angefärbt, p-150 rot

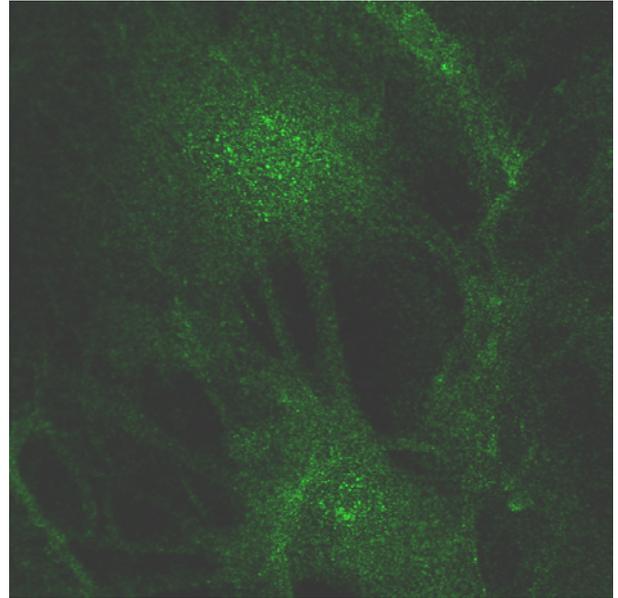


Abbildung 30 CRE-positiver: Fibroblast, Lis1 grün angefärbt, p-150 rot

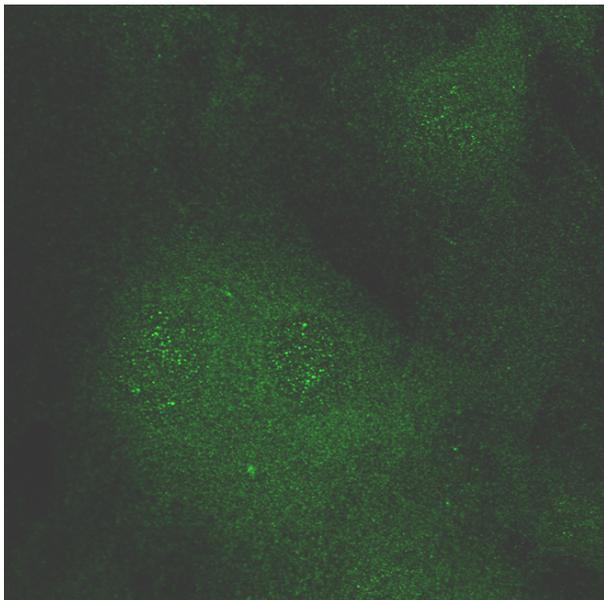


Abbildung 31: CRE-negativer Fibroblast, Lis1 grün angefärbt – isoliert dargestellt

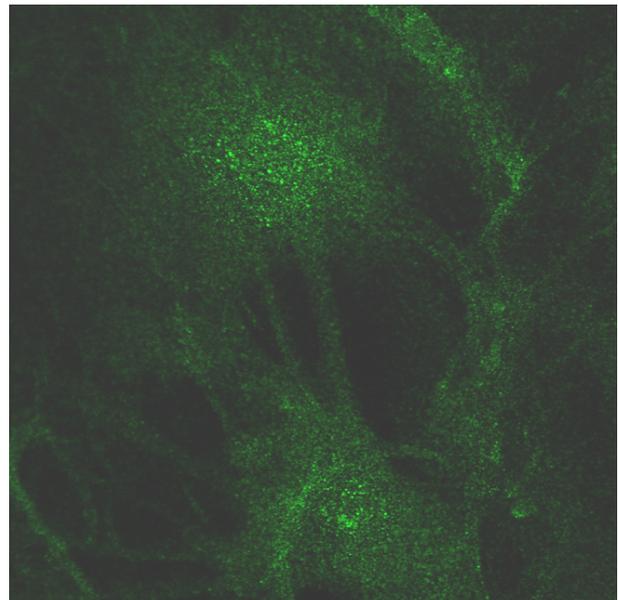


Abbildung 32: CRE-positiver Fibroblast, Lis1 grün angefärbt – isoliert dargestellt

V Diskussion

5.1 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war die Untersuchung eines möglichen pathologischen Effekts von Dynaktin. Dabei wurden 3 inhaltliche Schwerpunkte gesetzt:

- auf molekulargenetischer Ebene: die genetische Assoziation zwischen DCTN1 und Schizophrenie anhand eines Patienten-Kontroll-Kollektivs
- auf makroskopischer Ebene: eine Gen-Volumen-Korrelation anhand von Volumendaten des gleichen Patienten-Kontroll-Kollektivs
- auf mikroskopischer Ebene: der zellbiologische Einfluss des DCTN1-Gens auf die Organellorganisation der Zelle und auf die Präsenz eines weiteren Proteins aus dem Bereich der Neuronenmigration, Lis1

Es konnte keine Assoziation zwischen den ausgewählten Markern des Gens DCTN1 und der Ausprägung der Krankheit gefunden werden. Auch die konstruierten Haplotypen und Haplotypkombinationen zeigten keinen Einfluss auf die Diagnose.

Auf makroskopischer Seite zeigte sich eine Gen-Volumen-Korrelation im Bereich des Gyrus frontalis, Gyrus temporalis, Insula, Cingulum, Pallidum, Putamen, Thalamus. Insbesondere der Haplotyp 1 (ACCGCCC) zeigte in mehreren Gehirnarealen eine Assoziation. Probanden, die diesen Haplotyp nicht trugen, wiesen signifikant größere Gehirnareale auf als Probanden, die heterozygote oder homozygote Träger waren.

Auf der mikroskopischen Ebene konnte festgestellt werden, dass das Ausschalten des Gens DCTN1 zu einer Strukturveränderung des Golgi-Apparats führt, darüber hinaus aber keine auffälligen Zellveränderungen auslöste. Die Expression weiterer Untereinheiten des Dynaktin-Komplexes und des Interaktionspartners Lis1 blieb nach der Inaktivierung von DCTN1 unverändert.

5.2 Überblick Design und Ergebnisse thematisch ähnlicher Studien im Vergleich zur vorliegenden Arbeit

5.2.1 DCTN1-Mutationen bei weiteren Erkrankungen

DCTN1-Mutationen bei Patienten mit dem Perry-Syndrom – Farrer et al. [97]

Das Perry-Syndrom ist eine schnell fortschreitende neurodegenerative Krankheit, die sich hauptsächlich durch ein Parkinsonoid, Gewichtsverlust, begleitet von Depression und sozialem Rückzug auszeichnet. Der Krankheitsausbruch liegt überwiegend in der 5. Lebensdekade und es kommt innerhalb von 2-10 Jahren zum Tod aufgrund der Hypoventilation als Spätsymptom.

Farrer et al. konnten in einer Kopplungsanalyse von 8 Familien unterschiedlicher Herkunft mit dem Perry-Syndrom DCTN1 als Kandidatengen identifizieren. Die anschließende Sequenzierung erbrachte 5 neue Mutationen innerhalb Exon 2. Diese Mutationen lagen alle im Bereich des n-terminalen CAP-Gly Abschnitts. In diesem Bereich findet die direkte Bindung von Mikrotubuli statt, eine der wichtigsten Funktionen von Dynaktin.

In einer weiteren Untersuchung konnte die Arbeitsgruppe durch Transfektion von Hek293T-Zellen mit Plasmiden, die für ein Wildtypprotein p150 oder für mutierte p150-Proteine (G59S, G71R und Q74P) kodierte, intrazytoplasmatische Einschlusskörper in den mutierten Zellen demonstrieren. Die G59S-Mutation, ein Austausch von Glycin durch Serin im Bereich des CAP-Gly-Abschnitts, wurde bereits in der Arbeit von Puls et al. als Ursache für eine Motoneuronenerkrankung identifiziert. Zellen, die mit der G59S-Mutation transfiziert wurden, zeigten größere und mehr Einschlusskörper als Zellen mit Perry-Syndrom-Mutationen.

Man schloss aus den Untersuchungen eine Pathogenizität der entdeckten Mutationen.

DCTN1-Mutation bei Patienten mit Motorneuronenerkrankung – Puls et al [79]

Puls et al. konnten per Kopplungsanalyse in einer Familie mit einer langsam fortschreitenden Motoneuronenerkrankung, die sich u.a. durch Stimmlippenlähmung und Handmuskelatrophie auszeichnete, DCTN1 als passendes Kandidatengen identifizieren. Die Sequenzanalyse des Gens zeigte einen Basenaustausch an Position 59 (G59S) bei allen betroffenen Familienmitgliedern. Diese Mutation lag im Bereich des CAP-Gly Abschnitts. Kontrollpersonen zeigten diese Mutation nicht. Durch Demonstration der verminderten Mikrotubuli-Affinität der G59S-Variante

konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen der Motoneuronenerkrankung und der identifizierten DCTN1-Mutation angenommen werden.

DCTN1-Mutationen bei Patienten mit ALS und FTD – Münch et al [98][87]

Münch et al. konnten in zwei Studien 5 Mutationen im DCTN1-Gen bei Patienten mit amyotropher Lateralsklerose (ALS) bzw. Frontotemporaler Demenz (FTD) feststellen.

Bei der ALS handelt es sich um eine rasch progrediente degenerative Erkrankung, der eine Degeneration des 1. und 2. motorischen Neurons zugrunde liegt. Der Manifestationsgipfel liegt in der 5. Lebensdekade und Hauptsymptome wie Faszikulationen, atrophische und spastische Paresen sowie bulbäre Symptome charakterisieren das klinische Bild. Die FTD zeichnet sich durch Persönlichkeitsveränderung und Sprachstörung basierend auf einer primär progredienten Frontotemporalallappenatrophie aus.

Folgende missense-Mutationen wurden identifiziert:

Studie	Nukleotidänderung	Aminosäureänderung	Exon	Phenotyp	Geschlecht
2004	C4546T	T1249I	31	V.a. ALS	weiblich
2004	T2512C	M571T	15	ALS	weiblich
2004	C3153T	R785W	20	ALS	männlich
2004	C3153T	R785W	20	ALS	männlich
2005	G4102A	R1101K	27	ALS	männlich
2005	G4102A	R1101K	27	FTD	männlich

Tabelle 29 Überblick identifizierter missense-Mutationen in den Studien von Münch et al. [87][88],

Keine dieser Mutationen konnte bei gesunden Probanden nachgewiesen werden. Sequenzabweichungen der ALS- bzw. FTD-spezifischen Gene Tau und SOD1 wurden ausgeschlossen. Die Arbeitsgruppe schloss aus ihren Ergebnissen auf eine genetische Assoziation zwischen DCTN1 und ALS.

Einordnung der vorliegenden Studie über DCTN1 bei Patienten mit Schizophrenie

Die bis zum aktuellen Zeitpunkt identifizierten Mutationen im Gen DCTN1 konnten mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert werden. Erst die Verbindung zum Perry-Syndrom erweiterte den Kreis der Motoneuronenerkrankung um eine Krankheit mit affektiver Störung. Das Ergebnis unserer Studie hinsichtlich der DCTN1-Schizophrenie-Assoziation anhand von

Polymorphismen blieb negativ. So kann die Schizophrenie bislang nicht direkt in den Kreis der assoziierten Erkrankungen eingefügt werden. Allerdings ist bei der Komplexität der Erkrankung nicht mit einer direkten Verbindung zu einem einzelnen SNP zu rechnen. Die unten beschriebenen Limitationen der Studie können ebenfalls eine Rolle bei der fehlenden Assoziation spielen.

5.2.2 Suszeptibilitätsgene und ihre Assoziation mit Gehirnstrukturveränderungen

Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1)- Takahashi et al. [99]

Takahashi et al. untersuchten 33 Schizophrenie-Patienten und 29 gesunde Kontrollpersonen hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen dem Ser704Cys-DISC1-Genotyp und Gehirnstrukturunterschieden. Träger des Ser704Cys-DISC1-Polymorphismus zeigten bereits in einer früheren Studie ([61]) verminderte Hippokampus-Volumina.

Verschiedene Gehirnareale wiesen in dieser Studie Volumenunterschiede auf.

- *Gyrus frontalis superior med. und Insular-Kortex*: bei gesunden Cys-Allel-Träger größer als bei gesunden Ser/Ser-Allel-Träger
- *Gyrus supramarginalis*: bei Patienten mit dem Cys-Allel kleiner als bei Patienten mit Ser/Ser-Genotyp.

Zusätzlich wiesen die Autoren eine Korrelation zwischen der täglichen Einnahme von Antipsychotika und dem Volumen des *Gyrus frontalis sup. medialis* nach.

Neuregulin 1 (NRG1)- Gruber et al. [100]

Bei 30 Patienten mit Schizophrenie und 52 gesunden Verwandten wurde der sog. Risiko-Haplotyp HAP_{ICE} (bestehend aus 1 SNP und 2 Mikrosatelliten) genotypisiert und der Effekt auf das *Hippokampus-Volumen* bestimmt. Träger des Risiko-Haplotyps, sowohl Patienten als auch gesunde Verwandte, wiesen ein verringertes Volumen auf.

Catechol-O-Methyltransferase (COMT) – Ohnishi et al. [101]

Ohnishi et al. untersuchten in einem japanischen Kollektiv den Einfluss der Val158Met-Variante des COMT-Gens auf die Gehirnstruktur. Die Probanden wurden nach ihrer genotypischen

Ausprägung des Val158Met-Polymorphismus in homozygote Val-COMT-Träger und Met-COMT-Träger (heterozygot und homozygot) unterteilt. Patienten zeigten unabhängig von ihrem Genotyp Volumenreduktionen des parahippokampalen Gyrus, Amygdala-Unterkern, Inselrinde und anterioren Cingulus-Cortex (ACC), linken Thalamus und frontal- sowie temporal-assoziierter Gebiete. Lateraler Ventrikel sowie weitere kleinere Liquorräume waren signifikant vergrößert. Homozygote Val-COMT-Genträger, unabhängig von der Diagnose, hatten u.a. ein signifikant verringertes ACC-Volumen links als Met-COMT-Träger. Dieses Ergebnis wurde auch beim Vergleich zwischen gesunden und kranken homozygoten Val-COMT-Trägern sowie im internen Vergleich zwischen erkrankten homozygoten Val-COMT-Trägern und erkrankten Met-COMT-Trägern bestätigt, hierbei war zusätzlich auch der linke Amygdala-Unterkern reduziert.

Dopamin D3 Rezeptor (DRD3) und brain derived neurotrophic factor (BDNF) - Takahashi et al. [102]

Takahashi et al. verglichen die Länge der adhesio interthalamica (AI) und das Volumen des medialen Temporallappens, bestehend aus Amygdala, Hippokampus und parahippokampalen Gyrus. Dabei war der mögliche Einfluss der genotypischen Ausprägung des DRD3 Ser9Gly - und BDNF Val66Met-Polymorphismus von Interesse. Beide SNPs wiesen eine signifikante Assoziation zur Schizophrenie auf. Zusätzlich konnte bereits ein signifikanter Effekt der Interaktion beider SNPs auf das Ausbruchalter von Schizophrenie-Patienten gezeigt werden. Takahashi et al. unterteilten die Probanden in ihrer Arbeit in Träger des „high-risk“-Genotyps, homozygot für DRD3-9Ser-Allel und Träger des BDNF66Met-Allels, die nachweislich ein höheres Risiko für Schizophrenie tragen sollen, und in „non-high-risk“-Probanden, die jeden anderen Genotyp ausprägten und so ein geringeres Risiko für eine Erkrankung haben sollen. Es konnte kein Effekt der einzelnen SNPs auf die ausgewählten Strukturen festgestellt werden. Es fiel auf, dass gesunde „high-risk“-Probanden kürzere AI zeigten als gesunde „non-high-risk“-Probanden. Zusätzlich zeigten Probanden, unabhängig von der Diagnose, mit dem „high-risk“-Genotyp ein kleineres posteriores Hippokampusvolumen als Probanden ohne diesen Genotyp.

Serotonintransporter (5HTT) und brain derived neurotrophic factor (BDNF) - Dutt et al. [103]

In der Studie von Dutt et al. wurden verschiedene Gehirnareale mit der Konstellation der Gene 5HTT und BDNF verglichen.

Volumina der Hippocampi und Seitenventrikel wurden untersucht. Dabei war eine mögliche Korrelation mit der genotypischen Ausprägung der 5-HTT-Promoterregion und des BDNF Val66Met-Polymorphismus von Interesse.

Es konnte keine Gen-Volumen-Assoziation festgestellt werden. Nur beim Vergleich der Patienten und ihrer Angehörigen mit den unabhängigen Kontrollpersonen wurde eine Volumenminderung festgestellt, die unabhängig vom Genotyp war.

Einordnung der vorliegenden Studie über den DCTN1 – Einfluss auf die Gehirnstruktur

Wie bereits beschrieben, wurden bereits in mehreren Studien verschiedene Kandidatengene der Schizophrenie hinsichtlich eines Genotyp-Volumen-Zusammenhangs untersucht. Dabei wurden entweder bereits bekannte Polymorphismen mit Aminosäureaustausch oder Risikohaplotypen ausgewählt, deren genotypische Ausprägung einen Einfluss auf das Volumen haben sollte.

In unserer Studie wurde der Genotyp-Struktur-Zusammenhang von Dynaktin untersucht. Die identifizierten signifikanten SNPs in der vorliegenden Studie liegen alle im Intron-Bereich. Die beschriebene SNP-Struktur-Korrelation kann so nicht als Folge einer direkten Aminosäuresequenzänderung interpretiert werden. Es ist allerdings möglich, dass ein Kopplungsgleichgewicht zu einem im Exon liegenden SNP besteht. Ebenso liegen die untersuchten SNP nahe der Intron-Exon-Grenze, so dass auch ein Einfluss auf den Splice-Vorgang angenommen werden kann. So könnten die signifikanten SNPs trotz ihrer Lage einen Einfluss auf die entstehende Aminosäuresequenz und damit Proteinfunktionalität haben. Im Weiteren bleibt es abzuwarten, inwiefern Sequenzveränderungen in Introns einen noch weiterreichenden Einfluß auf Proteinexpression und –funktion haben können.

Es konnte zunächst kein Einfluss der Diagnose auf Strukturabweichungen festgestellt werden. Volumina einzelner Areale waren im Vergleich zwischen Patienten und gesunden Probanden nicht unterschiedlich. In Referenzstudien wurden Volumenabweichungen des Hippokampus und der Ventrikel in Abhängigkeit von der Diagnose beschrieben [103], [100], [101], [102]. Es zeigte sich zusätzlich in den Arbeiten von Gruber et al. [100] bzw. Takahashi et al. [102] eine Assoziation des Hippokampusvolumen mit NRG1 bzw. mit dem DRD3-BDNF-Haplotyp. In einer Metaanalyse im Jahr 2008 von Nelson et al [8] konnte bestätigt werden, dass eine Volumenreduktion sowohl des Hippokampus als auch der Amygdala mit der Erkrankung Schizophrenie assoziiert ist. In der vorliegenden Arbeit konnte im Gegensatz dazu keine Korrelation des Hippokampusvolumens oder Amygdalavolumen zu SNP, Haplotypen oder

klinischen Daten festgestellt werden. Der Hippokampus spielt eine entscheidende Rolle im Prozess des Erinnerns. Da unter anderen eine eingeschränkte Aufmerksamkeit, Lang- und Kurzzeitgedächtnis und erschwerte Entscheidungsfindung typische Defizite von Schizophrenie-Patienten sind, also Prozesse, die abhängig vom funktionsfähigen Erinnerungsprozess sind, liegt ein Zusammenhang nahe [104]. Obwohl makroskopisch keine Gen-Volumen-Korrelation für den Hippocampus in der vorliegenden Studie gefunden worden ist, könnte auf zellulärer Ebene ein Geneinfluss vorhanden sein, der in einer zytoarchitektonischen Abweichung resultiert. Veränderte zelluläre Strukturen in post-mortem-Gehirnen von Schizophrenie-Patienten wurden bereits in anderen Studien beschrieben [105][11]. Solche mikroskopischen Abweichungen müssen nicht in makroskopisch wahrnehmbare Volumenreduktionen resultieren. In der vorliegenden Studie wurde das Volumen von Amygdala und Hippokampus getrennt erfasst. In anderen Studien wurden beide Hirnareale als ein Bereich zusammengefasst. Resultierende Volumenunterschiede zwischen gesunden Kontrollen und Patienten können dabei auf einen additiven Effekt basieren [8], der in unserer Studie nicht entstand.

In der Metaanalyse von Wright et al. 2000 [5] konnte gezeigt werden, dass das Gesamtvolumen des Ventrikelsystems bei Patienten mit Schizophrenie größer ist als bei Kontrollprobanden, insbesondere die Seitenventrikel. Volumenveränderung des Ventrikelsystems wird als Ausdruck eines Hirnverlusts interpretiert. Sie ist nicht spezifisch für die Schizophrenie und wird auch im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen beschrieben. Das Ventrikelvolumen der untersuchten Probanden dieser Studie wurde nicht erfasst. Da im Vordergrund unserer Studie die Annahme stand, dass eine Hirnentwicklungsstörung Ursache der Schizophrenie ist und nicht die Neurodegeneration, war die Hirnsubstanz im Fokus der Untersuchung.

Das Volumen des Gehirnareals Cingulus anterior zeigte sowohl in der vorliegenden Studie als auch in Referenzarbeiten eine Assoziation zum Genotyp. In unserer Studie war das Cingulum anterior mit dem Haplotyp 1, dem häufigsten Haplotyp von DCTN1, korreliert. Träger des Haplotyp1 zeigten im Vergleich zu Nicht-Trägern eine Volumenminderung in dieser Region in der Gesamtgruppe und bei den Kontrollen, jedoch nicht in der Patientengruppe. In der Metaanalyse von Baiano et al. [106] konnten Hinweise auf eine Volumenabnahme des Cingulum anterior bei Patienten gefunden werden. Die Arbeit über eine DISC1-Volumen-Korrelation demonstrierte diesen Unterschied auch und präsentierte zusätzlich eine Volumenminderung bei Trägern des Risikogenotyps (alle Probanden wie auch Patienten) [99]. Das Cingulum ist ein funktioneller Bestandteil des limbischen Systems, welches maßgeblich an der Entstehung von Emotionen, Affektverhalten, Gedächtnis und Antrieb beteiligt ist. Der anteriore Gyrus cinguli

spielt hier beim psychomotorischen und lokomotorischen Antrieb sowie bei der Regulation vegetativer Funktionen eine wesentliche Rolle. Ein vermindertes Volumen könnte Ausdruck einer Hypofunktionalität sein oder als Hinweis einer Entwicklungsstörung dieses Areals gewertet werden. Die gefundene Volumendifferenz zwischen Haplotyp1-Trägern und Nichtträgern in dieser Arbeit könnte Hinweis auf einen potentiellen pathologischen Einfluss der genotypischen Ausprägung von DCTN1 sein, der die Entwicklung des Cingulums negativ beeinflussen könnte. Das Cingulum ein wesentliches Schlüsselareal in der Schizophrenieforschung und unterstreicht die Wichtigkeit der beobachteten Korrelation.

In der Metaanalyse von Wright et al. [5] konnte gezeigt werden, dass das relative Volumen der Basalganglien bei Patienten größer war als bei Kontrollen. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass das Vorhandensein vom rs909177-T-Allel offensichtlich mit einem größeren Volumen im Bereich des Pallidums assoziiert ist. Auch das rs740277-T-Allel und rs2268426-A-Allel wurden im Zusammenhang mit einer Pallidum-Volumen-Erhöhung gesehen. Ebenso scheint der Haplotyp 4 und sowie das Fehlen der Haplotypenkombination Haplotyp1/Haplotyp1 mit einem erhöhten Pallidumvolumen korreliert zu sein.

Als weitere Bestandteile der Basalganglien zeigte sich auch im Bereich des Putamen eine Gen-Volumen-Korrelation. Auch in diesem Bereich waren das 909177-T-Allel sowie der Haplotyps 5 mit einem größeren Volumen assoziiert. Die Basalganglien stehen wegen ihrer wichtigen Funktion im Dopamin-Transmitter-System im Fokus der Schizophrenie-Forschung. Vor allem die Wirkung von typischen Neuroleptika als Dopaminantagonisten mit Früh- und Spätdyskinesien sowie einem Parkinsonoid als Nebenwirkung ist in diesem Zusammenhang zu beachten. Es konnte gezeigt werden, dass eine Volumenerhöhung bei Patienten mit einer Typika-Behandlung im Bereich der Basalganglien stattfand [107]. In der vorliegenden Studie sind keine Volumendifferenzen bei Patienten allein festzustellen, sodass ein Medikamenteneinfluss als Störfaktor vernachlässigt werden kann. Dass Nichtträger des rs909177-T-Allels, rs740277-T-Allels und rs2268426-A-Allels im Vergleich zu Probanden mit diesen Allelen kleinere Areale aufwiesen, könnten Zeichen einer Entwicklungsstörung der genannten Strukturen sein, so dass kleinere Volumina resultierten. Vergrößerte Basalganglien könnten Resultat einer verstärkten Stimulation in diesem Bereich sein, der zu einer kompensatorischen Größenzunahme dieses Bereichs führte, wobei nicht klar ist, ob die Neuronenzahl, Synapsendichte o.ä. verändert ist.

In der Metaanalyse von Wright et al. [5] wurde ein kleineres Thalamusvolumen bei Patienten als bei Kontrollen festgestellt. Auch in der COMT-Studie [101] konnte diese Differenz festgestellt

werden, jedoch keine Gen-Volumen-Korrelation. In der vorliegenden Studie konnten die SNPs rs3815241, rs2268426 und der Haplotyp 4 dagegen einen Einfluss auf das Thalamusvolumen zeigen. Der Thalamus ist als Sammelstelle für ankommende Impulse und Umschaltstation zum Großhirn sowie Integrations- und Koordinationsorgan das wichtigste Element für das Bewusstsein. Als möglicher Zusammenhang zwischen Schizophrenie und Thalamusmalfunktion wird eine Minderintegration- und Verarbeitung diskutiert, die Symptome wie Halluzinationen und Ich-Erlebnisstörungen erklären könnten. Ein Volumendefizit könnte Hinweis auf eine Unterfunktion sein.

Wie bereits in der Mehrzahl der Referenzstudien bestätigt, fielen in kortikalen Arealen Assoziationen zwischen Genotyp und Volumen auf. Beispielsweise zeigten Insula und Gyrus frontalis in der DISC1-Studie [99] einen Gen-Volumen-Zusammenhang innerhalb der Kontrollgruppe. Das Gyrus-frontalis-Volumen in dieser Arbeit zeigte eine Korrelation mit mehreren SNPs (rs3825241, rs909177) und Haplotypen (Haplotyp 1, Haplotyp 2 und Haplotypkombinationen Haplotyp 1/1 und 1/2). Inselkortex und Gyrus temporalis zeigten ebenfalls Gen-Volumen-Assoziationen mit dem Haplotyp 1.

Bereits Goldstein et al. [108] demonstrierten Volumendefizite kortikaler Areale bei Patienten, insbesondere des Gyrus frontalis med. und der Insel. Sie argumentieren, dass durch die Rolle der Insel als Integrationsorgan des limbischen Systems sowie die Involvierung in sensorische Funktionen eine Strukturveränderung Hinweis auf eine Abnahme der Verarbeitung sensorischer Stimuli sein könnte. Besonders interessant ist dabei, dass die Insel als Assoziationszentrum für akustisches Denken diskutiert wird. Auch die Lokalisierung des Arbeitsgedächtnisses und exekutiver Funktionen in dem Bereich des Frontallappens geben Anlass, auch kortikale strukturelle Abweichungen bei Probanden in diesen Arealen hervorzuheben. Gemäß dieser Vorstellung könnte die in unserer Arbeit beschriebene kortikale Volumenabnahme, beispielsweise bei Haplotyp-1-Nichtträgern oder rs3815241-A/G-Trägern, Zeichen einer verminderten Funktionalität bzw. Aktivitätsabnahme dieser Areale sein. Eine damit assoziierte Störung der exekutiven Funktionen, wie z.B. Planen und Problemlösen, spielt bei der Schizophrenie eine wesentliche Rolle. In Bezug auf die Inselregion könnte das zur fehlerhaften Verarbeitung akustischer Reize führen, was ganz besonders in der Schizophrenie-Forschung zur Erklärung akustischer Halluzinationen herangezogen werden könnte.

Auffällig bei unserer Arbeit ist, dass im Patienten-Kollektiv keine Gen-Volumen-Assoziation gefunden werden konnte. Es könnte ein Hinweis darauf sein, dass der pathologische Einfluss

von Dynaktin nicht in einer Volumenänderung der untersuchten Areale resultiert sondern den zellulären Aufbau und damit die Funktionalität der Hirnstrukturen verändert. Die beobachteten Volumendifferenzen in der Gesamt- bzw. Kontrollgruppe würden daher die physiologische Dynaktin-Struktur-Regulation aufzeigen, die bei Schizophrenie-Patienten versagt hat. Eine weitere Möglichkeit ist, dass pathologische Mechanismen einsetzen, die den Einfluss von Dynaktin beeinflussen. Es könnten zum Beispiel Interaktionspartner oder andere Proteine hoch- bzw. runterreguliert werden, so dass ein positiver durch Dynaktin ausgelöster Neuronenmigrationsimpuls gestoppt wird bzw. verstärkt wird, was wiederum pathologische Veränderungen bewirken kann, die makroskopisch nicht immer erfasst werden können. Weitere Erklärungsansätze sind mögliche Einflussfaktoren, wie z.B. Medikation. Bereits entstehende Volumenveränderungen werden durch die Wirkung von Psychopharmaka, die insbesondere Wirkung auf die Neurotransmittersysteme und damit beispielsweise auf die Basalganglien haben, beeinflusst. Ebenso können Symptome/Verhaltensweisen, die erst im Verlauf der Krankheit entstehen, z.B. sozialer Rückzug, durch verstärkte bzw. verminderte Stimulation der Hirnareale Strukturveränderungen hervorrufen und damit vorhandene Volumenabweichungen kompensieren.

5.2.3 Interaktion Dynaktin und Lis1

Interaktion zwischen Dynaktin und Lis1 – Smith et al. ([94])

Smith et al. untersuchten die Interaktion zwischen Lis1 und Dynaktin. Zur Überprüfung eines Einflusses der Lis1-Konzentration auf den Dynaktin-Spiegel stellte die Arbeitsgruppe Zellen mit einer Überexpression von Lis1 her. Dafür konstruierten sie rekombinante AdLis1-Adenoviren (mit Lis1 und green fluorescent protein (GFP)) zur Transfektion von nicht-neuronalen Zellen. Zur weiteren Untersuchung von Lis1-Dynaktin-Interaktion wurden außerdem Fibroblasten von Lis1-heterozygoten (Lis1^{+/-}) Mäusen eingesetzt (**Tab. 30**).

	Lis-überexprimierende Zellen (AdLis1)	Lis-unterexprimierende Zellen (Lis1^{+/+})	p150-unterexprimierende Zellen (DCTN1-cKO)	
p150-Konzentration	keine Veränderung der Gesamtexpression	keine Veränderung der Gesamtexpression	keine Veränderung der Gesamtexpression	Lis1-Konzentration
p150-Verteilung	- verstärkt zentrosomale Verteilung - Abnahme der Löslichkeit	weniger starke perinukleäre Verteilung	Fibroblasten: - dezent verstärkte zentrosomale Konzentration	Lis1-Verteilung
Golgiapparat	stärker kondensiert	stärker zerteilt	weniger strukturiert, mehr diffuse Verteilung	Golgiapparat

Tab. 30: Zusammenfassung der Ergebnisse der Studie Smith et al. [94] und Darstellung der Ergebnisse der zellbiologischen Untersuchungen bei DCTN1-cKO-Zellen

DCTN1 – Einfluss auf Lis1 und Zellorganisation

Die Dynaktin-p150-Untereinheit und Lis1 sind Interaktionspartner und spielen eine Rolle im Transport und der Zellmigration. Smith et al. [94] konnten demonstrieren, wie eine Lis1-Konzentrationsabnahme bzw. –zunahme die p150-Verteilung beeinflusst.

Sie zeigten, dass bei einer Zunahme von Lis1 p150 verstärkt zentrosomal konzentriert vorliegt – es kommt zur Aktivierung des Transportprozesses. Sinkt die Lis1-Konzentration, kommt es zur peripheren Verteilung und zur „Down-Regulation“. In unserer Studie konnten wir demonstrieren, dass auch die Konzentration der p150-Untereinheit einen Einfluss auf das Lis1-Gleichgewicht hat. Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass bei einer Abnahme der p150-Untereinheit-Konzentration Lis1 vermehrt perinukleär konzentriert vorkommt. Auch dieses Wechselspiel könnte Ausdruck einer veränderten Transportaktivität sein, bei dem eine verminderte Anzahl aktiver Dynaktin-Komplexe zur Abnahme von axonalen Transportprozessen führt. Die Interaktion mit Lis 1 vermindert sich, so dass Lis1 verstärkt für andere Zellprozesse zur Verfügung steht. Es könnte sich bei der Neuverteilung von Lis1 ebenfalls um eine Reaktion der Zelle handeln, einerseits um verbleibende p150-Untereinheiten zu mobilisieren oder andererseits um noch zu klärende Aufgaben im Transportprozess zu übernehmen und einen Ausfall Dynaktins zu kompensieren. Ein weiteres Indiz eines Einfluss der Lis1- bzw. p150-Untereinheit auf die Zellorganisation ist die strukturelle Veränderung des Golgi-Apparats. Der Golgikomplex fällt in der Arbeit von Smith et al. durch eine diffusere Verteilung der Golgimembranen bei Lis1-Abnahme und stärkerer Kondensation bei Lis1-Zunahme auf. Auch in unserer Arbeit erscheint der Golgikomplex bei p150-Abnahme diffuser verteilt als bei einer normalen p150-Konzentration. Diese Veränderung könnte von einer Aktivitätsabnahme des Komplexes selbst oder Golgi-regulierender Prozesse, z.B. durch Abnahme des axonalen

Transports, zeugen. Unsere Studie konnte bestätigen, dass ein beidseitiges Wechselspiel zwischen Lis1 und Dynaktin, vertreten durch die p150-Untereinheit, besteht.

5.3 Limitationen der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal eine Assoziation zwischen Dynaktin und Schizophrenie untersucht. Die Auswahl dieses Kandidatengens für Schizophrenie erfolgte aufgrund der nachgewiesenen Rolle, die Dynaktin in der Neuronenmigration und damit in der Gehirnentwicklung spielt. Bildgebende Verfahren und pathologische Untersuchungen geben Hinweise auf eine mögliche Gehirnentwicklungsstörung als Ursache für Schizophrenie. Die vorliegende Studie versuchte eine direkte Verbindung zwischen einem pathologisch veränderten axonalen Transport und der Ausprägung einer Schizophrenie nachzuweisen.

Die Auswahl von 7 SNP über 32 Exons und Introns verteilt charakterisiert das Gen DCTN1 nur minimal. Die identifizierten Mutationen in den beschriebenen Referenzstudien liegen hauptsächlich im Bereich des 2. Exons, das die CAP-Gly-Region n-terminal mitkodiert, sowie im Bereich der Exone 13 – 20. Die vorliegende Arbeit kann so keine absolute Aussage über eine mögliche Gen-Diagnose-Korrelation zwischen DCTN1 und Schizophrenie treffen, da nur die Genotypen der betrachteten SNPs auf eine signifikante Verteilung innerhalb des Probandenkollektivs untersucht wurde. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag allerdings auf der Assoziationsanalyse von Haplotypen und nicht auf dem Screening des gesamten Gens. Vor allem für die Untersuchung von Gen-Struktur-Korrelationen war eine Reduktion auf einzelne Polymorphismen sinnvoller. Dafür wurden in der vorliegenden Arbeit nicht nur ein einzelner SNP eingesetzt, sondern die 7 ausgewählten Polymorphismen einzeln, in Kombination als Haplotyp und Haplotypen-Kombinationen untersucht. Der Vorteil dieses Wegs ist die Berücksichtigung von Genabschnitten. Dieses Vorgehen steht im Kontrast zur Risiko-SNP- bzw. Risiko-Haplotypen-Untersuchung in einigen Referenzstudien.

Die Auswahl der untersuchten Gehirnareale erstreckte sich über eine Vielzahl von kortikalen und subkortikalen Strukturen, die in anderen Arbeiten nur zum Teil berücksichtigt wurden. Dieses Vorgehen ermöglicht einerseits das Erfassen bereits assoziierter Strukturen, bietet jedoch andererseits die Möglichkeit, neue Zusammenhänge festzustellen. Für eine vollständigere Aussage über einen Einfluss von DCTN1 auf das Volumen wären zusätzliche Volumenangaben des Ventrikelsystems und des Gesamtvolumens vorteilhaft gewesen, um typische Strukturabweichungen bei Schizophrenie-Patienten überprüfen zu können. Zusätzlich reduziert

sich die Charakterisierung der Gehirnstruktur der Probanden auf Volumenangaben und es liegen daher keine Information über funktionelle Gehirnarealdifferenzen zwischen den einzelnen Probandengruppen vor, wie es z.B. beim Einsatz von fMRT möglich wäre. Aussagen über Veränderungen der Interaktion zwischen Gehirnarealen sowie signifikante Abweichungen der mikroskopischen Struktur können nicht getroffen werden. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Gehirnstruktur ist die Einnahme von Neuroleptika der Patienten. Eine mögliche Korrelation zwischen Volumina der Gehirnareale und der Einnahme von typischen bzw. atypischen Pharmaka wurde nicht untersucht, da keine weiteren Informationen über Einnahmedauer, Konzentration bzw. Compliance vorlagen.

Die vorliegende Arbeit ist eine Fall-Kontroll-Studie, deren Probanden in keinem verwandtschaftlichen Verhältnis stehen. Dieses Vorgehen entspricht der am häufigsten eingesetzten Methode in Studien zu Gen-Struktur-Korrelationen. Mit 110 eingeschlossenen Probanden liegt diese Studie im Mittelfeld der vergleichbaren Gen-Volumen-Untersuchungen. Probanden mit einer nachgewiesenen nicht-kaucasischen Herkunft wurden aus der Studie ausgeschlossen, um eine Homogenität zu erreichen. Nur in der Patientengruppe wurde eine Alter-Geschlecht-Assoziation festgestellt: männliche Patienten waren signifikant älter als weibliche. Da keine wesentlichen Gen-Volumen-Korrelationen in dieser Gruppe festgestellt worden sind, ist diese Korrelation kein wesentlicher Störfaktor. Als weiteren Einflussfaktor wirkt die Geschlechterverteilung. Es gab insgesamt weniger Frauen als Männer. Außerdem konnte ein Einfluss des Geschlechts auf die Gehirnvolumina festgestellt werden. Folgende Areale, die eine Gen-Volumen-Korrelation zeigten, waren bei männlichen Probanden größer als bei den weiblichen Probanden: Gyrus frontalis med., Gyrus temporalis, Insula, Cingulum, Ncl. Caudatus. Die Volumina der weiteren auffälligen Areale Pallidum rechts und links, Putamen rechts und links sowie Thalamus rechts und links zeigten keine Assoziation zum Geschlecht. Bei Berücksichtigung des Geschlechtseinflusses kann in der Gesamtgruppe kein signifikanter Volumenunterschied mehr im Bereich des linken Precuneus zwischen Trägern und Nichtträgern des Haplotyp1 festgestellt werden, alle anderen Ergebnisse blieben unverändert.

Ein Problem stellt die Analyse von Bildgebungsdaten mit genetischen Befunden hinsichtlich des multiplen Testens dar. Vor allem zur Untersuchung einer Gen-Struktur-Korrelation wurden die SNPs, Haplotypen und Haplotypkombinationen einzeln überprüft. Durch die Vielzahl an Tests können falsch positive Ergebnisse entstehen.

Ein Erklärungsansatz für die Genese der Schizophrenie ist die Multifaktorialität und auch Polygenität der Erkrankung. Es stehen mehrere Faktoren unter dem Verdacht, Schizophrenie mit zu verursachen. Es besteht ebenfalls die Vermutung, dass mehrere Gene mit kleinen Effekten zur

Genese von Schizophrenie beitragen. Es kann auch eine Interaktion zwischen Genen Einfluss haben, bei der ein pathologisch veränderter Partner die Wirkung des anderen einschränkt oder sogar verhindert. In der durchgeführten Studie wurde Lis 1 als beispielhafter Interaktionspartner von Dynaktin ausgewählt. Der Vorteil der Lis1-Auswahl war die bekannte Involvierung in Neuronenmigration und die Erkrankung Lissenzephalie als Folge einer Mutation. Die Ähnlichkeit der strukturellen Gehirnveränderungen bei Lissenzephalie-Patienten, wie z.B. Ventrikelerweiterung, mit den beobachteten strukturellen Veränderungen bei Schizophrenie-Patienten spricht ebenfalls für die gezielte Untersuchung einer Interaktion.

Insgesamt wird in der vorliegenden Arbeit zwar deutlich, dass die Verminderung der p150-Untereinheit die Zellorganisation nicht vollständig und schwerwiegend verändert bzw. zum Funktionsverlust der Zelle führt, wie man erwarten würde, wenn die Rolle eines funktionstüchtigen Dynaktinkomplex im axonalen Transport betrachtet wird. Andererseits spricht auch gegen eine schwerwiegende Veränderung des Systems, dass der überwiegende Teil der schizophrenen Patienten bis zum Ausbruch der Krankheit klinisch unauffällig bleiben.

Mit dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, eine pathologische Zellmigration, verursacht durch genetische Varianten von DCTN1 als möglichen Erklärungsansatz für die Ätiogenese der Schizophrenie darzustellen. Weitere Untersuchungen müssen unternommen werden, um eine direkte Assoziation nachweisen zu können.

5.4 Ausblick

Es spricht dafür, DCTN1 in die Gruppe der Kandidatengene für Schizophrenie aufzunehmen, da es gelungen ist

- eine Volumen-DCTN1-Korrelation zu identifizieren, die Schizophrenie-typische Gehirnareale betrifft.
- Zellveränderungen festzustellen, die durch Expressionsverminderung von p150 hervorgerufen worden sind und Hinweise auf eine Fehlfunktion des axonalen Transports geben.
- die Wechselwirkung zwischen Lis1, einem weiteren in den Prozess der Neuronenmigration involvierten Proteins, und der p150-Untereinheit von Dynaktin zu bestätigen.

Zur vollständigen Klärung eines Zusammenhangs zwischen DCTN1 und der Ausprägung einer Schizophrenie ist es nötig, die SNP-Auswahl auf die bekannten Mutationen zu erweitern sowie auf kodierende Abschnitte zu konzentrieren, um so zusätzliche Hinweise zu erhalten. Noch weiterführender könnte die komplette Sequenzierung von DCTN1 sein. Zusätzlich wäre die Ausweitung dieser Sequenzierung auf Lis1 vorteilhaft, um einerseits auch dieses Gen auf eine Assoziation zu überprüfen und andererseits Interaktionen zwischen beiden Genen und deren Einfluss auf die Diagnose Schizophrenie zu untersuchen. Auch andere Interaktionspartner wie Dynein, NudC, Kinesin II oder DISC1 als schon bekannte Kandidatengen für Schizophrenie wären Kandidaten, um einen Einfluss der DCTN1-Expression zu überprüfen. Besonders interessant wäre eine Sequenzierung des DCTN1-Gens wie auch eine Expressionsstudie bei den beiden Patienten mit der deutlichen Gen-Volumen-Korrelation (Vgl. rs2268426 und Haplotyp 4 bzw. Haplotyp 7), da hier eine fehlerhafte Expression von Dynaktin eine mögliche Ursache für die Ausprägung der Schizophrenie sein könnte. Ein weiterer Schritt, um den Einfluss Dynaktins oder auch Lis1 einzuschätzen, wäre eine Expressionsanalyse in postmortem-Materialien von Patienten. So könnten nachweislich veränderte Strukturen bei Schizophrenie-Patienten direkt auf eine Minderexpression bzw. Überexpression untersucht werden. Auf diese Weise wäre die Verbindung zwischen molekulargenetischer Ebene, Zellebene und makroskopisch-klinischer Ebene noch besser verbunden, wie es bereits in dieser Arbeit demonstriert worden ist.

Eine Vergrößerung der Fall-Kontroll-Gruppe sowie die Erweiterung der Volumetriedaten um Ventrikelvolumen und Gesamtvolumen sind zusätzliche mögliche Studiendesignänderungen. Vor allem zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse aufgrund des multiplen Testens sollten die signifikanten Resultate anhand eines unabhängigen neuen Probandenkollektivs überprüft werden. Des Weiteren bietet es sich an, statistische Analyseverfahren, die in den letzten Jahren zur Minimierung des multiplen Testens entwickelt worden sind, einzusetzen.

Es konnten Veränderungen beobachtet werden, die eine Neuordnung der Lis1-Moleküle und eine Veränderung des Golgikomplex zeigten, deren Konsequenz in weiteren Experimenten geklärt werden muss. Zellüberlebenszeit, Zellstabilität, Zellreproduktionsrate und Zellmigration wären wichtige Vergleichsparameter zwischen p150-verminderten Zellen und Wildtyp-Zellen. Interessant wäre auch der Versuch, p150-überexpremierende Zellmodelle zu entwickeln, um eventuelle Folgen in der Zelle zu beobachten und mit den bekannten Veränderungen zu vergleichen. Weiterhin wäre auch die in-vivo-Behandlung Cre-positiver Mäuse mit Tamoxifen und die Analyse der Gehirne postmortem in Hinsicht auf Volumenverminderung bzw. Veränderung ein weiterer Schritt, um die mögliche pathologische Folge eines p150-Ausfalls einschätzen zu können. Dabei könnte man besonders die Gehirnareale betrachten, die in der

vorliegenden Studie und in anderen Schizophrenie-Arbeiten auffällige Kontroll-Patienten-Differenzen aufzeigten.

Es ist sinnvoll, zur weiteren Klärung der Ätiopathogenese der Schizophrenie Gene und Proteine, die eine Rolle in der Neuronenmigration spielen, zu analysieren, um eine mögliche Kausalkette zu präsentieren. Das Ziel einer Frühdiagnostik durch z.B. Screeningverfahren und die Verbesserung der Behandlung kann nur durch Fortführung der Schizophrenieforschung und die Identifikation weiterer Risikogene erreicht werden.

VI Zusammenfassung

Schizophrenie ist eine psychiatrische Erkrankung aus dem Formenkreis der endogenen Psychosen, die ca. 1% der Weltbevölkerung betrifft. Zur Klärung der Ätiopathogenese müssen sowohl epidemiologische als auch genetische Faktoren betrachtet werden. In verschiedenen Studien konnten für die Schizophrenie typische strukturelle Gehirnveränderungen beschrieben werden, die sowohl kortikale als auch subkortikale Areale betreffen. Mehrere Kandidatengene waren ebenfalls mit dem Auftreten von Schizophrenie assoziiert, z.B. DISC-1 oder NRG1.

In der vorliegenden Studie wurde zum ersten Mal versucht, eine Assoziation zwischen dem Mikrotubuli- bindenden Proteinkomplex Dynaktin, u.a. kodiert durch DCTN1, und Schizophrenie zu finden. Dafür standen uns sowohl DNA-Proben als auch Gehirnvolumetrie-Daten von 135 Patienten und Kontrollen zur Verfügung. Durch die Genotypisierung von 7 SNPs im Verlauf des Gens DCTN1 und die Erstellung von Haplotypen konnte eine Korrelation zwischen Genotyp und Volumenausprägung verschiedener Gehirnareale untersucht werden. Zusätzlich wurde die Konsequenz einer verminderten DCTN1-Expression auf Zellorganellen und Expression des Partnerproteins Lis1 in einem Zellmodell betrachtet. Lis1 als wichtiges Protein der neuronalen Migration, das im Zusammenhang mit der klassischen Lissenzephalie, einer Hirnentwicklungsstörung, steht, ist vor allem in Hinsicht auf seine potentielle Rolle als Interaktionspartner im Mikrotubuli-assoziierten Transportprozess von Interesse.

Es konnte zwar keine Assoziation zwischen dem Gens DCTN1 und der Ausprägung der Krankheit gefunden werden, doch zeigte sich bei der Analyse der Bildgebungsdaten eine Gen-Volumen-Korrelation im Bereich verschiedener Gehirnareale, welche bereits in früheren Studien als auffällig bei schizophrenen Patienten beschrieben wurden. Insbesondere ein Haplotyp zeigte zu mehreren Gehirnarealen eine Assoziation. Probanden, die diesen Haplotyp nicht trugen, wiesen signifikant größere Gehirnareale auf als Probanden, die heterozygote oder homozygote Träger waren. In einem in vitro-Modell konnte zudem gezeigt werden, dass das Ausschalten des Gens DCTN1 zu einer Strukturveränderung des Golgi-Apparats führte. Die Expression weiterer Untereinheiten des Dynaktin-Komplexes und des Interaktionspartners Lis1 blieb nach der Inaktivierung von DCTN1 unverändert.

Diese Arbeit unterstreicht die potentielle Rolle Dynaktins in der Zellorganisation und Gehirnentwicklung. Weitere Untersuchungen müssen folgen, um die Rolle dieses Kandidatengens für Schizophrenie genauer zu untersuchen.

VII Abkürzungen und Fachbegriffe

5-HTT	Serotonin
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABI	Applied Biosystems™
ACC	anteriorer cingulärer Cortex
AdLis1	rekombinantes Adenovirus mit Lis1
AI	adhesio interthalamica
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	analysis of variance
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Arp	actin-related protein 1
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
Bp	Basenpaar
C oder c	Cytosin
CA	Kalifornien
CAP-Gly	cytoskeleton associated protein, glycine-rich
CapZ	conventional actin-capping protein
CGI	Clinical Global Impression Score
cKO	conditional Knock-out
CLIP-170	cytoplasmic linker protein 170
COMT	Catechyl-O-Methyltransferase
Cre	causes recombination
Cys	Cystein
DAT	Dopamine transporter
DCTN1	Dynaktin 1
DISC-1	Disrupted in schizophrenia 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	DNS, Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRD1	Dopaminrezeptor D 1
DRD2	Dopaminrezeptor D 2
DRD3	Dopaminrezeptor D 3
DRD4	Dopaminrezeptor D 4
ds-DNA	Doppelstrang-DNA
DSM	Diagnostic and Statistical Manual
DTBPN1	Dysbindin
EB-1	Ankyrin repeat and sterile alpha motif domain-containing protein 1B
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-ethynyl-2' -deoxyuridine
FISH	Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung
fMRT	funktionelle Magnetresonanztumogrphie
FTD	frontotemporale Demenz

G oder g	Guanin
G59S	Basenaustausch von Glycin durch Serin an Position 59
GFP	green fluorescent protein
GRM3	Glutamat Rezeptor
HAP-1	Huntingtin-associated Protein 1
HAP _{ICE}	Haplotyp, erstmals in einer isländischen Population beschrieben wurde
heteroz.	heterozygot
homoz.	homozygot
ICD	international classification of diseases
inf.	inferior
KY	Kentucky
Lis 1	Lissencephaly 1
LoxP	locus of X- over P1
med.	medius
Met	Methionin
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztumographie
MS	Missouri
NCBI	National center for Biotechnology Information
Ncl.	Nucleus
NEB	New England Biolabs®
NRG1	Neuregulin 1
NUDC	Nuclear distribution gene C
orb.	orbitalis
p.p.	post partum
PAF	platelet-activating-factor
PANSS	Positive and Negative Syndrome Scale
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET	Positronenemissionstumographie
rekr.	rekrutiert
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
Ser	Serin
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SOD1	superoxide dismutase
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
ss-DNA	single strang DNA
sup.	superior
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
UCSC	University of California, Santa Cruz
UK	United Kingdom

V.a. Verdacht auf
Val Valin
WHO world health organization

VIII Literaturverzeichnis

1. Andreasen NC, O'Leary DS, Flaum M, et al. Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naïve patients. *Lancet*. 1997 Jun 14;349(9067):1730-4.
2. Okubo Y, Suhara T, Suzuki K, et al. Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature*. 1997 Feb 13;385(6617):634-6.
3. Lawrie SM, Whalley H, Kestelman JN, et al. Magnetic resonance imaging of brain in people at high risk of developing schizophrenia. *Lancet*. 1999 Jan 2;353(9146):30-3.
4. Johnstone EC, Crow TJ, Frith CD, Husband J, Kreel L. Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet*. 1976 Oct 30;2(7992):924-6.
5. Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff PW, David AS, Murray RM, Bullmore ET. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2000 Jan;157(1):16-25.
6. Suddath RL, Christison GW, Torrey EF, Casanova MF, Weinberger DR. Anatomical abnormalities in the brains of monozygotic twins discordant for schizophrenia. *N Engl J Med*. 1990 Mar 22;322(12):789-94.
7. Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2001 Apr 15;49(1-2):1-52.
8. Nelson MD, Saykin AJ, Flashman LA, Riordan HJ. Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study. *Arch Gen Psychiatry*. 1998 May;55(5):433-40.
9. Velakoulis D, Pantelis C, McGorry PD, et al. Hippocampal volume in first-episode psychoses and chronic schizophrenia: a high-resolution magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry*. 1999 Feb;56(2):133-41.
10. Andreasen NC, Arndt S, Swayze V, et al. Thalamic abnormalities in schizophrenia visualized through magnetic resonance image averaging. *Science*. 1994 Oct 14;266(5183):294-8.
11. Conrad AJ, Abebe T, Austin R, Forsythe S, Scheibel AB. Hippocampal pyramidal cell disarray in schizophrenia as a bilateral phenomenon. *Arch Gen Psychiatry*. 1991 May;48(5):413-7.
12. Arnold SE, Ruschinsky DD, Han LY. Further evidence of abnormal cytoarchitecture of the entorhinal cortex in schizophrenia using spatial point pattern analyses. *Biol Psychiatry*. 1997 Oct 15;42(8):639-47.
13. Jönsson SA, Luts A, Guldberg-Kjaer N, Brun A. Hippocampal pyramidal cell disarray correlates negatively to cell number: implications for the pathogenesis of schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 1997;247(3):120-7.

14. Zaidel DW, Esiri MM, Harrison PJ. Size, shape, and orientation of neurons in the left and right hippocampus: investigation of normal asymmetries and alterations in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1997 Jun;154(6):812-8.
15. Bernstein HG, Krell D, Baumann B, et al. Morphometric studies of the entorhinal cortex in neuropsychiatric patients and controls: clusters of heterotopically displaced lamina II neurons are not indicative of schizophrenia. *Schizophr Res*. 1998 Oct 9;33(3):125-32.
16. Heckers S, Heinsen H, Geiger B, Beckmann H. Hippocampal neuron number in schizophrenia. A stereological study. *Arch Gen Psychiatry*. 1991 Nov;48(11):1002-8.
17. Harrison PJ, Eastwood SL. Neuropathological studies of synaptic connectivity in the hippocampal formation in schizophrenia. *Hippocampus*. 2001;11(5):508-19.
18. Young KA, Manaye KF, Liang C, Hicks PB, German DC. Reduced number of mediodorsal and anterior thalamic neurons in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2000 Jun 1;47(11):944-53.
19. Penner JD, Brown AS. Prenatal infectious and nutritional factors and risk of adult schizophrenia. *Expert Rev Neurother*. 2007 Jul;7(7):797-805.
20. Khashan AS, Abel KM, McNamee R, et al. Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Arch Gen Psychiatry*. 2008 Feb;65(2):146-52.
21. Byrne M, Agerbo E, Bennedsen B, Eaton WW, Mortensen PB. Obstetric conditions and risk of first admission with schizophrenia: a Danish national register based study. *Schizophr Res*. 2007 Dec;97(1-3):51-9.
22. Davies G, Welham J, Chant D, Torrey EF, McGrath J. A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2003;29(3):587-93.
23. Morgan C, Fisher H. Environment and schizophrenia: environmental factors in schizophrenia: childhood trauma--a critical review. *Schizophr Bull*. 2007 Jan;33(1):3-10.
24. David AS, Prince M. Psychosis following head injury: a critical review. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005 Mar;76 Suppl 1:i53-60.
25. Morgan C, Kirkbride J, Leff J, et al. Parental separation, loss and psychosis in different ethnic groups: a case-control study. *Psychol Med*. 2007 Apr;37(4):495-503.
26. Tienari P, Wynne LC, Sorri A, et al. Genotype-environment interaction in schizophrenia-spectrum disorder. Long-term follow-up study of Finnish adoptees. *Br J Psychiatry*. 2004 Mar;184:216-22.
27. Moore THM, Zammit S, Lingford-Hughes A, et al. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. *Lancet*. 2007 Jul 28;370(9584):319-28.

28. Semple DM, McIntosh AM, Lawrie SM. Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review. *J Psychopharmacol*. 2005 Mar;19(2):187-94.
29. Barnes TRE, Mutsatsa SH, Hutton SB, Watt HC, Joyce EM. Comorbid substance use and age at onset of schizophrenia. *Br J Psychiatry*. 2006 Mar;188:237-42.
30. Lewis G, David A, Andréasson S, Allebeck P. Schizophrenia and city life. *Lancet*. 1992 Jul 18;340(8812):137-40.
31. Pedersen CB, Mortensen PB. Evidence of a dose-response relationship between urbanicity during upbringing and schizophrenia risk. *Arch Gen Psychiatry*. 2001 Nov;58(11):1039-46.
32. Mortensen PB, Pedersen CB, Westergaard T, et al. Effects of family history and place and season of birth on the risk of schizophrenia. *N Engl J Med*. 1999 Feb 25;340(8):603-8.
33. Dohrenwend BP, Levav I, ShROUT PE, et al. Socioeconomic status and psychiatric disorders: the causation-selection issue. *Science*. 1992 Feb 21;255(5047):946-52.
34. Cantor-Graae E, Selten J. Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *Am J Psychiatry*. 2005 Jan;162(1):12-24.
35. Aleman A, Kahn RS, Selten J. Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry*. 2003 Jun;60(6):565-71.
36. McGrath J, Saha S, Welham J, El Saadi O, MacCauley C, Chant D. A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology. *BMC Med*. 2004 Apr 28;2:13.
37. ROSENTHAL D, WENDER PH, KETY SS, WELNER J, SCHULSINGER F. The Adopted-Away Offspring of Schizophrenics. *Am J Psychiatry*. 1971 Sep 1;128(3):307-311.
38. Kety SS. Schizophrenic illness in the families of schizophrenic adoptees: findings from the Danish national sample. *Schizophr Bull*. 1988;14(2):217-222.
39. Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry*. 2003 Dec;60(12):1187-92.
40. Kendler KS, Gardner CO. The risk for psychiatric disorders in relatives of schizophrenic and control probands: a comparison of three independent studies. *Psychol Med*. 1997 Mar;27(2):411-419.
41. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*. 1989 Mar;44(3):388-96.
42. Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology. *Schizophr Res*. 2008 Jul;102(1-3):1-18.
43. Badner JA, Gershon ES. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2002;7(4):405-11.

44. Lewis CM, Levinson DF, Wise LH, et al. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet.* 2003 Jul;73(1):34-48.
45. Allen NC, Bagade S, McQueen MB, et al. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet.* 2008 Jul;40(7):827-34.
46. Schindler KM, Pato MT, Dourado A, et al. Association and linkage disequilibrium between a functional polymorphism of the dopamine-2 receptor gene and schizophrenia in a genetically homogeneous Portuguese population. *Mol Psychiatry.* 2002;7(9):1002-5.
47. Arinami T, Gao M, Hamaguchi H, Toru M. A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 1997 Apr;6(4):577-82.
48. Jönsson EG, Nöthen MM, Neidt H, et al. Association between a promoter polymorphism in the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia. *Schizophr Res.* 1999 Nov 9;40(1):31-6.
49. Crocq MA, Mant R, Asherson P, et al. Association between schizophrenia and homozygosity at the dopamine D3 receptor gene. *J Med Genet.* 1992 Dec;29(12):858-60.
50. Nakajima M, Hattori E, Yamada K, et al. Association and synergistic interaction between promoter variants of the DRD4 gene in Japanese schizophrenics. *J Hum Genet.* 2007;52(1):86-91.
51. Shifman S, Bronstein M, Sternfeld M, et al. A highly significant association between a COMT haplotype and schizophrenia. *Am. J. Hum. Genet.* 2002 Dec;71(6):1296-1302.
52. Talkowski ME, Kirov G, Bamne M, et al. A network of dopaminergic gene variations implicated as risk factors for schizophrenia. *Hum Mol Genet.* 2008 Mar 1;17(5):747-58.
53. Inayama Y, Yoneda H, Sakai T, et al. Positive association between a DNA sequence variant in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia. *Am J Med Genet.* 1996 Feb 16;67(1):103-5.
54. Williams J, McGuffin P, Nöthen M, Owen MJ. Meta-analysis of association between the 5-HT2a receptor T102C polymorphism and schizophrenia. EMASS Collaborative Group. European Multicentre Association Study of Schizophrenia. *Lancet.* 1997 Apr 26;349(9060):1221.
55. Schwab SG, Plummer C, Albus M, et al. DNA sequence variants in the metabotropic glutamate receptor 3 and risk to schizophrenia: an association study. *Psychiatr Genet.* 2008 Feb;18(1):25-30.
56. Norton N, Williams HJ, Dwyer S, et al. No evidence for association between polymorphisms in GRM3 and schizophrenia. *BMC Psychiatry.* 2005;5:23.
57. Fujii Y, Shibata H, Kikuta R, et al. Positive associations of polymorphisms in the metabotropic glutamate receptor type 3 gene (GRM3) with schizophrenia. *Psychiatr Genet.* 2003 Jun;13(2):71-6.

58. St Clair D, Blackwood D, Muir W, et al. Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. *Lancet*. 1990 Jul 7;336(8706):13-6.
59. Hennah W, Varilo T, Kestilä M, et al. Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects. *Hum Mol Genet*. 2003 Dec 1;12(23):3151-9.
60. Chubb JE, Bradshaw NJ, Soares DC, Porteous DJ, Millar JK. The DISC locus in psychiatric illness. *Mol Psychiatry*. 2008 Jan;13(1):36-64.
61. Callicott JH, Straub RE, Pezawas L, et al. Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 14;102(24):8627-32.
62. Mei L, Xiong W. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Jun;9(6):437-52.
63. Walss-Bass C, Liu W, Lew DF, et al. A novel missense mutation in the transmembrane domain of neuregulin 1 is associated with schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 2006 Sep 15;60(6):548-53.
64. Weickert CS, Straub RE, McClintock BW, et al. Human dysbindin (DTNBP1) gene expression in normal brain and in schizophrenic prefrontal cortex and midbrain. *Arch Gen Psychiatry*. 2004 Jun;61(6):544-55.
65. Duan J, Martinez M, Sanders AR, et al. DTNBP1 (Dystrobrevin binding protein 1) and schizophrenia: association evidence in the 3' end of the gene. *Hum Hered*. 2007;64(2):97-106.
66. Li D, He L. Association study between the dystrobrevin binding protein 1 gene (DTNBP1) and schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res*. 2007 Nov;96(1-3):112-8.
67. Schroer TA. Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:759-79.
68. Bingham JB, Schroer TA. Self-regulated polymerization of the actin-related protein Arp1. *Curr Biol*. 1999 Feb 25;9(4):223-6.
69. Eckley DM, Gill SR, Melkonian KA, et al. Analysis of dynactin subcomplexes reveals a novel actin-related protein associated with the arp1 minifilament pointed end. *J Cell Biol*. 1999 Oct 18;147(2):307-20.
70. Karki S, LaMonte B, Holzbaur EL. Characterization of the p22 subunit of dynactin reveals the localization of cytoplasmic dynein and dynactin to the midbody of dividing cells. *J Cell Biol*. 1998 Aug 24;142(4):1023-34.
71. Yue L, Lu S, Garces J, Jin T, Li J. Protein kinase C-regulated dynamitin-macrophage-enriched myristoylated alanine-rich C kinase substrate interaction is involved in macrophage cell spreading. *J Biol Chem*. 2000 Aug 4;275(31):23948-56.

72. Starr DA, Williams BC, Hays TS, Goldberg ML. ZW10 helps recruit dynactin and dynein to the kinetochore. *J Cell Biol.* 1998 Aug 10;142(3):763-74.
73. Hoogenraad CC, Akhmanova A, Howell SA, et al. Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes. *EMBO J.* 2001 Aug 1;20(15):4041-54.
74. Holzbaur EL, Tokito MK. Localization of the DCTN1 gene encoding p150Glued to human chromosome 2p13 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 1996 Feb 1;31(3):398-9.
75. Vaughan PS, Miura P, Henderson M, Byrne B, Vaughan KT. A role for regulated binding of p150(Glued) to microtubule plus ends in organelle transport. *J Cell Biol.* 2002 Jul 22;158(2):305-19.
76. Quintyne NJ, Schroer TA. Distinct cell cycle-dependent roles for dynactin and dynein at centrosomes. *J Cell Biol.* 2002 Oct 28;159(2):245-54.
77. Gaglio T, Dionne MA, Compton DA. Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. *J Cell Biol.* 1997 Sep 8;138(5):1055-66.
78. Berrueta L, Tirnauer JS, Schuyler SC, Pellman D, Bierer BE. The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain. *Curr Biol.* 1999 Apr 22;9(8):425-8.
79. Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, et al. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat. Genet.* 2003 Apr;33(4):455-456.
80. Deacon SW, Serpinskaya AS, Vaughan PS, et al. Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J Cell Biol.* 2003 Feb 3;160(3):297-301.
81. Li SH, Gutekunst CA, Hersch SM, Li XJ. Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued. *J Neurosci.* 1998 Feb 15;18(4):1261-9.
82. Schliwa M, Woehlke G. Molecular motors. *Nature.* 2003 Apr 17;422(6933):759-765.
83. Levy JR, Holzbaur ELF. Cytoplasmic dynein/dynactin function and dysfunction in motor neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2006 May;24(2-3):103-111.
84. Dujardin DL, Vallee RB. Dynein at the cortex. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Feb;14(1):44-9.
85. Abe TK, Honda T, Takei K, et al. Dynactin is essential for growth cone advance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Aug 1;372(3):418-22.
86. Hubbard TJP, Aken BL, Ayling S, et al. Ensembl 2009. *Nucl. Acids Res.* 2009 Jan 1;37(suppl_1):D690-697.
87. Münch C, Sedlmeier R, Meyer T, et al. Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology.* 2004 Aug 24;63(4):724-6.

88. Münch C, Rosenbohm A, Sperfeld A, et al. Heterozygous R1101K mutation of the DCTN1 gene in a family with ALS and FTD. *Ann Neurol*. 2005 Nov;58(5):777-80.
89. Lai C, Lin X, Chandran J, Shim H, Yang W, Cai H. The G59S mutation in p150(glued) causes dysfunction of dynactin in mice. *J Neurosci*. 2007 Dec 19;27(51):13982-90.
90. Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, et al. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature*. 1993 Aug 19;364(6439):717-21.
91. Hirotsumi S, Fleck MW, Gambello MJ, et al. Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet*. 1998 Aug;19(4):333-9.
92. Faulkner NE, Dujardin DL, Tai CY, et al. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol*. 2000 Nov;2(11):784-91.
93. Dujardin DL, Barnhart LE, Stehman SA, Gomes ER, Gundersen GG, Vallee RB. A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J. Cell Biol*. 2003 Dec 22;163(6):1205-1211.
94. Smith DS, Niethammer M, Ayala R, et al. Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat Cell Biol*. 2000 Nov;2(11):767-75.
95. Wikimedia Commons contributors. Page name: File:Pcr.png . [cited 2009 Dec 2]; Available from: <http://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Pcr.png&oldid=27465414>
96. Lai C, Lin X, Chandran J, Shim H, Yang W, Cai H. The G59S Mutation in p150glued Causes Dysfunction of Dynactin in Mice. *J Neurosci*. . 2007 Dec 19;27(51):13982–13990.
97. Farrer MJ, Hulihan MM, Kachergus JM, et al. DCTN1 mutations in Perry syndrome. *Nat. Genet*. 2009 Feb;41(2):163-165.
98. Münch C, Meyer R, Linke P, et al. The p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand*. 2007 Oct;116(4):231-234.
99. Takahashi T, Suzuki M, Tsunoda M, et al. The Disrupted-in-Schizophrenia-1 Ser704Cys polymorphism and brain morphology in schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2009 May 15;172(2):128-135.
100. Gruber O, Falkai P, Schneider-Axmann T, Schwab SG, Wagner M, Maier W. Neuregulin-1 haplotype HAP(ICE) is associated with lower hippocampal volumes in schizophrenic patients and in non-affected family members. *J Psychiatr Res*. 2008 Nov;43(1):1-6.
101. Ohnishi T, Hashimoto R, Mori T, et al. The association between the Val158Met polymorphism of the catechol-O-methyl transferase gene and morphological abnormalities of the brain in chronic schizophrenia. *Brain*. 2006 Feb;129(Pt 2):399-410.
102. Takahashi T, Suzuki M, Tsunoda M, et al. The association of genotypic combination of the DRD3 and BDNF polymorphisms on the adhesio interthalamica and medial temporal lobe structures. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2008 Jul 1;32(5):1236-1242.

103. Dutt A, McDonald C, Dempster E, et al. The effect of COMT, BDNF, 5-HTT, NRG1 and DTNBP1 genes on hippocampal and lateral ventricular volume in psychosis. *Psychol Med.* 2009 Jul 2;:1-15.
104. Hill SK, Beers SR, Kmiec JA, Keshavan MS, Sweeney JA. Impairment of verbal memory and learning in antipsychotic-naïve patients with first-episode schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2004 Jun 1;68(2-3):127-136.
105. Jeste DV, Lohr JB. Hippocampal Pathologic Findings in Schizophrenia: A Morphometric Study. *Arch Gen Psychiatry.* 1989 Nov 1;46(11):1019-1024.
106. Baiano M, David A, Versace A, Churchill R, Balestrieri M, Brambilla P. Anterior cingulate volumes in schizophrenia: a systematic review and a meta-analysis of MRI studies. *Schizophr. Res.* 2007 Jul;93(1-3):1-12.
107. Chakos MH, Lieberman JA, Bilder RM, et al. Increase in caudate nuclei volumes of first-episode schizophrenic patients taking antipsychotic drugs. *Am J Psychiatry.* 1994 Oct;151(10):1430-1436.
108. Goldstein JM, Goodman JM, Seidman LJ, et al. Cortical abnormalities in schizophrenia identified by structural magnetic resonance imaging. *Arch. Gen. Psychiatry.* 1999 Jun;56(6):537-547.

IX Danksagung

Diese Arbeit wurde durch eine studentische Forschungsförderung der Charite, Berlin und einem Stipendium des DAAD unterstützt.

Sie wurde in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Charite Campus Mitte und am National Institutes of Health (NIH), Bethesda (USA) durchgeführt.

Ich danke ganz besonders Frau Prof. Dr. med. Imke Puls, Dr. rer. nat. Werner Kitzrow, Sarina Richter und natürlich Claudia Liensdorf für ihre Unterstützung und Motivation zu jedem Zeitpunkt.

MD Kenneth Fischbeck, PhD Huaibin Cai und PhD Chen Lai waren mir am NIH eine nicht ersetzbare Hilfe. Ich danke ihnen für ihre Geduld, Zeit und finanzielle Unterstützung, die sie in mich investiert haben.

Mein besonderer Dank geht an meine Familie und Stefan, die in der gesamten Zeit ohne Einschränkung für mich da waren.

X Selbstständigkeitserklärung

Erklärung

„Ich, Katja Grabowski, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle von Dynaktin 1 (DCTN1) bei der Pathogenese schizophrener Erkrankungen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

XI Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.