

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. V. Arolt -**

**Genomische Charakterisierung,
systematisches Mutationsscreening und
Assoziationsstudie des CREM Gens
bei Patienten mit Panikstörung**

**INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

vorgelegt von
Katharina Domschke
aus Erlangen

- 2004 -

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. J. Deckert

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. F. Stögbauer

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Dezember 2004

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. V. Arolt -
Referent: Priv.-Doz. Dr. J. Deckert
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. F. Stögbauer**

ZUSAMMENFASSUNG

Genomische Charakterisierung, systematisches Mutationsscreening und Assoziationsstudie des CREM Gens bei Patienten mit Panikstörung

Domschke, Katharina

Für die Panikstörung wurde in Familien- und Zwillingsstudien ein komplexer Vererbungsweg mit einem geschätzten Anteil der Heredität von 48% ermittelt. Der Einfluß einzelner Gene auf die Pathogenese der Erkrankung läßt sich über Assoziationsstudien untersuchen. In Verhaltensstudien wurde bei knock-out Mäusen für das 'C-AMP Responsive Element Modulator' (CREM) Gen ein signifikant niedrigeres Angstniveau als bei Wildtyp-Mäusen beobachtet. CREM spielt zudem als nukleärer Transkriptionsfaktor eine Schlüsselrolle in der hypothalamo-hypophysäo-adrenalen Achse. Daher wurde in dieser Studie das CREM Gen (Chromosom 10p12.1-11.1) als potentielles Kandidatengen in der Genese der Panikstörung genomisch charakterisiert und auf genetische Variationen sowie Assoziationen mit der Erkrankung untersucht.

Nach Identifizierung der genomischen Struktur des humanen CREM Gens wurde an Proben von 40 Patienten mit Panikstörung (DSM-III-R 300.01 und 300.21) ein systematisches Mutationsscreening der kodierenden und der regulatorischen Regionen des Gens unter Verwendung PCR-basierter Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) durchgeführt. Polymorphe Fragmente wurden mittels direkter Sequenzierung näher charakterisiert. Die identifizierten Polymorphismen wurden in einem erweiterten Kollektiv von 88 Patienten und einer alters- und geschlechtsangepassten Kontrollstichprobe mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen Analysen (RFLP) und Fragmentanalysen auf ihre Häufigkeit vergleichend untersucht.

Es konnten sechs Polymorphismen des humanen CREM Gens identifiziert werden. Ein Trinukleotid-Repeat-Polymorphismus in Promotor P2 war in der kürzeren Allelform signifikant mit dem Vorliegen von Panikstörung assoziiert ($p=0,02$). Zudem konnten signifikante Assoziationen des Trinukleotid-Repeat-Polymorphismus ($p=0,001$) sowie eines Basenaustauschs in CREM Promotor 1 ($p=0,02$) mit der Diagnose einer reinen Panikstörung (DSM-III-R 300.01) in Abgrenzung zu Panikstörung mit Agoraphobie (DSM-III-R 300.21) ermittelt werden.

Zusammenfassend ergaben sich in dieser Studie Hinweise auf eine Beteiligung des CREM Gens an der Pathogenese der Panikstörung sowie eine mögliche molekularbiologisch unterschiedliche Suszeptibilität für die diagnostisch differenzierbaren Erkrankungen ‚Panikstörung‘ und ‚Panikstörung mit Agoraphobie‘. Diese Studie stellt zudem die Grundlage für funktionelle Untersuchungen der CREM Promotor-Polymorphismen sowie für weitere Assoziationsstudien in relevanten Patientenkollektiven.

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Dezember 2004

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG

1.1 Panikstörung

1.1.1	Definition der Panikstörung	1
1.1.2	Diagnostik der Panikstörung	2
1.1.3	Therapie der Panikstörung	3
1.1.4	Neurobiologie der Panikstörung	4
1.1.5	Genetik der Panikstörung	7
1.1.5.1	Zwillingsstudien	7
1.1.5.2	Familienstudien	7
1.1.5.3	Kopplungsuntersuchungen	8
1.1.5.4	Assoziationsstudien	8

1.2 C-AMP-Responsive Element Modulator (CREM) 10

1.2.1	Der c-AMP-abhängige Signaltransduktionsweg	10
1.2.2	Die genomische Struktur von CREM	11
1.2.3	Die physiologische Funktion von CREM	16
1.2.3.1	Spermatogenese	16
1.2.3.2	Circadianer Rhythmus	16
1.2.3.3	Hypothalamus-Hypophysen-Achse	17

1.3 CREM als Kandidatengen bei Panikstörung 17

1.4 Problemstellung 19

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Stichproben 20

2.1.1	Patienten- und Kontrollstichproben	20
2.1.2	DNA-Präparation	22

2.2 Genomische Charakterisierung 23

2.3 Mutationscreening 23

2.3.1	Primer-Konstruktion	23
2.3.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	24
2.3.3	Agarosegelelektrophorese	27
2.3.4	Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA)	28

2.3.5	Silberfärbung	29
2.3.6	Sequenzierung	30
2.3.6.1	Polymerase-Ketten-Reaktion	30
2.3.6.2	Aufreinigung des PCR-Produkts	30
2.3.6.3	Sequenzierreaktion	31
2.3.6.4	Aufreinigung des Sequenzierreaktions-Produkts	31
2.3.6.5	Sequenzanalyse	31
2.4	<u>Genotypisierung</u>	32
2.4.1	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen Untersuchung (RFLP)	32
2.4.2	Fragmentanalyse	34
2.4.3	Transkriptionsfaktoranalyse	35
2.5	<u>Statistik</u>	36
2.6	<u>Lösungen und Puffer</u>	39
2.7	<u>Geräte und Materialien</u>	40
3	ERGEBNISSE	
3.1	<u>Struktur des humanen CREM Gens</u>	41
3.2	<u>Mutationsscreening</u>	46
3.2.1	C/G- und A/G-Polymorphismen in CREM Promotor 1	47
3.2.2	G/A (1)- und G/A (2)-Polymorphismen in CREM Promotor 4	50
3.2.3	Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2	53
3.2.4	Aminosäureaustausch (gly/asp) in CREM Exon ,glut 2'	57
3.3	<u>Genotypisierung</u>	59
3.3.1	C/G- und A/G-Polymorphismen in CREM Promotor 1	59
3.3.1.1	BsuRI – Verdau	59
3.3.1.2	Bsh1285I – Verdau	60
3.3.1.3	Statistische Analyse	61
3.3.2	G/A (1)- und G/A (2)-Polymorphismen in CREM Promotor 4	65
3.3.2.1	Sequenzierung	65
3.3.2.2	Statistische Analyse	66
3.3.3	Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2	70
3.3.3.1	Fragmentanalyse	70
3.3.3.2	Statistische Analyse	72
3.3.4	Aminosäureaustausch (gly/asp) in CREM Exon ,glut 2'	76
3.3.4.1	MvaI – Verdau	76

4 DISKUSSION

4.1	<u>Material und Methoden</u>	78
4.1.1	Stichproben	78
4.1.2	Mutationscreening	79
4.1.3	Genotypisierung	80
4.1.4	Statistik	81
4.2	<u>Ergebnisse</u>	82
4.2.1	Struktur des humanen CREM Gens	82
4.2.2	Mutationscreening und –analyse	83
4.2.3	Assoziationsuntersuchung	86
4.3	<u>CREM Promotor 2-Polymorphismus und Panikstörung</u>	89
4.4	<u>Ausblick</u>	93
	 <u>Literaturverzeichnis</u>	 95
	 <u>Danksagung</u>	 109
	 <u>Lebenslauf</u>	 110

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
dest.	destilliert
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang('double stranded')-Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HPLC	high performance liquid chromatography
kB	Kilobasen
l	Liter
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
min	Minute
mm	Millimeter
mRNA	Boten('messenger')-Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
pmol	Pikomol
Py	Pyrimidin
Pu	Purin
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
ssDNA	Einzelstrang('single stranded')-Desoxyribonukleinsäure
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer
TEMED	N,N,N,N'-Tetraethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett

1 EINLEITUNG

1.1 Panikstörung

1.1.1 Definition der Panikstörung

Die Panikstörung ist eine Angsterkrankung, die mit einer weltweiten Prävalenz von 1-3% auftritt (Weissman MM et al., 1997). Nach der ‚International Classification of Diseases‘ ICD-10 der Weltgesundheitsorganisation WHO (Dilling H et al., 1991) ist die Panikstörung (F41.0) als episodisch paroxysmale Angst gekennzeichnet von „wiederkehrenden schweren Angstattacken (Panik), die sich nicht auf eine spezifische Situation oder besondere Umstände beschränken und deshalb auch nicht vorhersehbar sind. Wie bei anderen Angsterkrankungen zählen zu den wesentlichen Symptomen plötzlich auftretendes Herzklopfen, Brustschmerz, Erstickungsgefühle, Schwindel und Entfremdungsgefühle (Depersonalisation oder Derealisation). Oft entsteht sekundär auch die Furcht zu sterben, die Kontrolle zu verlieren, oder die Angst, wahnsinnig zu werden.“ Die Kriterien für Panikstörung in der amerikanischen DSM-III-R-Klassifikation (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Wittchen HU et al., 1989) beinhalten weiterhin die mindestens einen Monat andauernde Erwartungsangst vor einer erneuten Panikattacke. Nach ICD-10 sind die Zeitkriterien einer Panikstörung gegeben, wenn „mehrere schwere vegetative Angstanfälle innerhalb eines Zeitraumes von etwa einem Monat“ auftreten. Die Dauer einer Panikattacke wird mit 10 bis 30 Minuten angegeben. Das durchschnittliche Erstmanifestationsalter liegt zwischen dem 30. und 44. Lebensjahr, wobei Frauen etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Männer (Weissman MM, 1988 und 1992; Keyl PM et al., 1990; Scheibe G et al., 1992). Differentialdiagnostisch ist die reine Panikstörung abzugrenzen gegen depressive Störungen, in deren Rahmen Panikattacken auftreten können, sowie gegen Panikattacken in Zusammenhang mit Agoraphobie. Agoraphobie bezeichnet ein

Vermeidungsverhalten des Patienten hinsichtlich öffentlicher Plätze oder Situationen, bei denen im Falle einer Panikattacke ein Entkommen oder Hilfe von außen nur schwer möglich wäre. Nach den Kriterien der ICD-10 werden reine Panikstörung (F41.0), Agoraphobie (F40.0) und Agoraphobie mit Panikstörung (F40.01) diagnostiziert. Im Gegensatz dazu wird in der DSM-III-R-Klassifikation zwischen einer Panikstörung mit (300.21) und ohne Agoraphobie (300.01) unterschieden.

Komorbidität von Panikstörung findet sich hauptsächlich mit anderen Angsterkrankungen (Leckman JF et al., 1983; Katerndahl DA und Realini JP, 1997), in 32-50% der Fälle mit Depressionen, des weiteren mit Alkoholismus (Wittchen HU et al., 1993), Drogenabhängigkeit und der Zwangserkrankung (Crowe RR et al., 1985, Lensi P et al., 1996).

1.1.2 Diagnostik der Panikstörung

Die Panikstörung läßt sich unter Verwendung strukturierter diagnostischer Interviews (SDI) wie des „Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia - Lifetime Anxiety“ (SADS-LA) und des „Composite International Diagnostic Interview“ (CIDI) gemäß den Kriterien des DSM-III-R (Diagnostisches und Statistisches Manual psychischer Störungen, Wittchen HU et al., 1989), des DSM-IV (Handbuch der Differentialdiagnosen DSM-IV, Saß H et al., 1999) oder der ICD-10 („International Classification of Diseases“, Weltgesundheitsorganisation WHO, Dilling H et al., 1991) diagnostizieren. Als zuverlässige strukturierte Interviewleitfäden gelten auch das „Strukturierte Klinische Interview für das DSM-III-R (SKID)“ (Wittchen HU et al., 1990) und das „Diagnostische Interview bei psychischen Störungen (DIPS)“ (Margraf J et al., 1991).

Auszuschließen sind organische Angstsyndrome im Rahmen einer Hyperthyreose, einer Hypoglykämie, eines Phäochromozytoms, einer Epilepsie, eines Herzinfarktes oder eines Asthma bronchiale. Entsprechend den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (DGPPN) werden hierzu als Teil der Basisdiagnostik bei Patienten mit Ängsten laborchemische und apparative

Untersuchungen wie die Bestimmung von Elektrolyten, Blutzucker, Schilddrüsenwerten (TSH-Basalwert, freies T3, freies T4) und Leberwerten (Gamma-GT, Transaminasen) sowie die Erhebung eines Blutbildes, eines Elektrokardiogramms und gegebenenfalls eines Elektroenzephalogramms empfohlen (Dengler W und Selbmann HK, 2000).

1.1.3 Therapie der Panikstörung

Für die Behandlung der Panikstörung ist die Wirksamkeit von verhaltenstherapeutischen und psychopharmakologischen Interventionen am besten belegt. Die kognitive Verhaltenstherapie von Panikattacken umfasst psychoedukative Elemente, die Konfrontation mit internen Reizen sowie die Reattributierung körperlicher und psychischer Symptome (Barlow DH et al., 1988). Bei Vorliegen von agoraphobischem Verhalten wird der Einsatz konfrontativer Therapieelemente überwiegend als unverzichtbar angesehen (Dengler W und Selbmann HK, 2000). Psychopharmakologisch werden zur Behandlung der Panikstörung Monoaminoxidase(MAO)-Hemmer (Sheehan DV, 1985), trizyklische Antidepressiva (Uhlenhuth EH et al., 1989) und vor allem selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (SSRI) (Den Boer JA et al., 1987) mit Erfolg eingesetzt. Vergleichende Studienergebnisse hinsichtlich der Wirksamkeit einer Kombination verhaltenstherapeutischer und psychopharmakologischer Interventionen versus einer Monotherapie bei Panikstörung zeigen uneinheitlich teils Synergieeffekte, teils eine gegenseitige Beeinträchtigung der einzelnen therapeutischen Komponenten (Dengler W und Selbmann HK, 2000).

In der anxiolytischen Soforttherapie werden Benzodiazepine angewandt, wobei ein langfristiger Einsatz von mehr als zwei bis vier Wochen wegen der Gefahr einer Abhängigkeitsentwicklung vermieden werden sollte (Ballenger JC et al., 1988). Eine tiefenpsychologische Psychotherapie kann vor allem bei der Bearbeitung stressinduzierender inter- und intrapersoneller Konflikte, insbesondere bei Autonomie-Dependenz-Konflikten, hilfreich sein (Dengler W und Selbmann HK, 2000).

1.1.4 Neurobiologie der Panikstörung

Mehrfach wurde die artifizielle Provokation von Panikattacken durch intravenöse Natrium-Laktat-Infusionen (Liebowitz MR et al., 1984 und 1985) sowie durch Kohlendioxid-Inhalation (Papp LA et al., 1993) beschrieben. Man nimmt derzeit an, daß es durch die Natrium-Laktat induzierte metabolische Alkalose zu einer kompensatorischen Hypoventilation kommt, in deren Folge Kohlendioxid akkumuliert. Kohlendioxid bewirkt eine zentrale Hyperkapnie, die wiederum über Stimulation des Locus coeruleus und nachfolgenden Anstieg des zerebralen Noradrenalin Panikattacken auslösen kann (Elam M et al., 1981; Redmond DE et al., 1979).

Für eine zentrale Rolle des noradrenergen Systems bei Panikattacken sprechen weiterhin positive Resultate in Provokationstests mit noradrenerg wirksamen Substanzen wie Yohimbin (Charney DS et al., 1984), Noradrenalin und Isoprenalin (Pohl R et al., 1988). Nachdem der Großteil der zerebralen Noradrenalinproduktion in den Kernen des Locus coeruleus zu lokalisieren ist und zudem über elektrische Stimulation des Locus coeruleus bei Affen panikartige Reaktionen auszulösen waren (Redmond DE et al., 1979), wurde der Locus coeruleus als eine noradrenerge Schaltstelle im Angst-Panik-System vorgeschlagen (Sullivan GM et al., 1999).

Ein weiterer Hinweis auf einen hyperadrenergen Status als eine biochemische Grundlage der Panikstörung ist der erfolgreiche psychopharmakologische Einsatz von selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmern (SSRI) (siehe 1.1.3), deren Hauptwirkungsmechanismus bei Panikstörung unter anderem auf eine Attenuierung der noradrenergen Impulsrate vor allem in Bereichen des Locus coeruleus zurückgeführt wird (z.B. Szabo ST et al., 2000).

Zur Überprüfung der Funktion der hypothalamo-hypophyseo-adrenalen Achse in Zusammenhang mit Panikstörung wurden Dexamethasonsuppressionstests (DST) und CRH-Stimulationstests durchgeführt. Neben erhöhten basalen Cortisolwerten (Abelson JL et al., 1996) fanden sich im Dexamethasonsuppressionstest bei 20-40% der Patienten mit Panikstörung im Vergleich zu Kontrollpersonen (2-5%) pathologische Resultate (Eriksson E, 1987). Im CRH-Stimulationstest zeigte sich bei Panikpatienten eine

verminderte ACTH-, jedoch eine normale Cortisol-Reaktion (Holsboer F et al., 1987). Als Ursache für dieses Resultat wird bei Patienten mit Panikstörung eine Übersekretion von hypothalamischem CRH diskutiert, die zu sekundärer Subsensitivität hypophysärer CRH-Rezeptoren führt (Holsboer F et al., 1987). Diese Hypothese wird durch tierexperimentelle Untersuchungen gestützt, die einen Zusammenhang zwischen CRH-Hypersekretion und Panikattacken beobachteten (Dunn AJ et al., 1990). Weiterhin konnten bei Mäusen ein Antagonismus an CRH₂-Rezeptoren wie auch eine Defizienz für das CRH₁- und CRH₂-Rezeptor Gen mit einer signifikanten Reduktion stressinduzierten Verhaltens assoziiert werden (Bakshi VP et al., 2002 und Bale TL et al., 2002). Nachdem der Locus coeruleus Afferenzen von hypothalamischen Kernen, insbesondere Fasern von CRH-Neuronen des Nucleus paraventricularis, erhält, wurde eine Schaltstelle zwischen neuroendokriner Streßreaktion und noradrenerger Antwort im Locus coeruleus postuliert (Holsboer F, 1993). Efferente Fasern verbinden den Locus coeruleus unter anderem mit dem Hypothalamus, dem Hippocampus, der Amygdala sowie dem Cortex und vermitteln über alpha-1 Adrenorezeptoren im Hypophysenvorderlappen eine erhöhte ACTH-Sekretion (Nauta WHJ et al., 1981; Al-Damluji D, 1988) und damit konsekutiv einen Anstieg des Cortisol-Spiegels. In Kenntnis dieser wechselseitigen Beziehung nahm man an, daß ein biochemisches Korrelat von Panikattacken in einer Störung dieser Interaktion zwischen Locus coeruleus und der hypothalamo-hypophysären Achse liegen könne (Holsboer F, 1993).

In Provokationstests mit Koffein zeigten Panikpatienten eine erhöhte Empfindlichkeit im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen (Charney DS et al., 1985). Als möglicher zugrundeliegender Mechanismus dieser anxiogenen Wirkung wurde die Blockade von Adenosinrezeptoren durch Koffein diskutiert, die zu einer sekundären Noradrenalinfreisetzung im Locus coeruleus führt (Snyder SH et al., 1981).

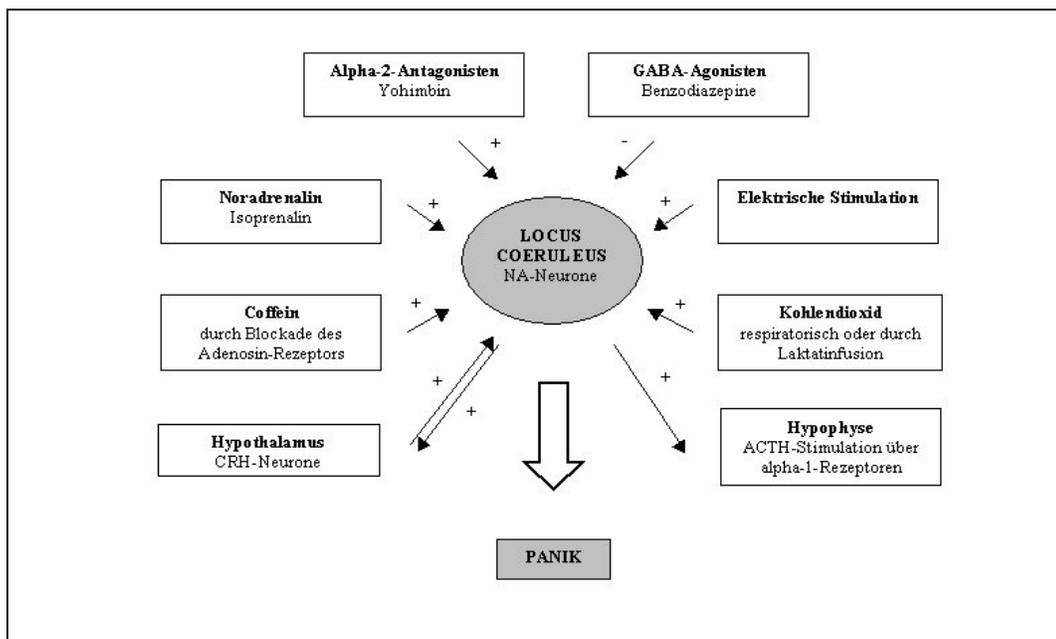
Nachdem bei Panikattacken Benzodiazepine als gamma-Aminobuttersäure(GABA)-A-Rezeptor-Agonisten therapeutisch erfolgreich eingesetzt werden (Ballenger JC et al., 1988), wurde weiterhin eine mögliche Rolle des GABA-ergen Systems bei der Genese der Panikstörung untersucht. In Provokationsstudien konnten durch Flumazenil, einen Antagonisten am GABA-A/Benzodiazepin-Rezeptor-Komplex, Panikattacken ausgelöst

werden (Randall PK et al., 1995). In einer weiteren Studie provozierte eine pharmakologische Unterbrechung der GABA-ergen Transmission in den Locus coeruleus durch die daraus resultierende mangelnde Hemmung der Noradrenalinsekretion das Auftreten von Panikattacken (Priolo E et al., 1991).

Cholezystokinin zeigte in Provokationsuntersuchungen ebenfalls panikogene Effekte mit signifikant erhöhten ACTH- und Cortisol-Spiegeln (De Montigny C, 1989; Bradwejn J et al., 1994; Flint AJ et al., 2000).

Abb.: 1.1.4.1

Rolle des Locus coeruleus bei experimentell induzierten bzw. supprimierten Panikattacken (nach Holsboer F, 1993 und Sullivan GM et al., 1999)



1.1.5 Genetik der Panikstörung

Vor dem Hintergrund eines mehrdimensionalen Modells der Entstehung der Panikstörung liegt neben der Untersuchung psychosozialer Faktoren wie life events oder Rollenerwartungen und organischer Prädispositionen wie kardialer Überleitungsstörungen oder Epilepsie ein Schwerpunkt des wissenschaftlichen Interesses in der Erforschung des hereditären Aspektes der Ätiologie und Transmission der Panikstörung.

1.1.5.1 Zwillingsstudien

In Zwillingsstudien wurde bei eineiigen Zwillingen eine 2- bis 3-fach höhere Konkordanzrate für die Erkrankung an einer Panikstörung ermittelt als bei zweieiigen Zwillingen der Kontrollstichprobe (Torgersen S, 1983; Skre I et al., 1993; Perna G et al., 1997). Eine Multivarianzanalyse bei weiblichen eineiigen Zwillingen zeigte einen Anteil der Heritabilität in der Genese der Panikstörung von 30-40% (Kendler KS et al., 1993). In einer Metaanalyse von Daten aus Zwillings- und Familienstudien wurde für die Erkrankung eine Heritabilität von 48% ermittelt (Hettema JM et al., 2001). Diese Befunde lassen auf einen signifikanten Einfluß genetischer Disposition in der Genese der Panikstörung schließen.

1.1.5.2 Familienstudien

In Familienstudien zeigten Verwandte ersten Grades eines Patienten mit Panikstörung ein signifikant höheres Risiko (7,7-20,5%), an Panikstörung zu erkranken als gesunde Kontrollpersonen (0,4-2,4%) (Weissman MM, 1993; Maier W et al., 1993; Crowe RR et al., 1983).

In einer Segregationsstudie von Pauls et al. (Pauls DL et al., 1980) wurde ein autosomal-dominanter Vererbungsweg der Panikstörung ermittelt. Nachfolgende Studien konnten dieses Ergebnis jedoch nicht replizieren, sondern fanden für die Transmission der Panikstörung kein klares Vererbungsmuster nach den Mendelschen

Gesetzen (Vieland VJ et al., 1996; Crowe RR et al., 1983). Diese Befunde sprechen entweder für Heterogenität, das heißt die Verantwortlichkeit mehrerer Gene für die Ausprägung des Merkmals der Erkrankung, oder für eine komplexe Vererbung nach dem Modell einer Interaktion zwischen multiplen Genen mit inkompletter Penetranz und Umweltfaktoren.

1.1.5.3 Kopplungsuntersuchungen

In Kopplungsuntersuchungen wird die Kosegregation von genetischen Markern mit dem Auftreten einer Erkrankung untersucht. Liegt für einen Befund die statistische odds-ratio unter 1:1000, bzw. der LOD(Logarithm of odds)-Wert über 3, darf eine Kopplung angenommen werden.

Die bislang einzigen das gesamte menschliche Genom umfassenden Kopplungsuntersuchungen für Panikstörung von Knowles et al. (Knowles JA et al., 1998), Gelernter et al. (Gelernter J et al., 2001) und Crowe et al. (Crowe RR et al., 2001) erbrachten mit LOD-Werten unter 2 für alle untersuchten Marker - mit Ausnahme von Loci auf den Chromosomen 1, 7 und 11 ($\text{LOD} < 3$) - keine signifikant positiven Ergebnisse. Crowe et al. führten weiterhin bei 26 Familien eine Kopplungsanalyse zwischen 29 genetischen Markern und Panikstörung durch und beschrieben einen Kopplungsbefund für den Genlocus des alpha-Haptoglobins auf Chromosom 16q22 (Crowe RR et al., 1987), der in nachfolgenden Studien allerdings nicht repliziert werden konnte (Crowe RR et al., 1990). Weitere gezielte Untersuchungen schlossen Kopplungsbefunde zwischen Panikstörung und den Genloci für Proopiomelanocortin (Crowe RR et al., 1987), adrenerge Rezeptoren (Wang ZW et al., 1992) sowie GABA-A-Rezeptor-Untereinheiten (Crowe RR et al., 1997) aus.

1.1.5.4 Assoziationsstudien

In Assoziationsstudien wird die Frequenz eines bestimmten genetischen Markers in Patienten- und Kontrollstichproben vergleichend bestimmt. Typischerweise werden hier sogenannte Kandidatengene, bei denen man einen pathophysiologischen Einfluß auf die Genese der jeweiligen Erkrankung vermutet, untersucht. Wird der genetische Marker

signifikant häufiger in der Patientenstichprobe gefunden als bei den Kontrollen, kann eine Assoziation zwischen dem betreffenden Allel und der Erkrankung angenommen werden.

Die bisherigen Assoziationsstudien konzentrierten sich hauptsächlich auf Gene, die für Proteine der potentiell für die Entstehung von Panikattacken relevanten Neurotransmittersysteme kodieren. Diese Kandidatengene wurden auf der Grundlage bekannter effektiver psychopharmakologischer Interventionen (SSRI, MAO-I, Benzodiazepine), positiver Befunde in Provokationsstudien (z.B. Koffein, Cholezystokinin) sowie von Verhaltensbeobachtungen bei transgenen oder knock-out Mäusen ermittelt.

Keine Assoziation mit Panikstörung konnte für Polymorphismen in Genen des Adenosin A1-Rezeptors (Deckert J et al., 1998), des Cholezystokinin-Rezeptors A (Kennedy JL et al., 1999), der Serotonin 5HT1D alpha- und 5HT1D beta-Rezeptoren (Ohara K et al., 1996), des Serotonin-Transporters (Deckert J et al., 1997), des Noradrenalin-Transporters (Sand PG et al., 2002), des Dopamin-Rezeptors 4 und des Dopamin-Transporters DAT (Hamilton SP et al., 2000), des GABA(B)-Rezeptors 1 (Sand PG et al., 2000), des alpha(2A)-adrenergen-Rezeptors (Ohara K et al., 2000) sowie des nikotinergen Acetylcholin-Rezeptors CHRNA4 (Steinlein OK et al., 1997) gefunden werden.

Für Kandidatengene wie die des Adenosin A2A-Rezeptors (Deckert J et al., 1998), des Cholezystokinin-Rezeptors B (Kennedy JL et al., 1999), des Cholezystokinin (Wang Z et al., 1998; Hattori E et al., 2001), des menschlichen Homologs des Drosophila-Tryptophantransporters (Nakamura M et al., 1999), des NTRK3 in einer duplizierten Region auf Chromosom 15 (Armengol L et al., 2002), der Monoaminoxidase A (Deckert J et al., 1999) sowie der Catechol-O-Methyl-Transferase (Hamilton SP et al., 2002; Woo JM et al., 2002) konnten Assoziationen mit Panikstörung gezeigt werden.

1.2 C-AMP-responsive element modulator (CREM)

1.2.1 Der cAMP-abhängige Signaltransduktionsweg

Der cAMP-abhängige intrazelluläre Signaltransduktionsweg wird durch die Bindung eines extrazellulären Botenstoffs wie Adrenalin, Noradrenalin, CRH, ACTH oder Serotonin an einen spezifischen zellmembranständigen G-Protein-gekoppelten Rezeptor induziert. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor bewirkt über Freisetzung des gebundenen GDP aus dem Rezeptor-assoziierten G-Protein-Komplex die Dissoziation der Untereinheit $G\alpha_s$. Die freigesetzte $G\alpha_s$ -Untereinheit kann nun GTP-vermittelt eine Adenylatzyklase aktivieren, die wiederum die Umwandlung von ATP in cyclo-AMP (cAMP) katalysiert (Woon CW et al., 1989). C-AMP bindet weiterhin kooperativ an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) und aktiviert dadurch deren katalytische Untereinheiten (Roesler WJ et al., 1988). Diese sogenannten C-Untereinheiten der PKA werden daraufhin in den Zellkern transloziert (Nigg EA et al., 1985) und phosphorylieren hier Serinreste nukleärer Transkriptionsfaktoren (McKnight GS et al., 1988). C-AMP-abhängige nukleäre Transkriptionsfaktoren beinhalten als DNA-bindende Domänen mindestens ein Leucin-Zipper-Motiv (Landschulz WH et al., 1988) und binden in aktivierter Form als Dimer an sogenannte CRE (cAMP-responsive elements) in Promotoren cAMP-induzierbarer Gene (Ziff EB, 1990; Borrelli E et al., 1992). CRE-Regionen sind durch eine palindromische 8 bp DNA-Konsensussequenz (TGACGTCA) charakterisiert (Montminy MR et al., 1987).

Als erster CRE-bindender Faktor wurde das ‚C-AMP Responsive Element Binding‘ (CREB) Protein gefunden (Hoeffler JP et al., 1988). Rehfuss et al. berichteten 1991 von ATF-1 als einem weiteren cAMP-induzierbaren nukleären Transkriptionsfaktor (Rehfuss RP et al., 1991).

Der ‚C-AMP-Responsive Element Modulator‘ (CREM) wurde ebenfalls 1991 von Foulkes et al. beschrieben (Foulkes NS et al., 1991). Als cAMP-abhängiger nukleärer

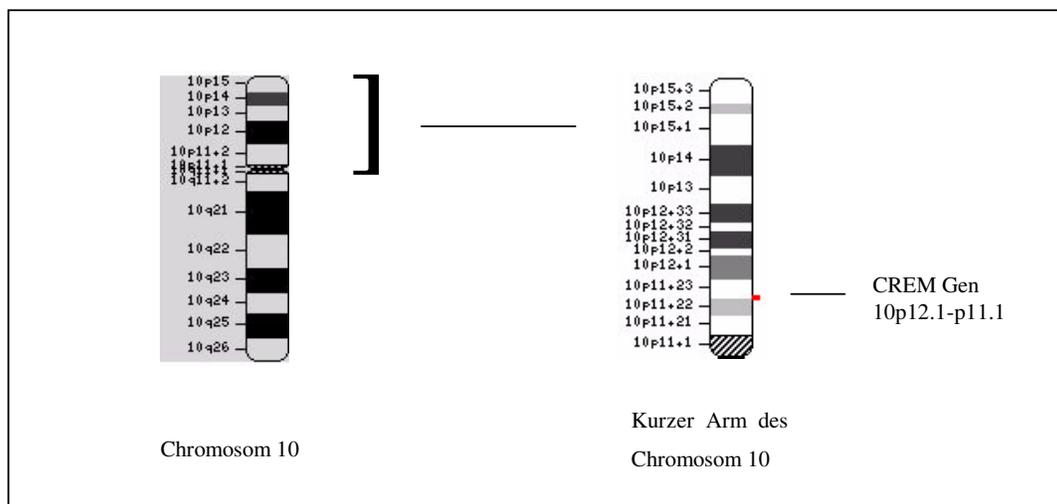
Transkriptionsfaktor der Leucin-Zipper-Familie weist CREM strukturell hohe Homologie mit CREB und ATF-1 auf (Foulkes NS et al., 1991; Waeber G et al., 1991). Mit dem ‚Inducible C-AMP Early Repressor‘ (ICER) als alternativem Produkt des CREM Gens wurde ein weiterer, direkt cAMP-induzierbarer nukleärer Transkriptionsfaktor beschrieben (Molina CA et al., 1993).

1.2.2 Die genomische Struktur von CREM

Das humane für CREM kodierende Gen wurde auf dem kurzen Arm des Chromosom 10 lokalisiert (10p12.1-p11.1) (Fuijmoto TJ et al., 1994). Nach Informationen der Online-Datenbanken ‚Online Mendelian Inheritance in Man‘ (OMIM) und ‚Map Viewer‘ (National Center for Biotechnology Information (NCBI); <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; Wheeler DL et al., 2001) läßt sich die Lokalisation des CREM Gens graphisch wie in Abbildung 1.2.2.1 gezeigt darstellen.

Abb.: 1.2.2.1

Lokalisation des humanen CREM Gens auf Chromosom 10p12.1-p11.1



Die genomische Struktur des humanen CREM Gens ist bisher nicht beschrieben. Das murine CREM Gen (Laoide BM et al., 1993) ist wie in Abbildung 1.2.2.2 dargestellt multiexonisch organisiert.

Abb.: 1.2.2.2

Genomische Organisation des murinen CREM Gens



Die Transkription des CREM Gens wird von Promotor P1 aus initiiert. P1 wurde in einer CG-reichen Insel vor dem ersten transkribierten Exon lokalisiert (Molina CA et al., 1993; Stehle JH et al., 1993). Die Translation beginnt mit der Kozak-Konsensussequenz ATG (Kozak M, 1989) im dritten Exon (118 bp). Darauf folgt das Kodon der ersten glutaminreichen Domäne ‚glut 1‘ (147 bp), die hypothetisch als Anlagerungsfläche für RNA-Polymerase II Kofaktoren und damit als transkriptionsaktivierende Domäne dient (Laoide BM et al., 1993; Hoey T et al., 1993). Die zwei folgenden Exons (95 bp und 143 bp) kodieren für die sogenannte P-Box, die mit Konsensussequenzen für Phosphorylierungen durch PKA eine Kinase-induzierbare Domäne darstellt. Die zweite glutaminreiche Domäne ‚glut 2‘ wird vom nachfolgenden Exon gebildet (189 bp) und gleicht in ihrer Funktion ‚glut 1‘. Nach dem sogenannten γ -Exon (36 bp) folgen zwei Exons (157 bp und 1769 bp bis zum Transkriptionsende), die für die beiden DNA-bindenden Domänen (DBD 1 und 2) des CREM Proteins kodieren (Laoide BM et al., 1993).

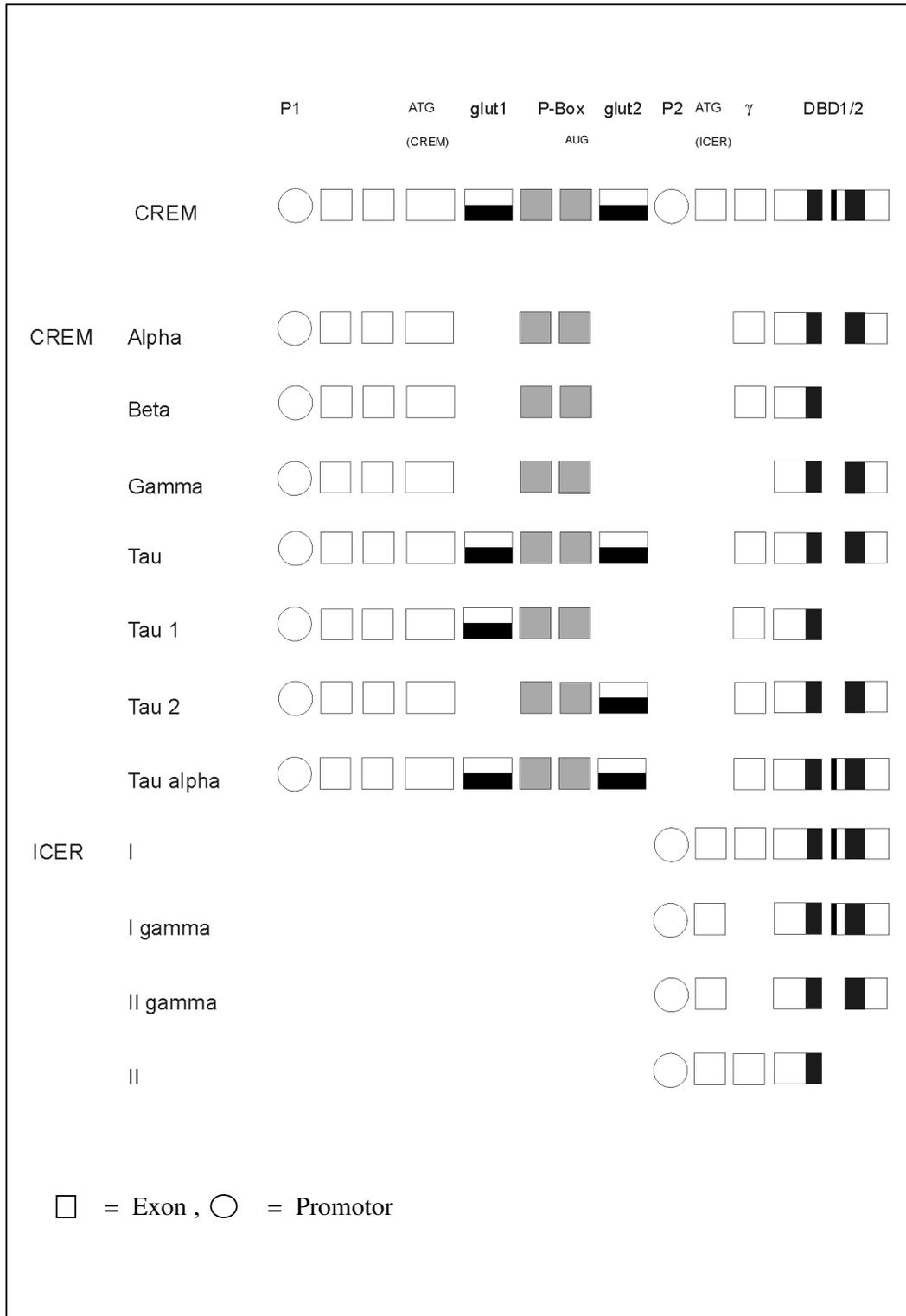
Zwischen Exon ‚glut 2‘ und dem γ -Exon liegen ein alternativer Promotor P2 und ein weiteres Exon (ICER Exon I). P2 hat im Gegensatz zu P1 einen normalen CG-Gehalt, weist TATA-Box Elemente auf und enthält vier jeweils im Tandem hintereinandergeschaltete CRE Elemente. Von zwei alternativ aktiven Transkriptionsstartpunkten S1 und S2 des Promotor P2 aus wird ein Transkriptionsprodukt initiiert, das sequentiell direkt auf P2 folgende spezifische ICER Exon I und das C-terminale Ende des CREM Gens (γ -Exon bis zum Transkriptionsende) umfasst. Dieses zuerst von Molina et al. als ‚Inducible C-AMP Early Repressor‘ (ICER) beschriebene trunkierte Produkt des CREM Gens wird direkt durch cAMP induziert und wirkt als Inhibitor der Transkription cAMP-induzierbarer Gene. Über Bindung an die in Promotor P2 enthaltenen CRE Elemente ist ICER in der Lage, in einer autoregulatorischen Schleife die Aktivität von P2 zu drosseln und damit die eigene Transkription zu inhibieren (Molina CA et al., 1993).

Das CREM Gen generiert durch alternative Kombination der Exons während der Transkription („alternatives Splicing“) eine Familie verschiedener Proteinprodukte mit daraus folgender unterschiedlicher Konstellation der funktionellen Domänen (Delmas V et al., 1992; Foulkes NS et al., 1993). Die Exonkombinationen dieser CREM wie auch ICER Isoformen sind in Abbildung 1.2.2.3 dargestellt.

Die CREM Isoformen alpha, beta und gamma blocken als Homodimer oder als Heterodimer mit CRE-bindenden Aktivatoren die Transkription cAMP-abhängiger Gene und wirken somit als inhibitorische Transkriptionsfaktoren (Foulkes NS et al., 1991; Laoide BM et al., 1993). Die CREM tau Isoformen hingegen fungieren als Aktivatoren der Transkription cAMP-induzierbarer Gene (Foulkes NS et al., 1992). Die glutaminreiche Domäne ‚glut 2‘ scheint hierbei einen höheren Beitrag zur Transaktivierungsfunktion zu leisten als die glutaminreiche Domäne ‚glut 1‘, da die ‚glut 2‘ enthaltende CREM tau 2 Isoform als stärkerer Transkriptionsaktivator wirkt als die CREM tau 1 Isoform (Laoide BM et al., 1993).

Abb.: 1.2.2.3

Isoformen des CREM Gens



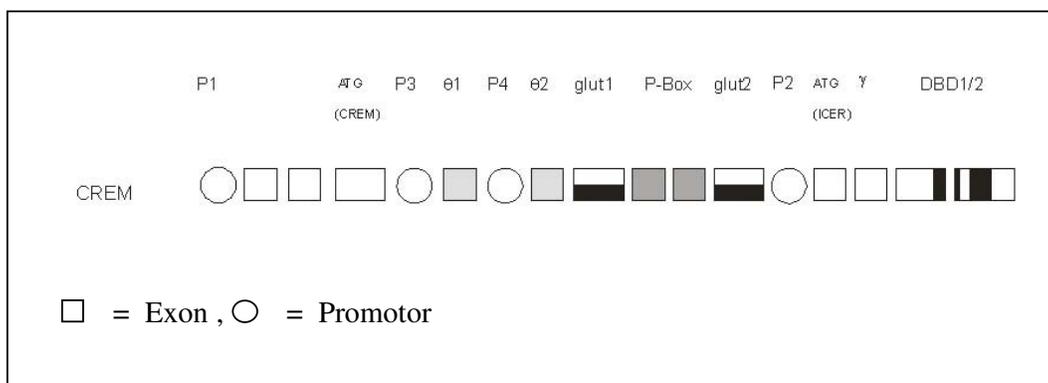
Die differentielle Transkription von ICER generiert die Isoformen I und II beziehungsweise I gamma und II gamma, die sich hinsichtlich der Präsenz des γ -Exons und der Länge der C-terminalen DNA-bindenden Domänen unterscheiden, die aber funktionell alle als Repressoren der cAMP-induzierten Genantwort wirken (Molina CA et al., 1993).

Eine weitere funktionelle Variante des CREM Gens wird über eine alternative Translationsinitiation generiert. Von einem internalen AUG-Kodon innerhalb des CREM tau Transkriptes (Exon P-Box II, Position 98-100 bp; siehe Abbildung 1.2.2.3) aus wird das sogenannte S-CREM als Repressor der cAMP-induzierten Transkriptionsaktivität translatiert (Delmas V et al., 1992).

Bis jetzt nur im Rattenhoden wurde die Aktivität zweier zusätzlicher Promotoren CREM P3 und CREM P4 beobachtet, von denen aus die Transkription der CREM Isoformen ,theta 1‘ und ,theta 2‘ reguliert wird. Diese Isoformen werden vor allem in prämeiotischen und postmeiotischen Keimzellen exprimiert und fungieren als Transkriptionsfaktoren in der Spermiogenese (Daniel PB et al., 2000). Die Position der CREM Promotoren P3 und P4 sowie die für die CREM Isoformen ,theta 1‘ und ,theta 2‘ spezifischen Exons ,theta 1‘ und ,theta 2‘ sind Abbildung 1.2.2.4 zu entnehmen.

Abb.: 1.2.2.4

Position der CREM Promotoren P3 und P4 sowie der Exons ,theta 1‘ und ,theta 2‘



1.2.3 Die physiologische Funktion von CREM

1.2.3.1 Spermatogenese

Im adulten Hoden von Mäusen wurde eine fast ausschließliche Expression von aktivierenden CREM Isoformen beobachtet, während in präpubertären murinen männlichen Keimzellen hauptsächlich reprimierende CREM Isoformen beschrieben wurden (Foulkes NS et al., 1992). Mehrere Studien zeigen, daß CREM innerhalb einer Transkriptionskaskade steht, die in der Aktivierung von Keimzell-spezifischen Genen wie Transition Protein-1 (Kistler MK et al., 1994) und Calspermin (Sun Z et al., 1995) und damit der Initiation der spermatogenetischen Differenzierung resultiert. Zusätzlich konnte durch FSH-Injektionen eine direkte Induktion von CREM bewirkt werden, so daß CREM durch FSH über die hypothalamo-hypophysen-gonadale Achse reguliert zu sein scheint (Foulkes NS et al., 1993). Bei männlichen CREM knock-out Mäusen wurden eine drastische Beeinträchtigung der Spermatogenese und eine komplette Azoospermie beobachtet (Maldonado R et al., 1999). Diese Befunde lassen auf eine Schlüsselrolle von CREM als Transkriptionsfaktor bei der Spermatogenese und damit männlicher Fertilität schließen. Zudem wurde im Rattenhoden die Expression der hodenspezifischen CREM Isoformen ‚theta 1‘ und ‚theta 2‘ (siehe 1.2.2) beschrieben (Daniel PB et al., 2000).

1.2.3.2 Circadianer Rhythmus

Im Corpus pineale wird die Melatoninsynthese über den c-AMP-abhängigen Signaltransduktionsweg initiiert. Die Analyse der CREM Expression im Corpus pineale zeigte ein Überwiegen der repressorischen Isoformen sowie einen signifikanten Tag-Nacht-Rhythmus und eine enge Korrelation mit der Synthese von Melatonin (Stehle JH et al., 1993). Weitere Studien beobachteten eine negative Regulation des Schlüsselenzyms der Melatoninsynthese, der N-Acetyltransferase, durch die Expression von ICER (Foulkes NS et al., 1997).

1.2.3.3 Hypothalamus-Hypophysen-Achse

Über In-Situ-Hybridisierungs-Untersuchungen wurden im Rattengehirn spezifische CREM Expressionsmuster festgestellt. Vor allem in Bereichen des limbischen Systems, des Hypothalamus und in Regionen pontiner Kerne entsprachen die CREM Transkripte in hoher Expression den Isoformen mit repressorischer Funktion, wodurch eine suppressorische Rolle für CREM in diesen Gehirnregionen anzunehmen ist (Mellström B et al., 1993). In hypophysären Zellen war die Transkription von CREM durch Aktivatoren des cAMP-abhängigen Signalweges wie TSH induzierbar (Lalli E et al., 1995). Weiterhin wurde in der hypophysären corticotrophen Zelllinie AtT20 unter Überexpression von ICER eine vollständige Unterdrückung der hormonalen Sekretion von ACTH beobachtet (Lamas M et al., 1997). Zudem fand sich unter adrenerger Stimulation des Lobus intermediatus der Hypophyse eine Induktion von ICER über eine Aktivierung beta2-adrenerger Rezeptoren und CRH-Rezeptoren (Mazzucchelli C et al., 1999). Diese Ergebnisse deuten auf eine feinregulatorische Funktion von CREM beziehungsweise ICER in der Steuerung der hypothalamo-hypophyse-adrenalen Achse hin.

1.3 CREM als Kandidatengen bei Panikstörung

Im Tiermodell zeigten männliche CREM knock-out Mäuse neben einem postmeiotischen Spermatogenese-arrest mit daraus resultierender Infertilität im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ein signifikant geringeres Angstniveau mit erhöhter explorativer Aktivität im Plus-Labyrinth-Test (‘Elevated Plus Maze’) sowie im Offenen-Feld-Test (‘Open Field Test’) (Maldonado R et al., 1999). In Übertragung des Mausmodells auf die Panikstörung als spezifische Angsterkrankung läßt sich hieraus die Hypothese ableiten, daß das CREM Gen über eine Alteration seiner Funktion oder seines Expressionsgrades eine Rolle in der Genese der Panikstörung spielen könnte.

Zudem wurde von Knowles et al. in Revision ihrer genomweiten Kopplungsanalyse (Knowles JA et al., 1998) ein LOD-Wert von 2,9 beziehungsweise 3,1 für einen Locus

auf dem kurzen Arm von Chromosom 10 festgestellt (persönliche Mitteilung), der nur etwa 128 Kilobasen von dem CREM Gen Locus (10p12.1-p11.1) entfernt liegt und damit als bislang erster signifikant positiver Kopplungsbefund bei Panikstörung eine potentielle Kandidatengen-Rolle von CREM in der Genese der Panikstörung nachdrücklich unterstützt.

Als ein zugrundeliegender Mechanismus für eine erhöhte Suszeptibilität für die Erkrankung könnte eine Überexpression der aktivierenden CREM Isoformen postuliert werden, die in Zielregionen der noradrenergen Neurotransmission sowie in der hypothalamo-hypophysären Achse als nukleäre Transkriptionsfaktoren der durch Adrenalin, Noradrenalin oder CRH induzierten cAMP-abhängigen Signalkaskade eine erhöhte Vulnerabilität für Streßreize darstellen könnten.

In Kenntnis der vorherrschend repressorischen Expressionsmuster von CREM in den für die Genese der Panikstörung in Frage kommenden Regionen wie des Locus coeruleus, des limbischen Systems oder des Hypothalamus (Mellström B et al., 1993) kann man sich jedoch außerdem eine alternative pathophysiologische Kette vorstellen, in der eine Unterexpression von repressorischen CREM Transkripten, und damit eine daraus resultierende mangelnde Hemmung der Streßantwort als ein verantwortlicher Pathomechanismus der Panikstörung angenommen werden kann. Hier gilt dem repressorischen CREM Transkript ICER insofern besonderes Interesse, als ICER als direkt cAMP-induzierbares ‚early gene‘ dynamisch auf momentane Neurotransmitterkonzentrationsverschiebungen reagieren und in seiner Funktion als „Puffer“ der cAMP-vermittelten Transkription einer übersteuerten Genantwort entgegenwirken kann (Molina CA et al., 1993). Bei einer Minderepression der ICER Isoform ginge also dieser Kontrollmechanismus innerhalb der cAMP-Signalkaskade zum Teil verloren und die über cAMP vermittelte Neurotransmitteraktion - wie von Adrenalin, Noradrenalin, CRH, ACTH oder Serotonin (siehe 1.2.1) - in den hypothetischen Panikzentren nach dem in Abbildung 1.1.4.1 dargestellten Modell könnte aufgrund der eingeschränkten Gegenregulation zum Auftreten einer Panikattacke führen.

1.4 Problemstellung

Voraussetzung für ein Mutationsscreening des CREM Gens bei Patienten mit Panikstörung ist zunächst die Charakterisierung der genomischen Struktur des humanen CREM Gens, die bis jetzt nur teilweise publiziert ist. Die Bestimmung der Exongrößen, der Sequenzen der Exon-Intron-Übergänge sowie der Intronregionen und der regulatorischen Bereiche im Vergleich mit der bekannten genomischen Organisation bei der Maus sind somit ein erstes Ziel dieser Arbeit.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse soll daraufhin bei einer Stichprobe von Patienten mit Panikstörung (DSM-III-R) ein Mutationsscreening des gesamten kodierenden Bereichs, der Exon-Intron-Grenzen und der putativen Promotorregionen von CREM beziehungsweise ICER unter Verwendung PCR-basierter Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCA) und nachfolgender direkter Sequenzierung durchgeführt werden.

Mit der Zielsetzung, die Rolle identifizierter Polymorphismen des CREM Gens in der Genese der Panikstörung näher zu bestimmen, wird schließlich deren Frequenz in Assoziationsstudien mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen-Untersuchungen (RFLP), direkter Sequenzierung und Fragmentanalysen in der Patientenstichprobe und einem Kontroll-Kollektiv anonymer Blutspender vergleichend bestimmt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Stichproben

2.1.1 Patienten- und Kontrollstichproben

Die untersuchte Patientenstichprobe umfasste 88 Patienten deutscher Abstammung mit diagnostizierter Panikstörung und setzte sich aus 57 weiblichen und 31 männlichen Probanden zusammen. Der Altersdurchschnitt der Patienten lag zu Beginn der vorliegenden Mutations- und Assoziationsanalyse des CREM Gens im Jahre 2000 bei 43,9 Jahren mit einem 95% Konfidenzintervall (CI) von 41,6 bis 46,3 Jahren (weibliche Probanden: 42,7 Jahre, 95% CI: 40,1 - 45,3 Jahre; männliche Probanden: 46,3 Jahre, 95% CI: 41,4 - 51,2 Jahre). Zum Zeitpunkt der Blutentnahmen, die im Zeitraum von 1994 bis 1996 durchgeführt wurden, lag das jeweilige Durchschnittsalter dementsprechend niedriger (alle Probanden: 38,6 Jahre, 95% CI: 36,2 - 41,0 Jahre; weibliche Probanden: 37,3 Jahre, 95% CI: 34,8 - 39,9 Jahre; männliche Probanden: 40,9 Jahre, 95% CI: 36,0 - 45,8 Jahre). Es bestanden keine verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den einzelnen Probanden. Die Patientenproben wurden im Rahmen eines DFG-geförderten Projektes (DE357/2-1 und 2-2) in den Jahren 1994 bis 1996 an den Kliniken für Psychiatrie und Psychotherapie der Universitäten Würzburg, Frankfurt und Mainz rekrutiert. Alle in dieser Untersuchung eingeschlossenen Patienten wurden gemäß den Kriterien des ‚Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders‘ DSM-III-R (Wittchen HU et al., 1989) auf das Vorliegen einer ‚Panikstörung‘ (DSM-III-R 300.01) oder ‚Panikstörung mit Agoraphobie‘ (DSM-III-R 300.21) unter Verwendung strukturierter klinischer Interviews wie des SADS-LA (‚Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia - Lifetime Anxiety‘; Mannuzza S et al., 1986) oder des CIDI (‚Composite International Diagnostic Interview‘; Robins LN et al., 1988) untersucht. Die endgültigen Diagnosen wurden unter Einsicht der

Krankenakten von erfahrenen Psychiatern gestellt. Bei einem Teil der Patienten lagen zusätzlich einfache Phobien (300.29) oder soziale Phobien (300.23), eine depressive Episode (296.2), rezidivierende depressive Episoden (296.3) oder Alkoholabhängigkeit (303.90) vor. Die prozentualen Anteile der Komorbiditäten innerhalb des Patientenkollektivs sind in Tabelle 2.1.1.1 aufgeführt.

Tab.: 2.1.1.1

Diagnoseschlüssel innerhalb des Patientenkollektivs

Diagnose DSM-III-R	Patienten		
	Gesamt (n=88)	Weiblich (n=57)	Männlich (n=31)
300.21	61 (69,3%)	45 (78,9%)	16 (51,6%)
300.01	27 (30,7%)	12 (21,1%)	15 (48,4%)
300.23	24 (27,3%)	16 (28,1%)	8 (25,8%)
300.29	31 (35,2%)	23 (40,4%)	8 (25,8%)
296.2	12 (13,6%)	8 (14,0%)	4 (12,9%)
296.3	8 (9,1%)	4 (7,0%)	4 (12,9%)
303.90	12 (13,6%)	5 (8,8%)	7 (22,6%)

Legende:

300.21: Panikstörung mit Agoraphobie, 300.01: Panikstörung ohne Agoraphobie; 300.23: soziale Phobien, 300.29: einfache Phobien, 296.2: depressive Episode, 296.3: rezidivierende depressive Episoden, 303.90: Alkoholabhängigkeit

Die Kontrollgruppe bestand aus 88 alters- und geschlechtsangepassten, anonymen deutschen Blutspendern (57 weibliche und 31 männliche Probanden). Zwischen den Kontrollpersonen bestanden keine verwandtschaftlichen Beziehungen. Der Altersdurchschnitt der Kontrollpersonen lag zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchung im Jahre 2000, der sich mit dem Datum der Blutentnahme deckt, bei 43,2 Jahren mit einem 95% Konfidenzintervall (CI) von 41,0 bis 45,4 Jahren (weibliche Kontrollen: 42,2 Jahre, 95% CI: 39,7 - 44,6 Jahre; männliche Kontrollen: 45,2 Jahre,

95% CI: 40,8 - 49,6 Jahre). Die Blutproben der Kontrollpersonen wurden vom Institut für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie der Universität Münster zur Verfügung gestellt.

Von allen an dieser Studie teilnehmenden Personen wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Untersuchung war von den Ethikkommissionen der betreffenden Universitätskliniken geprüft und gebilligt worden.

2.1.2 DNA-Präparation

Die in früheren Untersuchungen mittels NaCl-Fällung nach Miller aus EDTA-Blutproben extrahierte DNA der Patienten konnte in der vorliegenden Studie weiter verwendet werden.

Zur Extraktion der DNA der Kontrollen aus EDTA-Blut wurde das QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) verwendet. Die in einem Aliquot von 200 µl EDTA-Blut enthaltenen Zellen wurden zunächst durch Zugabe von QIAGEN Protease (Proteinase K, 20 mg/ml) lysiert. Nach Angaben des Herstellers wurde die freie DNA an die Silikaoberfläche einer Säule gebunden und über zwei Waschschriffe in einer Pufferlösung (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA; pH 0,9) eluiert. Die DNA-Konzentration wurde über photometrische Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 260 nm als dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren bestimmt. Vor Beginn der Messung wurde ein Nullabgleich mit H₂O durchgeführt. Die extrahierte DNA wurde mit HPLC-H₂O auf 20 ng/µl verdünnt. Dieses Vorgehen entspricht im wesentlichen der erstmals von Carter et al. beschriebenen Methode (Carter MJ et al., 1993).

2.2 Genomische Charakterisierung

Die menschlichen cDNA-Sequenzen des zu untersuchenden Gens für den ‚C-AMP Responsive Element Modulator‘ (CREM) und den ‚Inducible C-AMP Early Repressor‘ (ICER) wurden unter Hinzuziehung der Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>; Burks C et al., 1991) ermittelt. Um die Sequenzen der Exon-Intron-Übergänge und der Intronbereiche zu ermitteln, wurden die cDNA-Sequenzen mittels des ”basic local alignment search tool” (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) Algorithmus mit der ”high throughput genomic sequence”(”htgs”)- und der ”non-redundant”(”nr”)-Datenbank humaner genomischer DNA verglichen und auf die gefundenen Sequenzen der korrespondierenden genomischen Klone projiziert. Hierzu wurden die Programme SIM4 (<http://biom3.univ-lyon1.fr/sim4.html>; Florea L et al., 1998) und BLAST 2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) benutzt. Die Sequenzen der potentiellen humanen Promotorbereiche P1, P3 und P4 des CREM Gens und P2 der ICER Isoform wurden unter Verwendung der EditSeq™ und SeqMan™II Programme (DNASTar, Inc., Madison, WI, USA) mittels Abgleich mit den entsprechenden, bereits publizierten murinen Promotor-Sequenzen ermittelt.

2.3 Mutationsscreening

2.3.1 Primer – Konstruktion

Primer flankieren bei der PCR die zu amplifizierende DNA-Region und stellen die von der DNA-Polymerase für die DNA-Synthese in 5‘-3‘-Richtung benötigten freien 3‘-OH-Gruppen zur Verfügung. Die Spezifität der Primer wird von deren Länge, Schmelztemperatur (T_m-Wert), Selbst- und 3‘-Komplementarität, CG-Gehalt und Gehalt an Mononukleotid-Repeats bestimmt.

Unter Benutzung des vom Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center for Genome Research, Cambridge, MA, USA, im Internet zur Verfügung gestellten Computer-assistierte Primersuchprogramms (Copyright (c) 1996,1997,1998 Whitehead Institute for Biomedical Research, http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html) wurden für die jeweils zu amplifizierenden Fragmente die entsprechenden Primer konstruiert (Rozen S et al., 2000). Die Fragmentlängen wurden in einer Größenordnung zwischen 215 bp und 290 bp gewählt, da die optimale Sensitivität der Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) bei PCR-Produktgrößen von 150 bp bis 300 bp liegt (Sheffield VC et al., 1993; Kukita Y et al., 1997). Die von den Primerpaaren flankierten Fragmente umfassten die gesamte kodierende Region, die Exon-Intron-Grenzen sowie die putativen Promotorbereiche des CREM Gens.

Die gefundenen Primer wurden als HPSF® („high purity salt free“)-Oligonukleotide kommerziell (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Zur Verwendung in der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden die Primer mit HPLC-H₂O auf eine Konzentration von 10 pmol/µl verdünnt.

2.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine in-vitro Technik, mit der sich eine zwischen zwei Oligonukleotid-Primern liegende genomische Sequenz spezifisch durch eine DNA-Polymerase amplifizieren lässt (Saiki RK et al., 1985 und 1988). Die DNA-Matrize wird unter Zugabe von Oligonukleotid-Primern, dNTPs, Puffer und DNA-Polymerase in einer Primerverlängerungsreaktion („primer extension“) von 25-30 Zyklen etwa 10⁵-mal vervielfacht. Nach Denaturierung der dsDNA bei 94°C in Einzelstränge werden zunächst ‚Sense‘- und ‚Antisense‘-Oligonukleotide bei optimaler Anlagerungstemperatur („annealing temperature“) als Primer an die denaturierte ssDNA hybridisiert. Die Temperatur wird daraufhin auf 72°C erhöht und die DNA-Matrize von

Taq-Polymerase in Gegenwart aller vier dNTPs neu synthetisiert. Mit der Denaturierung in Einzelstränge bei 94°C beginnt ein neuer Zyklus.

Standard PCR-Ansätze mit einem Volumen von 25 µl enthielten 2,5 µl 10 x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl), 1,0 µl 50 mM MgCl₂, 0,2 µl (1U) Taq-DNA-Polymerase (alle Life TechnologiesTM, Eggenstein, Deutschland), 0,5 µl 10 mM dNTP Mix (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland), jeweils 1 µl F/R Primer (10 pmol/µl), 14,8 µl HPLC-H₂O und 4 µl DNA (20 ng/µl). Die eingesetzten Primerpaare mit den jeweiligen Reaktionsbedingungen sind Tabellen 2.3.2.1 und 2.4.1.1 zu entnehmen.

Zur Amplifikation der CG-reichen Fragmente Crem-pro1(2), Crem-pro1(3), Crem-pro1(4), Crem-pro4(1) und Crem-pro4(2) (Tab. 2.3.2.1) wie auch Crem-Pro1(0)-c/g (Tab. 2.4.1.1) wurden pro 25 µl PCR-Ansatz 2,5 µl 10 x PCR-Puffer (enthält 15 mM MgCl₂ pro 10 µl), 5 µl Q-Solution, 0,125 µl (5U/µl) HotStarTaqTM DNA-Polymerase (alle Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), 0,5 µl 10 mM dNTP Mix (Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland), jeweils 1 µl F/R Primer (10 pmol/µl), 10,875 µl HPLC-H₂O und 4 µl DNA (20 ng/µl) verwendet.

Um die optimale Anlagerungstemperatur („annealing temperature“) der Primer zu ermitteln, wurde für jedes Primerpaar zunächst eine Gradienten-PCR unter zwölf verschiedenen Anlagerungstemperaturen (44°C - 66°C) in einem RoboCycler®Gradient 96 PCR-Gerät (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt.

Die Amplifikationsreaktion wurde in einem PE Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Langen, Deutschland) unter Standard-PCR-Bedingungen ausgeführt (initial 10 min bei 94°C - 30 Zyklen: 30 s bei 94°C, 30 s bei der jeweiligen Anlagerungstemperatur der Primer, 30 s bei 72°C - abschließend 10 min bei 72°C).

Tab.: 2.3.2.1

PCR-Primer zur Amplifikation der kodierenden Bereiche, der Exon-Intron-Grenzen und der Promotorbereiche von CREM und ICER

Region	Primerpaar	Primersequenz (5'-3')	Fragmentgröße (bp)	Temperatur
CREM Promotor 1	Crem-pro1(0)-F	cctggggagatagaggtgc	272	64°C
	Crem-pro1(0)-R	gccaaaggagggaactagcc		
	Crem-pro1(1)-F	tctggctgacaagtcattgg	274	58°C
	Crem-pro1(1)-R	aaaatccaggctcgaactcc		
	Crem-pro1(2)-F	cggtccatttcattgttg	224	50°C
	Crem-pro1(2)-R	ctcacgtcagctgtgatgc		
	Crem-pro1(3)-F	gctgcagcgtacttttg	222	54°C
	Crem-pro1(3)-R	agccgacgcaccacttac		
CREM Promotor 1 und Exon I	Crem-pro1(4)-F	ctcgcgtccgtaacagtg	248	50°C
CREM Exon II	Crem-exon-II-F	tgttacgatctccaattcaa	287	56°C
	Crem-exon-II-R	agtgaatggctgaataatttg		
CREM Exon III	Crem-exon-III-F	gggatgtcaacctgtatttc	258	56°C
	Crem-exon-III-R	tetgcacctaatctcatttc		
CREM Promotor 3	Crem-pro3(1)-F	aagactccgtctcagtg	223	58°C
	Crem-pro3(1)-R	cactaacaagctaagcaagaag		
	Crem-pro3(2)-F	tgcttttcccctatagaacagac	229	60°C
	Crem-pro3(2)-R	caaagctactaggcctgcattc		
	Crem-pro3(3)-F	attttcaggagcagagttg	270	56°C
	Crem-pro3(3)-R	acagccttattggctttgc		
	Crem-pro3(4)-F	acgggtcagagctagtcacc	190	60°C
	Crem-pro3(4)-R	accacatcccaaaaaatcc		
CREM Exon θ 1	Crem-exon- θ 1-F	aattgcaaagccaataaagg	227	56°C
	Crem-exon- θ 1-R	ttttaccctcttttcacaagg		
CREM Promotor 4	Crem-pro4(1)-F	caaagcatcagctcacatcc	290	52°C
	Crem-pro4(1)-R	aagctctacctcccagggtc		
	Crem-pro4(2)-F	ggcgggcacctgtagtcc	250	60°C
	Crem-pro4(2)-R	tcactacgacctcacgcctac		
CREM Exon θ 2	Crem-exon- θ 2-F	tggcctaagaaaggcttcac	232	56°C
	Crem-exon- θ 2-R	tttctgctgctgagaaatg		
CREM ExonIV (glutI)	Crem-exon-IV-F	tccagctttaatcctcaatgg	234	50°C
	Crem-exon-IV-R	aaaaatggctcaagaaagtc		
CREM Exons V/VI (Sequenz)	Crem-exons-V/VI(seq)-F	ctgcacacacagactcttagc	(→563)	64°C
	Crem-exons-V/VI(seq)-R	taatgcaaaacctgagttgc		
CREM Exon V (P-BoxI)	Crem-exon-V-F	ttttgaaatgagggaaaag	240	48°C
CREM Exon VI (P-BoxII)	Crem-exon-V-R	aaggaagaattgattgatg		
	Crem-exon-VI-F	catgtatcttagtgactaccttg	215	54°C
	Crem-exon-VI-R	gcactgatgatcgaattgc		

Region	Primerpaar	Primersequenz (5'-3')	Fragment- größe (bp)	Tem- pera- tur
CREM Exon VII (glutII-1)	Crem-exon-VII(1)-F	cccagagtattctccaatagg	220	52°C
	Crem-exon-VII(1)-R	gctgattgtgctgcgtactg		
CREM Exon VII (glutII-2)	Crem-exon-VII(2)-F	cccaggatctgatggtgttc	280	56°C
	Crem-exon-VII(2)-R	ttttaaagtcctccaacc		
CREM Promotor2	Crem-pro2(1)-F	tgtgggtttattctcccttag	246	60°C
	Crem-pro2(1)-R	acaggcgagctcactgaaac		
	Crem-pro2(2)-F	gccacctcaaacagatttc	189	60°C
	Crem-pro2(2)-R	gcaagcatgtgcaggataag		
CREM Promotor2/ ICER Exon I	Crem-pro2/exon-I-F	ttatagggttgggttcagt	286	60°C
CREM Exon VIII (γ -Exon)	Crem-exon-VIII-F	gggaagaggaaggaactaac	216	62°C
	Crem-exon-VIII-R	cagaaaaagcatggggttg		
CREM Exon IX	Crem-exon-IX-F	tcattccagatcagttttat	274	50°C
	Crem-exon-IX-R	tgctctagaagttaccgattc		
CREM Exon X	Crem-exon-X(1)-F	aaggctgttctctgtatcatt	232	60°C
	Crem-exon-X(1)-R	gcattctctgcttgattaga		
	Crem-exon-X(2)-F	ggaactcaaggccctcaaag	288	64°C
	Crem-exon-X(2)-R	agcaaaaggcaacaagc		
	Crem-exon-X(3)-F	tggacttgggaaggacac	265	64°C
	Crem-exon-X(3)-R	cttcagcactgcaactc		
	Crem-exon-X(4)-F	aatgctttgttgcccttg	216	62°C
	Crem-exon-X(4)-R	catgctgccttcagttcatag		
	Crem-exon-X(5)-F	gacattgttctccaaaacag	279	58°C
	Crem-exon-X(5)-R	ggcattggaacaagccttac		
Crem-exon-X(6)-F	ttcctaaaatgcttcactgtacg	239	54°C	
Crem-exon-X(6)-R	ctgctggatgcattattttg			

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

PCR-Produkte 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 bedingt durch den Molekularsieb-Effekt des Agarosegels umgekehrt proportional der Molekülgröße des Amplikons (Aaij C et al., 1972). Unter Einbau des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid (1 mg/ml) in den DNA-Doppelstrang kann das Fragment unter UV-Licht detektiert werden (Sharp PA et al., 1973). Mit Hilfe eines Größenmarkers, der parallel auf das Gel aufgetragen wird, läßt sich die Größe des

Amplikons bestimmen.

Zur Herstellung eines 1,5% Agarosegels für DNA-Partikelgrößen von 0,2 bis 3 kb wurden 7,5 g SeaKem® LE Agarose (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) in 500 ml 1xTBE (10xTBE: 107,32 g 0,89 M TRIS, 55,03 g 0,89 M Borsäure, 7,44 g 2mM EDTA; pH 8,3) durch Aufkochen für 5 min aufgelöst. Der Ansatz wurde mit aqua dest. auf ein Zielvolumen von 500 ml aufgefüllt und auf 60°C erhitzt. 20 ml dieses Ansatzes wurden mit 5 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) versetzt und in erstarrtem Zustand in eine Horizontal-Gel-Elektrophorese-Kammer (Harnischmacher Labortechnik, Arnsberg, Deutschland) mit 1xTBE als Elektrophoresepuffer eingepaßt. Jeweils 5 µl des PCR-Produktes wurden mit 1 µl Bromphenolblau-Ladepuffer (10 ml 10xTBE (Herstellung s.o.), 40 ml 20% Ficoll, 10 ml 0,1% Bromphenolblau, 40 ml H₂O) versetzt und bei 13 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Als Längenstandard diente der 100 bp DNA ladder Gene ruler™ (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland). Zur Geldokumentation wurde ein UV-Licht-Kamerasystem verwandt (MultiImage™ Light Cabinet, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA).

2.3.4 Einzelstrang-Konformations-Analyse

- ‚Single stranded conformational analysis‘ (SSCA) -

Einzelsträngige DNA-Fragmente mit geringfügigen Sequenzunterschieden lassen sich durch Elektrophorese auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel voneinander unterscheiden. Ursache für diese sequenzabhängigen Mobilitätsunterschiede ist, daß durch primärstrukturabhängige Basenpaarungen innerhalb des Einzelstranges die Konformation der Tertiärstruktur und damit die elektrophoretischen Wanderungseigenschaften des Nukleinsäurepolymers beeinflußt werden. Einzelne Basensubstitutionen lassen sich somit am im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlichen Bandenmuster erkennen (Orita M et al., 1989).

Die Glasplatten eines Multigel-Elektrophorese-Systems (11x12 cm Gelgröße, 1 mm Geldicke; Whatman Biometra®, Göttingen, Deutschland) wurden mit Extran und 70%

Ethanol gereinigt. Zwischen jeweils zwei durch Gummileisten abgedichtete Platten wurde daraufhin ein 10% nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel (Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 49:1; 0,5xTBE; 100 µl TEMED pro 100 ml Ansatz, 100 µl Ammoniumpersulfat pro 10 ml Ansatz) gegossen und in polymerisiertem Zustand mit 0,5xTBE als Laufpuffer in die Elektrophoresekammer eingesetzt.

Für die Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) wurden 8 µl des PCR-Produkts zunächst mit 12 µl eines Elektrophorese-Puffer-Gemisches (Formamid / Bromphenolblau-Ladepuffer (Herstellung siehe 2.3.3) im Verhältnis 6:1) versetzt, für 5 min bei 94°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt.

Jeweils 7 µl der denaturierten PCR-Produkt/Puffer-Gemische sowie 4 µl des 100 bp DNA ladder Gene rulerTM (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) als Längenmarker wurden schließlich auf getrennte Laufspuren des Gels aufgetragen und bei zwei verschiedenen Bedingungen (Raumtemperatur bei 6 V/cm und 4°C bei 7 V/cm) elektrophoretisch über 12-16 h aufgetrennt.

2.3.5 Silberfärbung

Nukleinsäuren, die in einer Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt wurden, lassen sich auf dem Gel mittels einer Silberfärbung sichtbar machen. Das Prinzip der Silberfärbung beruht auf einer durch Lichteinfall katalysierten chemischen Reduktion von ionischem zu metallischem Silber (Boulikas T et al., 1983).

Die Polyacrylamidgele wurden aus den Glasplatten gelöst und in einer 220x150x55 cm Glasinstrumentenschale (Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) auf einem Taumel-Wipptisch WT12 min (Whatman Biometra®, Göttingen, Deutschland) mit einer Wippfrequenz von 40/min nach folgendem Protokoll gefärbt: 5 min – 10% Ethanol, 3 min - 1% HNO₃, 10 min - AgNO₃ (10 g AgNO₃, 5 ml Formaldehyd ad 5000 ml H₂O), 3 x 1 min - aqua dest., Fällungsreaktion - Na₂CO₃ (150 g Na₂CO₃, 2,5 ml Formaldehyd ad 5000 ml H₂O), Entwicklung - Na₂CO₃ (150 g Na₂CO₃, 2,5 ml

Formaldehyd ad 5000 ml H₂O), Fixierung - 10% CH₃COOH. Die Gele wurden anschließend zwischen Filterpapier (Schleicher & Schuell GmbH, Einbeck, Deutschland) und Zellophan für 2,5 h auf einem Geltdrockner Maxidry D64 (40x60 cm, Whatman Biometra®, Göttingen, Deutschland) unter Anlegen eines Vakuums getrocknet.

2.3.6 Sequenzierung

Die Lokalisation und die Art eines Polymorphismus lassen sich über DNA-Sequenzierung definieren. Direktes Sequenzieren basiert auf der Didesoxy-Ketten-Abbruch-Methode (Sanger F et al., 1977). Die DNA wird hier als einzelsträngige Matrize unter Einbau von fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Terminatoren („Dye Terminatoren“), die die einzelnen Nukleotide spezifisch markieren und jeweils zufällig zum Abbruch der Synthese führen, reamplifiziert. Während der Elektrophorese des Amplikons wird ein Laserstrahl konstant auf eine bestimmte Stelle des Gels fokussiert. Passieren die Nukleotid-spezifisch markierten DNA-Fragmente diese Stelle, regt der Laserstrahl die Farbstoffe zur Fluoreszenz an. In einem angeschlossenen Computer werden die gemessenen Wellenlängen der einzelnen Fluoreszenzmaxima aufgenommen und die Sequenz des DNA-Fragments rekonstruiert.

2.3.6.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zunächst wurde das jeweils zu sequenzierende Fragment unter Benutzung des zugehörigen Primerpaares (siehe Tabelle 2.3.2.1) in einer Standard-PCR-Reaktion (Durchführung siehe 2.3.2) mit einem modifizierten Endvolumen von 50 µl amplifiziert.

2.3.6.2 Aufreinigung des PCR-Produkts

Unter Verwendung des QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) wurde das PCR-Produkt nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Hierbei wurde die amplifizierte DNA bei einem $\text{pH} < 7,5$ an eine Silika-Membran adsorbiert. Nach Auswaschen von Verunreinigungen über einen ethanolhaltigen Puffer wurde die DNA mit Tris-Puffer (10mM Tris-Cl; $\text{pH} 8,5$) eluiert. Der reine DNA-Gehalt (ng/Bande) des Eluates wurde unter elektrophoretischer Auftrennung auf Agarosegel (siehe 2.3.3) im Vergleich mit dem SmartLadder (Eurogentec, Köln, Deutschland) als standardisiertem Längen- und ng-Gehalt-Marker bestimmt.

2.3.6.3 Sequenzierreaktion

Zur Markierung der DNA mit Fluoreszenz-Farbstoffen wurde das BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems, Langen, Deutschland) verwendet, das BigDye® Terminatoren für die einzelnen Nukleotide (dR110 BD/C, dR6G BD/A, dTAMRA BD/G, dROX BD/T) sowie AmpliTaq®-DNA-Polymerase enthält. Ein Standard-Ansatz mit einem Endvolumen von 10 μl pro F- beziehungsweise R-Primer setzte sich wie folgt zusammen: 2 μl BigDye®, 2 μl Sequenzierpuffer (200 mM Tris ($\text{pH} 9,0$) und 5 mM MgCl_2), 0,5 μl F- beziehungsweise R-Primer, 50-100 ng PCR-Produkt, 4,0 μl H_2O . Die Sequenzierreaktion wurde in einem PE Applied Biosystems GeneAmp® PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Langen, Deutschland) durchgeführt und umfasste 25 Zyklen (10 s - 96°C , 10 s - 55°C , 4 min - 60°C).

2.3.6.4 Aufreinigung des Sequenzierreaktions-Produkts

Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden unter Verwendung eines DyeEx™ Spin Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers von nicht-inkorporierten BigDye® Terminatoren gereinigt. Dabei wurden BigDye® Terminator-Rückstände in den Poren des Gelfiltrationsmaterials retiniert. Die DNA wurde über eine Säule eluiert und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.3.6.5 Sequenzanalyse

Für die Sequenzanalyse wurde zunächst ein 4,8% denaturierendes Polyacrylamidgel angesetzt. Hierzu wurden 18 g Urea in 26,5 ml HPLC- H_2O mit 5 ml 10xTBE und 6 ml

40% PAGE-plus-Lösung (AMRESCO, Solon, USA) aufgelöst und nach Vakuumfiltration mit 300 µl APS und 20 µl TEMED versetzt. Nach Gießen der Polyacrylamidlösung zwischen zwei Glasplatten (38x43 cm Gelgröße, 2 mm Geldicke; Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und Polymerisation des Gels wurden die Platten in ein automatisches Sequenziergerät 377 Applied Biosystems (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) eingesetzt.

Die aufgereinigten Sequenzierprodukte wurden in je 2,5 µl eines Gemisches aus 25 mM Blue Dextran-EDTA (pH 8,0; Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und Formamid (Verhältnis 1:5) aufgenommen und für 2 min bei 90°C denaturiert. Von diesen Ansätzen wurden jeweils 1,5 µl auf eine Laufspur des Gels aufgetragen und über 7 h bei 2700 V mit 1xTBE als Laufpuffer elektrophoretisch aufgetrennt. Die Daten wurden von einem angeschlossenen Rechner automatisch analysiert.

2.4 Genotypisierung

2.4.1 Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen Untersuchung - ‚Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Assay‘ -

Zur Typisierung eines größeren Probenkollektivs hinsichtlich bestimmter DNA-Polymorphismen lassen sich statt der aufwendigen Sequenzierung Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) Untersuchungen heranziehen.

Polymorphe Sequenzen können bestimmte Allele bedingen, denen im Vergleich zum Wildtyp entweder die Erkennungsschnittstelle einer bestimmten Restriktionsendonuklease fehlt, oder die eine zusätzliche Restriktionsstelle aufweisen. Werden die den betreffenden Polymorphismus enthaltenden PCR-Produkte mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease inkubiert, entstehen in einer Gelelektrophorese identifizierbare unterschiedliche Restriktionsfragmente, deren Längen für die jeweiligen Allele spezifisch sind.

Zum Teil unter Benutzung mutagener Primer zur artifiziellen Einführung von allelspezifischen Restriktionsenzym-Erkennungssequenzen (siehe Tabelle 2.4.1.1) wurden die entsprechenden Fragmente in einem Standard-PCR-Ansatz (siehe 2.3.2) amplifiziert.

Tab.: 2.4.1.1

Bedingungen der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) Untersuchungen

Region	Austausch	Primerpaar (5'-3') Anlagerungstemperatur	Restriktions- enzym	Allel	Fragment- größen (bp)
Crem Pro1- c/g	C → G	Crem Pro1(0)-c/g (F) ¹ : accacgccactgcagcccgg	BsuRI	C	130 + 20
		Crem Pro1(0)-c/g (R): gccagaaatccaatgacttg		G	150
52°C					
Crem Pro1- a/g	A → G	Crem Pro1(0)-a/g (F): tggggagatagaggttcag	Bsh1285I	A	158
		Crem Pro1(0)-a/g (R) ¹ : gtcagccagagtaacggcgg		G	139 + 19
64°C					
Crem ExonVII-g/a	G → A (Gly → Asp)	Crem-exon-VII(2)-F: cccaggatctgatggtgttc	MvaI	G	63 + 36 + 3
		Crem-exon-VII(1)-R: gctgattgtgctgcgtactg		A	99 + 3
54°C					

Legende: ¹ Mutagene Primer zur artifiziellen Einführung einer Restriktionsschnittstelle
(die jeweilige mutagene Basensubstitution ist fett gedruckt)

Für den Restriktionsansatz mit einem Endvolumen von 20 μl wurden 6 μl des PCR-Produkts mit 1 μl Restriktionsenzym, 2 μl Enzym-Puffer (alle MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) und 11 μl HPLC-H₂O versetzt und - geltend für alle in dieser Arbeit verwandten Enzyme - bei 37°C für 4 h inkubiert.

Anschließend wurden 7 μl eines Gemisches von 4 μl des inkubierten Restriktionsansatzes und 6 μl eines Elektrophorese-Puffer-Ansatzes (Formamid/Bromphenolblau-Ladepuffer (Herstellung siehe 2.3.3) im Verhältnis 6:1) auf einem 15% Polyacrylamidgel (Herstellung siehe 2.3.4) bei 20 V/cm über 2 h elektrophoretisch aufgetrennt (Laufpuffer: 1xTBE) und das Bandenmuster mittels einer Silberfärbung (siehe 2.3.5) sichtbar gemacht.

2.4.2 Fragmentanalyse

Zur Längenbestimmung von DNA-Fragmenten bei polymorphen repetitiven Elementen läßt sich die Fragmentanalyse heranziehen. Zur automatischen Analyse müssen die DNA-Fragmente zunächst mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert werden. Dazu wird ein Primer durch chemische Modifikation am 5'-Terminus mit einem Fluoreszenz-Amidit versehen und direkt mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion in die DNA inkorporiert. Das so markierte PCR-Produkt wird auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Länge des DNA-Fragments wird in Analogie zur Laufgeschwindigkeit automatisch über einen Argonlaser (Hauptemission bei 488 nm und 514,5 nm) detektiert und in einem angeschlossenen Rechnersystem analysiert.

Zunächst wurde der Vorwärtsprimer Crem-pro2(1)-F des zu analysierenden Fragments ,Crem-Promotor 2' am 5'-Terminus mit einem 6-FAM-Phosphoramidit (6'-Carboxyamido fluoreszein) chemisch markiert (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) und mit HPLC-H₂O auf eine Konzentration von 10 pmol/ μl verdünnt.

Das DNA-Fragment wurde in einem Standard-PCR-Ansatz (siehe 2.3.2) unter verlängerten Zyklusbedingungen (initial 10 min bei 94°C - 30 Zyklen: 1 min bei 94°C, 1 min bei 60°C, 1,5 min bei 72°C – abschließend 10 min bei 72°C) mit dem Primerpaar

Crem-pro2(1)-F(6-FAM) und Crem-pro2(1)-R (siehe Tabelle 2.3.2.1) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit HPLC-H₂O im Verhältnis 1:16 verdünnt. 1 µl dieser Verdünnung wurde anschließend mit 2,2 µl eines Gemisches aus 25 mM Blue Dextran-EDTA (pH 8,0; Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) und Formamid (Verhältnis 1:5) sowie 0,3 µl ROX size standard (PE Applied Biosystems Langen, Deutschland) versetzt und nach 2-minütiger Inkubation bei 90°C auf Eis gekühlt. Ein Aliquot von 1 µl dieses Ansatzes wurde auf ein 4,8% Polyacrylamidgel (Herstellung siehe 2.3.6.5) aufgetragen und über 2 h bei 2700 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Länge (bp) des DNA-Fragments wurde von einem 377 Applied Biosystems Sequenziergerät (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) automatisch analysiert.

2.4.3 Transkriptionsfaktoranalyse

Unter Verwendung der im Internet zugänglichen MatInspector Version 2.2 (Quandt K et al., 1995) wurden die die Polymorphismen enthaltenden Promotorsequenzen mit der Datenbank TRANSFAC – „The Transcription Factor Database“ (<http://transfac.gbf.de/> TRANSFAC; Wingender E et al., 2000), die alle bekannten Konsensussequenzen Transaktivator-bindender DNA-Abschnitte enthält, verglichen und somit auf Transkriptionsfaktorbindungsstellen untersucht. Die Transkriptionsfaktorbindungsstellen werden hier auf Grundlage der Übereinstimmung der zu untersuchenden Sequenz mit der Konsensusbindungssequenz für den jeweiligen Transkriptionsfaktor mit einem „score“ bewertet, der den prädiktiven Wert für eine Bindung angibt. Hier wird zwischen den Werten für „core similarity“ und „matrix similarity“ differenziert, die die Übereinstimmung der untersuchten Sequenz mit der Kernkonsensussequenz („core“) beziehungsweise der Umgebungskonsensussequenz („matrix“) des jeweiligen Transkriptionsfaktors anzeigen.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Chi-Quadrat-Tests unter Verwendung eines im Internet verfügbaren Programms der Ohio State University, Columbus, OH, USA (<http://quantrm2.psy.ohio-state.edu/kris/chisq/chisq.htm>). Hierbei wurden die jeweiligen Genotyp- und Allelfrequenzen des Patientenkollektivs mit den Daten der Kontrollgruppe in einer Kontingenztafel verglichen und auf Unabhängigkeit geprüft. Der Chi-Quadrat-Wert wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\chi^2 = \sum_i \sum_j \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Legende: O = beobachtete Frequenz, E = erwartete Frequenz
(jeweils nach der Bedingung i und in der Gruppe j)

Wenn mehr als 20 Prozent der erwarteten Häufigkeiten kleiner als fünf waren, war die Anwendbarkeit des Chi-Quadrat-Tests nicht mehr gegeben. In diesem Fall wurde unter Verwendung der im Internet frei zugänglichen Software „Simple Interactive Statistical Analysis“ (SISA) (<http://home.clara.net/sisa/index.htm>) der exakte Test nach Fisher herangezogen ($p(O \geq E | O \leq E)$).

Das Signifikanzniveau der Parameter wurde folgendermaßen klassifiziert:

- signifikant bei $p \leq 0,05$ (markiert durch *)
- deutlich signifikant bei $p \leq 0,01$ (markiert durch **)
- hoch signifikant bei $p \leq 0,001$ (markiert durch ***)

Die Allel- und Genotypfrequenzen des höher polymorphen Trinukleotid-Repeat-Polymorphismus innerhalb des CREM Promotor 2 wurden mittels einer Monte-Carlo-Analyse unter Verwendung der frei im Internet zugänglichen CLUMP-Software untersucht (Sham PC et al., 1995). Weiterhin wurde hier eine Dichotomisierung der Allelverteilung nach Vorliegen des kürzeren 8-repeats Allels versus aller längeren 9-, 10- und 11-repeats Allele beziehungsweise des 9-repeats Allels versus der 8-, 10- und 11-repeats Allele vorgenommen, was eine zusätzliche Analyse über den Chi-Quadrat-Test ermöglichte. Diese Bildung potentiell funktionell relevanter Subgruppen entspricht dem Konzept eines linearen oder parabolischen funktionellen Zusammenhangs zwischen Fragmentlänge und Expressionsgrad (siehe Deckert J et al., 1999; Sabol SZ et al., 1998).

Bei mittels Chi-Quadrat- oder Monte-Carlo-Analyse signifikanten Befunden wurde weiterhin die Odds-Ratio mit dem jeweils zugehörigen 95% Konfidenzintervall (CI) unter Verwendung des im Internet zugänglichen Programms „Simple Interactive Statistical Analysis“ (SISA) (<http://home.clara.net/sisa/index.htm>) ermittelt. Die Odds-Ratio gibt als Wert für das ‚Quotenverhältnis‘ oder die ‚relative Chance‘ an, um welchen Faktor häufiger oder weniger häufig ein Ereignis unter zwei verschiedenen Bedingungen auftritt. Damit erhält man ein Maß für die mit einem bestimmten Allel verbundene Risikoerhöhung für das Auftreten einer Panikstörung.

Der Wert für die Odds-Ratio wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Odds-Ratio} = \frac{A/B}{C/D}$$

Legende: A = Häufigkeit der Bedingung 1 in Gruppe 1

B = Häufigkeit der Bedingung 2 in Gruppe 1

C = Häufigkeit der Bedingung 1 in Gruppe 2

D = Häufigkeit der Bedingung 2 in Gruppe 2

Weiterhin wurden für die einzelnen Polymorphismen das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht sowie das Kopplungsungleichgewicht in den Kontrollstichproben bestimmt. Hierzu wurden im Internet verfügbare Programme (http://kursus.kvl.dk/shares/vetgen/_Popgen/genetik/applets/kitest.htm; Prof. Christensen, Kopenhagen, Dänemark; <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>; Prof. Lowry, Vassar College, Poughkeepsie, NY, USA) sowie die GENETIX v3.0 Analyse (Belkhir K et al., 1996) herangezogen. Waren die den angegebenen Chi-Quadrat-Werten zugehörigen p-Werte nicht signifikant, konnte das Vorliegen eines signifikanten Hardy-Weinberg-Gleichgewichts angenommen werden.

2.6 Lösungen und Puffer

(soweit nicht im Text aufgeführt)

Silbernitrat (99,9%)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Natriumcarbonat	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Salpetersäure (69-72%)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Essigsäure (99,7%)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Ethanol (96%)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
TEMED 5 ml	Bio-Rad, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd (37%)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Formamid (100ml)	AMRESCO, Solon, USA
Acrylamid/Bisacrylamid 49:1 (40%)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Ficoll	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Extran	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TRIS	ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA	ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Urea	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

2.7 Geräte und Materialien

(soweit nicht im Text aufgeführt)

Eppendorf Reference® Pipetten (0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 50-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Standardtips Pipettenspitzen	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Standard Reaktionsgefäß 3810X (1,5 ml)	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810 R Centrifuge 5417 C	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
MS 1IKA-Minishaker (Vortexer)	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Analysenwaage Typ 1801	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
DU®640 Spectrophotometer	Beckman Instruments GmbH, München, Deutschland
MultiImage™ Light Cabinet	Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA
Vakuumzentrifuge SpeedVac®System AES 1010	Life Sciences International, Frankfurt, Deutschland

3 ERGEBNISSE

3.1 Struktur des humanen CREM Gens

Als Voraussetzung für ein Mutationsscreening des CREM Gens bei Patienten mit Panikstörung wurde zunächst die genomische Struktur des humanen CREM Gens bestimmt. Unter Hinzuziehung der Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>; Burks C et al., 1991) wurden humane cDNA-Sequenzen für CREM unter den GenBank Accession Codes S68271 (Masquilier D et al., 1993) und D14825 (Fujimoto T et al., 1994) sowie für das alternative Produkt ICER unter GenBank Accession Code U44836 (Bodor J et al., 1996) gefunden. Die ermittelten cDNA-Sequenzen sowie die der Literatur entnommenen Sequenzen der CREM Isoformen ,theta 1‘ und ,theta 2‘ (Daniel PB et al., 2000) wurden anschließend mit genomischen Sequenzen der „htgs“- und „nr“-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) verglichen und ließen sich auf die genomischen Klone BAC 314a8 (GenBank Acc. AL157783, Sanger Centre, Hinxton, UK, 2000) und ,Chromosome 10 working draft sequence‘ gi 12735601 (GenBank Acc. NT_008640, Human Genome Project, 2001) projizieren. Unter Berücksichtigung hochkonservierter Konsensussequenzen für die ersten beiden Nukleotide am 5‘-Ende (GT) wie die letzten beiden Nukleotide am 3‘-Ende (AG) eines Introns (Breathnach R et al., 1978) wurden die Exon-Intron-Übergänge ermittelt. Auf diese Weise konnten die genauen Exongrößen, die Sequenzen der Exon-Intron-Übergänge, die bp-Größen der Introns und die Struktur des 3‘-Terminus einschließlich des Poly-A-Signals (GenBank Acc. AL117336; Wilson, S, zur Veröffentlichung eingereicht) bestimmt werden.

Da der zu Beginn der Arbeit als einzige korrespondierende genomische Sequenz verfügbare genomische Klon BAC 314a8 (GenBank Acc. AL157783, Sanger Centre, Hinxton, UK, Aug 2000) eine Sequenzlücke beginnend im 3‘-Ende des Exons P-Box I und endend im 5‘-Ende des Exons P-Box II aufwies, wurde unter Verwendung der aus Tabelle 2.3.2.1 ersichtlichen Primer Crem-Exons-V/VI(seq)-F und Crem-Exons-

V/VI(seq)-R über die lückenhafte DNA-Region sequenziert. Die ermittelte Sequenz der fehlenden Teile der P-Box-Exons sowie des dazwischenliegenden Introns von lediglich 147 bp wurde durch die im Februar 2001 veröffentlichte ‚Chromosome 10 working draft sequence‘ (GenBank Acc. NT_008640, Human Genome Project) bestätigt (Exon P-Box I: Nukleotide Nr. 217930-218028, Exon P-Box II: Nukleotide Nr. 218176-218318).

Weiterhin wurden unter Verwendung des UCSC Genome Browsers (<http://genome.ucsc.edu/>) humane, hodenspezifische expressed sequence tag (EST) Klone identifiziert, die die Sequenz der CREM Exons ‚theta 1‘ und ‚theta 2‘ (Daniel PB et al., 2000) enthalten und sie in 5‘ Richtung verlängern. Exon ‚theta 1‘ wird hierbei um 126 bp (EST Klone BG719264, BG717625, BG724392) und Exon ‚theta 2‘ um 79 bp (EST Klone BG720999, BF979386, BG720329) extendiert.

Zusammenfassend stellt sich die genomische Organisation des humanen CREM Gens im Datenbank-Vergleich wie folgt dar:

Tab.: 3.1.1

Genomische Organisation des humanen CREM Gens

Exon	Nukleotid-Nummern (GenBank Acc. NT_008640)	Exonlänge (bp)
CREM Exon I	163356 - 163387	32
CREM Exon II	173976 - 174073	98
CREM Exon III (ATG)	184559 - 184682	124
CREM Exon θ I	204226 - 204364*	139*
CREM Exon θ II	214713 - 214746*	34*
CREM Exon IV (glut 1)	214894 - 215040	147
CREM Exon V (P-Box I)	217930 - 218028	98
CREM Exon VI (P-Box II)	218176 - 218318	143
CREM Exon VII (glut 2)	227436 - 227624	189
ICER Exon I (ATG)	234437 - 234461	25
CREM Exon VIII (γ -Exon)	240686 - 240721	36
CREM Exon IX (DBD I)	246139 - 246295	157
CREM Exon X (DBD II) (inkl. 3‘-Transkriptionsende und Poly-A-Signal)	250498 - ca. 251416	ca. 918

* vorläufige Exonlänge

Die Sequenzen der Promotoren P1, P3 und P4 des CREM Gens und des Promotor P2 der ICER Isoform wurden in Homologie zu publizierten murinen Sequenzen ermittelt. Nach Arbeiten an der Maus wird der CREM Promotor 1 in einer CG-reichen Insel vor CREM Exon I lokalisiert und als sogenannter Haushalts-Promotor („housekeeping promoter“) beschrieben (Molina CA et al., 1993; Stehle JH et al., 1993). Als typischer „housekeeping promoter“ (Shiga K et al., 1990) ist der putative humane CREM Promotor 1 durch CG-Boxen der Konsensussequenz GGGCGG sowie das Fehlen von TATA-Box- und CAAT-Box-Elementen charakterisiert. CG-Boxen enthalten Konsenserkennungsequenzen für den aktivierenden Transkriptionsfaktor Sp1 (Briggs MR et al., 1986).

Abb.: 3.1.2

Sequenz des CREM Promotor 1 (Mensch)

```

CCTGGACAGAGGTGAGACGCTCGCGGACCTTAGCTTGGGGTTGGCGGCCTTAGGAAGAAACCGACCTCGAGACCTGAAG
ACCTGACAACAGCCGTTACTCTGGCTGACAAGTCATTGGATTCTGGCGCACGCGGCGGGCACGGGCAGCTTCCGGT
TTCCAGCCTTGCCCCGCCCCCTACCTTCCGCCCCACCTCCAGGCTAGTTCCTCCTCTTGGCCCCGCCCCCTGACCTTCCT
TCTCCCTATCCCTAGGCCCGCCCCCTGACCCGCACCTTCCCGCCGCCCTCCCCGGTTCCATTTTCATTGTTGGATTGTG
GCGCTTACTCCTGCTGGCGGCCGGCAGGGGGCGGAGTTCGAGCCTGGATTTTTTCTCGGGCCTCCCCGGGAGGCC
GTCCCGGCGTGGGGGAGGGGAGGACGGGGCGGAGGACGCGGTTCCGGTCCGGTGCAGCGCTACTTTGGTCCGGGGTCGG
CAGGGAGGCCGCGCTACCGCATCACAGCTGACGTGAGGACTACGTGGGGCCGCTGCCGGCTCCGGGTTGCTGGGCGGCG
GCGCCGCTGCTGAGCGGCGGTTCGGGCTCGCCGCTCCACCTCCTCGCGTCCGTAATCAGTGAACGAGGTCGCTACGTAAA
TCCCTTTGCGGCGGGTAAGTGGTGCCTCGGCTCCGGCCCCGAGACCCAGCAGCGGGCGACGCGGCATGAGGTGGAGGT

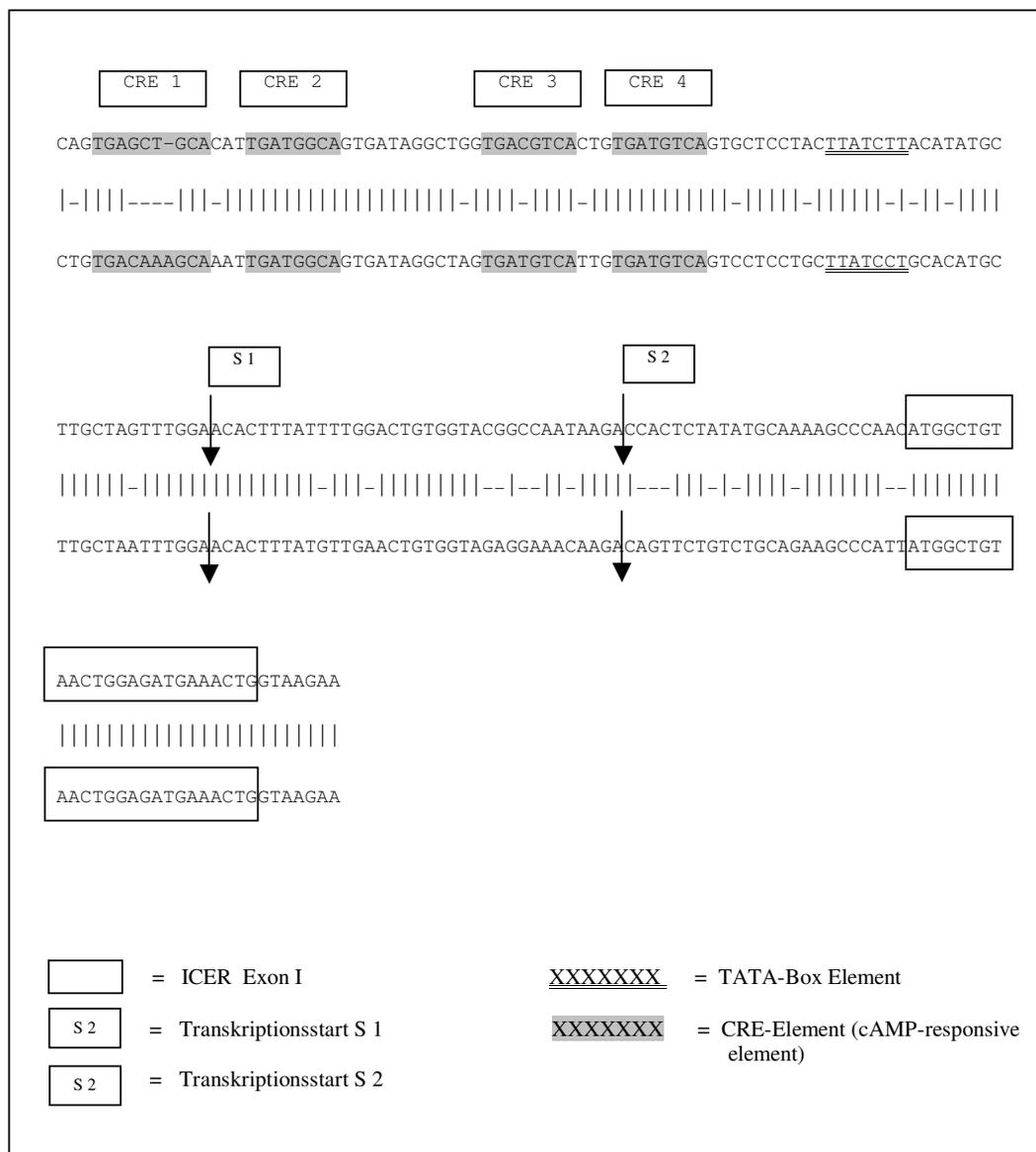
```

GGGCGG = CG-Box Element
 = CREM Exon I

Die humane Sequenz des die ICER Isoform generierenden CREM Promotor 2 wurde ebenfalls in Homologie zu publizierten Daten des CREM Promotor 2 der Maus (GenBank Acc. AJ292222; Molina CA et al., 1993) erschlossen. In Abbildung 3.1.3 sind die murinen und die korrespondierenden humanen Sequenzen unter Kennzeichnung der jeweiligen TATA-Box- und CRE-Elemente vergleichend dargestellt.

Abb.: 3.1.3

Vergleich der murinen und humanen Nukleotidsequenzen des Promotorbereichs CREM P2 (obere Zeile: murine Sequenz, untere Zeile: humane Sequenz)



Die CRE-Bindungsstellen CRE 2 und CRE 4 des CREM Promotor 2 sind beim Menschen im Vergleich zur Maus zu 100% konserviert. CRE 1 und CRE 3 weisen eine Sequenzhomologie von nur 67% beziehungsweise 88% auf, wobei beim humanen CRE 1 eine Insertion von einer Base vorliegt. Die zwölf zwischen den beiden CRE-Tandems liegenden Basen sind zu 100%, die jeweils zwei CRE-Partner trennenden drei Basen zu 67% konserviert. Bei den TATA-Box-Elementen zeigte sich eine Sequenzhomologie von 86%.

Die kodierenden Sequenzen des humanen CREM Gens (GenBank Acc. S68271 (Masquillier D et al., 1993) und D14825 (Fujimoto T et al., 1994)) sowie der ICER Isoform (GenBank Acc. U44836 (Bodor J et al., 1996)) sind im Vergleich zu der korrespondierenden cDNA der Maus (GenBank Acc. NM_013498; Foulkes NS et al., 1993) zu 90% (S68271), 89% (D14825) bzw. 86% (U44836) konserviert.

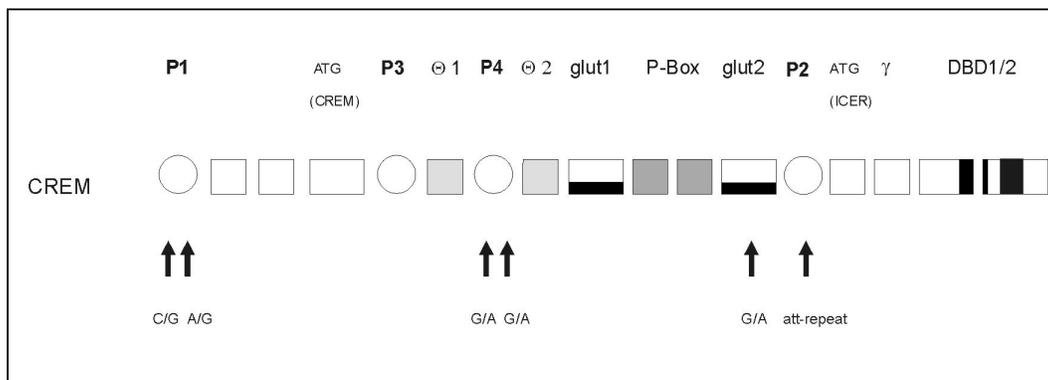
3.2 Mutationsscreening

Das Mutationsscreening des humanen CREM Gens wurde an 40 Proben des Patientenkollektivs mit diagnostizierter Panikstörung unter Verwendung PCR-basierter Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) bei zwei Bedingungen (Raumtemperatur und 4°C) durchgeführt. Die untersuchten Fragmente in einer Größe von 215 bp bis 290 bp umfassten die gesamte kodierende Region, die Exon-Intron-Grenzen, die Promotorbereiche bis etwa - 650 bp vor dem jeweilig nachfolgenden Exon sowie das 3'-Transkriptionseende einschließlich des Poly-A-Signals (GenBank Acc. 9581769, direct submission by Sanger, Hinxton, UK).

Sechs Polymorphismen wurden identifiziert und durch anschließende Sequenzierung bestimmt. Im einzelnen wurden ein Basenaustausch („single nucleotide polymorphism“ - SNP) von C zu G sowie ein zweiter Basenaustausch von A zu G in CREM Promotor 1, zwei Basenaustausche von jeweils G zu A in CREM Promotor 4, ein Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2 sowie ein Aminosäureaustausch von Glycin zu Aspartat über einen Basenaustausch von G zu A an zweiter Stelle innerhalb eines Kodons in CREM Exon ,glut 2‘ gefunden.

Abb.: 3.2.0

Lokalisation der identifizierten Polymorphismen innerhalb des CREM Gens

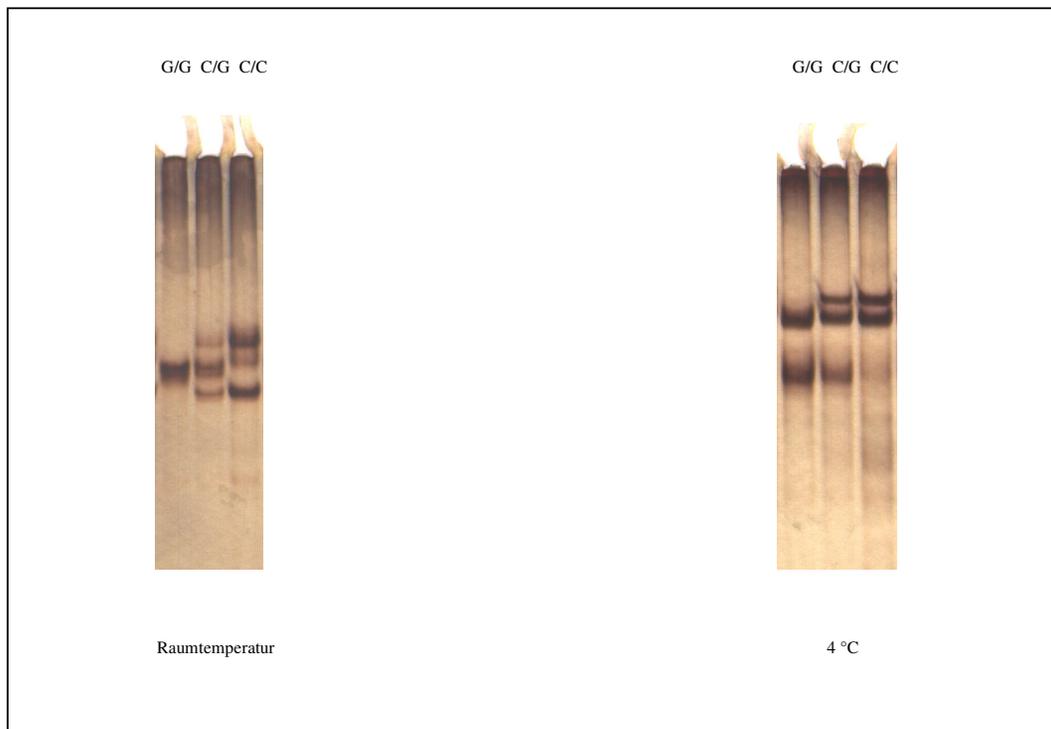


3.2.1 C/G- und A/G-Polymorphismen in CREM Promotor 1

Zunächst wurde der DNA-Abschnitt CREM Pro1(0) innerhalb des CREM Promotor 1 unter Verwendung des in Tabelle 2.3.2.1 aufgeführten Primerpaares Crem-pro1(0)-F/R bei 40 Proben des Patientenkollektivs amplifiziert. In der Einzelstrang-Konformations-Untersuchung (SSCA) der PCR-Produkte zeigte sich nach Silberfärbung ein polymorphes Bandenmuster (Abbildung 3.2.1.1).

Abb.: 3.2.1.1

Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) des DNA-Abschnitts CREM Pro1(0)



Die nachfolgende Sequenzierung der im SSCA-Muster unterschiedlich erscheinenden PCR-Produkte erlaubte die Bestimmung eines Polymorphismus als Basenaustausch von C zu G an Position - 622 bp vor CREM Exon I (Abbildung 3.2.1.2) und eines zweiten Polymorphismus in Form eines Basenaustauschs von A zu G an Position - 535 bp vor CREM Exon I (Abbildung 3.2.1.3).

Abb.: 3.2.1.2

Sequenzierung des DNA-Abschnitts CREM Pro1(0) - C/G-Polymorphismus

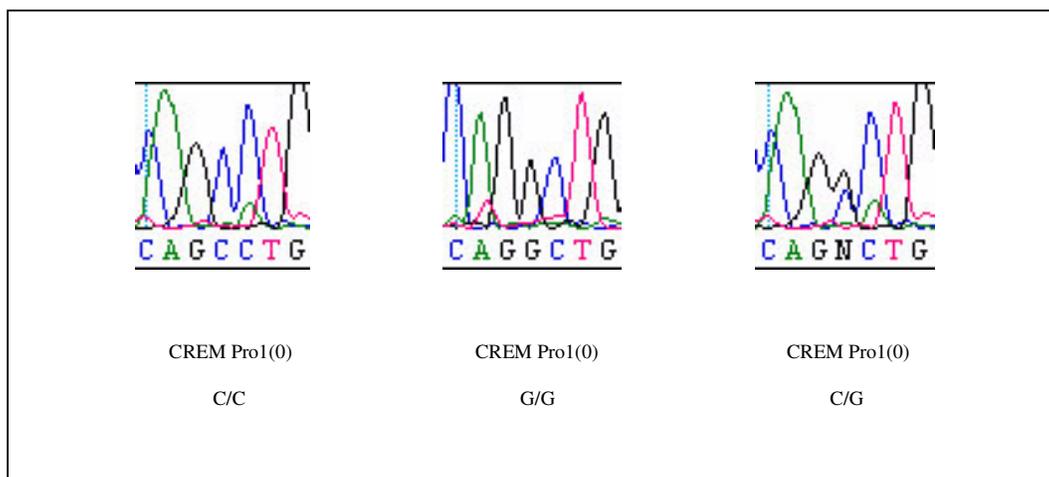


Abb.: 3.2.1.3

Sequenzierung des DNA-Abschnitts CREM Pro1(0) – A/G-Polymorphismus

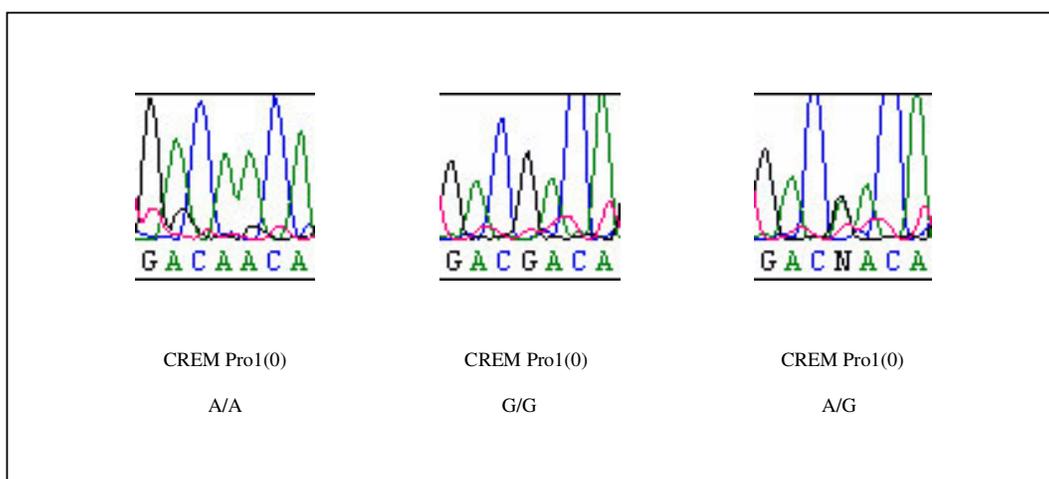


Abb.: 3.2.1.4

Lokalisation des C/G- und des A/G-Polymorphismus innerhalb des CREM Promotor 1

TGGAGAAAAGGGCCACTAGTCAAGGTATGTAGATAGCTTTTAGAAGTCAGAAGAAGCACGCCTGCAGTCCCAGCTACTC
 AGGAGGCTGAGGCCGGAGGATCGCTTGAGCCTGGGGAGATAGAGGTTGCAGAGAGCCGAGACCACGCCACTGCAGCCCAG
CCTGGACAGAGGTGAGACGCTCGCGGACCTTAGCTTGGGGTTGGCGGCCTTAGGAAGAAACCACCTCGAGACCTGAAG
 ACCTGAC**A**ACAGCCGTTACTCTGGCTGACAAGTATTGGATTCTGGCGCACGCGCGCGGGCAGGGCAGCTTCCGGT
 TTCCAGCCTTGCCCCGCCCTACCTTCCGCCACCTCCAGGCTAGTTCCCTCCTCTTGGCCCCGCCCTGACCTTCCT
 TCTCCCTATCCCTAGGCCCGCCCCCTGACCCGCACCTTCCCGCCGCCCTCCCCGGTCCATTTTCATTGTTGGATTGTG
 GCGCTTACTCCTGCTGGCGCCGGCAGGGGGCGGAGTTCGAGCCTGGATTTTTTCTCGGGCCTCCCCGGGAGGCC
 GTCCCGCGTGGGGAGGGGAGGACGGGGCGGAGGACGCGGTTCCGGTCGGCTGCAGCGCTACTTTGGTCCGGGTCGG
 CAGGGAGGCCGCGGCTACCGCATCACAGCTGACGTGAGGACTACGTGGGGCCGCTGCCGGCTCCGGGTTGCTGGCGGGC
 GCGCCGCTGCTGAGCGCGGTCCGGCTCGCCGTCTCCACCTCCTCGCGTCCGTAATCAGTGA**CGAGGTCGCTACGTAAA**
TCCCTTTGCGGGGGSTAAGTGGTGCCTCGGCTCCGGCCCCGAGACCAGCAGCGGGCGACGCGGCATGAGGTGGAGGT

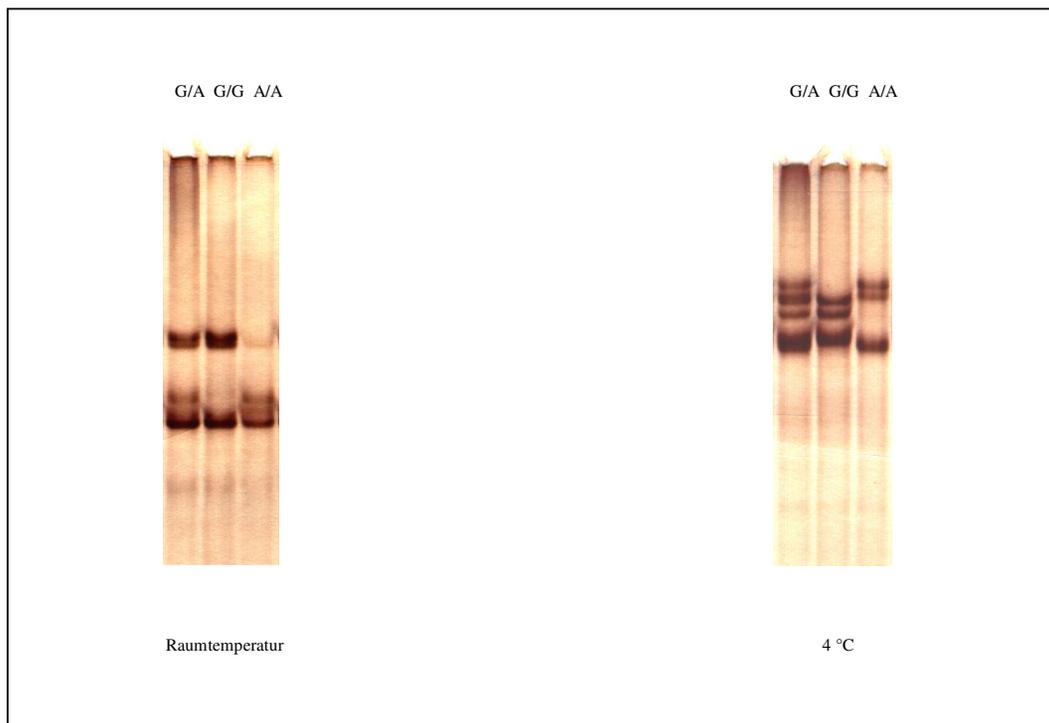
= Crem Exon I
C = Stelle des C/G-Polymorphismus: Statt **C** (Wildtyp) in mutiertem Allel **C**
A = Stelle des A/G-Polymorphismus: Statt **A** (Wildtyp) in mutiertem Allel **G**

3.2.2 G/A (1)- und G/A (2)-Polymorphismen in CREM Promotor 4

Der DNA-Abschnitt CREM Pro4(1) innerhalb des CREM Promotor 4 wurde mit dem in Tabelle 2.3.2.1 aufgeführten Primerpaar Crem-pro4(1)-F/R bei 40 Proben des Patientenkollektivs amplifiziert. In der Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) der PCR-Produkte war nach Silberfärbung ein polymorphes Bandenmuster sichtbar (Abbildung 3.2.2.1).

Abb.: 3.2.2.1

Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) des DNA-Abschnitts CREM Pro 4(1)



Die anschließende Sequenzierung der im SSCA-Bandenmuster unterschiedlich erscheinenden PCR-Produkte zeigte einen Basenaustausch von G zu A an Position - 432 bp vor CREM Exon ,theta 2' (Abbildung 3.2.2.2) und einen zusätzlichen Basenaustausch von G zu A an Position - 428 bp vor CREM Exon ,theta 2' (Abbildung 3.2.2.3).

Abb.: 3.2.2.2

Sequenzierung des DNA-Abschnitts CREM Pro4(1) – G/A (1)-Polymorphismus

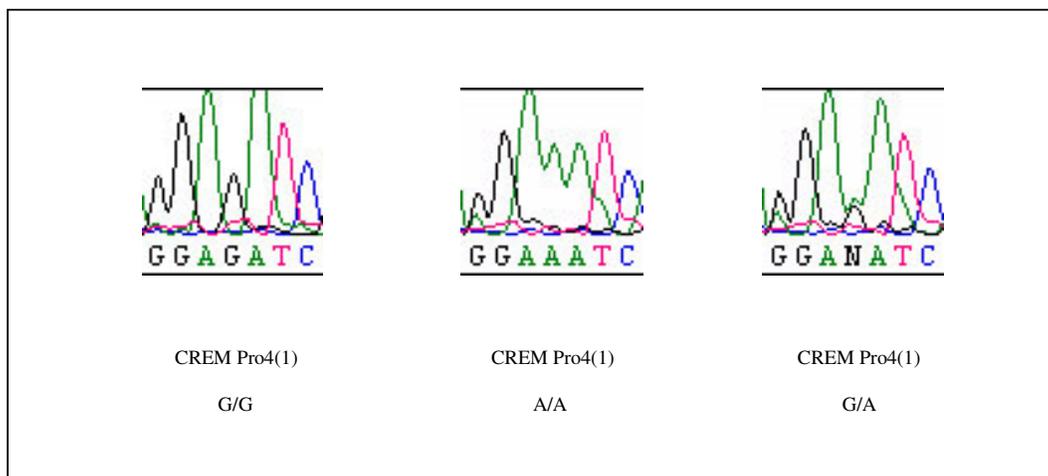


Abb.: 3.2.2.3

Sequenzierung des DNA-Abschnitts CREM Pro4(1) – G/A (2)-Polymorphismus

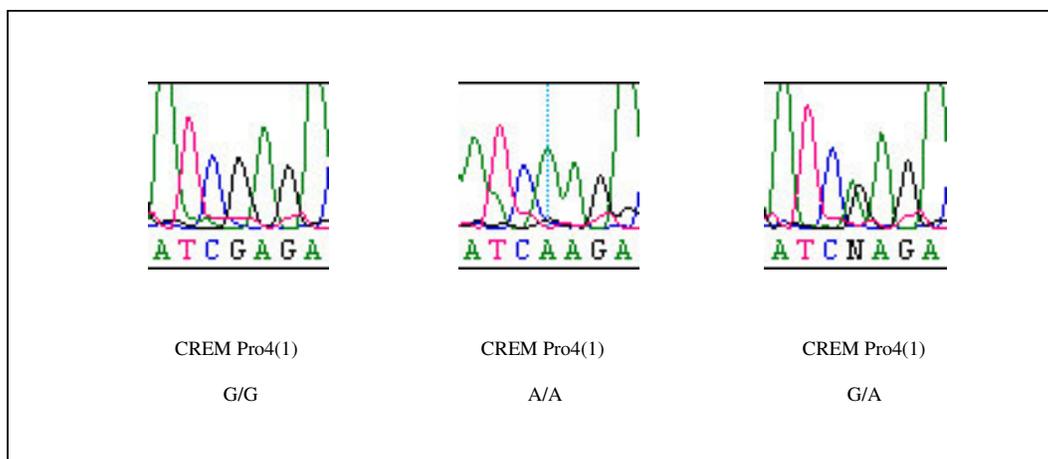


Abb.: 3.2.2.4

Lokalisation des G/A (1)- und des G/A (2)-Polymorphismus innerhalb des CREM Promotor 4

```

ATCAGCTCACATCCAGAGTAACACTAGAAATATCATATGTCACACATTTAATAAAAAATAATCACTGGCCAGGTACAGTGG
CTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGGGCAGATCACAAGGTCAGGAGATCAGACCATCCTGGCTAA
TGGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAACAATTAGCTGAGCGTGGTGGCGGGCACCTGTAGTCCCAGCTACTCAG
GAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCTTGAACCTGGGAGGTAGAGCTTGCAGGGAGCCAAGATCACGCCACTGCACCTCCAGCCT
GGGCAGCAGAGCAAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAGAACCATAGTTAAGTTCTATCTCCAATTTCTCTGAAGAAGTTAGA
GGGTAGTTTATACTCTGGCCTAAGAAAGGCTTCACTGTTAGTAGGCGTGAGGTCGTAGTGAGGTAGTTTAACTGCTTTAG
AACTTTGTGCTTGGAACATTCTTAGCCACCGAAGTATGGGCACCAAAAAGCGATAAGGAGCATGTGTTCCCTTAATAAATGT
CACATCAGAAAATGACTGTTCCAGGACAGTAACCACCTCCCGATG

```

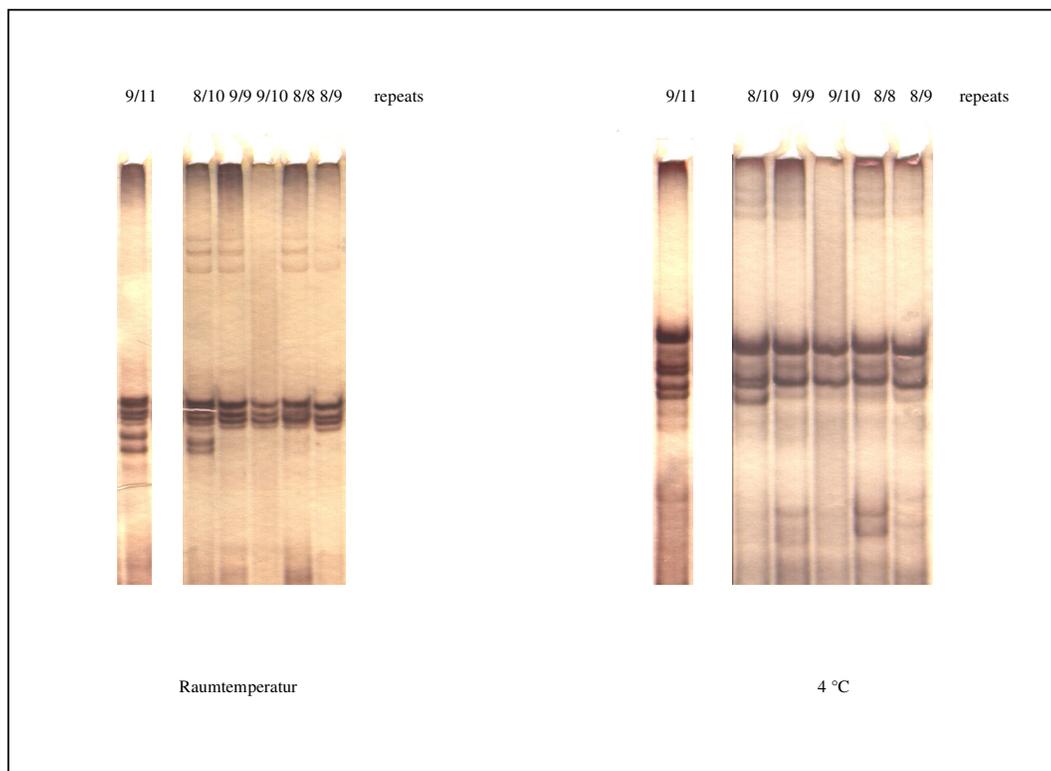
= Crem Exon theta 2 (vorläufige Größe)
G = Stelle des G/A (1) Polymorphismus: Statt G (Wildtyp) in mutiertem Allel A
G = Stelle des G/A (2) Polymorphismus: Statt G (Wildtyp) in mutiertem Allel A

3.2.3 Trinukleotid-Repeat(ATT)-Polymorphismus in CREM Promotor 2

Die Amplifikation des DNA-Abschnitts CREM Promotor 2 wurde mit den Tabelle 2.3.2.1 zu entnehmenden Primern Crem-pro2(1)-F/R bei 40 Proben des Patientenkollektivs durchgeführt. Bei der Einzelstrang-Konformations-Untersuchung (SSCA) der PCR-Produkte war nach Silberfärbung ein polymorphes Bandenmuster zu erkennen.

Abb.: 3.2.3.1

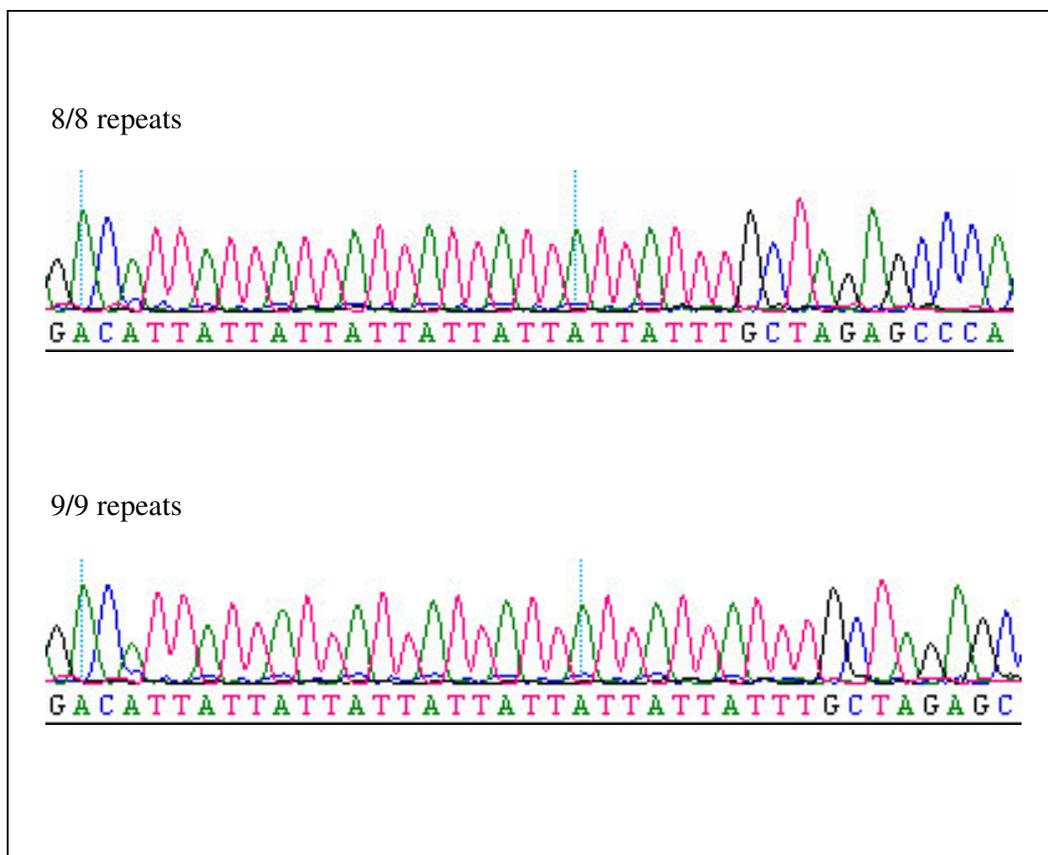
Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) des DNA-Abschnitts CREM Pro 2



Die nachfolgende Sequenzierung der im SSCA-Muster unterschiedlich erscheinenden PCR-Produkte erlaubte die Bestimmung des Polymorphismus als Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus beginnend an Position - 229 bp vor dem Transkriptionsstartpunkt S1 (siehe Abbildung 3.2.3.3) für das alternative CREM Produkt ICER. Die Anzahl der Trinukleotid-Wiederholungen variierte von 8 bis zu 11 ATT-Repeats beziehungsweise von 24 bis zu 33 Basen in den allelischen Kombinationen 8/8, 9/9, 8/9, 8/10, 9/10 und 9/11 (Abbildung 3.2.3.2).

Abb.: 3.2.3.2

Sequenzierung des DNA-Abschnitts CREM Pro 2 - Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus

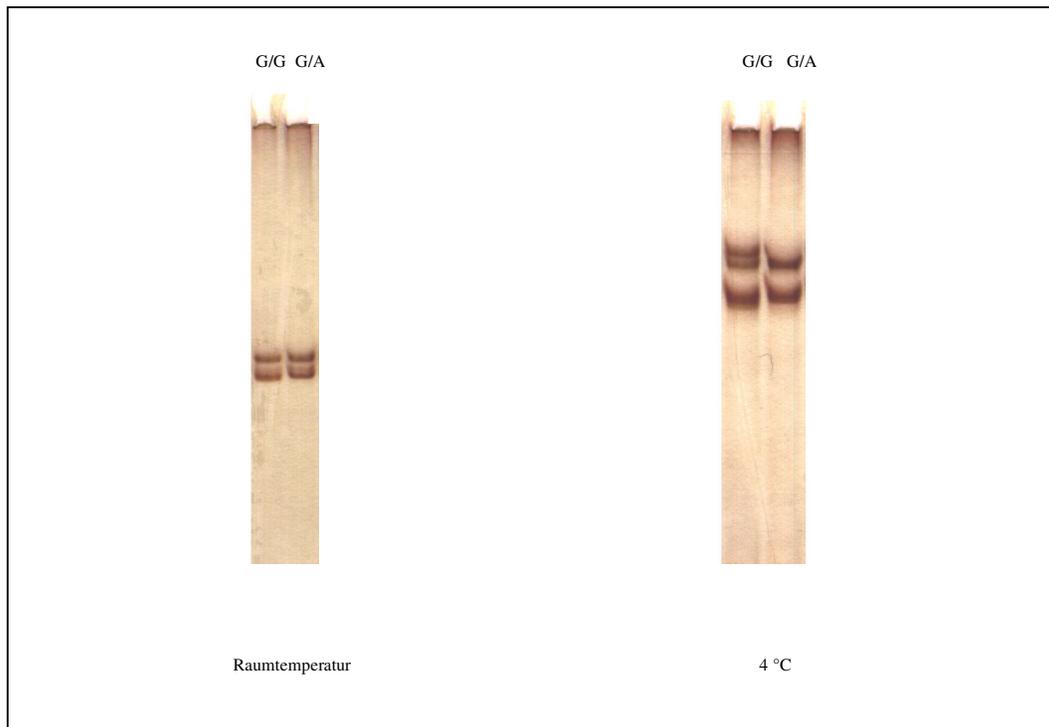


3.2.4 Aminosäureaustausch (gly/asp) in CREM Exon ,glut 2‘

Der DNA-Abschnitt CREM Exon VII ,glut 2‘ wurde mit den in Tabelle 2.3.2.1 aufgeführten zugehörigen Primern Crem-exon-VII(1)-F/R bei 40 Proben des Patientenkollektivs amplifiziert. In der Einzelstrang-Konformations-Untersuchung (SSCA) der PCR-Produkte zeigte sich nach Silberfärbung bei einer Patientin ein polymorphes Bandenmuster (G/A) im Vergleich zu den übrigen Proben (G/G).

Abb.: 3.2.4.1

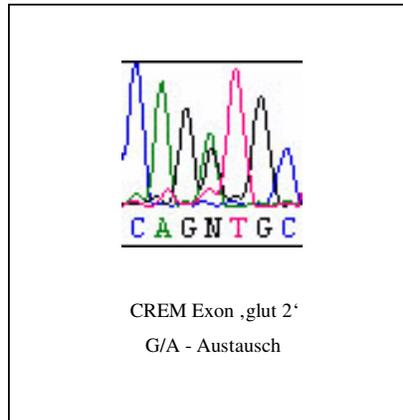
Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) des DNA-Abschnitts CREM ,glut 2‘(1)



In der anschließenden Sequenzierung des im SSCA-Muster polymorph erscheinenden PCR-Produkts zeigte sich Heterozygotie für einen Basenaustausch von G zu A an Position 106 innerhalb des Exons CREM ,glut 2‘ (Abbildung 3.2.4.2).

Abb.: 3.2.4.2

Sequenzierung des DNA-Abschnitts CREM ,glut 2'(1) – G/A-Polymorphismus

Abb.: 3.2.4.3

Lokalisation des G/A-Polymorphismus innerhalb des CREM Exon ,glut 2'

```

AGCAATGGTAATAAATAGACCCAGAGTATATTCTTCCAATAGGGGATTATTAATAAATAATCTTGAAATTCCTAATATT
TCTTTTCTTTTCTGTTAAGTTGCTATAGCCCAAGGTGGAACAATCCAGATTTCTAACCCAGGATCTGATGGTGTTCAGG
GACTGCAGGCATTAACAATGACAAATTCAGGAGCTCCTCCACCAGGTTGCTACAATTGTACAGTACGCAGCACAAATCAGCT
GATGGCACACAGCAGTTCTTTGTCCAGGCAGCCAGGTTGTGTTCAAGGTATATTTTATTAATCTAATACATTTAGAAT
ACCTATGGATTACTATATACACCATTGAGTG

```

= CREM Exon ,glut 2'
G = Stelle des Polymorphismus: statt **G** (Wildtyp) in mutiertem Allel **A**

3.3 Genotypisierung

Die in Abschnitt 3.2 beschriebenen Polymorphismen wurden in Assoziationsstudien mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) Untersuchungen, direkter Sequenzierung oder Fragmentanalyse in einem erweiterten Kollektiv von 88 beziehungsweise 80 Patienten und einer alters- und geschlechtsangepassten Kontrollstichprobe vergleichend untersucht. Die Ergebnisse der Assoziationsstudien wurden statistisch unter Verwendung des Chi-Quadrat-Tests, des Fisher-Exact-Tests beziehungsweise bei Vorliegen von mehr als zwei Freiheitsgraden mittels des Monte-Carlo-Tests analysiert. Voraussetzung für die statistisch korrekte Durchführung dieser Assoziationsstudien war in jedem Fall das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in der Kontrollstichprobe.

3.3.1 C/G- und A/G-Polymorphismen in CREM Promotor 1

3.3.1.1 BsuRI - Verdau

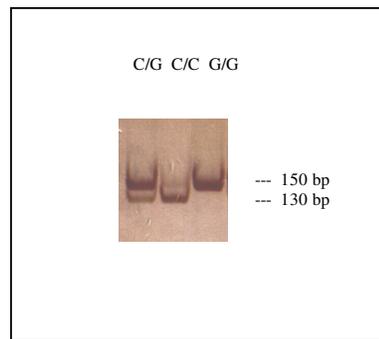
Zur Genotypisierung der jeweils 88 Proben des Patienten- und Kontrollkollektivs mittels RFLP-Untersuchungen wurde zunächst die Amplifikation des den C/G-Polymorphismus enthaltenden DNA-Bereichs mit den aus Tabelle 2.4.1.1 ersichtlichen Primern durchgeführt. Der mutagene Primer Crem-Pro1(0)-c/g(F) führte hierbei einen zusätzlichen Basenaustausch ein, der in Kombination mit Vorliegen des normalen C-Allels die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BsuRI (G-G-C-C) herstellte.

Nach Verdau der PCR-Produkte (150 bp) mit dem Restriktionsenzym BsuRI war gelelektrophoretisch folgendes Bandenmuster nachweisbar (siehe Abbildung 3.3.1.1.1): Amplifikate mit homozygotem Vorliegen des normalen C-Allels wurden in zwei Fragmente von 130 bp und 20 bp Länge geschnitten, wobei aufgrund der elektrophoretischen Laufbedingungen nur das 130 bp Fragment auf dem Gel zu sehen

ist. Produkte mit Homozygotie für das mutierte G-Allel wurden von BsuRI nicht geschnitten und erscheinen daher in der Gelelektrophorese als Bande in der Größe des PCR-Produkts von 150 bp. Heterozygotes Vorliegen sowohl des C- als auch des G-Allels resultierte in drei Fragmenten von 150 bp, 130 bp und 20 bp Länge, wobei wiederum nur die ersten beiden Fragmente in der Gelelektrophorese als Banden sichtbar werden.

Abb.: 3.3.1.1.1

Gelelektrophoretische Auftrennung des BsuRI-Verdau der mit Primerpaar Crem-Pro1(0)-c/g(F) und (R) amplifizierten DNA



3.3.1.2 Bsh1285I - Verdau

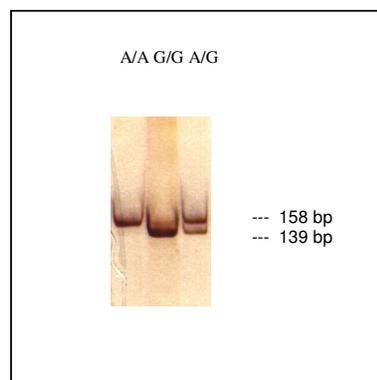
Der den A/G-Polymorphismus enthaltende DNA-Bereich innerhalb des CREM Promotor 1 wurde mit den aus Tabelle 2.4.1.1 ersichtlichen Primern bei den jeweils 88 Proben des Patienten- und Kontrollkollektivs amplifiziert.

Der mutagene Primer Crem-Pro1(0)-a/g(R) führte hierbei einen zusätzlichen Basenaustausch ein, der in Kombination mit Vorliegen des mutierten G-Allels die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Bsh1285I (C-G-Purinbase-Pyrimidinbase-C-G) herstellte.

Nach Verdau der PCR-Produkte (158 bp) mit dem Restriktionsenzym Bsh1285I war gelelektrophoretisch folgendes Bandenmuster nachweisbar (Abbildung 3.3.1.2.1): Amplifikate mit homozygotem Vorliegen des normalen A-Allels wurden von Bsh1285I nicht geschnitten und erscheinen daher in der Gelelektrophorese als Bande in der Größe des PCR-Produktes von 158 bp. Produkte mit Homozygotie für das mutierte G-Allel wurden in zwei Fragmente von 139 bp und 19 bp Länge geschnitten, wobei aufgrund der elektrophoretischen Laufbedingungen nur das 139 bp Fragment auf dem Gel zu sehen ist. Heterozygoties Vorliegen sowohl des A- als auch des G-Allels resultiert in drei Fragmenten von 158 bp, 139 bp und 19 bp Länge, wobei wiederum nur die ersten beiden Fragmente in der Gelelektrophorese als Banden sichtbar werden.

Abb.: 3.3.1.2.1

Gelelektrophoretische Auftrennung des Bsh1285I-Verdau der mit Primerpaar Crem-Pro1(0)-a/g(F) und (R) amplifizierten DNA



3.3.1.3 Statistische Analyse

In Tabelle 3.3.1.3.1 sind die Genotyp- und Allelhäufigkeiten mit ihren jeweiligen prozentualen Anteilen an den Grundgesamtheiten (Gesamtstichprobe (n=88), Anteil der weiblichen Probanden (n=57), Anteil der männlichen Probanden (n=31)) sowie die dazugehörigen errechneten p-Werte aufgeführt.

Tab.: 3.3.1.3.1

Statistische Auswertung der Genotyp- und Allelfrequenzen des C/G-Polymorphismus und des A/G-Polymorphismus innerhalb des CREM Promotor 1

	Patienten			Kontrollen			Signifikanzniveau (p)		
	gesamt (n=88)	weiblich (n=57)	männlich (n=31)	gesamt (n=88)	weiblich (n=57)	männlich (n=31)	gesamt (n=88)	weiblich (n=57)	männlich (n=31)
Genotypen									
C/C	32 (36,4%)	27 (47,4%)	5 (16,1%)	40 (45,5%)	27 (47,4%)	13 (41,9%)	0,2736	0,1206	0,0676
G/G	18 (20,5%)	11 (19,3%)	7 (22,6%)	11 (12,5%)	4 (7,0%)	7 (22,6%)			
C/G	38 (43,2%)	19 (33,3%)	19 (61,3%)	37 (42,0%)	26 (45,6%)	11 (35,5%)			
Allele							0,0992	0,3237	0,1499
C	102 (58,0%)	73 (64,0%)	29 (46,8%)	117 (66,5%)	80 (70,2%)	37 (59,7%)			
G	74 (42,0%)	41 (36,0%)	33 (53,2%)	59 (33,5%)	34 (29,8%)	25 (40,3%)			

	Patienten			Kontrollen			Signifikanzniveau (p)		
	gesamt (n=88)	weiblich (n=57)	männlich (n=31)	gesamt (n=88)	weiblich (n=57)	männlich (n=31)	gesamt (n=88)	weiblich (n=57)	männlich (n=31)
Genotypen									
A/A	31 (35,2%)	26 (45,6%)	5 (16,1%)	40 (45,5%)	27 (47,4%)	13 (41,9%)	0,2496	0,0724	0,0415*
G/G	19 (21,6%)	12 (21,1%)	7 (22,6%)	12 (13,6%)	4 (7,0%)	8 (25,8%)			
A/G	38 (43,2%)	19 (33,3%)	19 (61,3%)	36 (40,9%)	26 (45,6%)	10 (32,3%)			
Allele							0,0799	0,2076	0,2081
A	100 (56,8%)	71 (62,3%)	29 (46,8%)	116 (65,9%)	80 (70,2%)	36 (58,1%)			
G	76 (43,2%)	43 (37,7%)	33 (53,2%)	60 (34,1%)	34 (29,8%)	26 (41,9%)			

Bei differenzierter statistischer Betrachtung der Patientengruppe nach Diagnose wurden für Patienten mit der Diagnose einer reinen Panikstörung (DSM-III-R 300.01) und

Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie (DSM-III-R 300.21) im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollgruppen die in Tabelle 3.3.1.3.2 und Tabelle 3.3.1.3.3 aufgeführten p-Werte ermittelt. Aufgrund eines fast kompletten Kopplungsungleichgewichts in der Patienten- wie auch in der Kontrollgruppe wurden die Ergebnisse für beide Polymorphismen zusammengefaßt, wobei die in Klammern angegebenen Werte für den A/G-Polymorphismus stehen.

Tab.: 3.3.1.3.2

Statistische Auswertung der Genotypfrequenzen des C/G- und des A/G (in Klammern) - Polymorphismus bei Patienten mit reiner Panikstörung (DSM-III-R 300.01)

Genotypen	Patienten (300.01)			Signifikanzniveau (p)		
	gesamt (n=27)	weiblich (n=12)	männlich (n=15)	gesamt (n=27)	weiblich (n=12)	männlich (n=15)
C/C (A/A)	6	4	2	p=0,0186*	p=0,0513*	p=0,1735 (0,1460)
G/G	9	4	5			
C/G (A/G)	12	4	8			
Allele				p=0,0036*	p=0,0567	p=0,0761
C (A)	24	12	12			
G (G)	30	12	18			

Tab.: 3.3.1.3.3

Statistische Auswertung der Genotypfrequenzen des C/G- und des A/G (in Klammern) - Polymorphismus bei Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie (DSM-III-R 300.21)

Genotypen	Patienten (300.21)			Signifikanzniveau (p)		
	gesamt (n=61)	weiblich (n=45)	männlich (n=16)	gesamt (n=61)	weiblich (n=45)	männlich (n=16)
C/C (A/A)	26 (25)	23 (22)	3	p= 0,9030 (0,8286)	p=0,2773 (0,1902)	p=0,1251 (0,0755)
G/G	9 (10)	7 (8)	2			
C/G (A/G)	26	15	11			
Allele				p=0,1578 (0,5215)	p=0,7133 (0,4822)	p=0,5425 (0,6475)
C (A)	78 (76)	61 (59)	17			
G (G)	44 (46)	29 (31)	15			

Die statistische Analyse der Genotyphäufigkeiten in den Kontrollen zeigte das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (siehe Tabelle 3.3.1.3.4), was eine Assoziations-Analyse in diesem Kollektiv rechtfertigt. Weiterhin wurde bei Abweichen lediglich einer Patientin und eines Kontrollprobanden ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht ($\chi^2=96,12$) beider Polymorphismen ermittelt.

Tab.: 3.3.1.3.4

Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts für den C/G- und den A/G-Polymorphismus des CREM Promotor 1

Genotyp	Fälle		χ^2	Frequenzen
	beobachtete	erwartete		
C/C	40	39	0,03	0,44
C/G	37	39	0,10	0,44
G/G	11	10	0,10	0,11

Genotyp	Fälle		χ^2	Frequenzen
	beobachtete	erwartete		
A/A	40	38	0,11	0,43
A/G	36	40	0,40	0,45
G/G	12	10	0,40	0,12

3.3.2 G/A (1)- und G/A (2)-Polymorphismen in CREM Promotor 4

3.3.2.1 Sequenzierung

Nachdem trotz mehrfacher Versuche keine eindeutigen Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) Untersuchungen für die Typisierung der G/A (1)- und G/A (2)-Polymorphismen des CREM Promotor 4 etabliert werden konnten, wurde die Assoziationsanalyse dieser Polymorphismen mittels direkter Sequenzierung der einzelnen Proben durchgeführt. Hierzu wurde das untersuchte Patientenkollektiv auf lediglich 80 Probanden erweitert, da zum Zeitpunkt dieser Untersuchung die verfügbare genomische DNA von acht Patienten des ursprünglichen Kollektivs (88 Probanden) degeneriert war.

Die Amplifikation des die G/A (1)- und G/A (2)-Polymorphismen enthaltenden DNA-Bereichs wurde mit den aus Tabelle 2.3.2.1 ersichtlichen Primern Crem-pro4(1)-F und R durchgeführt. Die amplifizierten Fragmente wurden mittels direkter Sequenzierung (siehe 2.3.6) analysiert.

Abb.: 3.3.2.1.1

Sequenzierung des DNA-Abschnitts CREM Pro4(1) – G/A (1)-Polymorphismus

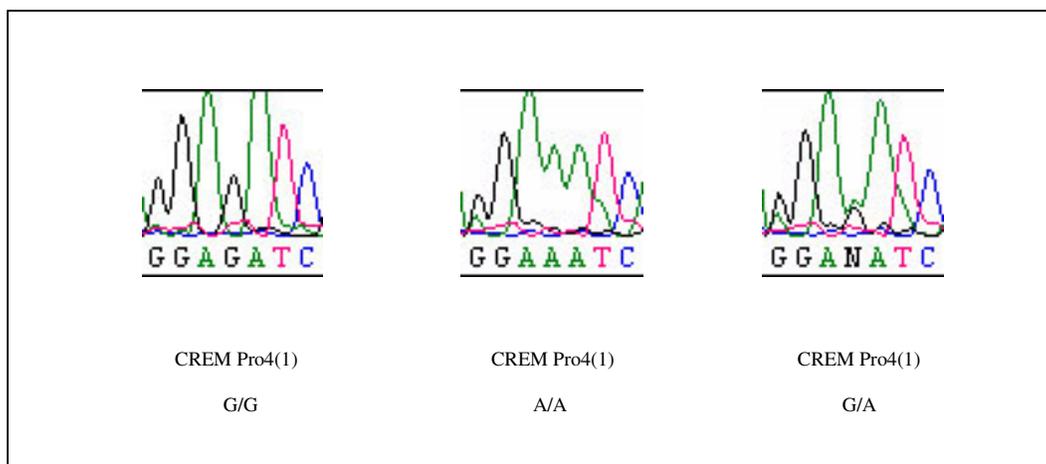
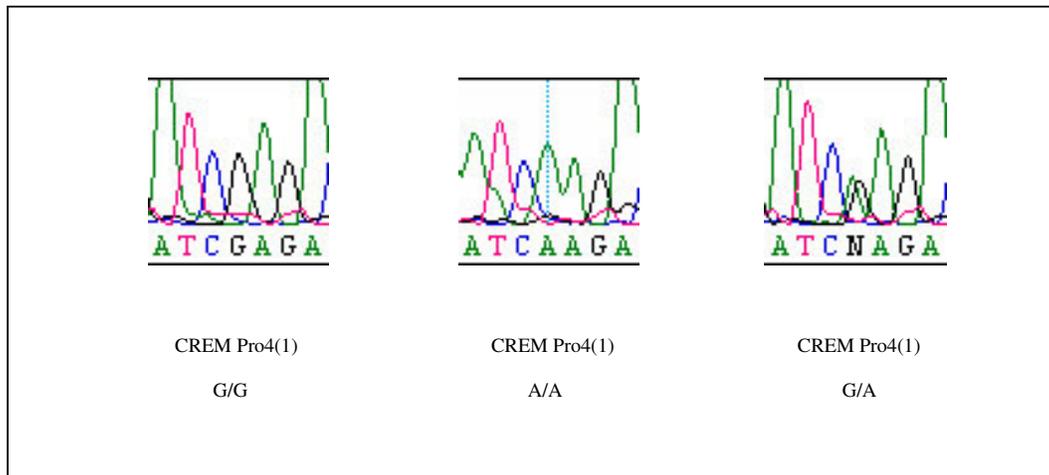


Abb.: 3.3.2.1.2

Sequenzierung des DNA-Abschnitts CREM Pro4(1) – G/A (2)-Polymorphismus

3.3.2.2 Statistische Analyse

In Tabelle 3.3.2.2.1 sind die Genotyp- und Allelhäufigkeiten mit ihren jeweiligen prozentualen Anteilen an den Grundgesamtheiten (Gesamtstichprobe (n=80), Anteil der weiblichen Probanden (n=53), Anteil der männlichen Probanden (n=27)) sowie die dazugehörigen errechneten p-Werte aufgeführt.

Bei Einteilung der Patientengruppe in Subgruppen nach differenzierter Diagnose wurden für Patienten mit der Diagnose einer reinen Panikstörung (DSM-III-R 300.01) und Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie (DSM-III-R 300.21) im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollgruppen die in Tabelle 3.3.2.2.2 und Tabelle 3.3.2.2.3 aufgeführten p-Werte berechnet.

Im Rahmen einer statistischen Analyse der Genotyphäufigkeiten wurde das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (siehe Tabelle 3.3.2.2.4) bei der Genotypverteilung beider Polymorphismen in der Kontrollstichprobe ermittelt, was eine Assoziations-Analyse in diesem Kollektiv rechtfertigt.

Tab.: 3.3.2.2.1

Statistische Auswertung der Genotyp- und Allelfrequenzen des G/A (1)- und des G/A (2)-Polymorphismus innerhalb des CREM Promotor 4

	Patienten			Kontrollen			Signifikanzniveau (p)		
	gesamt (n=80)	weiblich (n=53)	männlich (n=27)	gesamt (n=80)	weiblich (n=53)	männlich (n=27)	gesamt (n=80)	weiblich (n=53)	männlich (n=27)
Genotypen									
G/G	23 (28,8%)	17 (32,1%)	6 (22,2%)	33 (41,3%)	23 (43,4%)	10 (37,0%)	0,0564	0,4070	0,1054
A/A	7 (8,8%)	4 (7,6%)	3 (11,1%)	12 (15,0%)	5 (9,4%)	7 (25,9%)			
G/A	50 (62,5%)	32 (60,4%)	18 (66,7%)	35 (43,7%)	25 (47,2%)	10 (37,0%)			
Allele							0,5657	0,4726	1,0000
G	96 (60,0%)	66 (62,3%)	30 (55,6%)	101 (63,1%)	71 (67,0%)	30 (55,6%)			
A	64 (40,0%)	40 (37,7%)	24 (44,4%)	59 (36,9%)	35 (33,0%)	24 (44,4%)			

	Patienten			Kontrollen			Signifikanzniveau (p)		
	gesamt (n=80)	weiblich (n=53)	männlich (n=27)	gesamt (n=80)	weiblich (n=53)	männlich (n=27)	gesamt (n=80)	weiblich (n=53)	männlich (n=27)
Genotypen									
G/G	23 (28,8%)	17 (32,1%)	6 (22,2%)	33 (41,3%)	23 (43,4%)	10 (37,0%)	0,0564	0,4070	0,1054
A/A	7 (8,8%)	4 (7,6%)	3 (11,1%)	12 (15,0%)	5 (9,4%)	7 (25,9%)			
G/A	50 (62,5%)	32 (60,4%)	18 (66,7%)	35 (43,7%)	25 (47,2%)	10 (37,0%)			
Allele							0,5657	0,4726	1,0000
G	96 (60,0%)	66 (62,3%)	30 (55,6%)	101 (63,1%)	71 (67,0%)	30 (55,6%)			
A	64 (40,0%)	40 (37,7%)	24 (44,4%)	59 (36,9%)	35 (33,0%)	24 (44,4%)			

Tab.: 3.3.2.2.2

Statistische Auswertung der Genotypfrequenzen des G/A (1)- und des G/A (2)-Polymorphismus bei Patienten mit reiner Panikstörung (DSM-III-R 300.01)

Genotypen	Patienten (300.01)			Signifikanzniveau (p)		
	gesamt (n=28)	weiblich (n=12)	männlich (n=16)	gesamt (n=28)	weiblich (n=12)	männlich (n=16)
G/G	6	3	3	p= 0,1264	p=0,4344	p=0,1753
A/A	4	2	2			
G/A	18	7	11			
Allele				p=0,2079	p=0,2359	p=0,8266
G	30	13	17			
A	26	11	15			

Tab.: 3.3.2.2.3

Statistische Auswertung der Genotypfrequenzen des G/A (1)- und des G/A (2)-Polymorphismus bei Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie (DSM-III-R 300.21)

Genotypen	Patienten (300.21)			Signifikanzniveau (p)		
	gesamt (n=52)	weiblich (n=41)	männlich (n=11)	gesamt (n=52)	weiblich (n=41)	männlich (n=11)
G/G	17	14	3	p= 0,0985	p=0,4218	p=0,3448
A/A	3	2	1			
G/A	32	25	7			
Allele				p=0,9563	p=0,7368	p=0,7773
G	66	53	13			
A	38	29	9			

Weiterhin wurde ein signifikantes, komplettes Kopplungsungleichgewicht zwischen den beiden Polymorphismen ermittelt ($\chi^2=86,42$), weshalb die Ergebnisse der Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts in einer Tabelle zusammengefasst werden können (siehe Tabelle 3.3.2.2.4).

Tab.: 3.3.2.2.4

Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts für den G/A (1)- und den G/A (2)-Polymorphismus des CREM Promotor 4

Genotyp	Fälle		χ^2	Frequenzen
	beobachtete	erwartete		
G/G	33	32	0,03	0,40
G/A	35	37	0,11	0,47
A/A	12	11	0,09	0,14

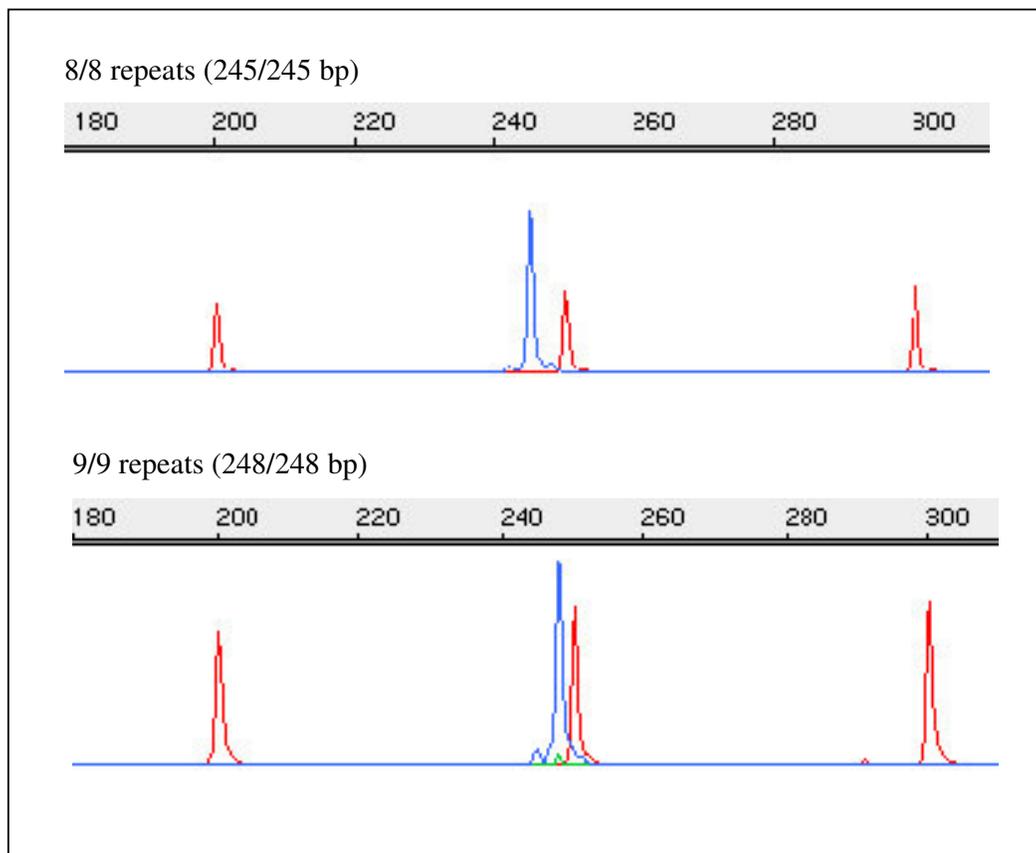
3.3.3 Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2

3.3.3.1 Fragmentanalyse

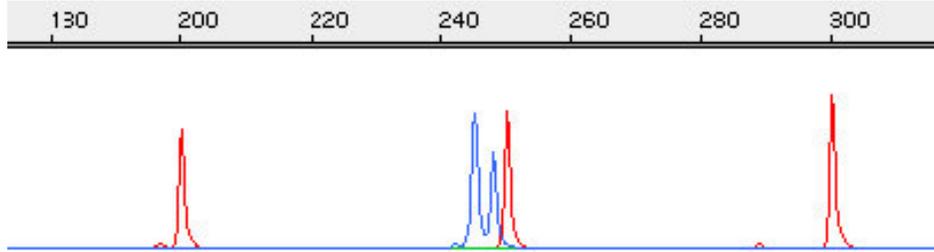
Zur Typisierung der jeweils 88 Proben des Patienten- und Kontrollkollektivs wurde das Verfahren der Fragmentanalyse (siehe 2.4.2) herangezogen. Hierbei ließen sich die jeweils unterschiedlichen Fragmentlängen (245 bp, 248 bp, 251 bp und 254 bp) und damit die differierende Anzahl der ATT-repeats bestimmen. Wie in Abbildung 3.3.3.1.1 dargestellt, zeigen in der automatischen Computeranalyse der Gelelektrophorese blaue Peaks die jeweiligen bp-Längen der beiden Allele pro Fragment in Relation zu geeichten Größenmarkern (rote Peaks) an.

Abb.: 3.3.3.1.1

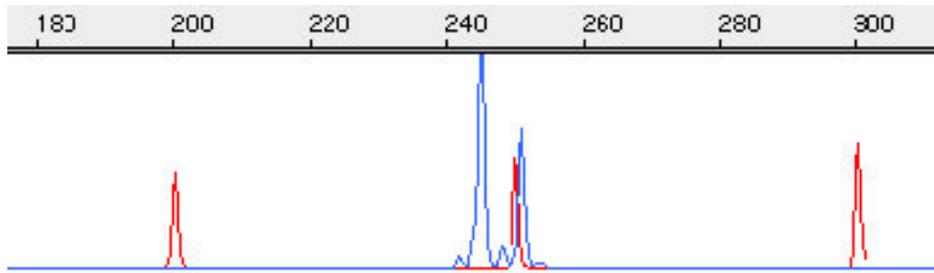
Fragmentanalyse des Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2



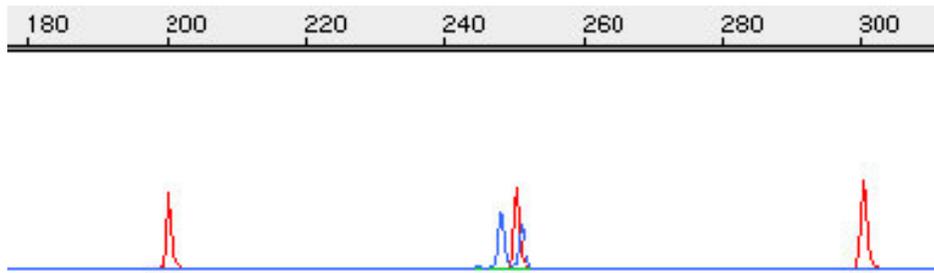
8/9 repeats (245/248 bp)



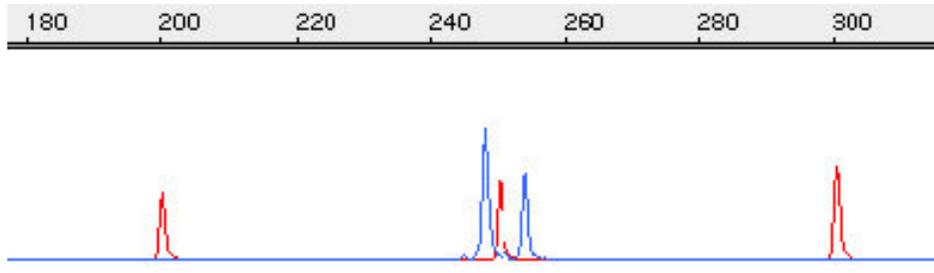
8/10 repeats (245/251 bp)



9/10 repeats (248/251 bp)



9/11 repeats (248/254 bp)



3.3.3.2 Statistische Analyse

In Tabelle 3.3.3.2.1 sind zunächst die numerischen sowie die prozentualen Genotyp- und Allelhäufigkeiten des Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus innerhalb des CREM Promotor 2 aufgeführt, wobei die Fragmentlängen 245 bp einer 8-fachen, 248 bp einer 9-fachen, 251 bp einer 10-fachen und 254 bp einer 11-fachen Wiederholung des Trinukleotidmusters der Basenfolge ‚ATT‘ entsprechen.

Tab.: 3.3.3.2.1

Genotyp- und Allelhäufigkeiten des Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus innerhalb des CREM Promotor 2

	Patienten			Kontrollen		
	gesamt (n=88)	weiblich (n=57)	männlich (n=31)	gesamt (n=88)	weiblich (n=57)	männlich (n=31)
Genotypen						
245/245	2 (2,3%)	2 (3,5%)	0 (0,0%)	1 (1,1%)	0 (0,0%)	1 (3,2%)
245/248	28 (31,8%)	17 (29,8%)	11 (35,5%)	15 (17,1%)	9 (15,8%)	6 (19,4%)
245/251	1 (1,1%)	0 (0,0%)	1 (3,2%)	1 (1,1%)	1 (1,8%)	0 (0,0%)
248/248	46 (52,3%)	29 (50,9%)	17 (54,8%)	65 (73,9%)	44 (77,2%)	21 (67,7%)
248/251	9 (10,2%)	8 (14,0%)	1 (3,2%)	4 (4,6%)	1 (1,8%)	3 (9,7%)
248/254	2 (2,3%)	1 (1,8%)	1 (3,2%)	1 (1,1%)	1 (1,8%)	0 (0,0%)
251/251	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,1%)	1 (1,8%)	0 (0,0%)
Allele						
245	33 (18,8%)	21 (18,4%)	12 (19,4%)	18 (10,2%)	10 (8,8%)	8 (12,9%)
248	131 (74,4%)	84 (73,7%)	47 (75,8%)	150 (85,2%)	99 (86,8%)	51 (82,3%)
251	10 (5,7%)	8 (7,0%)	2 (3,2%)	7 (4,0%)	4 (3,5%)	3 (4,8%)
254	2 (1,1%)	1 (0,9%)	1 (1,6%)	1 (0,6%)	1 (0,9%)	0 (0,0%)

Für die Gesamtverteilung der Allele und Genotypen wurden mittels einer Monte-Carlo-Analyse die Tabelle 3.3.3.2.2 zu entnehmenden p-Werte ermittelt. Weiterhin wurde die Verteilung des kürzeren 8-repeats Allels (Fragmentlänge 245 bp) und des 9-repeats Allels (Fragmentlänge 248 bp) beziehungsweise der jeweiligen das 8-repeats- oder das 9-repeats Allel enthaltenden Genotypen gesondert mittels des Chi-Quadrat-Tests analysiert (siehe Tabelle 3.3.3.2.2). Diese Dichotomisierung der Allelverteilung wurde unter der Annahme eines möglichen linearen oder parabolischen funktionellen Zusammenhangs zwischen Fragmentlänge und Expressionsgrad vorgenommen (vgl. 2.5; Deckert J et al., 1999; Sabol SZ et al., 1998).

Tab.: 3.3.3.2.2

Statistische Analyse der Genotyp- und Allelhäufigkeiten des Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus innerhalb des CREM Promotor 2

Bedingung	Patienten			Kontrollen			Signifikanzniveau (p)		
	gesamt (n=88)	weiblich (n=57)	männlich (n=31)	gesamt (n=88)	weiblich (n=57)	männlich (n=31)	gesamt (n=88)	weiblich (n=57)	männlich (n=31)
Allele (gesamt)	siehe Tabelle 3.3.3.2.1			siehe Tabelle 3.3.3.2.1			p=0,1092	p=0,0910	p=0,5392
Genotypen (gesamt)	siehe Tabelle 3.3.3.2.1			siehe Tabelle 3.3.3.2.1			p=0,0673	p=0,0203*	p=0,3168
Allel 245 vs alle übrigen	33 vs 143	21 vs 93	12 vs 50	18 vs 158	10 vs 104	8 vs 54	p=0,0231*	p=0,0336*	p=0,3287
Genotyp mit Allel 245 vs alle übrigen	31 vs 57	19 vs 38	12 vs 19	17 vs 71	10 vs 47	7 vs 24	p=0,0178*	p=0,0529*	p=0,1684
Allel 248 vs alle übrigen	131 vs 45	84 vs 30	47 vs 15	150 vs 26	99 vs 15	51 vs 11	p=0,0116**	p=0,0126**	p=0,3776
Genotyp 248/248 vs alle übrigen	46 vs 42	29 vs 28	17 vs 14	65 vs 23	44 vs 13	21 vs 10	p=0,0030**	p=0,0034**	p=0,2969

Bei getrennter statistischer Betrachtung der beiden großen diagnostischen Untergruppen innerhalb des Patientenkollektivs (Panikstörung ohne Agoraphobie (DSM-III-R 300.01), n=27 und Panikstörung mit Agoraphobie (DSM-III-R 300.21), n=61) ergaben sich im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollgruppen die in Tabelle 3.3.3.2.3 und Tabelle 3.3.3.2.4 aufgeführten Signifikanzwerte.

Tab.: 3.3.3.2.3

Statistische Analyse der Genotyp- und Allelhäufigkeiten des Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus innerhalb des CREM Promotor 2 bei Patienten mit reiner Panikstörung (DSM-III-R 300.01)

Bedingung	Patienten (300.01)			Signifikanzniveau (p)		
	gesamt (n=27)	weiblich (n=12)	männlich (n=15)	gesamt (n=27)	weiblich (n=12)	männlich (n=15)
Allel 245 vs alle übrigen	15 vs 39	7 vs 17	8 vs 22	p=0,0013***	p=0,0057**	p=0,1025
Genotyp mit Allel 245 vs alle übrigen	14 vs 13	6 vs 6	8 vs 7	p=0,0008***	p=0,0154**	p=0,0370*
Allel 248 vs alle übrigen	35 vs 19	14 vs 10	21 vs 9	p=0,0009***	p=0,0009***	p=0,1814
Genotyp 248/248 vs alle übrigen	9 vs 18	3 vs 9	6 vs 9	p=0,0001***	p=0,0004***	p=0,0732

Tab.: 3.3.3.2.4

Statistische Analyse der Genotyp- und Allelhäufigkeiten des Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus innerhalb des CREM Promotor 2 bei Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie (DSM-III-R 300.21)

Bedingung	Patienten (300.21)			Signifikanzniveau (p)		
	gesamt (n=61)	weiblich (n=45)	männlich (n=16)	gesamt (n=61)	weiblich (n=45)	männlich (n=16)
Allel 245 vs alle übrigen	18 vs 104	14 vs 76	4 vs 28	p=0,2384	p=0,1354	p=0,9999
Genotyp mit Allel 245 vs alle übrigen	17 vs 44	13 vs 32	4 vs 12	p=0,2213	p=0,1734	p=0,9999
Allel 248 vs alle übrigen	96 vs 26	70 vs 20	26 vs 6	p=0,0715	p=0,0378*	p=0,9058
Genotyp 248/248 vs alle übrigen	37 vs 24	26 vs 19	11 vs 5	p=0,0879	p=0,0608	p=0,7194

Die computergestützte statistische Analyse der Genotypverteilung des Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus innerhalb des CREM Promotor 2 zeigte in der Kontrollgruppe das Vorliegen eines signifikanten Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (siehe Tabelle 3.3.2.2.5), was eine Assoziationsanalyse in diesem Kollektiv erlaubt.

Tab.: 3.3.3.2.5

Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts für den Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus innerhalb des CREM Promotor 2

Genotyp	Fälle		χ^2	Frequenzen
	beobachtete	erwartete		
245/245	1	1	6,29	0,01
245/248	15	15		0,17
248/248	65	64		0,73
245/251	1	1		0,01
248/251	4	6		0,07
251/251	1	0		0
248/254	1	1		0,01

3.3.4 Aminosäureaustausch (gly/asp) in CREM Exon ‚glut 2‘

3.3.4.1 MvaI - Verdau

Der nur bei einer Patientin vorliegende Basenaustausch von G zu A innerhalb des CREM Exon ‚glut 2‘ wurde durch eine Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) Untersuchung bestätigt. Die den G/A-Polymorphismus enthaltende DNA-Region innerhalb des CREM Exon ‚glut 2‘ wurde unter Verwendung der aus Tabelle 2.4.1.1 ersichtlichen Primer Crem-exon-VII(2)-F und Crem-exon-VII(1)-R mit einer Produktgröße von 102 bp amplifiziert.

Neben einer konstanten Schnittstelle für das Restriktionsenzym MvaI (Isoschizomer: EcoRII) mit der Erkennungssequenz C-C-A/T-G-G bedingt das Vorliegen des normalen G-Allels eine zusätzliche Schnittstelle.

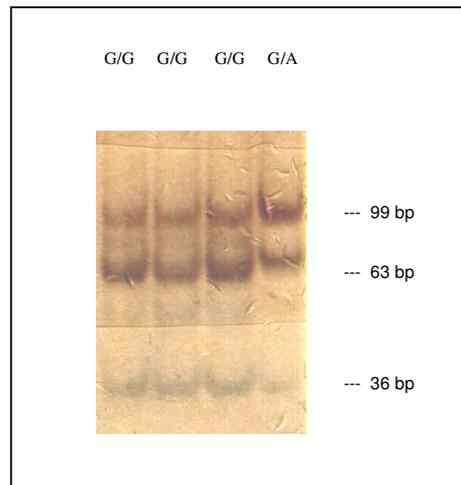
In der gelelektrophoretischen Auftrennung war folgendes Bandenmuster nachweisbar (Abbildung 3.3.4.1.1): Drei Amplifikate von gesunden Kontrollpersonen mit Homozygotie für das normale G-Allel wurden in drei Fragmente von 3 bp, 36 bp und 63 bp Länge geschnitten, wobei das durch die konstante Schnittstelle entstehende 3 bp Fragment aufgrund der gelelektrophoretischen Wanderungseigenschaften nicht sichtbar wird. Die in Abbildung 3.3.4.1.1 bei homozygotem Vorliegen des G-Allels noch schwach zu erkennende Bande auf der Höhe von 99 bp ist Ausdruck eines Partialverdaus, wobei die deutlich stärker ausgeprägte 63 bp Bande aber dennoch die Interpretation eines erfolgreichen Verdaus durch MvaI zulässt. Heterozygoties Vorliegen sowohl des G- als auch des A-Allels resultiert in vier Fragmenten von 3 bp, 36 bp, 63 bp und 99 bp Länge, wobei die hier im Vergleich zu der 63 bp Bande deutlich akzentuierte 99 bp Bande und die schwächere 36 bp Bande auf Heterozygotie schließen lassen. Aufgrund der gelelektrophoretischen Wanderungseigenschaften wird hier wiederum das durch die konstante Schnittstelle entstehende 3 bp Fragment nicht sichtbar.

Der Basenaustausch von G zu A in Exon ‚glut 2‘ resultiert aufgrund seiner Position an

zweiter Stelle innerhalb eines Kodons in einem Aminosäureaustausch von Glycin (GGT) zu Aspartat (GAT). Da dieser Basenaustausch bei lediglich einer Patientin in heterozygoter Form beobachtet werden konnte, wurde keine Assoziationsstudie angeschlossen.

Abb.: 3.3.4.1.1

Gelelektrophoretische Auftrennung des MvaI-Verdau der mit Primerpaar Crem-exon-VII(2)-F und Crem-exon-VII(1)-R amplifizierten DNA



4 DISKUSSION

4.1 Material und Methoden

4.1.1 Stichproben

Bei allen in dieser Studie untersuchten Patienten wurde von erfahrenen Psychiatern unter Verwendung strukturierter Interviews (SADS-LA oder CIDI; siehe 2.1.1) eine Panikstörung nach DSM-III-R Kriterien diagnostiziert. Die beiden Hauptdiagnosen stellten Panikstörung mit Agoraphobie (DSM-III-R 300.21) und reine Panikstörung (DSM-III-R 300.01) mit den jeweiligen prozentualen Anteilen von 69,3% und 30,7% dar. Das in dieser Studie untersuchte Patientenkollektiv wies weiterhin annähernd die gleichen Komorbiditätszahlen auf wie sie in mehreren Studien europäischer und amerikanischer Populationen gefunden wurden (siehe 1.1.1 und Tabelle 2.1.1.1) und ist daher als eine typische Stichprobe für die Erkrankung an Panikstörung anzusehen.

Die weiblichen Patienten bildeten einen höheren Anteil an der Diagnose Panikstörung mit Agoraphobie (78,9%) als die männlichen Probanden (51,6%) (siehe Tabelle 2.1.1.1) und zeigten zudem eine höhere Komorbidität mit einfacher Phobie (40,4%) als die männlichen Patienten (25,8%). Bei den männlichen Probanden überwog im Vergleich zu den weiblichen Patienten der Anteil der zusätzlichen Diagnose einer Alkoholabhängigkeit (22,6% vs. 8,8%). Vor dem Hintergrund dieser auch aus Familienstudien bekannten Geschlechtsunterschiede bei Patienten mit Panikstörung hinsichtlich der Häufigkeit der Erkrankung, der Komorbidität und insbesondere auch des Vorliegens von Agoraphobie (Maier W et al., 1993 und Noyes R et al., 1986), wurde in der vorliegenden Assoziationsuntersuchung eine Unterteilung der Probanden nach Geschlecht vorgenommen, um eventuell differentielle Effekte identifizieren zu können.

Komorbidität mit Alkoholismus findet sich nach einer Familienstudie von Maier et al.

signifikant häufiger bei Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie (25,0%) als bei Patienten mit reiner Panikstörung (11,9%). Weiterhin ist aus dieser Studie bekannt, daß Panikstörung mit Agoraphobie signifikant häufiger bei Angehörigen von Patienten mit Panikstörung mit Agoraphobie (4,5%) als in Familien von Patienten mit reiner Panikstörung (2,6%) auftritt (Maier W et al., 1993). Diese Befunde weisen auf einen möglichen differentiellen Pathomechanismus in der Genese der Panikstörung mit und ohne Agoraphobie hin. Daher wurden in der vorliegenden Assoziationsstudie die untersuchten Subgruppen weiterhin differenziert nach den Diagnosen Panikstörung mit Agoraphobie (DSM-III-R 300.21) und Panikstörung ohne Agoraphobie (DSM-III-R 300.01).

4.1.2 Mutationsscreening

Für das Mutationsscreening wurde die Methode der Einzelstrang-Konformations-Analyse (SSCA) angewendet. Die Sensitivität dieses Verfahrens hängt neben den Elektrophoresebedingungen von der Basensequenz sowie der Länge des untersuchten DNA-Fragments ab. Aufgrund der nicht immer optimierbaren Konstellation dieser Einzelfaktoren erreicht die Sensitivität der SSCA nicht immer 100% (Hayashi K et al., 1993). Somit besteht der Hauptnachteil dieser Methode darin, daß einzelne Polymorphismen im Rahmen des Mutationsscreenings übersehen werden können.

Dieses Risiko wurde in der vorliegenden Studie dadurch minimiert, daß die Fragmentgrößen in einem Bereich von 215 bp bis 290 bp, also innerhalb des mehrfach ermittelten optimalen Fragmentgrößenbereichs für die SSCA von 150 bp bis 300 bp (Sheffield VC et al., 1993; Kukita Y et al., 1997), gewählt wurden, und die SSCA bei zwei verschiedenen Elektrophoresebedingungen (Raumtemperatur und 4°C; siehe 2.3.4) durchgeführt wurde.

Eine alternative Möglichkeit des Mutationsscreenings ohne die oben angeführten Nachteile der SSCA wäre die direkte Sequenzierung des Patienten- und Kontrollkollektivs, die jedoch einen erheblichen technischen Aufwand bedeutet und

damit eher bei kleineren Stichproben anwendbar ist. Bei kleineren Kollektivgrößen wiederum steigt jedoch das Risiko, seltene Polymorphismen nicht zu erfassen, weswegen in dieser Untersuchung die SSCA als Methode für das Mutationsscreening gewählt wurde.

4.1.3 Genotypisierung

Da für die Erkrankung an Panikstörung ein oligo- oder polygener Vererbungsweg postuliert wird, wurde in der vorliegenden Studie für die weitere Untersuchung der identifizierten Polymorphismen die Methode der Assoziationsstudie gewählt, mit deren Hilfe auch kleinere Einflüsse von Vulnerabilitätsgenen auf die Pathogenese einer Erkrankung ermittelt werden können (Risch N et al., 1996).

Da im Rahmen dieser Studie die DNA der Eltern der Patienten nicht vorlag, war die Analyse von Trios und damit eine interne Kontrolle beispielsweise über eine Haplotype Relative Risk (HRR) - Untersuchung (Falk CT et al., 1987), also eine Analyse der beiden nicht an den Patienten vererbten elterlichen Allele (Khoury MJ, 1994), nicht möglich. Daher wurde in der vorliegenden Assoziationsuntersuchung das klassische Modell der Fall-Kontroll-Studie mit nicht-verwandten Patienten und gesunden Kontrollpersonen gewählt.

Das Risiko, in Assoziationsstudien falsch positive Ergebnisse zu generieren, beruht vor allem auf Stratifikationseffekten (Kidd KK, 1993; Lander ES et al., 1994). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit das Patienten- und das Kontrollkollektiv aus einer ethnisch homogenen Population rekrutiert. Zusätzlich wurden die Patienten- und die Kontrollstichprobe hinsichtlich Geschlecht und Alter angepasst.

Zur besseren Validierung der Befunde werden weiterhin familienbasierte Replikationsstudien durchgeführt werden müssen, die auf Populationsstratifikation beruhende falsch positive Befunde durch die Verwendung interner Kontrollen

vermeiden (Falk CT et al., 1987 und Spielman RS et al., 1993). Aufgrund der Schwierigkeiten in der Rekrutierung solcher Stichproben existiert zum jetzigen Zeitpunkt weltweit kein einziges derartiges Kollektiv mit ausreichender statistischer Power, um die erwarteten geringen Effektstärken mittels Assoziationsstudien erfassen zu können.

4.1.4 Statistik

Werden in Assoziationsstudien multiple Testungen mehrerer Polymorphismen in ein und derselben Stichprobe durchgeführt, können statistisch falsch positive Ergebnisse ermittelt werden. Die dadurch entstehende Vergrößerung des Fehlers erster Art kann durch die sogenannte Bonferroni-Korrektur ausgeglichen werden. Hierbei wird der Grenzwert der Signifikanz nicht wie üblich bei 0,05 festgesetzt, sondern bei $0,05/n$, wobei ‚n‘ für die Zahl der geprüften unabhängigen Assoziationen steht. Diese mathematische Forderung ist aber insofern schwierig umsetzbar, als einerseits die geforderte Stichprobengröße mit der Zahl der zu prüfenden Polymorphismen exponentiell stiege und nicht zu rekrutieren wäre und andererseits die zu erwartenden Effekte innerhalb eines heterogenen Krankheitsmodells wie der Panikstörung zu klein sind, um auf dem dann geforderten Signifikanzniveau zu liegen. Damit wüchse mit Anwenden der Bonferroni-Korrektur der Fehler zweiter Art und damit die Gefahr, die in einem polygenen Krankheitsmodell erwarteten kleinen Effekte einzelner Gene fälschlicherweise zu übersehen. Um dennoch der hinter der Bonferroni-Korrektur stehenden Forderung nach erhöhter Validität der Statistik nachzukommen, werden Replikationsstudien der primär gefundenen Assoziation in unabhängigen Stichproben empfohlen (Owen MJ et al., 1993).

Aus diesem Grunde, insbesondere aber auch in Anbetracht der in der vorliegenden Untersuchung noch relativ kleinen Probandenzahlen und damit geringen Power in den diagnostischen Untergruppen, sind Replikationsstudien der ermittelten Assoziationen in größeren, unabhängigen Stichproben geplant.

Dem oben angesprochenen Problem der kleinen Stichprobengrößen und damit geringen Power in den diagnostischen Subgruppen bei Anwendung der Monte-Carlo-Analyse wurde bei der statistischen Analyse der Allel- und Genotypverteilung des höher polymorphen Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2 durch eine Zusammenfassung der Allel- und Genotypfrequenzen in zwei große Subgruppen und Verwendung einer Chi-Quadrat-Analyse begegnet (siehe 3.3.3.2). Dies wurde in Analogie zu der beim MAO-A-Promotor-Polymorphismus gefundenen linearen oder parabolischen funktionellen Relevanz der verschiedenen Allele für den Expressionsgrad vorgenommen (siehe 3.3.3.2; Deckert J et al., 1999; Sabol SZ et al., 1998).

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Struktur des humanen CREM Gens

Über Sequenzvergleiche der cDNA des humanen CREM Gens mit im Internet zur Verfügung stehenden Datenbanken der genomischen DNA des Menschen wurde die bislang nicht publizierte Struktur des humanen CREM Gens mit 13 Exons charakterisiert (siehe Tabelle 3.1.1). Bis dahin noch lückenhafte Sequenzen (siehe 3.1) im Klon BAC 314a8 (GenBank Acc. AL157785) konnten über direkte Sequenzierung im Herbst 2000 vervollständigt werden (siehe 2.3.6). Die ermittelten Sequenzen wurden durch die im Februar 2001 veröffentlichte ‚Chromosome 10 working draft sequence‘ (GenBank Acc. NT_008640) bestätigt. Die kodierende Sequenz des humanen CREM Gens zeigte im Vergleich mit der murinen Sequenz eine hohe Konservierung (86-90%; siehe 3.1).

Über Sequenzhomologie-Analysen von in der Literatur publizierten murinen und in Datenbanken verfügbaren humanen intronischen Sequenzen wurden putative Promotorbereiche mit hoher Konservierung funktioneller Elemente wie der CG-Boxen in CREM Promotor 1 sowie der TATA-Boxen und CRE-Elemente in CREM Promotor

2 (siehe 3.1) identifiziert. Das in den untersuchten Kollektiven polymorphe Trinukleotid(ATT)-Repeat-Muster fand sich jedoch nicht in der murinen, sondern nur in der humanen Sequenz.

Weiterhin wurden über eine computergestützte Analyse hodenspezifische expressed sequence tag (EST) Klone identifiziert, die die Sequenz der CREM Exons ,theta 1‘ und ,theta 2‘ (Daniel PB et al., 2000) enthielten und sie in 5‘ Richtung verlängerten (siehe 3.1). Hierbei handelt es sich voraussichtlich um immer noch vorläufige Exongrößen, die - wie auch die beiden jeweils 5‘ liegenden Promotorbereiche CREM P3 und CREM P4 - über experimentelle Untersuchungen weiter definiert werden müssen.

Zudem konnte beobachtet werden, daß Exons für funktionell eng zusammenhängende Domänen wie die für die P-Box kodierenden Exons V (P-Box I) und VI (P-Box II) sowie die gemeinsam transkribierten Exons ,theta 2‘ und ,glut 1‘ jeweils durch lediglich 149 bp bzw. 147 bp intronische Sequenz getrennt sind (siehe Tabelle 3.1.1). Das 5‘-Ende des jeweils zwischen den Exons liegenden Introns weist in beiden Fällen die Sequenz ,GTAAGT‘ auf, die eine optimale 5‘-Donor-Spleißstelle darstellt (Seif I et al., 1979).

4.2.2 Mutationsscreening und -analyse

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde erstmals ein vollständiges Mutationsscreening der kodierenden Regionen, der Exon-Intron-Grenzen sowie der putativen Promotorbereiche des humanen CREM Gens durchgeführt. Hierbei konnten fünf häufige Polymorphismen in regulatorischen Regionen des Gens identifiziert werden: zwei einzelne Basenaustausche („single nucleotide polymorphisms“ – SNPs) in CREM Promotor 1, zwei weitere Basensubstitutionen in CREM Promotor 4 sowie ein Trinukleotid-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2. Weiterhin wurde bei einer einzelnen Patientin ein seltener Aminosäureaustausch von Glycin zu Aspartat in CREM Exon ,glut 2‘ gefunden.

Unter Verwendung einer im Internet zugänglichen Transkriptionsfaktor-Datenbank (siehe 2.4.3) wurden die die Polymorphismen enthaltenden Sequenzen auf Transkriptionsfaktorbindungsstellen untersucht. Bei Vorliegen eines Basenaustausches in der Bindungsregion eines Transkriptionsfaktors könnte die Bindung beeinträchtigt oder verbessert sein, woraus eine Alteration der Genexpression resultierte. Der tatsächliche Einfluß der Polymorphismen auf die Transkriptionsfaktorbindung und damit die Genexpression kann konklusiv allerdings nur über funktionelle Untersuchungen geklärt werden. Aus der in-silico-Analyse über eine Transkriptionsfaktor-Datenbank lassen sich jedoch erste Hinweise auf eine potentielle funktionelle Relevanz der Promotor-Polymorphismen gewinnen.

So liegt der A/G-Polymorphismus innerhalb des CREM Promotor 1 in der Kernkonsensussequenz des Onkogens V-Myb (core similarity: 0,820) sowie in der Umgebungskonsensussequenz von AP-1 (matrix similarity: 0,854). AP-1 bindet in Kooperation mit AP-4 als aktivierender Transkriptionsfaktor an Enhancerregionen verschiedener Gene (Mermod N et al., 1988).

Der weiter 5' gelegene G/A-Austausch innerhalb des CREM Promotor 4 wurde in der Kernbindungsregion, der weiter 3' gelegene G/A-Polymorphismus in der Umgebungsbindungsregion des „cut-like homeodomain protein“ mit einer ‚core similarity‘ von 1,000 und einer ‚matrix similarity‘ von 0,850 lokalisiert. Das „cut-like homeodomain protein“ wirkt als aktivierender Faktor in der Zelldifferenzierung (Harada R et al., 1995).

Die Konsensussequenzen der Bindungsregionen dieser für die Polymorphismen in den CREM Promotoren 1 und 4 angeführten Transkriptionsfaktoren werden durch das Vorliegen des mutierten Allels alteriert, was möglicherweise eine Beeinträchtigung der Bindung des jeweiligen Transkriptionsfaktors zur Folge hat.

Innerhalb des Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2 konnten Bindungsregionen für S 8 (core similarity: 1,000, matrix similarity: 0,854) identifiziert werden, deren Kernkonsensussequenzen entsprechend der Anzahl der ATT-repeats von sieben bis zu zehn Bindungsmöglichkeiten variieren. S 8 wirkt als aktivierender Transkriptionsfaktor in mesodermalen Zelllinien (deJong R et al., 1993). Weiterhin wurde am Rand der Trinukleotid-Region eine Konsensussequenz für den

Transkriptionsfaktor HNF-3Beta (core similarity: 1,000, matrix similarity: 0,886) lokalisiert, der die Transkriptionsaktivität von Leber spezifischen Genen reguliert (Overdier DG et al., 1994). Eine unterschiedliche Anzahl von ATT-repeats hat allerdings keinen alterierenden Einfluß auf die Konsensussequenz und damit wahrscheinlich auch das Bindungsverhalten von HNF-3Beta.

In Anbetracht der lediglich 112 bp betragenden Entfernung des ATT-Repeat-Polymorphismus von den CRE-Elementen in CREM Promotor 2 läßt sich weiterhin über eine negative Auswirkung des kürzeren 8-repeats Allels auf das Bindungsverhalten aktivierender, c-AMP-abhängiger nukleärer Transkriptionsfaktoren wie CREM, CREB oder ATF-1 an diese CRE-Elemente und damit eine mögliche Beeinträchtigung der von Promotor P2 aus gesteuerten Transkription der ICER Isoform spekulieren.

Der bei einer Patientin heterozygot vorliegende Basenaustausch von G zu A an Position 106 innerhalb des CREM Exon ,glut 2' hat durch seine Lokalisation an zweiter Stelle innerhalb eines Kodons einen Aminosäureaustausch von Glycin zu Aspartat zur Folge. Es handelt sich hierbei um eine nicht-konservative Missense-Mutation, in der eine neutrale Aminosäure (Glycin) durch eine Aminosäure mit negativer Ladung (Aspartat) ersetzt wird. Daher kann durch den beschriebenen Basenaustausch theoretisch eine Funktionsveränderung des Proteins angenommen werden. Nachdem die das Exon ,glut 2' enthaltende CREM tau 2 Isoform im Vergleich zu der alternativ transkribierten CREM tau 1 Isoform einen höheren Beitrag zur Transaktivierungsfunktion des CREM Proteins leistet (Laoide BM et al., 1993), könnte ein Aminosäureaustausch in Exon ,glut 2' durchaus zu einer beeinträchtigten Aktivierung der Transkription cAMP-abhängiger Gene führen. Es ist jedoch nicht klar, ob ein derartiger Aminosäureaustausch bei Vorliegen eines heterozygoten Genotyps klinisch zum Tragen kommen muß.

4.2.3 Assoziationsuntersuchung

Bei der Typisierung des erweiterten Patientenkollektivs wie der Kontrollstichprobe konnte ein signifikantes Kopplungsungleichgewicht der Basenaustausche in CREM Promotor 1 ($\chi^2=96,12$), der Polymorphismen in CREM Promotor 4 ($\chi^2=86,42$) wie auch der beiden CREM Promotor 1 Polymorphismen mit dem Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2 (für CREM P1 C/G: $\chi^2=21,57$, für CREM P1 A/G: $\chi^2=20,92$) beobachtet werden. Diese Ergebnisse lassen auf eine Tendenz der gekoppelten Allele schließen, eine geringe meiotische Rekombinationsrate aufzuweisen und damit in hoher Frequenz gemeinsam vererbt zu werden. Zwischen den Polymorphismen in CREM Promotor 4 und dem Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2 war das Kopplungsungleichgewicht am geringsten ausgeprägt ($\chi^2=12,67$).

Bei der statistischen Analyse der Genotyphäufigkeiten der SNPs in CREM Promotor 1 und CREM Promotor 4 sowie des Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2 bei den untersuchten Kontrollen wurde das Vorliegen eines signifikanten Hardy-Weinberg-Gleichgewichts ermittelt (siehe Tabellen 3.3.1.3.4, 3.3.2.2.4 und 3.3.3.2.5). Mit diesen Berechnungen wurde sichergestellt, daß in der untersuchten Kontrollpopulation alle Allele eines Genortes die gleiche Chance zur Vererbung besitzen und es sich damit nicht um eine genetisch isolierte Subpopulation, sondern um ein repräsentatives Normalkollektiv handelt, welches daher in Assoziationsstudien verwendet werden kann.

Weiterhin wurden die im Mutationsscreening identifizierten Polymorphismen in CREM Promotor 1 CREM Promotor 4 und CREM Promotor 2 im erweiterten Patientenkollektiv sowie der Kontrollstichprobe auf eine Assoziation mit Panikstörung untersucht.

Nach Berechnungen mittels des Chi-Quadrat-Tests ergaben sich für das Gesamt-Patientenkollektiv keine signifikanten p-Werte für eine Assoziation zwischen einem der

beiden Polymorphismen in CREM Promotor 1 und dem Vorliegen von Panikstörung. Lediglich bei der Genotypverteilung in den männlichen Untergruppen konnte eine schwach signifikante Tendenz zu einem Überwiegen des mutierten G-Allels beobachtet werden (siehe Tabelle 3.3.1.3.1).

Bei differenzierter statistischer Betrachtung der Patientengruppe nach Diagnose konnten bei Patienten mit der Diagnose einer reinen Panikstörung (DSM-III-R 300.01) signifikante Werte ($p=0,0186^*$ für Genotypen und $p=0,0036^*$ für Allele) für eine Überrepräsentanz des mutierten G-Allels ermittelt werden, die sich vor allem aus dem weiblichen Anteil der Patienten zu rekrutieren schienen (siehe Tabelle 3.3.1.3.2). Das Vorliegen des mutierten G-Allels war damit signifikant mit einer Risikoerhöhung für das Auftreten von Panikstörung ohne Agoraphobie assoziiert (OR 2,48; CI 1,33-4,61), wobei sich die ermittelten Signifikanzen nach Bonferroni-Korrektur allerdings nicht mehr aufrechterhalten ließen. Bei Patienten mit Panikstörung mit Agoraphobie (DSM-III-R 300.21) konnten keine signifikanten Tendenzen zum Vorliegen eines spezifischen Allels beobachtet werden (siehe Tabelle 3.3.1.3.3). Diese Befunde sprechen entweder für eine eigenständige klinisch-funktionelle Relevanz der Polymorphismen in CREM Promotor 1 in der Genese der Panikstörung ohne Agoraphobie oder lassen sich vor dem Hintergrund des signifikanten Kopplungsungleichgewichts mit dem Trinukleotid-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2 ($\chi^2=21,57$ bzw. $\chi^2=20,92$) als Widerspiegelung des hochsignifikanten Assoziationsbefundes des Polymorphismus in CREM Promotor 2 mit der Erkrankung deuten.

Bei Berechnung der Allel- und Genotypverteilungen der G/A-Polymorphismen in CREM Promotor 4 ergaben sich weder für das Gesamtkollektiv noch für die diagnostischen Untergruppen DSM-III-R 300.01 und 300.21 signifikante Werte für eine Assoziation mit Panikstörung (siehe Tabellen 3.3.2.2.1, 3.3.2.2.2 und 3.3.2.2.3). Unter der Annahme einer hodenspezifischen Aktivität des CREM Promotor 4 (Daniel PB et al., 2000) ist ein wesentlicher Beitrag dieses Promotor-Polymorphismus in der Pathogenese der Panikstörung auch aus biochemisch-neuroendokrinen Überlegungen heraus unwahrscheinlich.

Im Rahmen der statistischen Analyse der Allel- und Genotypverteilung des

Trinukleotid-Repeat-Polymorphismus wurde neben der Betrachtung des Gesamtkollektivs eine Einteilung der Proben in Subgruppen vorgenommen, die auf der Hypothese eines funktionellen Unterschiedes der Aktivität des CREM Promotor 2 je nach Vorliegen des kürzeren, eine 8-fache Wiederholung des Trinukleotid-Musters enthaltenden Allels oder des längeren 9-repeats Allels beruht (siehe 3.3.3.2).

Für die Genotyp- und Allelverteilung im Gesamten (siehe Tabelle 3.3.3.2.2) ergab sich lediglich für die Genotypen in der Untergruppe der weiblichen Probanden ein signifikanter p-Wert ($p=0,0203^*$) bei einem Trend für Allele ($p=0,1$) und Genotypen ($p=0,07$) in der Gesamtstichprobe. Unter der oben angesprochenen Bildung von Subgruppen zum Vergleich der Verteilungen des kürzeren 8-repeats Allels und des 9-repeats Allels (siehe Tabelle 3.3.3.2.2) fand sich eine signifikante Prävalenz des kürzeren Allels mit acht Trinukleotid-Wiederholungen bei den Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,0231^*$ für Allele und $p=0,0178^{**}$ für Genotypen). Dementsprechend war die Überrepräsentanz des 8-repeats Allels signifikant mit einer Risikoerhöhung für das Auftreten von Panikstörung assoziiert (OR 2,03; CI 1,09-3,76 für Allele und OR 2,27; CI 1,14-4,51 für Genotypen). Deutliche Signifikanzen ergaben sich auch bei der vergleichenden Betrachtung des Allels mit einer neunmaligen Wiederholung des ATT-Motivs im Vergleich zu allen übrigen Allelen ($p=0,0116^{**}$; OR 1,98; CI 1,16-3,39) sowie des Genotyps mit Homozygotie für das 9-repeats Allel im Vergleich zu allen anderen Genotypen ($p=0,0030^{**}$; OR 2,58; CI 1,37-4,86).

Bei der differenzierten Betrachtung der Allel- und Genotypverteilungen nach genauer spezifizierter Diagnose zeigte sich bei Patienten mit der Diagnose einer reinen Panikstörung (DSM-III-R 300.01; siehe Tabelle 3.3.3.2.3) eine hochsignifikante Überrepräsentanz des kürzeren Allels mit nur 8 Trinukleotid-Repeats ($p=0,0013^{***}$; OR 3,37; CI 1,56-7,29) beziehungsweise ein relativer Mangel des 9-repeats Allels ($p=0,0009^{***}$; OR 3,13; CI 1,56-6,29). Dieser Effekt scheint sich hauptsächlich aus der Subgruppe der weiblichen Probanden zu rekrutieren, die mit hohen Odds-Ratios ebenfalls deutlich signifikante Assoziationen entweder einer Prävalenz des kürzeren 8-repeats Allels ($p=0,0057$; OR 4,28; CI 1,44-12,78) oder einer Unterrepräsentanz des längeren 9-repeats Allels ($p=0,0009$; OR 4,71; CI 1,78-12,52) mit Panikstörung ohne Agoraphobie zeigte. Die für eine Assoziation eines relativen Mangels an einem

homozygoten 9-repeats Genotyp mit Panikstörung ohne Agoraphobie ermittelten p-Werte behalten in der gesamten Patientengruppe ($p=0,0001^{***}$; OR 5,65; CI 2,23-14,34) wie auch in der weiblichen Subgruppe ($p=0,0004^{***}$; OR 10,15; CI 2,39-43,10) sogar nach Bonferroni-Korrektur statistische Signifikanz ($p\leq 0,01$), was diesen Befund im Hinblick auf die Relevanz in der Pathogenese der Panikstörung besonders unterstreicht.

Bei Vorliegen von Panikstörung mit Agoraphobie (DSM-III-R 300.21) konnte im Gegensatz dazu keine signifikante Tendenz zu einem bestimmten Allel ermittelt werden (siehe Tabelle 3.3.3.2.4).

Da der zum Aminosäureaustausch gly/asp führende Basenaustausch in CREM Exon ‚glut 2‘ im Rahmen des Mutationsscreenings bei lediglich einer Patientin in heterozygoter Form beobachtet werden konnte, wurde keine Assoziationsstudie angeschlossen. Aufgrund des Auftretens bei nur einer Patientin stellt dieser Polymorphismus sicher keinen wesentlichen Populations-Effekt bei der Pathogenese der Panikstörung dar. Inwieweit dieser Polymorphismus in der Familie der Patientin von Relevanz ist, müßte durch eine Kosegregationsanalyse innerhalb der Familie geklärt werden. Im Rahmen der vorliegenden Studie war diese Analyse jedoch nicht möglich, da die DNA von Familienangehörigen des Patientenkollektivs nicht vorlag und generell mit dem hier gewählten Ansatz die Rolle seltener Varianten in einzelnen Familien nicht zu klären ist.

4.3 CREM Promotor 2-Polymorphismus und Panikstörung

Die signifikanten Assoziationsbefunde bei der Untersuchung des Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2 innerhalb des Gesamtpatientenkollektivs unterstützen die Ausgangshypothese, daß das CREM Gen eine Rolle in der Pathogenese der Panikstörung spielt.

In Kenntnis funktioneller Analysen beispielsweise eines Repeat-Polymorphismus im Promotor des MAO-A Gens, bei dem die längeren Allele mit einer erhöhten, die kürzeren mit einer erniedrigten Transkriptionsaktivität des Gens assoziiert waren

(Deckert J et al., 1999), könnte man auch im Fall des Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2 eine Beeinträchtigung der Transkriptionsaktivität bei Vorliegen des kürzeren, bei Patienten mit Panikstörung signifikant häufigeren 8-repeats Allels annehmen. Die dadurch bedingte Unterexpression der von Promotor P2 generierten repressorischen ICER Isoform könnte damit einen Pathomechanismus der Panikstörung darstellen.

In Anbetracht des bei Panikstörung postulierten hyperadrenergen Status (siehe 1.1.4) ist unter der Hypothese einer Unterexpression von ICER eine mangelnde Hemmung der durch Noradrenalin oder Adrenalin induzierten, cAMP-vermittelten Neurotransmitteraktion in den für die Genese der Panikstörung in Frage kommenden Regionen wie dem Locus coeruleus oder dem limbischen System (siehe 1.1.4.1 und 1.3) als Vulnerabilitätsfaktor für das Auftreten von Panikattacken denkbar.

Nachdem ebenfalls eine Überaktivierung der hypothalamo-hypophyseo-adrenalen Achse in Zusammenhang mit der Pathogenese der Panikstörung diskutiert wird (siehe 1.1.4; z.B. Bakshi VP et al., 2002 und Bale TL et al., 2002), kann auch eine mangelnde Hemmung besonders der CRH- und ACTH-vermittelten Genantwort durch eine Unterexpression der ICER Isoform als Pathogenitätsfaktor in der Entstehung von Panikattacken wirken.

Die Beobachtung eines erniedrigten, und nicht - wie nach dem oben dargestellten Modell zu erwartenden - erhöhten Angstniveaus bei CREM knock-out Mäusen (Maldonado R et al., 1999) mag darauf beruhen, daß hier das CREM Gen unspezifisch inaktiviert wurde. Somit fehlen in diesem Modell auch alle ubiquitär und konstitutionell exprimierte Transkriptions-aktivierende CREM Isoformen in der cAMP-gekoppelten Signalkaskade, weswegen die durch Adrenalin, Noradrenalin, Serotonin, CRH oder ACTH induzierte und über CREM Isoformen vermittelte Genantwort, die zu einer Panikattacke führen könnte, nicht mehr adäquat vermittelt werden kann. Die im knock-out Modell ebenfalls inaktivierte repressorische ICER Isoform fällt im Vergleich aufgrund ihrer gewebsspezifischen Expression und feinregulatorischen Funktion hier funktionell möglicherweise nicht ins Gewicht.

Ein weiterer zu diskutierender Befund der vorliegenden Studie besteht darin, daß die deutlichen Unterschiede in der Allel- und Genotypverteilung bei Patienten mit reiner Panikstörung (DSM-III-R 300.01) und Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie (DSM-III-R 300.21) für die CREM Promotor 1 Polymorphismen ($p \leq 0,05$) sowie auf hochsignifikantem Niveau für den Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus ($p \leq 0,001$) auf eine mögliche molekularbiologische Differenzierbarkeit der Pathogenese dieser beiden klinischen Diagnosen hindeuten könnten. So scheinen die identifizierten Promotor-Varianten eine spezifische Rolle bei der Pathogenese der Panikattacke an sich einzunehmen, während sie für die Entwicklung einer phobischen Symptomatik eher nicht relevant zu sein scheinen.

Die der oben dargestellten Hypothese einer Unterexpression der repressorischen ICER Isoform zugrundeliegende Annahme einer Beeinträchtigung der Aktivität des CREM Promotor 2 bei Vorliegen des kürzeren 8-repeats Allels wird durch weitere Experimente unter Verwendung von Luciferase-Assays funktionell untersucht werden müssen.

Die in den Assoziationsuntersuchungen ermittelten Risikoerhöhungen passen in das Konzept der Genese der Panikstörung auf multifaktoriellem und oligo- oder polygenem Weg (Knowles JA et al., 1998). Danach würden die beschriebenen CREM Polymorphismen in Zusammenwirken mit weiteren Polymorphismen die Vulnerabilität für das Auftreten der Erkrankung nach dem Epistase-Modell synergistisch wirkender Mutationen bedingen und damit als Suszeptibilitätsfaktor wirken (Greenberg DA, 1993).

Schließlich ist zu erwägen, daß die identifizierten Polymorphismen, für die eine signifikante Assoziation mit dem Vorliegen von Panikstörung gefunden wurde, nicht selbst für das Erkrankungsrisiko verantwortlich sind, sondern im Kopplungsungleichgewicht mit einem weiteren Polymorphismus stehen können, der den eigentlich pathogenen Einfluß auf die Genese der Panikstörung ausübt. Dieser gekoppelte Marker mit einer Rekombinationsfrequenz unter 0,5 zu den gefundenen Polymorphismen läge etwa in einem Bereich von 1 Megabase oder weniger um die identifizierten Loci auf demselben Chromosom (Strachan T et al., 1996). Diese

Hypothese ist vor allem vor dem Hintergrund der Revision der genomweiten Kopplungsanalyse von Knowles et al. interessant, in der ein LOD-Wert von 2,9 beziehungsweise 3,1 für einen Locus auf dem kurzen Arm von Chromosom 10 festgestellt wurde, der nur etwa 128 Kilobasen von dem CREM Gen Locus (10p12.1-p11.1) entfernt liegt (Knowles JA et al., 1998; persönliche Mitteilung). Um diese Hypothese zu klären, sind Replikationsuntersuchungen in unabhängigen Stichproben, gegebenenfalls unter Analyse von Haplotypen, erforderlich.

4.4 Ausblick

Die vorliegende Untersuchung bietet mit der erstmaligen Charakterisierung der genomischen Struktur des humanen CREM Gens und der Identifikation von bislang nicht bekannten, häufigen Polymorphismen die Grundlage für weitere Assoziationsstudien in anderen relevanten Kollektiven wie beispielsweise vor dem Hintergrund des Phänotyps der CREM knock-out Maus (siehe 1.2.3.1 und 1.3) bei Patienten mit Azoospermie infolge eines Spermatogenese-arrestes. Weiterhin dürften die Ergebnisse dieser Arbeit auch im Hinblick auf die Untersuchung einer möglichen Rolle des CREM Gens bei der Regulation myokardialer Proteinexpression von Interesse sein, nachdem eine herzspezifische Aktivität einiger CREM Isoformen in der Literatur beschrieben ist (Muller FU et al., 1998).

Die deutlichen Unterschiede in der Allel- und Genotypverteilung bei Patienten mit Panikstörung mit und ohne Agoraphobie für die CREM Promotor 1 Polymorphismen sowie vor allem für den Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2 weisen auf eine potentielle biologisch-molekulare Differenzierbarkeit von Panikstörung mit und ohne Agoraphobie hin, die der von der DSM-Klassifikation vorgeschlagenen klinischen Trennung dieser Krankheitsbilder entspräche. Um derartige Effekte identifizieren zu können, ergibt sich in diesem Zusammenhang für zukünftige molekularbiologische Untersuchungen der Pathogenese der Panikstörung die Notwendigkeit einer Subgruppierung des Patientenkollektivs differenziert nach dem Vorliegen von Agoraphobie zusätzlich zur Untersuchung der Gesamtstichprobe.

Schließlich könnte die klinische Relevanz der Ergebnisse dieser Arbeit im Beitrag zu einem neuartigen Konzept der Entwicklung von anxiolytischen Substanzen liegen, die nicht - wie beispielsweise die als potentiell wirksam diskutierte CRH2-Antagonisten (Bakshi VP et al., 2002) - auf Rezeptor- sondern auf Transkriptionsebene wirken. Möglicherweise könnten Substanzen, die entweder direkt oder indirekt die Expression von ICER induzieren, bei Trägern des kürzeren 8-repeats Allels innerhalb des Trinukleotid(ATT)-Repeat-Polymorphismus in CREM Promotor 2 eine anxiolytische

Wirkung zeigen. Nachdem, wie oben angeprochen, eine Übersekretion von hypothalamischem CRH wie auch ein hyperadrenerger Status als potentielle biochemische Grundlagen der Panikstörung diskutiert werden, könnte durch medikamentöse oder zukünftig eventuell verfügbare genterapeutische Induktion der ICER Expression die hypothetisch angenommene mangelnde Hemmung der beispielsweise durch Noradrenalin, CRH oder ACTH induzierten cAMP-vermittelten Neurotransmitteraktion in den für die Genese der Panikstörung in Frage kommenden Regionen kompensiert werden.

Literaturverzeichnis

1. Aaij C, Borst P (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta* 269:192-200.
2. Abelson JL, Curtis GC (1996) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in panic disorder. 24-hour secretion of corticotropin and cortisol. *Arch Gen Psychiatry* 53:323-31.
3. Al-Damluji S (1988) Adrenergic mechanisms in the control of corticotrophin secretion. *J Endocrinol* 119:5-14.
4. Armengol L, Gratacos M, Pujana MA, Ribases M, Martin-Santos R, Estivill X (2002) 5' UTR-region SNP in the NTRK3 gene is associated with panic disorder. *Mol Psychiatry* 7:928-30.
5. Bakshi VP, Smith-Roe S, Newman SM, Grigoriadis DE, Kalin NH (2002) Reduction of stress-induced behavior by antagonism of corticotropin-releasing hormone 2 (CRH2) receptors in lateral septum or CRH1 receptors in amygdala. *J Neurosci* 22:2926-35.
6. Bale TL, Picetti R, Contarino A, Koob GF, Vale WW, Lee KF (2002) Mice deficient for both corticotropin-releasing factor receptor 1 (CRFR1) and CRFR2 have an impaired stress response and display sexually dichotomous anxiety-like behavior. *J Neurosci* 22:193-9.
7. Ballenger JC, Burrows GD, DuPont RL, Jr., Lesser IM, Noyes R, Jr., Pecknold JC, Rifkin A, Swinson RP (1988) Alprazolam in panic disorder and agoraphobia: results from a multicenter trial. I. Efficacy in short-term treatment. *Arch Gen Psychiatry* 45:413-22.
8. Barlow D, Cerny J (1988) Psychological treatment of panic. Guilford, New York.
9. Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F (1996) Genetix v3.0 logiciel sous Windows TM pour la genetique des populations. Laboratoire Genome et Populations, CNRS UPR 9060, Universite de Montpellier 2, France.
10. Bodor J, Spetz AL, Strominger JL, Habener JF (1996) cAMP inducibility of transcriptional repressor ICER in developing and mature human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3536-41.

11. Borrelli E, Montmayeur JP, Foulkes NS, Sassone-Corsi P (1992) Signal transduction and gene control: the cAMP pathway. *Crit Rev Oncog* 3:321-38
12. Boulikas T, Hancock R (1981) A highly sensitive technique for staining DNA and RNA in polyacrylamide gels using silver. *J Biochem Biophys Methods* 5: 219-28.
13. Bradwejn J, Koszycki D (1994) The cholecystokinin hypothesis of anxiety and panic disorder. *Ann N Y Acad Sci* 713:273-82.
14. Breathnach R, Benoist C, O'Hare K, Gannon F, Chambon P (1978) Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:4853-7.
15. Briggs MR, Kadonaga JT, Bell SP, Tjian R (1986) Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. *Science* 234:47-52.
16. Burks C, Cassidy M, Cinkosky MJ, Cumella KE, Gilna P, Hayden JE, Keen GM, Kelley TA, Kelly M, Kristofferson D, et al. (1991) GenBank. *Nucleic Acids Res* 19 Suppl:2221-5.
17. Carter MJ, Milton ID (1993) An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles. *Nucleic Acids Res* 21:1044.
18. Charney DS, Heninger GR, Breier A (1984) Noradrenergic function in panic anxiety. Effects of yohimbine in healthy subjects and patients with agoraphobia and panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 41:751-63.
19. Charney DS, Heninger GR, Jatlow PI (1985) Increased anxiogenic effects of caffeine in panic disorders. *Arch Gen Psychiatry* 42:233-43.
20. Charney DS, Woods SW, Nagy LM, Southwick SM, Krystal JH, Heninger GR (1990) Noradrenergic function in panic disorder. *J Clin Psychiatry* 51 Suppl A:5-11.
21. Comings DE, MacMurray JP (2000) Molecular heterosis: a review. *Mol Genet Metab* 71:19-31.
22. Crowe RR (1985) Mitral valve prolapse and panic disorder. *Psychiatr Clin North Am* 8:63-71.
23. Crowe RR, Goedken R, Samuelson S, Wilson R, Nelson J, Noyes R, Jr. (2001) Genomewide survey of panic disorder. *Am J Med Genet* 105:105-9.
24. Crowe RR, Noyes R, Pauls DL, Slymen D (1983) A family study of panic

- disorder. *Arch Gen Psychiatry* 40:1065-9.
25. Crowe RR, Noyes R, Persico AM (1987) Pro-opiomelanocortin (POMC) gene excluded as a cause of panic disorder in a large family. *J Affect Disord* 12:23-7.
 26. Crowe RR, Noyes R, Samuelson S, Wesner R, Wilson R (1990) Close linkage between panic disorder and alpha-haptoglobin excluded in 10 families. *Arch Gen Psychiatry* 47:377-80.
 27. Crowe RR, Noyes R, Wilson AF, Elston RC, Ward LJ (1987) A linkage study of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 44:933-7.
 28. Crowe RR, Wang Z, Noyes R, Albrecht BE, Darlison MG, Bailey ME, Johnson KJ, Zoega T (1997) Candidate gene study of eight GABAA receptor subunits in panic disorder. *Am J Psychiatry* 154:1096-100.
 29. Daniel PB, Rohrbach L, Habener JF (2000) Novel cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP) response element modulator theta isoforms expressed by two newly identified cAMP-responsive promoters active in the testis. *Endocrinology* 141:3923-30.
 30. de Jong R, van der Heijden J, Meijlink F (1993) DNA-binding specificity of the S8 homeodomain. *Nucleic Acids Res* 21:4711-20.
 31. de Montigny C (1989) Cholecystokinin tetrapeptide induces panic-like attacks in healthy volunteers. Preliminary findings. *Arch Gen Psychiatry* 46:511-7.
 32. Deckert J, Catalano M, Heils A, Di Bella D, Friess F, Politi E, Franke P, Nothen MM, Maier W, Bellodi L, Lesch KP (1997) Functional promoter polymorphism of the human serotonin transporter: lack of association with panic disorder. *Psychiatr Genet* 7:45-7.
 33. Deckert J, Catalano M, Syagailo YV, Bosi M, Okladnova O, Di Bella D, Nothen MM, Maffei P, Franke P, Fritze J, Maier W, Propping P, Beckmann H, Bellodi L, Lesch KP (1999) Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet* 8:621-4.
 34. Deckert J, Nothen MM, Franke P, Delmo C, Fritze J, Knapp M, Maier W, Beckmann H, Propping P (1998) Systematic mutation screening and association study of the A1 and A2a adenosine receptor genes in panic disorder suggest a contribution of the A2a gene to the development of disease. *Mol Psychiatry* 3:81-5.

35. Delmas V, Laoide BM, Masquillier D, de Groot RP, Foulkes NS, Sassone-Corsi P (1992) Alternative usage of initiation codons in mRNA encoding the cAMP-responsive-element modulator generates regulators with opposite functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4226-30.
36. den Boer JA, Westenberg HG, Kamerbeek WD, Verhoeven WM, Kahn RS (1987) Effect of serotonin uptake inhibitors in anxiety disorders; a double-blind comparison of clomipramine and fluvoxamine. *Int Clin Psychopharmacol* 2:21-32.
37. Dengler W, Selbmann HK (2000) *Praxisleitlinien in Psychiatrie und Psychotherapie; Band 2: Leitlinien zur Diagnostik und Therapie von Angsterkrankungen*. Steinkopff, Darmstadt.
38. Dilling H, Mombour W, Schmidt M (1991) *Internationale Klassifikation psychischer Störungen: ICD-10*. Huber, Bern.
39. Dunn AJ, Berridge CW (1990) Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Brain Res Rev* 15:71-100.
40. Elam M, Yao T, Thoren P, Svensson TH (1981) Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. *Brain Res* 222:373-81.
41. Eriksson E (1987) Brain neurotransmission in panic disorder. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 335:31-7.
42. Falk CT, Rubinstein P (1987) Haplotype relative risks: an easy reliable way to construct a proper control sample for risk calculations. *Ann Hum Genet* 51:227-33.
43. Flint AJ, Koszycki D, Bradwejn J, Vaccarino FJ (2000) Neurohormonal responses to cholecystokinin tetrapeptide: a comparison of younger and older healthy subjects. *Psychoneuroendocrinology* 25:633-47.
44. Florea L, Hartzell G, Zhang Z, Rubin GM, Miller W (1998) A computer program for aligning a cDNA sequence with a genomic DNA sequence. *Genome Res* 8:967-74.
45. Foulkes NS, Borjigin J, Snyder SH, Sassone-Corsi P (1997) Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Trends*

- Neurosci 20:487-92.
46. Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P (1991) CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 64:739-49.
 47. Foulkes NS, Mellstrom B, Benusiglio E, Sassone-Corsi P (1992) Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to activator. *Nature* 355:80-4.
 48. Foulkes NS, Schlotter F, Pevet P, Sassone-Corsi P (1993) Pituitary hormone FSH directs the CREM functional switch during spermatogenesis. *Nature* 362: 264-7.
 49. Fujimoto T, Fujisawa J, Yoshida M (1994) Novel isoforms of human cyclic AMP-responsive element modulator (hCREM) mRNA. *J Biochem (Tokyo)* 115:298-303.
 50. Gelernter J, Bonvicini K, Page G, Woods SW, Goddard AW, Kruger S, Pauls DL, Goodson S (2001) Linkage genome scan for loci predisposing to panic disorder or agoraphobia. *Am J Med Genet* 105:548-57.
 51. Greenberg DA (1993) Linkage analysis of necessary disease loci versus susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 52:135-43.
 52. Hamilton SP, Slager SL, Heiman GA, Deng Z, Haghghi F, Klein DF, Hodge SE, Weissman MM, Fyer AJ, Knowles JA (2002) Evidence for a susceptibility locus for panic disorder near the catechol-O-methyltransferase gene on chromosome 22. *Biol Psychiatry* 51:591-601.
 53. Harada R, Berube G, Tamplin OJ, Denis-Larose C, Nepveu A (1995) DNA-binding specificity of the cut repeats from the human cut-like protein. *Mol Cell Biol* 15:129-40.
 54. Hattori E, Yamada K, Toyota T, Yoshitsugu K, Toru M, Shibuya H, Yoshikawa T (2001) Association studies of the CT repeat polymorphism in the 5' upstream region of the cholecystokinin B receptor gene with panic disorder and schizophrenia in Japanese subjects. *Am J Med Genet* 105:779-82.
 55. Hayashi K, Yandell DW (1993) How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 2:338-46.
 56. Hetta JM, Neale MC, Kendler KS (2001) A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 158(10):1568-78.

57. Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF (1988) Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 242:1430-3.
58. Hoey T, Weinzierl RO, Gill G, Chen JL, Dynlacht BD, Tjian R (1993) Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* 72:247-60.
59. Holsboer F (1993) Neurobiologie. In: Holsboer F, Philipp M (eds) *Angststörungen, Pathogenese - Diagnostik - Therapie*. SM Verlag, Gräfelfing.
60. Holsboer F, von Bardeleben U, Buller R, Heuser I, Steiger A (1987) Stimulation response to corticotropin-releasing hormone (CRH) in patients with depression, alcoholism and panic disorder. *Horm Metab Res Suppl* 16:80-8.
61. Huber G (1999) *Psychiatrie*, 6. edn. Schattauer, Stuttgart.
62. Katerndahl DA, Realini JP (1997) Comorbid psychiatric disorders in subjects with panic attacks. *J Nerv Ment Dis* 185(11):669-74.
63. Kendall DA, Millns PJ, Firth JL (1992) Direct and indirect stimulations of cyclic AMP formation in human brain. *Br J Pharmacol* 105:899-902.
64. Kendler KS, Neale MC, Kessler RC, Heath AC, Eaves LJ (1993) Panic disorder in women: a population-based twin study. *Psychol Med* 23:397-406.
65. Kennedy JL, Bradwejn J, Koszycki D, King N, Crowe R, Vincent J, Fourie O (1999) Investigation of cholecystokinin system genes in panic disorder. *Mol Psychiatry* 4:284-5.
66. Keyl PM, Eaton WW (1990) Risk factors for the onset of panic disorder and other panic attacks in a prospective, population-based study. *Am J Epidemiol* 131:301-11.
67. Khoury MJ (1994) Case-parental control method in the search for disease-susceptibility genes. *Am J Hum Genet* 55:414-5.
68. Kidd KK (1993) Associations of disease with genetic markers: deja vu all over again. *Am J Med Genet* 48:71-3.
69. Kistler MK, Sassone-Corsi P, Kistler WS (1994) Identification of a functional cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element in the 5'-flanking region of the gene for transition protein 1 (TP1), a basic chromosomal protein of mammalian spermatids. *Biol Reprod* 51:1322-9.

70. Knowles JA, Fyer AJ, Vieland VJ, Weissman MM, Hodge SE, Heiman GA, Haghighi F, de Jesus GM, Rassnick H, Preud'homme-Rivelli X, Austin T, Cunjak J, Mick S, Fine LD, Woodley KA, Das K, Maier W, Adams PB, Freimer NB, Klein DF, Gilliam TC (1998) Results of a genome-wide genetic screen for panic disorder. *Am J Med Genet* 81:139-47.
71. Kozak M (1989) The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol* 108:229-41.
72. Kukita Y, Tahira T, Sommer SS, Hayashi K (1997) SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. *Hum Mutat* 10:400-7.
73. Lalli E, Sassone-Corsi P (1995) Thyroid-stimulating hormone (TSH)-directed induction of the CREM gene in the thyroid gland participates in the long-term desensitization of the TSH receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9633-7.
74. Lamas M, Molina C, Foulkes NS, Jansen E, Sassone-Corsi P (1997) Ectopic ICER expression in pituitary corticotroph AtT20 cells: effects on morphology, cell cycle, and hormonal production. *Mol Endocrinol* 11:1425-34.
75. Lander ES, Schork NJ (1994) Genetic dissection of complex traits. *Science* 265:2037-48.
76. Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759-64.
77. Laoide BM, Foulkes NS, Schlotter F, Sassone-Corsi P (1993) The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *Embo J* 12:1179-91.
78. Leckman JF, Weissman MM, Merikangas KR, Pauls DL, Prusoff BA (1983) Panic disorder and major depression. Increased risk of depression, alcoholism, panic, and phobic disorders in families of depressed probands with panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 40:1055-60.
79. Lensi P, Cassano GB, Correddu G, Ravagli S, Kunovac JL, Akiskal HS (1996) Obsessive-compulsive disorder. Familial-developmental history, symptomatology, comorbidity and course with special reference to gender-related differences. *Br J Psychiatry* 169:101-7.
80. Liebowitz MR, Fyer AJ, Gorman JM, Dillon D, Appleby IL, Levy G, Anderson S, Levitt M, Palij M, Davies SO, et al. (1984) Lactate provocation of panic attacks. I.

- Clinical and behavioral findings. *Arch Gen Psychiatry* 41:764-70.
81. Liebowitz MR, Gorman JM, Fyer AJ, Levitt M, Dillon D, Levy G, Appleby IL, Anderson S, Palij M, Davies SO, et al. (1985) Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. *Arch Gen Psychiatry* 42:709-19.
 82. Maier W, Lichtermann D (1993) The genetic epidemiology of unipolar depression and panic disorder. *Int Clin Psychopharmacol* 8 Suppl 1:27-33.
 83. Maier W, Lichtermann D, Minges J, Oehrlin A, Franke P (1993) A controlled family study in panic disorder. *J Psychiatr Res* 27:79-87.
 84. Maldonado R, Smadja C, Mazzucchelli C, Sassone-Corsi P, Mazucchelli C (1999) Altered emotional and locomotor responses in mice deficient in the transcription factor CREM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14094-9.
 85. Malizia AL, Cunningham VJ, Bell CJ, Liddle PF, Jones T, Nutt DJ (1998) Decreased brain GABA(A)-benzodiazepine receptor binding in panic disorder: preliminary results from a quantitative PET study. *Arch Gen Psychiatry* 55:715-20.
 86. Mannuzza S, Fyer AJ, Klein DF, Endicott J (1986) Schedule for Affective Disorders and Schizophrenia--Lifetime Version modified for the study of anxiety disorders (SADS-LA): rationale and conceptual development. *J Psychiatr Res* 20:317-25.
 87. Margraf J, Schneider S, Ehlers A, DiNardo P, Barlow D (1991) Diagnostisches Interview bei psychischen Störungen. Springer, Berlin.
 88. Martin NG, Jardine R, Andrews G, Heath AC (1988) Anxiety disorders and neuroticism: are there genetic factors specific to panic? *Acta Psychiatr Scand* 77:698-706.
 89. Masquillier D, Foulkes NS, Mattei MG, Sassone-Corsi P (1993) Human CREM gene: evolutionary conservation, chromosomal localization, and inducibility of the transcript. *Cell Growth Differ* 4:931-7.
 90. Mazzucchelli C, Sassone-Corsi P (1999) The inducible cyclic adenosine monophosphate early repressor (ICER) in the pituitary intermediate lobe: role in the stress response. *Mol Cell Endocrinol* 155:101-13.
 91. McIntyre IM, Norman TR, Marriott PF, Burrows GD (1987) The pineal hormone

- melatonin in panic disorder. *J Affect Disord* 12:203-6.
92. McKnight GS, Clegg CH, Uhler MD, Chrivia JC, Cadd GG, Correll LA, Otten AD (1988) Analysis of the cAMP-dependent protein kinase system using molecular genetic approaches. *Recent Prog Horm Res* 44:307-35.
 93. Mellstrom B, Naranjo JR, Foulkes NS, Lafarga M, Sassone-Corsi P (1993) Transcriptional response to cAMP in brain: specific distribution and induction of CREM antagonists. *Neuron* 10:655-65.
 94. Mermod N, Williams TJ, Tjian R (1988) Enhancer binding factors AP-4 and AP-1 act in concert to activate SV40 late transcription in vitro. *Nature* 332:557-61.
 95. Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P (1993) Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* 75:875-86.
 96. Montminy MR, Bilezikjian LM (1987) Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature* 328:175-8.
 97. Muller FU, Boknik P, Knapp J, Neumann J, Vahlensieck U, Oetjen E, Scheld HH, Schmitz W (1998) Identification and expression of a novel isoform of cAMP response element modulator in the human heart. *Faseb J* 12:1191-9.
 98. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51:263-73.
 99. Nakamura M, Ueno S, Sano A, Tanabe H (1999) Polymorphisms of the human homologue of the *Drosophila* white gene are associated with mood and panic disorders. *Mol Psychiatry* 4:155-62.
 100. Nauta W, Domesick V (1981) Ramifications of the Limbic system. In: Matthysse S (ed) *Psychiatry and Biology of the Human Brain*. Elsevier Press, Amsterdam.
 101. Nigg EA, Hilz H, Eppenberger HM, Dutly F (1985) Rapid and reversible translocation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase type II from the Golgi complex to the nucleus. *Embo J* 4:2801-6.
 102. Noyes R, Jr., Crowe RR, Harris EL, Hamra BJ, McChesney CM, Chaudhry DR (1986) Relationship between panic disorder and agoraphobia. A family study. *Arch Gen Psychiatry* 43:227-32.
 103. Ohara K, Xie DW, Ishigaki T, Deng ZL, Nakamura Y, Suzuki Y, Miyasato K

- (1996) The genes encoding the 5HT1D alpha and 5HT1D beta receptors are unchanged in patients with panic disorder. *Biol Psychiatry* 39:5-10.
104. Ohara K, Suzuki Y, Ochiai M, Terada H (2000) Polymorphism in the promoter region of the alpha(2A)-adrenergic receptor gene and panic disorders. *Psychiatry Res* 93:79-82.
105. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2766-70.
106. Overdier DG, Porcella A, Costa RH (1994) The DNA-binding specificity of the hepatocyte nuclear factor 3/forkhead domain is influenced by amino-acid residues adjacent to the recognition helix. *Mol Cell Biol* 14:2755-66.
107. Owen MJ, McGuffin P (1993) Association and linkage: complementary strategies for complex disorders. *J Med Genet* 30:638-9.
108. Papp LA, Klein DF, Gorman JM (1993) Carbon dioxide hypersensitivity, hyperventilation, and panic disorder. *Am J Psychiatry* 150:1149-57.
109. Pauls DL, Bucher KD, Crowe RR, Noyes R (1980) A genetic study of panic disorder pedigrees. *Am J Hum Genet* 32:639-44.
110. Perna G, Caldirola D, Arancio C, Bellodi L (1997) Panic attacks: a twin study. *Psychiatry Res* 66:69-71.
111. Pohl R, Yeragani VK, Balon R, Rainey JM, Lycaki H, Ortiz A, Berchou R, Weinberg P (1988) Isoproterenol-induced panic attacks. *Biol Psychiatry* 24:891-902.
112. Priolo E, Libri V, Lopilato R, David E, Nappi G, Nistico G (1991) Panic-like attack induced by microinfusion into the locus coeruleus of antagonists and inverse agonists at GABAA-receptors in rodents. *Funct Neurol* 6:393-403.
113. Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23:4878-84.
114. Randall PK, Bremner JD, Krystal JH, Nagy LM, Heninger GR, Nicolaou AL, Charney DS (1995) Effects of the benzodiazepine antagonist flumazenil in PTSD. *Biol Psychiatry* 38:319-24.
115. Redmond DE, Jr., Huang YH (1979) Current concepts. II. New evidence for a

- locus coeruleus-norepinephrine connection with anxiety. *Life Sci* 25:2149-62.
116. Rehfuss RP, Walton KM, Loriaux MM, Goodman RH (1991) The cAMP-regulated enhancer-binding protein ATF-1 activates transcription in response to cAMP-dependent protein kinase A. *J Biol Chem* 266:18431-4.
117. Risch N, Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273:1516-7.
118. Robins LN, Wing J, Wittchen HU, Helzer JE, Babor TF, Burke J, Farmer A, Jablenski A, Pickens R, Regier DA, et al (1988) The Composite International Diagnostic Interview. An epidemiologic instrument suitable for use in conjunction with different diagnostic systems and in different cultures. *Arch Gen Psychiatry* 45:1069-77.
119. Roesler WJ, Vandenbark GR, Hanson RW (1988) Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem* 263:9063-6.
120. Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-86.
121. Sabol SZ, Hu S, Hamer D (1998) A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter. *Hum Genet* 103:273-9.
122. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91.
123. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4.
124. Sand PG, Godau C, Riederer P, Peters C, Franke P, Nothen MM, Stober G, Fritze J, Maier W, Propping P, Lesch KP, Riess O, Sander T, Beckmann H, Deckert J (2000) Exonic variants of the GABA(B) receptor gene and panic disorder. *Psychiatr Genet* 10:191-4.
125. Sand PG, Mori T, Godau C, Stober G, Flachenecker P, Franke P, Nothen MM, Fritze J, Maier W, Lesch KP, Riederer P, Beckmann H, Deckert J (2002) Norepinephrine transporter gene (NET) variants in patients with panic disorder. *Neurosci Lett* 333:41-4.
126. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating

- inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-7.
127. Saß H, Wittchen H, Zaudig M (1999) *Handbuch der Differentialdiagnosen DSM-IV*. Hogrefe, Göttingen.
 128. Scheibe G, Albus M (1992) Age at onset, precipitating events, sex distribution, and co-occurrence of anxiety disorders. *Psychopathology* 25:11-8.
 129. Seif I, Khoury G, Dhar R (1979) BKV splice sequences based on analysis of preferred donor and acceptor sites. *Nucleic Acids Res* 6:3387-98.
 130. Sham PC, Curtis D (1995) Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet* 59:97-105.
 131. Sharp PA, Sugden B, Sambrook J (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12:3055-63.
 132. Sheehan DV (1985) Monoamine oxidase inhibitors and alprazolam in the treatment of panic disorder and agoraphobia. *Psychiatr Clin North Am* 8:49-62.
 133. Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16:325-32.
 134. Shiga K, Yamamoto H, Okamoto H (1990) Isolation and characterization of the human homologue of *rig* and its pseudogenes: the functional gene has features characteristic of housekeeping genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:3594-8.
 135. Skre I, Onstad S, Torgersen S, Lygren S, Kringlen E (1993) A twin study of DSM-III-R anxiety disorders. *Acta Psychiatr Scand* 88:85-92.
 136. Snyder SH, Katims JJ, Annau Z, Bruns RF, Daly JW (1981) Adenosine receptors and behavioral actions of methylxanthines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:3260-4.
 137. Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993) Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52:506-16.
 138. Stehle JH, Foulkes NS, Molina CA, Simonneaux V, Pevet P, Sassone-Corsi P (1993) Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* 365:314-20.
 139. Steinlein OK, Deckert J, Nothen MM, Franke P, Maier W, Beckmann H, Propping P (1997) Neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit

- (CHRNA4) and panic disorder: an association study. *Am J Med Genet* 74:199-201.
140. Strachan T, Read A (1996) *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
141. Sullivan GM, Coplan JD, Kent JM, Gorman JM (1999) The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. *Biol Psychiatry* 46(9):1205-18.
142. Sun Z, Means RL, LeMagueresse B, Means AR (1995) Organization and analysis of the complete rat calmodulin-dependent protein kinase IV gene. *J Biol Chem* 270:29507-14.
143. Szabo ST, de Montigny C, Blier P (2000) Progressive attenuation of the firing activity of locus coeruleus noradrenergic neurons by sustained administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *Int J Neuropsychopharmacol* 3:1-11.
144. Torgersen S (1983) Genetic factors in anxiety disorders. *Arch Gen Psychiatry* 40:1085-9.
145. Uhlenhuth EH, Matuzas W, Glass RM, Easton C (1989) Response of panic disorder to fixed doses of alprazolam or imipramine. *J Affect Disord* 17:261-70.
146. Vieland VJ, Goodman DW, Chapman T, Fyer AJ (1996) New segregation analysis of panic disorder. *Am J Med Genet* 67:147-53.
147. Waeber G, Meyer TE, LeSieur M, Hermann HL, Gerard N, Habener JF (1991) Developmental stage-specific expression of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein CREB during spermatogenesis involves alternative exon splicing. *Mol Endocrinol* 5:1418-30.
148. Wang Z, Valdes J, Noyes R, Zoega T, Crowe RR (1998) Possible association of a cholecystokinin promoter polymorphism (CCK-36CT) with panic disorder. *Am J Med Genet* 81:228-34.
149. Wang ZW, Crowe RR, Noyes R (1992) Adrenergic receptor genes as candidate genes for panic disorder: a linkage study. *Am J Psychiatry* 149:470-4.
150. Weissman MM (1988) The epidemiology of anxiety disorders: rates, risks and familial patterns. *J Psychiatr Res* 22:99-114.
151. Weissman MM (1992) The epidemiology and genetics of panic disorder. *Clin Neuropharmacol* 15:18A-19A.

152. Weissman MM (1993) Family genetic studies of panic disorder. *J Psychiatr Res* 27:69-78.
153. Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Faravelli C, Greenwald S, Hwu HG, Joyce PR, Karam EG, Lee CK, Lellouch J, Lepine JP, Newman SC, Oakley-Browne MA, Rubio-Stipec M, Wells JE, Wickramaratne PJ, Wittchen HU, Yeh EK (1997) The cross-national epidemiology of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 54:305-9.
154. Wheeler DL, Church DM, Lash AE, Leipe DD, Madden TL, Pontius JU, Schuler GD, Schriml LM, Tatusova TA, Wagner L, Rapp BA (2001) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 29:11-6.
155. Wingender E, Chen X, Hehl R, Karas H, Liebich I, Matys V, Meinhardt T, Pruss M, Reuter I, Schacherer F (2000) TRANSFAC: an integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res* 28:316-9.
156. Wittchen H, Saß H, Zaudig M, Kohler K (1989) Diagnostisches und Statistisches Manual psychischer Störungen (DSM-III-R Revision). Beltz, Weinheim.
157. Wittchen H, Schramm E, Zaudig M, Spengler P, Rummeler R, Mombour W (1990) SKID. Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-III-R. Beltz, Weinheim.
158. Wittchen HU, Essau CA (1993) Epidemiology of panic disorder: progress and unresolved issues. *J Psychiatr Res* 27:47-68.
159. Woo JM, Yoon KS, Yu BH (2002) Catechol O-methyltransferase genetic polymorphism in panic disorder. *Am J Psychiatry* 159:1785-7.
160. Woon CW, Soparkar S, Heasley L, Johnson GL (1989) Expression of a G alpha s/G alpha i chimera that constitutively activates cyclic AMP synthesis. *J Biol Chem* 264:5687-93.
161. Ziff EB (1990) Transcription factors: a new family gathers at the cAMP response site. *Trends Genet* 6:69-72.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt als Direktor der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster für die freundliche Überlassung des Themas,

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. J. Deckert für die hervorragende fachliche Anleitung, Betreuung, Unterstützung und Förderung bei der Anfertigung dieser Arbeit und weit darüber hinaus,

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. F. Stögbauer für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes und vielfältige Beratung,

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. G. Kuhlenbäumer für die äußerst kompetente und stets hilfsbereite Begleitung in allen Fragen im Rahmen dieses Projektes,

Frau Dipl.-Biol. A. Schirmacher und Frau K. Weiß für die geduldige und freundschaftliche praktische Vermittlung der von mir verwandten Arbeitstechniken,

Herrn Dr. med. H. Garritsen für die Überlassung von Kontrollstichproben aus der Blutbank des Instituts für Transfusionsmedizin, Universität Münster,

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster für die unkomplizierte Zusammenarbeit und das harmonische Arbeitsklima sowie

meiner Familie für die immer geduldige Rücksicht und liebevolle Unterstützung - nicht nur während meiner Arbeit an diesem Projekt.

