

**Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
der Universitäts Nervenlinik Würzburg  
Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. H. Beckmann**

**Evolutionsgenetische Untersuchung von Genvarianten monoaminerger Systeme  
bei nichtmenschlichen Primaten**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von**

**Michael Hampe**

**aus Bessenbach**

**Würzburg, November 2005**

Referent: Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch

Koreferent: Prof. Dr. Alfred Renk

Dekan: Prof. Dr. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung:

Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch 07.08.2006

Prof. Dr. Alfred Renk 14.08.2006

Der Promovend ist Zahnarzt

# Inhaltsverzeichnis:

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Genetische Polymorphismen und Evolution</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Genetische Unterschiede zwischen Menschen und Affen</b>	<b>3</b>
<b>1.3. Stammbaum der Primaten</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Neurotransmittersysteme und Verhaltensdispositionen</b>	<b>7</b>
1.4.1. Fragestellungen der Verhaltensgenetik	7
1.4.2. Neurotransmittersysteme und Verhaltenskorrelate	8
1.4.2.1. Dopaminerge Systeme im Gehirn	9
1.4.2.2. Serotonerge Systeme im Gehirn	12
<b>2. FRAGESTELLUNG</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Material</b>	<b>17</b>
3.1.1. Primaten	17
3.1.2. Chemikalien	18
3.1.3. Puffer und Lösungen	19
3.1.4. Medien und Nährboden	21
3.1.5. Geräte	21
3.1.6. Antibiotika	22
3.1.7. Transformationskit	23
3.1.8. Radionukleotide	23
3.1.9. Nukleotide	23
3.1.10. Enzyme	23

3.1.11. Software	24
<b>3.2. Methoden</b>	<b>25</b>
3.2.1. DNA-Extraktion	25
3.2.2. Polymerase-Kettenreaktion	25
3.2.2.1. DNA-Gelelektrophorese	26
3.2.2.2. “Touchdown”-PCR	27
3.2.2.3. “Hotstart”-PCR	27
3.2.2.4. Parameter zur Optimierung einer PCR	27
3.2.2.5. Radioaktiv PCR	28
3.2.2.6. DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	28
3.2.3. PCR-Ansätze	28
3.2.3.1. Dopamin-Rezeptor-Gen D4	28
3.2.3.2. Das Dopamin-Transporter-Gen	29
3.2.3.3. Das Promotorpolymorphismus des Serotonin-Transporters	30
3.2.3.4. Das Gen der Monoaminoxidase A	30
<b>3.3. DNA-Sequenzanalyse</b>	<b>31</b>
3.3.1. DNA-Extraktion aus Agarosegelen	31
3.3.2. DNA-Klonierung in Bakterien	32
3.3.3. Sequenzbestimmung	32
3.3.3.1. Der Promotor des Serotonin-Transporter-Gens (5-HTTLPR)	33
3.3.3.2. Das Gen der Monoaminoxidase A (MAOA)	34
<b>4. ERGEBNISSE</b>	<b>35</b>
<b>4.1. Das Dopamin-Rezeptor-Gen D4 (DRD4)</b>	<b>35</b>
<b>4.2. Das Dopamin-Transporter-Gen (DAT)</b>	<b>35</b>
<b>4.3. Der Promotor des Serotonin-Transporter-Gens</b>	<b>36</b>
<b>4.4. Das Gen der Monoamino-Oxidase der A-Form (MAOA)</b>	<b>39</b>
4.4.1. Macaca sylvanus	39
4.4.2. Pan troglodytes, Pan paniscus und Gorilla gorilla	39

4.4.3. Pongo pygmaeus und Theropithecus gelada	40
4.4.4. MAOA-VNTR-Sequenzen	43
<b>5. DISKUSSION</b>	<b>46</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>50</b>
<b>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>52</b>
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>53</b>
<b>9. LITERATURVERZEICHNIS:</b>	<b>54</b>
<b>10. VERÖFFENTLICHUNG</b>	<b>58</b>

# 1. Einleitung

In den letzten Jahren hat die Genetik in der Verhaltensforschung und Psychiatrie immer größere Bedeutung bekommen. Das Interesse der Forscher richtet sich dabei auf den Einfluss genetischer Faktoren auf die Persönlichkeit und die Psychopathologie eines Individuums und die Verbindungen zwischen Allel und Verhaltensdisposition.

1996 wurden Untersuchungen über Auswirkungen spezifischer Veränderungen der Nukleotidsequenz von Neurotransmittersystemen auf Verhaltensdispositionen in den Zeitschriften „Nature Genetics“ und „Science“ veröffentlicht [1, 2]. Dabei wurden viele neue Fragen aufgeworfen, denn die Zusammenhänge zwischen Umwelteinflüssen und genetischer Prädisposition sind sehr vielschichtig. Besonderes Augenmerk lag auf den serotonergen und dopaminergen Neurotransmittersystemen, deren Einfluss auf Persönlichkeit und Verhalten zum einen sehr weitreichend sind und zum anderen schon ausreichend erforscht wurden.

Von Interesse war und ist auch der Weg, den einzelne Genabschnitte im Laufe der Evolution durchschritten haben und wie sie sich in dieser langen Zeit veränderten und entwickelten. Gemeinsamkeiten und Unterschiede einzelner verhaltensrelevanter Genabschnitte zwischen Homo sapiens und anderen Primaten können weitere Aufschlüsse in der Verhaltensforschung geben und neue Erkenntnisse über die Entstehung psychiatrischer Erkrankungen liefern.

## 1.1. Genetische Polymorphismen und Evolution

*„Every genetic locus mingles the information about the evolutionary history of the human species with the history of its own“.* [3]

Pääbo und seine Mitarbeiter beschreiben das menschliche Genom als ein Mosaik mit einzelnen Segmenten, von denen jedes seine eigene Geschichte hat und zu den

entsprechenden Segmenten unserer Vorfahren und anderer Individuen in einem Verwandtschaftsverhältnis steht [4].

Evolutionsstudien befassen sich mit ebensolchen ausgesuchten Segmenten, die innerhalb ausgewählter Arten, Familien oder Ordnungen verglichen werden können. So können Rückschlüsse auf den evolutionären Übergang zwischen verschiedenen Spezies gezogen werden. Zum Zeitpunkt eines evolutionären Übergangs kann man polymorphe Gene beobachten. Genetische Polymorphismen sind über das ganze Genom verteilt. Interessant sind die Polymorphismen, die sich in den kodierenden Abschnitten der DNA, den Exons, befinden, oder in regulierenden Abschnitten, z.B. den Gen-Promotoren, welche die Transkription steuern.

Zwei wichtige Arten von Polymorphismen sind Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) und Variable-Number-of-Tandem-Repeats (VNTR). RFLP entstehen durch Veränderungen der Nukleotid-Sequenz an Erkennungsstellen der Restriktions-Nukleasen. VNTR entstehen durch sich wiederholende Basenpaare. Allgemein liegt ein Polymorphismus dann vor, wenn es mehr als ein Allel zu einem Gen gibt. Er entsteht durch eine Mutation, wobei es auch „stille Mutationen“ gibt, die keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz haben. Haben sich Mutationen bereits vor längerer Zeit im Genpool etabliert, werden sie zu Varianten und damit zu Allelen. Mutationen können zu neuen Allelen und Genen führen, wenn ganze Regionen dupliziert werden (VNTR). Etwa 5% des menschlichen Genoms besteht aus mehr als 1.000 Basen langen Kopien [5].

Eine Mutation wiederholt sich nur sehr selten. Das Schicksal einer Mutation hängt deshalb auch von anderen Faktoren ab, wie Migration, natürlicher Selektion und zufälligem genetischen Drift. All diese Faktoren verändern die Genhäufigkeit in einer Population. Definitionsgemäß ist ein Genlocus polymorph, wenn das oder die seltenen Allele eine Häufigkeit von mindestens 0,01 (1%) haben [6]. Im Durchschnitt kommt auf 500 Nukleotide 1 Nukleotid, das von Chromosom zu Chromosom (Individuum zu Individuum) verschieden ist. Verschiedene DNA-Regionen können dabei

unterschiedlich polymorph sein. Innerhalb einer Population führt ein genetischer Polymorphismus zur Ausprägung von variablen Phänotypen [7].

Die Entwicklung neuer Techniken (Polymerase-Ketten-Reaktion, Klonieren, Sequenzieren) zur Untersuchung von Polymorphismen ermöglicht es, die molekulare Evolution zu studieren. Daraus können sich Schlussfolgerungen hinsichtlich des Verwandtschaftsverhältnisses zwischen Homo sapiens und anderen Primaten, der Herkunft des Menschen und seiner spezifischen Charakteristika ergeben. Beim Homo sapiens bietet sich der Vergleich mit unseren nächsten Verwandten, den Primaten an.

## **1.2. Genetische Unterschiede zwischen Menschen und Affen**

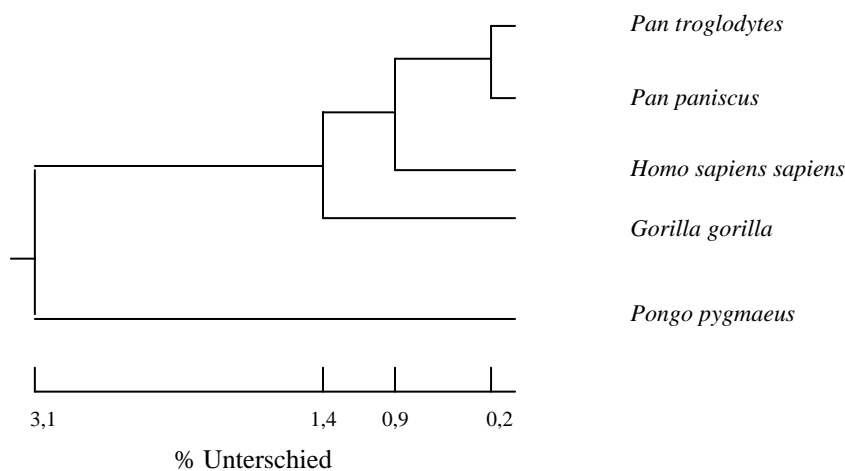
Ein Ziel dieser Arbeit ist es, ausgehend von anderen Spezies, Erkenntnisse über das menschliche Genom und die Auswirkungen von Veränderungen in diesem zu gewinnen. Dazu müssen offensichtliche Unterschiede zwischen Homo sapiens und anderen Primaten berücksichtigt werden, die allerdings auf genetischer Ebene geringer erscheinen.

Vergleicht man einen Genabschnitt von Pan troglodytes (Schimpanse) mit dem korrespondierenden Abschnitt eines Homo sapiens, wird man nicht mehr als eines von 100 Nukleotiden finden, das sich unterscheidet. Dieser Unterschied ist nicht viel größer als der zwischen einem Afrikanischen und einem Indischen Elefanten oder ungefähr so groß, wie der zweier Individuen von ein und derselben Fruchtfliegenspezies [8, 9]. Dabei muss bedacht werden, dass nicht der Genotyp, sondern der Phänotyp den offensichtlichen Unterschied zwischen Homo sapiens und Pan troglodytes sichtbar macht, also nicht nur die Quantität der genetischen Unterschiede wichtig ist, sondern vielmehr ihre Qualität. Dieses eine Prozent kann zudem zur Einschätzung der Zeit herangezogen werden, die nötig war, um ebendieses auszubilden und so den Menschen vom Schimpanse in der heutigen Form in Genotyp und Phänotyp zu trennen [10].

Für weitere Vergleiche zwischen mehreren Hominidae-Arten (Große Menschenaffen) wurde in einer anderen Untersuchung ein Abschnitt des X-Chromosoms, eine als



Xq13.3 bezeichnete Sequenz, ausgesucht [11]. Dieser Abschnitt kodiert nicht für Proteine, besitzt eine niedrige Mutations- und Rekombinationsrate und hat somit weniger Veränderungen im Laufe der Evolution erfahren. Das DNA-Fragment aus dem Blut von drei geographischen (ost-, zentral- und westafrikanischen) Unterarten von Schimpansen, des Bonobo, eines Artverwandten des Schimpansen, von Gorilla, Orang-Utan und Menschen unterschiedlicher Sprachgruppen, wurde sequenziert und verglichen [11, 12] (vgl. Abb 1).



**Abbildung 1:**

Phylogenetischer Stammbaum der beobachteten Unterschiede zwischen Spezies in Bezug auf die Xq13.3-Sequenz. (als Prozentangabe)

Das bedeutsamste Ergebnis dieser Vergleiche: die untersuchten Arten der Hominidae (Große Menschenaffen) wiesen eine deutlich höhere Variabilität der Xq13.3-Sequenz auf als der *Homo sapiens* und damit auch ein höheres Alter für den entsprechenden DNA-Abschnitt als beim Menschen. Diese geringe genetische Variabilität und ungemein enge Verwandtschaft aller Menschen überraschte und wird durch einen evolutionären "Flaschenhals" erklärt. Dieser „Flaschenhals“, ein Engpass in der menschlichen Evolution, könnte die genetischen Unterschiede reduziert haben [4].

Auch in einer anderen Studie, in der die geographische Verteilung des Enzyms Monoaminoxidase A (MAOA) von kaukasischen, asiatischen und afrikanischen Menschen untersucht wurde, konnte die Theorie eines „Flaschenhalses“ unterstützt

werden, der erst vor vergleichsweise kurzer Zeit, vor einigen hunderttausend Jahren, durchschritten worden ist und damit lange nach der Abspaltung der Hominiden von den Schimpansen [3].

Diese beiden Studien verdeutlichen, wie sich Genabschnitte an einer bestimmten Stelle der Evolution in zwei oder mehrere unterschiedliche Richtungen entwickeln können, in denen jeder Genabschnitt eigene Wege mit verschiedenen Mutationen und Polymorphismen durchläuft, die unter Umständen durch Expression dieser Genabschnitte Einfluss auf die weitere evolutionäre Entwicklung der jeweiligen Individuen haben können. Die Studien zeigen auch auf, weshalb die evolutionärgenetische Entwicklung der Primaten für die verhaltensgenetische Forschung so interessant ist. Ihre Gene entwickelten sich über längere Zeiträume und können unter Umständen eine höhere Vielfalt an genetischen Besonderheiten aufweisen als die Gene des Menschen und dadurch neue Erkenntnisse über Verbindungen zwischen Genen und Verhaltensdispositionen liefern.

Eine weitere interessante Gruppe für die Molekulargenetik sind die Makaken. Sie sind die geographisch am weitesten verbreitete und im Verhalten unterschiedlichste Gattung unter den Primaten. Vor allem *Macaca sylvanus* (Berberaffe) nimmt eine Sonderstellung innerhalb der Makaken ein, da er als einzige Art noch in Nordafrika und nicht in Südost-Asien verbreitet ist und durch sein genetisches und soziales Verhaltensmuster als der Ur-Makake bezeichnet werden kann [13]. Reduziert man die Fähigkeiten und Eigenschaften innerhalb des sozialen Verhaltens und der Organisation aller Makakenarten auf einige grundlegende Verhaltensmuster, so ähneln diese vor allem dem *Macaca sylvanus*.

### 1.3. Stammbaum der Primaten

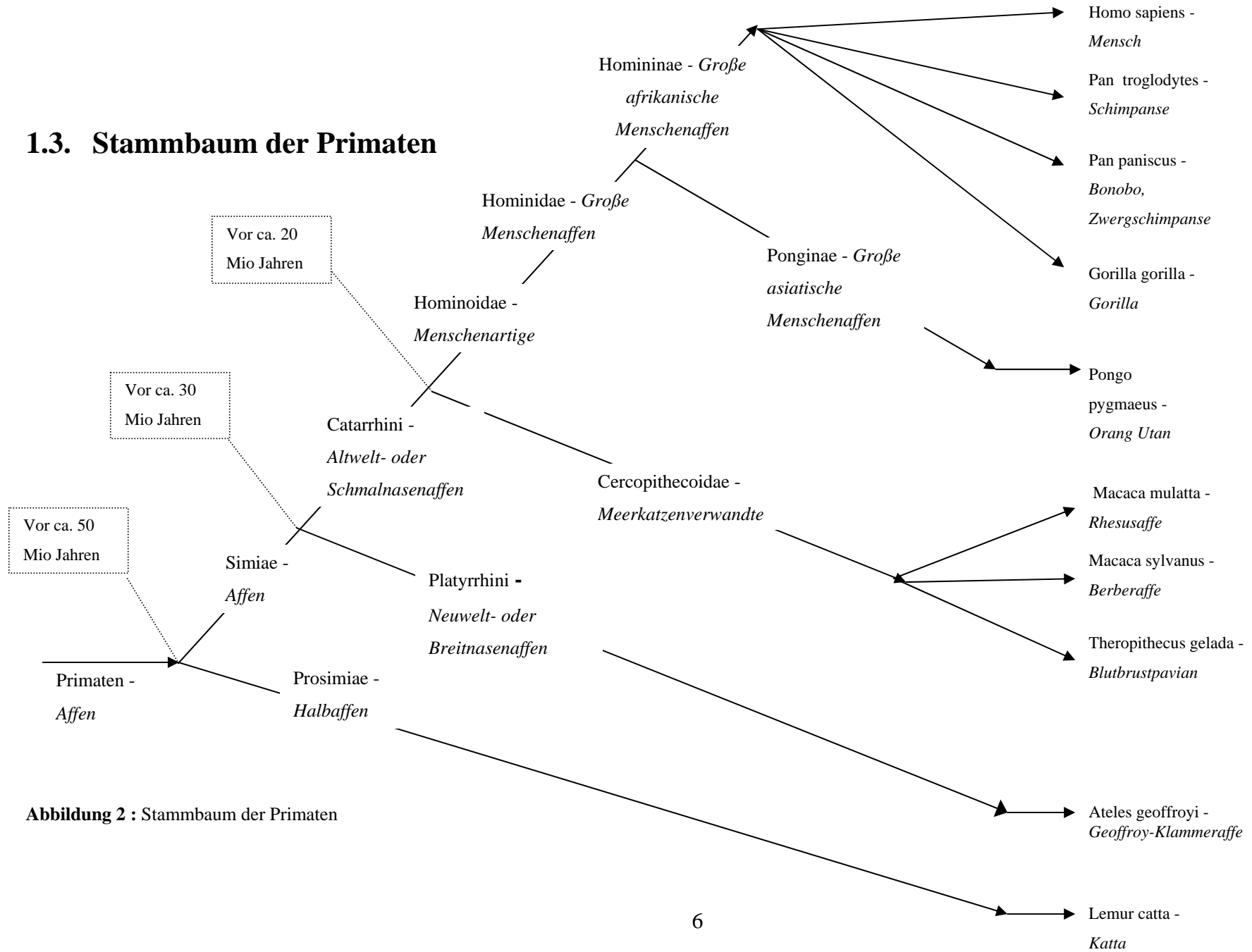


Abbildung 2 : Stammbaum der Primaten

## **1.4. Neurotransmittersysteme und Verhaltensdispositionen**

### **1.4.1. Fragestellungen der Verhaltensgenetik**

Bevor auf die aktuellen Ansätze und Theorien über die Molekulargenetik der Persönlichkeit eingegangen wird, sollen allgemeine Fragestellungen geklärt werden, mit denen sich die moderne Verhaltensgenetik befasst, um damit einen kurzen Überblick zu geben und die Komplexität des Themas aufzuzeigen.

Man kann die Verhaltensgenetik in folgende drei Gebiete und Fragestellungen unterteilen:

1. Für welche Verhaltensweisen spielen genetische Faktoren und Umweltfaktoren in welchem Umfang eine Rolle? (quantitative Genetik)
2. Welche Gene sind für bestimmte Verhaltensweisen bzw. Verhaltensdispositionen von Bedeutung? (Molekulare Verhaltensgenetik; Lokalisation von spezifischen verhaltensrelevanten Genen).
3. Wie und mit welchen Mechanismen üben Gene ihre Wirkung auf das Verhalten aus? Welche „biologischen Pfade“ verbinden Gene und Verhalten? (Funktionelle Genomik und Neurogenetik).

zu 1) Quantitative Genetik

Der genetische Faktor für individuelle Verhaltensweisen ist genetische Variation. Diese kann durch die Summe der Wirkung einzelner Allele oder die Interaktion von Allelen untereinander noch erhöht werden.

Umweltbedingte Faktoren können zwei Quellen zugeordnet werden: Die Anlage-Umwelt-Interaktion und die Anlage-Umwelt-Kovariation. Anlage-Umwelt-Interaktion beinhaltet, dass Umwelteinflüsse je nach Genotyp unterschiedliche Wirkung entfalten. Die Anlage-Umwelt-Kovariation wird in passiv, reaktiv und aktiv unterteilt und beinhaltet, dass Genotypen nicht zufällig auf Umwelten verteilt werden, weil Personen mit unterschiedlicher genetischer Veranlagung auch in unterschiedliche Umwelten hineingeboren werden (passiv), weil genetisch bedingte Verhaltensunterschiede unterschiedliche Reaktionen durch Umwelten hervorrufen (reaktiv), oder weil Individuen mit unterschiedlicher genetischer Veranlagung unterschiedliche Umwelten aufsuchen und gestalten (aktiv). Bei der praktischen Umsetzung dieser Aspekte bedient man sich üblicherweise Zwillings-, Adoptions- und Familienstudien.

zu 2 und 3) Molekulare Verhaltensgenetik und funktionelle Genomik

Geben die Befunde der quantitativen Genetik den Hinweis auf einen genetischen Einfluss für eine bestimmte Verhaltensdisposition, muss weiter angenommen werden, dass zwischen der genetischen Besonderheit und der Verhaltensdisposition eine Verbindung besteht. Die genetischen Besonderheiten werden auch als Kandidaten-Gene bezeichnet und können bestimmte Gene oder Variationen (Polymorphismen) sein. Die Verhaltensdispositionen nennt man Merkmale („Traits“). Die Verbindung zwischen diesen beiden Punkten wird als Pfad bezeichnet und ergibt sich aus der Funktion und dem Expressionsmuster der Kandidaten-Gene. Zur Untersuchung der Gen-Merkmal-Assoziation kann man demnach entweder den Phänotyp als Ausgangspunkt heranziehen (= „forward genetics“ bzw. „top down“ Strategie) oder aber die molekulargenetische Besonderheit (= „reverse genetics“ bzw. „bottom up“ Strategie) [14].

### **1.4.2. Neurotransmittersysteme und Verhaltenskorrelate**

Die Katecholamine Dopamin und Noradrenalin sowie das Indoleamin Serotonin machen nur einen geringen Teil der Transmittersubstanzen im Gehirn aus, scheinen

allerdings von herausragender Bedeutung für die Modulation motorischer, emotionaler und kognitiver Funktionen zu sein [15].

Monoaminerge Systeme zeichnen sich durch weite Verzweigung und vielfältige Wirkungen aus. Die Monoamine können im Zentralnervensystem je nach Lokalisation sowohl erregende als auch hemmende Wirkungen haben und präsynaptisch oder postsynaptisch vorkommen. Darüber hinaus interagieren dopaminerge, noradrenerge und serotonerge Systeme vielerorts miteinander.

Die Kenntnis der Lokalisation und Wirkung monoaminergere Systeme im Gehirn und ihres Einflusses auf das Verhalten sowie der Rolle verschiedener Monoaminrezeptoren und -transporter ermöglicht dabei die Herleitung von Assoziationen zwischen den beiden Endpunkten des verhaltensgenetischen Pfades, den Merkmalen und genetischen Polymorphismen.

#### **1.4.2.1. Dopaminerge Systeme im Gehirn**

Das dopaminerge Systeme gehört zu den neuromodulatorischen Systemen. Es geht vom ventralen Areal im Mittelhirn und dem Nucleus accumbens im Endhirn aus. Dabei schickt es über seine Fasern Dopamin vornehmlich in den präfrontalen und orbitofrontalen Cortex. Ein weiterer, für die Bewegungssteuerung wichtiger Teil besteht im dopaminergen Projektionssystem zwischen Substantia nigra und Striatum. Es wirkt antreibend und belohnend bzw. belohnungs-versprechend. Vier bedeutsame dopaminerge Systeme im Gehirn lassen sich unterscheiden: das nigrostriatale, das mesokortikale, das mesolimbische und das tuberoinfundibulare Dopaminsystem. [16] [17].

Diese vier Systeme sind unter anderem an der Bewegungskontrolle beteiligt (Degenerationen führen zur Parkinson-Erkrankung [15]). Zudem sind die dopaminergen Systeme an Lern- und Gedächtnisprozessen, Vermittlung von positiver Verstärkung und Anreizmotivation sowie Hormonregulationen beteiligt [18,15].

Dopamin wird von dem Enzym Tyrosin-Hydroxylase aus der Aminosäure Tyrosin aufgebaut. Nach der Freisetzung in den synaptischen Spalt bindet Dopamin entweder präsynaptisch an Autorezeptoren und reguliert die Freisetzung und Synthese von Dopamin oder es bindet an postsynaptische Rezeptoren [16]. Die fünf bisher bekannten Dopamin-Rezeptor-Subtypen lassen sich in second-messenger-stimulierende D1-ähnliche (D1, D5) und second-messenger-hemmende D2-ähnliche Dopamin-Rezeptoren (D2, D3, D4) unterteilen [16]. Die dopaminerge Transmitterwirkung wird beendet durch aktiven Dopamin-Rücktransport über den Dopamin-Transporter (DAT) oder durch enzymatischen Abbau zu (primär) Homovanillinsäure (HVA) durch Katechol-O-Methyltransferase (COMT) und Monoaminoxidase B (MAOB).

#### ▪ **Das Dopamin-Rezeptor-Gen D4 (DRD4)**

Dopamin D4-Rezeptoren werden als postsynaptische Rezeptoren in verschiedenen Teilen des Gehirns exprimiert. [16]. D4-Knockout-Mäuse zeigen reduzierte Responsivität gegenüber Unbekanntem und eine verringerte Tendenz zu Exploration [19]. Dies legt die Annahme nahe, dass D4-Rezeptoren an der Modulation von Verhalten gegenüber Neuem beteiligt sind.

Das D4-Rezeptor-Gen (DRD4) zeigt eine außerordentlich hohe Variabilität [20]. Besonders interessant erscheint dabei der DRD4 Exon III Polymorphismus [21], bei dem es sich um eine 48-bp-Repeat-Sequenz handelt, die zwischen zwei- und zehnfach wiederholt. Die häufigsten dieser Repeat-Varianten sind der 4-Repeat mit etwa 60% Allelhäufigkeit und der 7-Repeat mit etwa 20% Allelhäufigkeit. Funktionelle Analysen von DRD4 Exon III deuten auf einen in Bezug auf das Bindungspotential und die Hemmung des Second-Messenger-Systems geringfügig veränderten D4-Rezeptor bei Vorliegen des 7-Repeat-Allels, verglichen mit dem 2- bzw. 4-Repeat-Allel hin [22]. Das DRD4 Exon III wurde aufgrund seiner ungewöhnlich großen Variation eingehend im Hinblick auf Assoziationen mit einer Vielzahl von Phänotypen

(Persönlichkeitsmerkmalen, Substanzmissbrauch und Abhängigkeit, Schizophrenie, Aufmerksamkeitsstörungen, Hyperkinetisches Syndrom, Depression) untersucht. Hier sind insbesondere die Arbeiten zu Persönlichkeitsmerkmalen von Interesse [23]. Einige Studien konnten zeigen, dass Personen mit mindestens einer Kopie der DRD4 Exon III 7-Repeat-Variante signifikant höhere Werte in Novelty Seeking aufwiesen als Personen ohne das 7-Repeat-Allel. Der Begriff Novelty Seeking bezeichnet eine erbliche Tendenz, vermehrt auf neue Reize zu reagieren und sich dadurch Belohnung zu sichern oder Bestrafung und Monotonie zu entgehen. Eine wesentliche Rolle spielt dabei das dopaminerge System. So haben Dopamin-Agonisten wie Amphetamine, Kokain oder auch Alkohol einen verstärkenden Einfluss auf Euphorie und exploratorische Aktivität, während die Gabe von Dopamin-Antagonisten, wie etwa Haloperidol, zu verminderter exploratorischer Aktivität, Lustlosigkeit und reduzierter Responsivität auf positive Verstärkung führt [24,25].

#### ▪ **Das Dopamin-Transporter-Gen (DAT)**

Das Dopamin-Transporter-Gen (DAT) beinhaltet nur wenige und zudem seltene Polymorphismen in kodierenden Regionen [26]. Studien zu diesem Polymorphismus bezogen sich daher vor allem auf einen 40-bp-VNTR mit variabler Anzahl in einer nichtkodierenden Region [27]. Dieser Polymorphismus weist mehrere Allele auf mit 3 bis 11 Repeats, von denen der 9- und der 10-Repeat am häufigsten vorkommen (je >40%)[28]. Das 10-Repeat Allel wird beim Menschen mit Aufmerksamkeits- und Hyperaktivitätsstörungen (ADHS) in Verbindung gebracht [29]. Zusätzlich wurden bei einer kleinen Gruppe von *Macaca mulatta* mit unterschiedlichen Verhaltensauffälligkeiten (ruhig oder hyperaktiv) ein Polymorphismus untersucht, der nur aus einem veränderten Nukleotid besteht („Single Nucleotide Polymorphism“: SNP) und von dem Restriktionsenzym Bst1107 I geschnitten werden kann. Es zeigte sich, dass Bst1107 I-positive Affen eher zur hyperaktiven Gruppe gehörten. Allerdings war die untersuchte Gruppe von 22 Rhesusaffen nicht ausreichend, um ein signifikantes Ergebnis zu erhalten [30]. Diese Untersuchung innerhalb dieser Rhesusaffen-Gruppe kann bei anderen Makaken-Arten weitergeführt werden, da diese eine mit anderen Affenarten nicht vergleichbare Zahl von Verhaltensunterschieden besitzen. Vor allem



*Macaca sylvanus* nimmt eine Sonderstellung innerhalb der Makaken ein, da er als einzige Art noch in Nordafrika und nicht in Südost-Asien verbreitet ist und durch sein genetisches Muster und soziales Verhalten als der Ur-Makake bezeichnet werden kann [13]. Dies macht ihn für weiterführende Untersuchungen interessant.

#### **1.4.2.2. Serotonerge Systeme im Gehirn**

Die Einteilung in serotonerge Subsysteme ist schwierig, da die Projektionsareale der Ursprungsgebiete im Gehirn (Raphe-Kerne) häufig überlappen. Grob lassen sich die Fasersysteme der dorsalen und medialen Raphe-Kerngruppen zuordnen [31,16]. Die serotonerge Innervationsdichte ist besonders hoch in kortikalen Arealen, die an der Verarbeitung sensorischer Information sowie Information aus limbischen Arealen beteiligt sind. Serotonin spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation anderer monoaminergere Systeme. Auf präsynaptischer Ebene interagieren insbesondere Serotonin und Dopamin miteinander. Obwohl zuweilen von einer allgemein hemmenden bzw. dämpfenden Wirkung von Serotonin auf eine Reihe von Verhaltenskategorien (z.B. passive Vermeidung, Schlafeinleitung) ausgegangen wird, greift dies angesichts der Vielfalt der direkten und indirekten serotonergen Wirkungen sicher zu kurz.

Biosynthese und Stoffwechsel von Serotonin (oder 5-Hydroxytryptamin, 5-HT) sind sehr gut aufgeklärt, doch etwas kompliziert: Serotonin entsteht aus Tryptophan durch Hydroxylierung (eine OH-Gruppe wird an den Kohlenstoffring angelagert, es entsteht 5-Hydroxytryptophan) und Decarboxylierung (Kohlendioxid wird abgespalten). Das verantwortliche Enzym ist die Tryptophan-Hydroxylase. Der Abbau erfolgt auf verschiedenen Wegen, u. a. durch oxidative Desaminierung (die NH<sub>2</sub>-Gruppe wird abgespalten). Es können verschiedene andere Substanzen wie z.B.: Melatonin; sekundären und/oder tertiären Aminen entstehen. Primär wird Serotonin von MAOA zu 5-Hydroxy-Indol-Essigsäure (5-HIAA) abgebaut [16]. Es sind bisher sieben Rezeptorfamilien (5-HT<sub>1-7</sub>) mit einer Vielzahl verschiedener Rezeptor-Subtypen bekannt [16,32].

### ▪ **Der Promotor des Serotonin-Transporter-Gens (5-HTTLPR)**

Einer der seit 1996 untersuchten genetischen Variationen ist der Polymorphismus im Promotor des Serotonin-Transporter-Gens („5-HT Tranporter Gene-Linked Polymorphic Region“ = 5-HTTLPR). Der Serotonin-Transporter kommt an vielen Nervenendigungen vor und steuert die serotonerge Transmitter-wirkung und reguliert circadiane und neuroendocrine physiologische Funktionen wie Emotionen, Wahrnehmungen, motorische Funktionen oder aber auch Nahrungsaufnahme, Schlaf und Paarungsverhalten. Bei der Behandlung von Depressionen und Angststörungen kann dies ausgenutzt werden und medikamentös inhibiert werden. Die Verbindung zu bestimmten Verhaltensdispositionen (Gen-Merkmal-Assoziation) ist also gegeben.

Normalerweise sorgt das limbischen Systems dafür, dass hereinströmende negative Erlebnisse gedämpft werden und die dafür zuständige Hirnregion nicht überreagiert. Dabei spielt das für die Wiederaufnahme von Serotonin zuständige Transporter-Gen eine zentrale Rolle. Das Gen des Serotonin-Transporters weist in seiner Regulator-Region einen Repeatsequenz auf, bei der eine Sequenz von 44 Basenpaaren fehlen kann. Diese kurze Variante, die als S-Allel bezeichnet wird und bei etwa 40% der untersuchten Personen nicht vorhanden war, bewirkt über eine Reduktion der Effizienz der mRNA-Transkription eine verringerte Verfügbarkeit des Serotonin-Transporters und damit eine verminderte Serotonin-Wiederaufnahme, die wiederum zu vermehrter Stressempfindlichkeit und Depressionen führt [1,33]. Weitere bekannte Allele sind neben dem S-Allel, ein L-, XL- und XXL-Allel. Bei *Macaca mulatta* (Rhesusaffe) konnte ein S-, L-, und XL-Allel gefunden werden [34].

Um die evolutionsgenetische Entwicklung des 5-HTTLPR zu studieren, wurden 1997 verschiedene Primaten untersucht. 5-HTTLPR wurde bei den Platyrrhini (Neuwelt- oder Breitnasenaffen) und den Catarrhini (Altwelt- oder Schmalnasenaffen) gefunden (vgl. 1.3). Bei den Prosimiae (Halbaffen) trat der Polymorphismus nicht auf. Damit kann davon ausgegangen werden, dass 5-HTTLPR vor ca. 40 Mio. Jahren im Genom der Simiae (Affen) erstmals auftrat. Bei allen Hominoidea (Menschenartige Affen) wurde nur ein Genort mit einem Polymorphismus gefunden. Bei *Macaca mulatta* wurde

eine alternative Längenvariante gefunden, die durch eine 21 bp große Insertion/Deletion gekennzeichnet ist. Diese Affenart besitzt zudem ähnliche Allel- und Genotypfrequenzen, was Grund zur Annahme gibt, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression des Serotonin-Transporter-Gens, Verhaltensdispositionen und dem Sozialverhalten von Menschen und nichtmenschlichen Primaten besteht [34].

#### ▪ **Das Gen der Monoaminoxidase A (MAOA)**

Das Enzym Monoamino-Oxidase (MAO) ist ein Flavoprotein der äußeren mitochondrialen Membran. Das MAO-Gen der A-Form (MAOA) befindet sich auf dem X-Chromosom (Xp11.23-11.4) [35]. Das Enzym kann Neurotransmitter wie Noradrenalin, Serotonin und Dopamin metabolisieren und inaktivieren [36].

Das MAOA-Gen weist einen funktionellen Polymorphismus in der Promoter-Region auf. Der Polymorphismus ist ein 30 bp-VNTR, der vier Allele aufweist, von denen das 3-Repeat-Allel (~36% Allelhäufigkeit) und das 4-Repeat-Allel (~62%) am häufigsten vorkommen. Das Vorliegen des 3-Repeats führt zu einer deutlich verringerten Transkriptionseffizienz [37,38]. Die MAOA nimmt eine besondere Stellung in Bezug auf psychiatrische Störungen oder normales Verhalten ein. In einigen Studien konnten Gen-Merkmal-Assoziationen nachgewiesen werden.

Eine Punktmutation im achten Exon von MAOA führt zu einem verfrühten Abbruch des Codons. Bei den männlichen Personen einer holländischen Familie konnte gezeigt werden, dass diese Mutation eher zu Aggressionen und Gewaltverhalten wie Brandstiftung, Vergewaltigung oder Exhibitionismus führt [39].

Opfer von Kindesmisshandlungen weisen eine geringere Wahrscheinlichkeit auf, später im Leben dissoziales Verhalten zu zeigen, wenn sie jenes Allel für das MAOA-Gen besitzen, das mit einer starken Expression der MAOA einhergeht [40].

Inhibitoren von MAO werden als antidepressive Medikamente oder zur Behandlung von Panikstörungen verwendet [41,42]. Neueste Daten von *Macaca mulatta* geben Grund zur Annahme, dass bestimmte Emotionen, Orientierungs- und Aufmerksamkeitsfähigkeiten mit dem serotonergen System im Zusammenhang stehen. [43,44]. Dies stimmt mit dem Ergebnis überein, dass ein Polymorphismus in einem 18 Basenpaar großen Repeat bei Rhesusaffen, analog zum VNTR beim Menschen, zu aggressivem Verhalten führt [45].

In dieser Arbeit wurden die oben genannten Genabschnitte von unterschiedlichen Primaten untersucht, um weitere Pfade zwischen veränderten genetischen Sequenzen und Verhaltensdispositionen zu entdecken. (vgl. Tab.1)

## **2. Fragestellung**

Im Rahmen dieser Arbeit soll die Frage geklärt werden, ob ausgewählte Gene dopaminerg und serotonerg Neurotransmittersysteme, die mit unterschiedlichen Persönlichkeitsmerkmalen assoziiert sind, bei verschiedenen Primaten den Menschen orthologe Polymorphismen aufweisen und sich so Rückschlüsse auf deren evolutionsgenetische Entwicklung und die Übertragbarkeit auf menschliche Gen-Merkmal-Assoziationen ergeben können.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Primaten

Es wurde DNA von folgenden Primaten verwendet:

Berberaffen ( <i>Macaca sylvanus</i> ):	N=63 (Tierpark Rheine) N=13 (Gibraltar)
Blutbrustpavian ( <i>Theropithecus gelada</i> ):	N=6
Bonobo ( <i>Pan paniscus</i> ):	N=5
Geoffroy-Klammeraffe ( <i>Ateles geoffroyi</i> ):	N=6
Gorilla ( <i>Gorilla gorilla</i> ):	N=10
Katta ( <i>Lemur catta</i> ):	N=5
Orang-Utan ( <i>Pongo pygmaeus</i> ):	N=9
Schimpanzen ( <i>Pan troglodytes</i> ):	N=5
Rhesusaffen ( <i>Macaca mulatta</i> ):	N=3 (Göttingen) N=3 (NIH Primate Center)

### 3.1.2. Chemikalien

Agarose	BIOZYM, Rockland USA
Ammoniumpersulfat	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
100 bp DNA-Leiter	PEQLAB; Erlangen
Entwickler: Neopress HC®	TETANAL PHOTOWERK GmbH & Co, Norderstedt
Ethanol	BAKER; Deventer Holland
Ethidiumbromid	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Fixierer: Superfix®	TETANAL PHOTOWERK GmbH & Co, Norderstedt
Formamid	APPLICHEM, Darmstadt
Glycerol	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
IPTG (Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranosid)	STRATAGENE
Isopropanol	MERCK, Darmstadt
KCL	APPLICHEM, Darmstadt
KHCO <sub>3</sub> (Kaliumhydrogencarbonat)	APPLICHEM, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	APPLICHEM, Darmstadt
Natrium-Acetat (NaAc)	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
NH <sub>4</sub> HCl (Ammoniumchlorid)	APPLICHEM, Darmstadt
N,N,N',N' – Tetramethylethylenediamine	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim

Nulceospin Blood XL	Machrie & Nagel, Düren
Protease	APPLICHEM, Darmstadt
SDS	APPLICHEM, Darmstadt
Sequenziermix:	APPLIED BIOSYSTEMS; Darmstadt
○ Big Dye Terminator v1.1 cycle sequencing Kit	
○ POP6 (performance optimized polymer 6)	
○ EDTA-Buffer (10x)	
○ Capillaries (5-47 cm x 50 µm), 310 GeneticAnalyzer	
○ Septa for 0,5 ml Sample Tubes, 310 GeneticAnalyzer	
○ Sample Tubes (0,5 ml), 310 GeneticAnalyzer	
Sequenziergel Konzentrat	ROTH, Karlsruhe
Sequenziergel Verdünner	ROTH, Karlsruhe
Silikon	BMA, Rockland ME USA
Tris-Acetat, Tris-Borat, Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Tween 20	APPLICHEM, Darmstadt
Wasser zur Chromatographie	Merck, Darmstadt
X-Gal (5-Brom-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-Galactopyranosid)	STRATAGENE
Xylen Cyanol FF	SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim

### 3.1.3. Puffer und Lösungen

1 x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA (pH 8,0)
----------------	---



1 x TBE-Puffer	89 mM Tris-Borat 2 mM EDTA (pH 8,0)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCL 1 mM EDTA (pH 8,0)
Ladepuffer für native Gele	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylen Cyanol FF 30% Glycerol in Wasser
Ladepuffer für denaturierende Gele	95% Formamid 0,05% Bromphenolblau 0,05% Xylen Cyanol FF EDTA (pH 7,5)
PCR-Puffer	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 0,25% (v/v) Tween 20 0,25 mg/ml BSA 10 mM oder 15 mM MgCl <sub>2</sub>
Lysispuffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM KHCO <sub>3</sub>
0,1 mM EDTA	(pH mit 15% HCl auf 7,4 einstellen)
Kernlysispuffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 400 mM NaCl 2 mM Na <sub>2</sub> EDTA-Puffer (pH 8,2)

### 3.1.4. Medien und Nährboden

LB-Pulvermedium	APPLICHEM, Darmstadt
Select Agar	Gibco

### 3.1.5. Geräte

Biometra T-Gradient Thermocycler	BIOMETRA, Göttingen
Biomatra UNOII Thermoblock	BIOMETRA, Göttingen
Brutschrank	HERAUS
Elektrophoresekammer vertikal	STRATAGENE
Sequenzierer: ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	APPLIED BIOSYSTEMS Foster City, USA
Spannungsgerät: Power Supply	LKB, Bromma, Schweden
Ultraviolet Transilluminator	UVP, Upland CA
Zentrifugen: Megafuge 1.OR	HERAEUS INSTRUMENTS GmbH, Osterode
Rotanta 96RS	HETTICH, Tuttlingen
Sorvall RC5C	DUPONT, Bad Homburg
Waagen: Mettler AT21 Comparator	METTLER; Gießen
PM 300	METTLER; Gießen
Heizrührplatte	GLW, Würzburg
Schüttelgerät	IKA-LABORTECHNIK Staufen
Wasserbad	GFL, Burgwedel

Photometer	EPPENDORF, Hamburg
Geiger-Müller-Zählrohr	MORGAN, Burnham-on-Couch, England
Polaroid Kamera	POLAROID, Offenbach
Röntgenfilmkassette	KODAK, Stuttgart
Fuji Medical X-Ray Film	FUJI, Düsseldorf
Polaroid-Film 667	POLAROID, Offenbach
Blottingpapier (0,37 mm/ 190 g/m <sup>2</sup> )	SCHLEICHER & SCHUELL, Dassel
Gelkammern, Kämmen, Spacer, Klammern	PEQLAB; Erlangen
Reaktionsgefäße:	
PCR Softubes 0,2 ml	BIOZYM, Oldendorf
Safe Lock 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	EPPENDORF, Hamburg
Spitzbodenröhrchen 15 ml, 50 ml	SARSTEDT, Nürnbrecht
Reaktionsgefäße zum Sequenzieren:	
GENETIC ANALYZER; 0,5 ml Tubes	APPLIED BIOSYSTEMS Foster City, USA
Filterspitzen	GREINER LABORTECHNIK, Frickenhausen
Geltrockner	BIOMETRA, Göttingen
PH-Meter	ROTH
Glasplatten	ROTH
Petrischalen (94x16 mm)	FALCON

### **3.1.6. Antibiotika**

Ampicillin	GIBCO
------------	-------

### **3.1.7. Transformationskit**

TA Cloning Kit Dual Promotor (PCR II)

INVITROGEN, Paisley, UK

- Bakterienstamm: One shot competent cells
- Vektor: PCR II

### **3.1.8. Radionukleotide**

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]- Desoxycytidintriphosphat (10 MBq/ml)

HARTMANN ANALYTIC,  
Braunschweig

### **3.1.9. Nukleotide**

DNTP (100 mM; dGTP, dATP, dTTP, dCTP)

GENECRAFT, Münster

### **3.1.10. Enzyme**

BstZ17 I

BIOLABS

TAQ Polymerase

EUROGENETECH, Searing

### **3.1.11. Software**

Sequencing Analysis 3.4

APPLIED BIOSYSTEMS,  
Darmstadt

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. DNA-Extraktion**

Die DNA wurde aus je 10 ml frischem oder gefrorenem EDTA-Blut gewonnen. Bei der Fällung wurde das Qiagen Blood Kit verwendet.

### **3.2.2. Polymerase-Kettenreaktion**

Der Nachweis und die Analyse von genetischem Material in Medizin und Biologie scheiterte früher oft an den zu geringen Mengen, die normalerweise zu Verfügung standen. 1985 gelang es Karry Mullis von der Cetus Corporation in Californien, dieses Problem mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu lösen.

Die PCR ist eine in vitro-Technik, mit der man gezielt Desoxyribonucleinsäure-(DNA-) Abschnitte vervielfältigen kann und so eine ausreichende Menge der Ziel-DNA für die weitere Verarbeitung und Analyse erhält. Der Abschnitt wird dabei von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt, für die spezifische Oligonucleotidprimer hergestellt werden. Dabei handelt es sich um einzelsträngige DNA-Moleküle, die zu den DNA-Sequenzen komplementär sind. Eine DNA-Polymerase verlängert unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize und synthetisiert so neue doppelsträngige DNA-Stränge.

Um die DNA aufzutrennen, wurde der Ansatz auf eine Temperatur nahe dem Siedepunkt (95°C) erhitzt. Die Anlagerung der Primer erfolgt bei der sogenannten „Annealing“-Temperatur. Die optimale „Annealing“-Temperatur ist abhängig vom Schmelzpunkt der synthetisierten Oligonukleotideprimer. Bei ihr bilden sich Wasserstoffbrücken zwischen Primer und Zielsequenzen (Start- und Endpunkt) in der DNA und sie bestimmt die Spezifität der PCR. Der optimale Wert wurde in einer

Gradienten-PCR herausgefunden. Dabei wurden mehrere Proben desselben Ansatzes im Thermocycler während der Reaktion auf jeweils unterschiedliche „Annealing“-Temperaturen erwärmt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarosegel wurde unter UV-Licht das beste Ergebnis (= scharfe Bande und wenig Artefakte) und somit die optimale „Annealing“-Temperatur ausgesucht [46].

Damit die DNA-Polymerase durch die Hitze zu Beginn nicht inaktiviert wird, muss sie thermostabil sein. Die sogenannte Taq-Polymerase (aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) hat diese Eigenschaft. Die Polymerisation erfolgte bei 72°C.

Um die neusynthetisierten Stränge von der Matrize zu trennen, erfolgte ein erneutes Erhitzen auf 95°C. In einem Temperaturwechselgerät (Thermocycler) wurde diese Reihenfolge programmiert und der Zyklus dann wiederholt. Auf diese Weise wird die Ziel-Sequenz exponentiell vervielfältigt.

### **3.2.2.1. DNA-Gelelektrophorese**

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA wurden abhängig von der Größe der Ziel-DNA Agarosegele zwischen 1-5% verwendet. Das Volumen der Gele betrug dabei entweder 50 ml für kleine oder 100 ml für große Gelkammern.

Zur Herstellung kocht man je nach Prozentzahl des benötigten Gels die passende Mischung aus 1x TAE-Puffer und Agarose mehrmals auf, bis diese blasen- und schlierenfrei ist. Nach Abkühlung auf 60°C wird Ethidium-(Dimidium-)Bromid (0,2 mg/mL) hinzugefügt. Das Ethidium-(Dimidium-)Bromid interkaliert mit der DNA.

Die Agaroselösung wird in einen Gelträger gegossen und ein Kamm für die Probenaschen eingesetzt.

Nach Erstarren des Gels wird der Kamm entfernt, der Gelträger mit dem Gel in der passenden Kammer positioniert und mit 1x TAE-Puffer bis über die Geloberfläche befüllt. Die Proben werden mit Laufpuffer im Verhältnis 5:1 versehen und die Taschen je nach Kammgröße mit ausreichender Menge geladen. Zum Größenvergleich wird eine Leiter mit 100 bp- oder 1kbp-Skalierung aufgetragen.

Die negativ geladene DNA läuft nun im elektrischen Feld der Kammer zur Anode, bedingt durch die negativ geladenen Phosphate entlang des DNA-Rückgrats.

Die Laufzeit ist dabei abhängig vom Unterschied der Basenanzahl, die differenziert werden muss, und der Größe des DNA-Abschnittes. Die entstandenen Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht, photographiert und digitalisiert.

### **3.2.2.2. “Touchdown”-PCR**

Bei der „Touchdown-PCR“ sind die Bedingungen für die Zyklen so gewählt, dass möglichst wenig Artefakte oder Primerdimere entstehen. Dabei wird die „Annealing“-Temperatur von einem höheren Wert auf einen niedrigeren als die zu erwartende Anlagerungstemperatur der Primer gesenkt. Dies führt zu einer optimalen Reaktion der Primer mit dem Zielmolekül, bevor unerwünschte Nebenprodukte auftauchen. Im Thermocycler kann dieser Zyklus einprogrammiert werden.

### **3.2.2.3. “Hotstart”-PCR**

Bei der „Hotstart“-PCR werden alle Reagentien außer der DNA-Polymerase im Reaktionsgefäß gemischt und im Thermocycler bis auf die Starttemperatur von 95°C (siehe 3.2.2.) erhitzt. Erst dann wird die DNA-Polymerase hinzugegeben. Die Hotstart-PCR ist spezifischer und effektiver als eine Standard-PCR, denn weniger Primer binden unspezifisch an falsche DNA-Sequenzen oder lagern sich zu Primerdimeren oder -oligomeren zusammen. Ein Problem dabei ist, dass die Reaktionsgefäße einmal mehr geöffnet und geschlossen werden müssen und so leichter Verunreinigungen entstehen können.

### **3.2.2.4. Parameter zur Optimierung einer PCR**

PCR-Temperaturprofil (Primeranlagerung, Verlängerung, Denaturierung, Aufheiz- und Abkühlzeit, Anzahl der Zyklen)

Konzentration der Magnesiumionen

Aufbau und Konzentration der Primer

Qualität und Konzentration der Matrize

PCR-Puffer

dNTP-Konzentration

Vermeiden von Inhibitoren der PCR

Heißstart-PCR



### **3.2.2.5. Radioaktiv PCR**

Bei dieser PCR wird der Vorteil genutzt, dass radioaktiv markierte Basen, in die Ziel-DNA eingebracht, einen Röntgenfilm schwärzen können. Dazu wurden Nucleotide verwendet, bei denen die Base Cytosin mit <sup>32</sup>Phosphor markiert worden ist. Mit den Ansätzen wurden nach demselben Prinzip verfahren, wie oben beschrieben. Zu beachten waren die zusätzlichen Bestimmungen der Röntgenverordnung.

### **3.2.2.6. DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen**

Durch den Verdau chromosomaler oder Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen lassen sich durch Linearisierung bzw. Fragmentierung Aussagen über exakte Länge und Lokalisation von Schnittstellen innerhalb der untersuchten DNA machen („Mapping“), zu klonierende Fragmente ausschneiden und nach erfolgter Klonierung deren Lage und Orientierung im Zielvektor überprüfen.

Die Reaktionsbedingungen sind abhängig von dem jeweils verwendeten Enzym und dem Zweck der Reaktion. Die Zusammensetzung des von der Herstellerfirma mitgelieferten Puffer ist auf die optimalen Bedingungen für das Enzym abgestimmt.

Die Anteile von Enzym und Puffer dürfen nicht mehr als 1/10 des Gesamtvolumens betragen. Reaktionsansatz und Inkubationszeit sind vom Hersteller abgestimmt.

## **3.2.3. PCR-Ansätze**

### **3.2.3.1. Dopamin-Rezeptor-Gen D4**

Für die Untersuchung des Dopamin-Rezeptor-Gen D4 (DRD4) wurde eine Gruppe von 63 *Macaca sylvani* aus dem Tierpark Rheine untersucht.

Die DNA wurde aus dem Blut der Affen gewonnen, die bei der Blutabnahme mit 15 mg/kg Ketamin betäubt waren.

Die zum Einsatz gekommenen Primer waren (D4-3) 5'- GCG ACT ACG TGG TCT ACT ACT CG -3' und (D4-42) 5'- AGG ACC CTC ATG GCC TTG -3'

Die PCR-Bedingungen waren: 5 Min. bei 95°C und 37 Wiederholungen mit 95°C (Denaturierung), 65°C (Annealing-Temperatur) und 72°C (Elongation) für jeweils 45 Sec., abschließend 5 Min. bei 72°C.

Die Amplicons wurden durch ein 3% LE Agarosegel getrennt und durch Ethidium Bromid (Sigma) sichtbar gemacht.

### **3.2.3.2. Das Dopamin-Transporter-Gen**

Für die Untersuchung des Dopamin-Transporter-Gen (DAT) wurde ebenfalls die Gruppe der *Macacae sylvani* aus dem Tierpark Rheine untersucht.

Die DNA wurde in der gleichen Weise wie unter 3.2.2.1. gewonnen.

Die zum Einsatz gekommenen Primer waren (DAT-U13) 5'- TGT TCA GAG GCA TTG GAG -3' und (DAT-L12) 5'- AAA AAG CCA TTC GCA AAC AT -3'.

Die PCR-Bedingungen waren: 3 Min. bei 95°C und 36 Wiederholungen mit 95°C (Denaturierung), 45°C (Annealing-Temperatur) und 72°C (Elongation) für jeweils 45 Sec., abschließend 3 Min. bei 72°C.

Für die Untersuchung des SNP (A/T) wurde ein Enzymschnitt mit dem Enzym BstZ17I (Biolabs) vorgenommen. Der Ansatz für den Schnitt bestand aus 7,5 µl PCR-Eluat, 2 µl Puffer (Biolabs: 1xNeBuffer3), 1 µl des Enzyms und 9,5 µl dH<sub>2</sub>O für ein Gesamtvolumen von 20 µl. Nach 16 Stunden Inkubationszeit wurden die Amplicons jeweils geschnitten und ungeschnitten nebeneinander aufgetragen, durch ein 3% LE Agarosegel getrennt und durch Ethidium Bromid (Sigma) sichtbar gemacht.

### **3.2.3.3. Das Promotorpolymorphismus des Serotonin-Transporters**

Für die Untersuchung des Polymorphismus des Serotonin-Transporters (5-HTTLPR) wurde ebenfalls die Gruppe der *Macaca sylvani* aus dem Tierpark Rheine untersucht. Die DNA wurde in der gleichen Weise wie unter 3.2.2.1. gewonnen.

Die zum Einsatz gekommenen Primer waren (MUT1) 5'- GGC GTT GCC GCT CTG AAT GC -3' und (INT1) 5'- CCC TCC CAG GAT CTC CCC TG -3'. Die Ansätze wurden zur radioaktiven Markierung zusätzlich mit Desoxycytidintriphosphat (10 MBq/mal) versehen.

Die PCR wurde unter Touch-down-Bedingungen durchgeführt:

5 Min bei 95°C, dann jeweils 45 Sec. mit Wiederholung 95°C, 62°C bis 58°C mit 1°C absteigend und 72°C, danach 30 Wiederholungen mit 95°C, 57,5°C und 72°C für je 45 Sec., abschließend 5 Min. bei 72°C.

Die Amplikons wurden auf ein 6% denaturierendes PAA-Gel aufgetragen, welches aus 100 ml Sequenziermix (Rotiphorese), 700 µl auf 37°C erwärmtes Amoniumpersulfat und 100 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) hergestellt wurde, in eine doppelwandige Glasplatte gegossen und 2 Stunden polymerisiert.

Das PAA-Gel wurde von den Glasplatten mittels Blottingpapier gelöst, die Gelseite wurde mit Frischhaltefolie bedeckt, anschließend 2 Stunden im Gelrockner (Biometra) getrocknet, danach die Frischhaltefolie entfernt und in einer Filmkassette auf einen Röntgenfilm (KODAK) übertragen. Nach 24 Stunden Exposition wurde von Hand entwickelt und ausgewertet.

### **3.2.3.4. Das Gen der Monoaminoxidase A**

Für die Untersuchung des Gens der MAOA wurden die schon bekannten 63 *Macaca sylvani* sowie 13 *Macaca sylvani* aus Gibraltar untersucht.

Die zum Einsatz gekommenen Primer waren (MAOA-F2) 5'-CCC AGC GTG CTC CAG AAA C-3' und (MAOA-R2) 5'-GGA CCT GGG CAG TTG TGC-3'.

Die PCR-Bedingungen waren:

3 Min. bei 95°C und 35 Wiederholungen mit 95°C für 40 Sec. (Denaturierung), 65°C für 40 Sec. (Annealing-Temperatur) und 72°C für 50 Sec. (Elongation).

Die Amplicons wurden durch ein 3,5% LE Agarosegel getrennt und durch Ethidium Bromid (Sigma) sichtbar gemacht.

### **3.3. DNA-Sequenzanalyse**

#### **3.3.1. DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Nachdem das gesuchte DNA-Fragment im elektrischen Feld so weit gelaufen ist, dass die gewünschte Bande deutlich von anderen getrennt ist, schneidet man unter UV-Bestrahlung mit einem sauberen Skalpell eine Tasche knapp vor und hinter der Bande aus. Das Gel-Fragment wird gewogen und mit dem dreifachen Volumen QX1-Puffer versetzt und 10 Min. bei 50 °C inkubiert, bis die Agarose vollständig gelöst ist.

Nach Fällung durch 1 Vol. Isopropanol und Aufladen auf die Quiagen-Säule folgt eine einminütige Zentrifugation in der Mikrozentrifuge zur Adsorption der DNA an die Silicagel-Membran in der Säule. Mit 0,5 ml QX1 werden die übriggebliebenen Gelreste abzentrifugiert, danach wird durch Zentrifugation mit jeweils 0,75 ml PE-Puffer einmal gewaschen, getrocknet und zentrifugiert. Mit je 50 µl dH<sub>2</sub>O wird die DNA wiederum durch einmaliges Zentrifugieren (1 Min.) in ein Eppendorf-Gefäß eluiert.

### **3.3.2. DNA-Klonierung in Bakterien**

Zur Ligation, Transformation und Isolation der Bakterien zur Klonierung der DNA wurde streng nach Herstellerangaben vorgegangen. Vergleiche hierzu das Handbuch „TA Cloning® Kit Dual Promoto (pCR®II)“ der Firma Invitrogen .

### **3.3.3. Sequenzbestimmung**

Das zur Sequenzierung von DNA verwendete “Big Dye™ Terminator Ready Reaction Kit“ basiert auf der Methode nach Sanger. Dabei wird die DNA vom Oligonukleotid ausgehend amplifiziert. Durch den Einbau von Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Didesoxynukleotide (ddNTPs), denen eine Hydroxylgruppe an Position 3 der Desoxyribose fehlt, kann keine Phosphodiester Bindung zustande kommen, was zu Kettenabbrüchen nach Einbau eines ddNTP's führt. Eine Verlängerung des wachsenden DNA-Fragmentes ist nicht mehr möglich und es resultiert somit ein Mix aus unterschiedlich langen DNA Fragmenten. Das ursprüngliche Protokoll nach Sanger sah die Reaktion mit vier verschiedenen Ansätzen mit jeweils nur einem ddNTP (A,C,G,oder T) vor. Durch das verwendete Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit in Kombination mit dem ABI Sequencer ist es heute möglich alle vier ddNTPs in einer Reaktion zu verwenden.

Ein typischer Reaktionsansatz besteht aus:

- 4 µl Premix (ddNTPs, dNTPs, Puffer, und AmpliTaq DNA-Polymerase)
- 4 µl DNA (Konz. 100-200 ng)
- 3 µl Oligonukleotid (2,5 pmol/µl)
- 10 µl ddH<sub>2</sub>O

Die Reaktion im Thermocycler wurde mit

96°C 10 Sec.

56°C 5 Sec.

60°C 4 Min. und 25 Zyklen amplifiziert.

Der Reaktionsansatz wird zunächst im Verhältnis 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O versetzt und gemischt. Dazu gibt man 10 µl NaAcetat (3M, pH 4,6) und mischt erneut. Nach Zugabe des 2,5 fachen Volumens Ethanol (96%) wird 10 Min. in der Tischzentrifuge zentrifugiert und anschließend der Überstand dekantiert. Dies wird nochmals mit 70% Ethanol wiederholt und danach das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Das getrocknete Pellet wird in destiliertem H<sub>2</sub>O resuspendiert und in Sequenziercaps überführt. Durch die Aufarbeitung der Proben werden überschüssige ddNTPs abgetrennt, die sonst bei der Sequenzierung stören könnten.

Die Sequenzierungsprodukte werden im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer Sequencer analysiert. Dabei erfolgt eine Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mittels Argonlasers, sobald diese die Detektionseinheit passieren, die Sekundärstrahlung wird über einen Filter und einen Photomultiplier aufgezeichnet. Mittels der Analysesoftware wird daraus ein Chromatogramm erstellt, aus dem sich die Sequenzabfolge der analysierten DNA ablesen lässt.

### **3.3.3.1. Der Promotor des Serotonin-Transporter-Gens (5-HTTLPR)**

Für den Promotor des Serotonin-Transporters-Gens (5-HTTLPR) wurde die Sequenz der XL-Bande eines Rhesusaffen aus Amerika bestimmt, der bei einer vorangegangenen PCR eine Doppelbande in Höhe der XL- und L-Bande aufwies.

Die Bande wurde nach den oben beschriebenen Methoden geschnitten, kloniert und durch einen automatisierten Ablauf (Abi-Prism 310) jeweils zweimal für beide Stränge sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit S, L, XL und XXL des Homo sapiens, Pan troglodytes, Pongo pygmaeus und S, L und XL-Sequenz von Macaca mulatta verglichen.

### 3.3.3.2. Das Gen der Monoaminoxidase A (MAOA)

Für die Untersuchung des Neurotransmitters MAOA wurde eine Gruppe von 5 *Pan troglodytes*, 5 *Pan paniscus*, 10 *Gorilla gorilla*, 9 *Pongo pygmaeus*, 6 *Theropithecus gelada*, 6 *Ateles geoffroyi*, 5 *Lemur catta* (vgl. 1.3) untersucht. Die Proben stammten aus Stuttgart, Antwerpen, Köln, San Diego, Nürnberg, Leipzig, Duisburg, Basel, Berlin, Zürich, Ulm und Freiburg.

Die DNA wurde aus dem Blut der Affen gewonnen, die bei der Blutabnahme mit 15 mg/kg Ketamine betäubt waren. Eine Gesamtmenge von 0,5-100 ng DNA wurde mit dem Roche FastStart High Fidelity 10 x Reaktionspuffer versehen, welcher 18 mM MgCl<sub>2</sub>, 4% DMSO, 5 mM dNTPs, 10 pmol forward und reverse Primer und 1,25 U der Roche FastStart High Fidelity DNA Polymerase mit einem Gesamtvolumen von 25 µl enthält.

Die zum Einsatz gekommenen Primer waren (MAOA-F2) 5'-CCC AGC GTG CTC CAG AAA C-3', (MAOA-jrwF) 5'-AGC CTG ACC GTG GAG AAG G-3', (MAOA-jrwF2) 5'-AGA AGG GCT GCG GGA AGC-3', (MAOA-R2) 5'-GGA CCT GGG CAG TTG TGC-3' und (MAOA-jrwR) 5'-GTG CTC CAC TGG GAA CTG G-3'.

Die PCR-Bedingungen waren: 2 Min. bei 95°C und 35 Wiederholungen mit 95°C (Denaturierung), 65°C (Annealing-Temperatur) und 72°C (Elongation) für jeweils 30 Sec..

Die Amplicons wurden durch ein 3,5% LE Agarosegel getrennt und mittels Ethidium Bromid (Sigma) sichtbar gemacht. Der Genotype von mindestens 3 Proben jeder Primatenspezies (außer *Pan paniscus* nur eine Probe) wurde durch einen automatisierten Ablauf (Abi-Prism 310) jeweils zweimal für beide Stränge untersucht. Die Sequenzen wurden mit den schon bekannten des menschlichen VNTR (hVNTR, Genbanknr.: M89636) und des Rhesusaffen VNTR (rhVNTR, AJ544234) verglichen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Das Dopamin-Rezeptor-Gen D4 (DRD4)

Alle 63 *Macacae sylvani* waren homozygot für den Genabschnitt und lieferten eine Bande in Höhe des 4-Repeat-Allels, was einer Anzahl von 474 bp entsprechen würde.

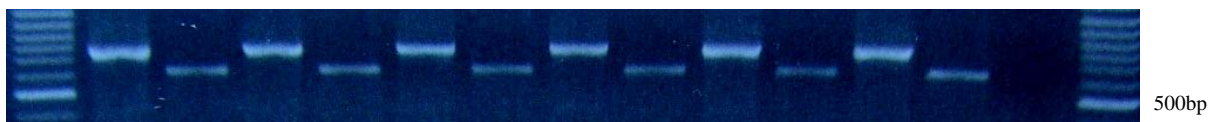


**Abbildung 3:**

Ausschnitt aus dem Foto des Gels. Die Proben 125 und 126 zeigen die Banden zweier *Macaca mulatta*, die als Referenz mit einer bekannten Bandengröße von 522 bp (entspricht dem 5-Repeat-Allel) verwendet wurden.

### 4.2. Das Dopamin-Transporter-Gen (DAT)

Alle 63 *Macacae sylvani* waren homozygot für den gesuchten Genabschnitt und lieferten eine Bande in Höhe des 12-Repeat-Allels. Auch der SNP war homozygot. In Abbildung 4 ist ein Ausschnitt des Fotos des Gels zu sehen. Alle anderen Proben zeigten das gleiche Ergebnis.



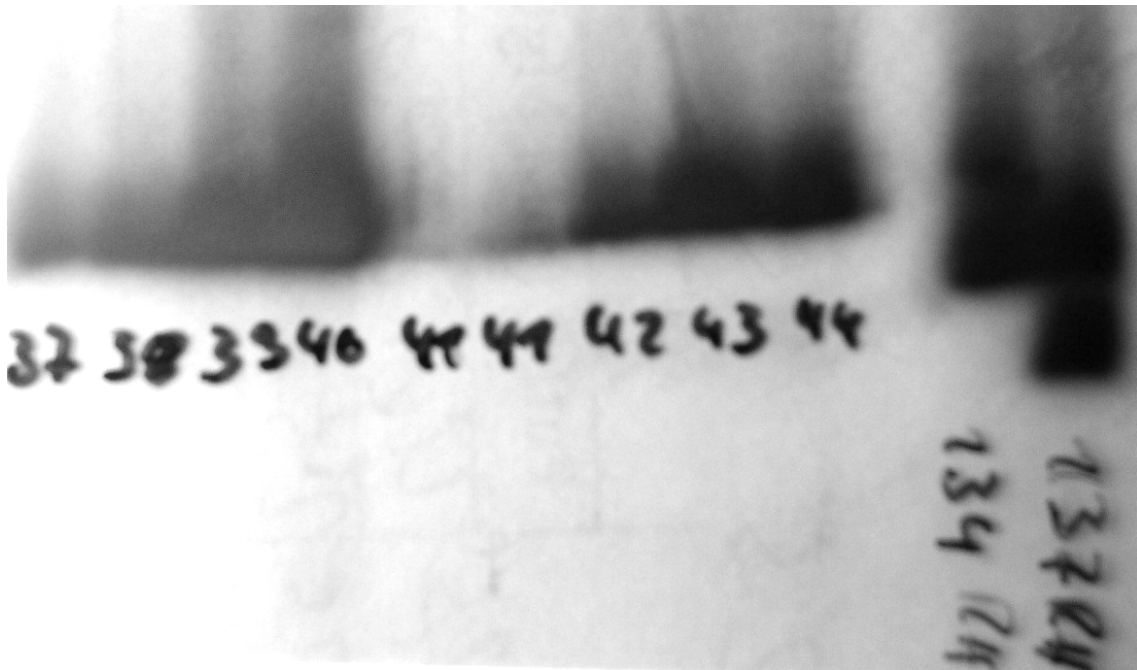
**Abbildung 4:**

Ausschnitt aus dem DAT-Agarose-Gel der *Macacae sylvani* jeweils mit und ohne Enzymschnitt nebeneinander.



### 4.3. Der Promotor des Serotonin-Transporter-Gens (5-HTTLPR)

Alle 63 *Macaca sylvani* waren homozygot und lieferten eine Bande in Höhe des XL-Allels.



**Abbildung 5:**

Ausschnitt aus dem entwickelten Röntgenfilm. Die Proben 134 RH und 137 RH zeigen 2 *Macaca mulatta*-Proben mit bekannter Größe als Referenz. (Probe 134 RH zeigte das L Allel, Probe 137 RH S/L).

Zusätzlich wurde ein *Macaca mulatta* (NIH Primate Center) untersucht, der eine XL/L-Bande aufwies. Die Sequenzanalyse der XL-Bande zeigte eine 21 bp große Insertion kurz vor dem Int1- Primer.

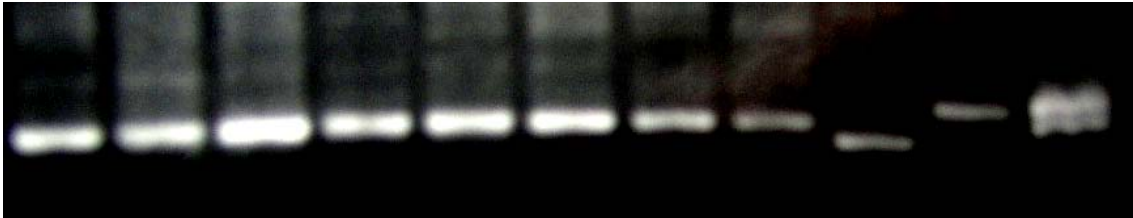
S	CCCTACTGCAGCC-TCCCAGCAT	-----	-----	-----	-----	-----	22
L	CCCTACTGCAGCC-TCCCAGCAT	-----	-----	-----	-----	-----	22
xL	CCCTACTGCAGCC-TCCCAGCAT	-----	-----	-----	-----	-----	22
xxL	CCCTACTGCAGCC-TCCCAGCAT	-----	-----	-----	-----	-----	22
mt i	CCCTGCTGCAGCCCTCCCAGCAT	CTCCCTGTACCCCTCCTAGGAT	CTCCCCTGCACCCCC .ATTATC	CTCCCTACACCCCCA--GCAT	-----	-----	86
rhS	CCCTGCTGCAGCCCTCCCAGCAT	CTCCCTGCACCCCTCCTAGGAT	CTCCCCTGCACCCCCCATTATC	CTCCCTACACCCCCA--GCAT	-----PL2-----	-----	87
rhL	CCCTGCTGCAGCCCTCCCAGCAT	CTCCCTGCACCCCTCCTAGGAT	CTCCCCTGCACCCCCCATTATC	CTCCCTACACCCCCA--GCAT	-----	-----	87
rhxL	CCCTGCTGCAGCCCTCCCAGCAT	CTCCCTGTACCCCTCCTAGGAT	CTCCCCTGCACCCCCCATTATC	CTCCCTACACCCCCA--GCAT	-----	-----	87
msy	CCCTGCTGCAGCCCTCCCAGCAT	CTCCCTGTACCCCTCCTAGGAT	CTCCCCTGCACCCCCCATTATC	CTCCCTGCACCCCTTGCGGCAT	CCCCCTGCACCCCCAACAT	-----	109
S	-----	-----	CCCCCTGCAA-CCTCCCAGCAA	CT-CCCTGTACCCCTCCTAGGAT	CGCTCCTGCATCCCCCATTAT	-----	87
L	-----	-----	CCCCCTGCAA-CCTCCCAGCAA	CT-CCCTGTACCCCTCCTAGGAT	CGCTCCTGCATCCCCCATTAT	-----	87
xL	-----	-----	CCCCCTGCAA-CCTCCCAGCAA	CT-CCCTGTACCCCTCCTAGGAT	CGCTCCTGCATCCCCCATTAT	-----	87
xxL	-----	-----	CCCCCTGCAA-CCTCCCAGCAA	CT-CCCTGTACCCCTCCTAGGAT	CGCTCCTGCATCCCCCATTAT	-----	87
mt i	-----PL2-----	-----	CCCCCTGCAGCCCTTTCAGTAT	CC-CCCTGCACCCCTCCCAGGAT	CTCCCTTGCATCCCC-ATTAT	-----	151
rhS	CCCCCTGCAGCCTCCCAGCAT	CTCCCTGCACCCCCCAGCAT	-----PL2-----	CCCCCTGCACCCCTCCCAGGAT	CTCCCTTGCATCCCC-ATTAT	-----	173
rhL	CCCCCTGCAGCCTCCCAGCAT	CTCCCTGCACCCCCCAGCAT	-CCCCCTGCAG-CCTTTCAGCAT	CCCCCTGCACCCCTCCCAGGAT	CTCCCTTGCATCCCC-ATTAT	-----	194
rhxL	CCCCCTGCAGCCTCCCAGCAT	CTCCCTGCACCCCCCAGCAT	CCCCCTGCAGCCCTTTCAGCAT	CC-CCCTGCACCCCTCCCAGGAT	CTCCCTTGCATCCC-TATTAT	-----	195
msy	CCCCCTGCAGCCTCCCAGCAT	CTCCCTGCACCCCCCAGCAT	CCCCCTGCAGCCCTTTCAGCAT	CC-CCCTGCACCCCTCCCAGGAT	CTCCCTTGCAT-CCCC-ATTAT	-----	216
S	CCCCCCTTCACTCCTCGGGCAT	CCCCCTGCACCCCCCAGCAT	-----	-----	-----	-----	132
L	CCCCCCTTCACTCCTCGGGCAT	CCCCCTGCACCCCCCAGCAT	-----Polymorphic Locus 1 (PL1)-----	-----	-----	-----	132
xL	CCCCCCTTCACTCCTCGGGCAT	CCCCCTGCACCCCCCAGCAT	-----	-----	CCCCCTGCAGCCCTTCCAGCAT	-----	155
xxL	CCCCCCTTCACTCCTCGGGCAT	CCCCCTGCACCCCC-AGCAT	CCCCCTGCAGCCCCCAGCAT	CTCCCCTGCACCCCC-AGCAT	CCCCCTGCAGCCCTTCCAGCAT	-----	197
mt i	CTCCCC-TGCACCCCTCGAGTAT	CCCCCC-GCACCTCC-ATTAT	CCCCCTGCACCC-TTGCGGCAT	CCCCCCTGCACCCCCAGTAT	-----	-----	236
rhS	CTCCCC-TGCACCCCTCGAGTAT	CCCCCC-GCACCTCC-ATTAT	CCCCCTGCACCCCTTGCGGCAT	CCCCCTACACCCCCAGTAT	-----	-----	259
rhL	CTCCCC-TGCACCCCTCGAGTAT	CCCCCC-GCACCTCC-ATTAT	CCCCCTGCACCCCTTGCGGCAT	CCCCCTACACCCCCAGTAT	-----	-----	280
rhxL	CTACCC-TGCACCCCTCGAGTAT	CTCCCC-GCACCTCC-ATTAT	CCCCCTGCACCCCTTGCGGCAT	CCCCCTGCACCCCCAGTAT	-----	-----	281
msy	CTCCCC-TGCACCCCTCGAGTAT	TCCCCC-GCACCTCC-ATTAT	CCCCCTGCACCCCTTGCGGCAT	CCCCCTGCACCCCCAGTAT	-----	-----	302



## 4.4. Das Gen der Monoamino-Oxidase der A-Form (MAOA)

### 4.4.1. *Macaca sylvanus*

Alle 63 *Macacae sylvani* und auch die 13 aus Gibraltar waren homozygot und lieferten eine Bande in Höhe des 6-Repeat-Allels. Als Referenz dienten wiederum bekannte Proben von *Macaca mulatta*.

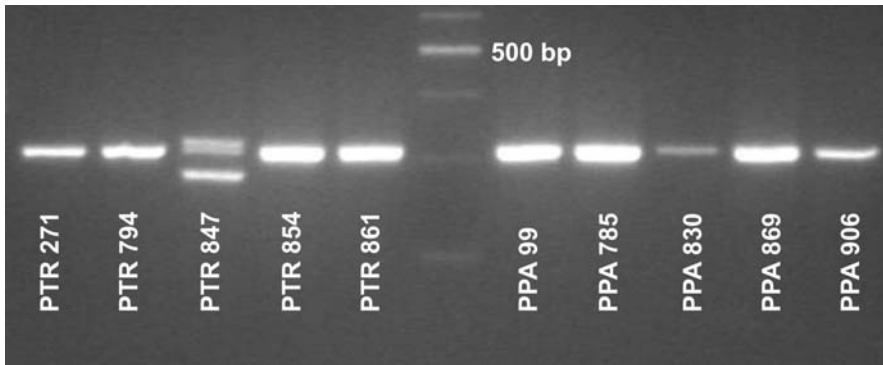


**Abbildung 6:**

Ausschnitt des Agarosegels für MAOA; VNTR der *Macacae sylvani* und *Macacae mulatta* (E20 = 5-Repeat-Allel, E85 = 7-Repeat-Allel, G02 = 6/7 -Repeat-Allel)

### 4.4.2. *Pan troglodytes*, *Pan paniscus* und *Gorilla gorilla*

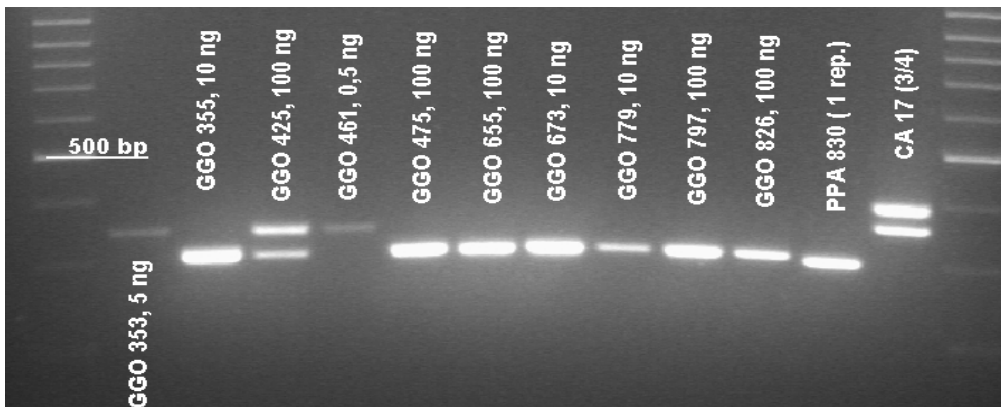
Mit Ausnahme eines Tieres lieferten alle Proben von *Pan troglodytes* und *Pan paniscus* ein VNTR mit einer 100% homologen Sequenz zur hVNTR-Sequenz. Eine Probe von *Pan troglodytes* war hereozygot (847). Bei der Sequenzanalyse ergaben sich ein fehlendes und ein komplettes menschliches VNTR.



**Abbildung 7:**

Agarosegel des VNTR-Repeats der 5 Pan troglodytes und 5 Pan paniscus

Die Sequenz von Gorilla gorilla entsprach den ersten 18 bp des menschlichen VNTRs



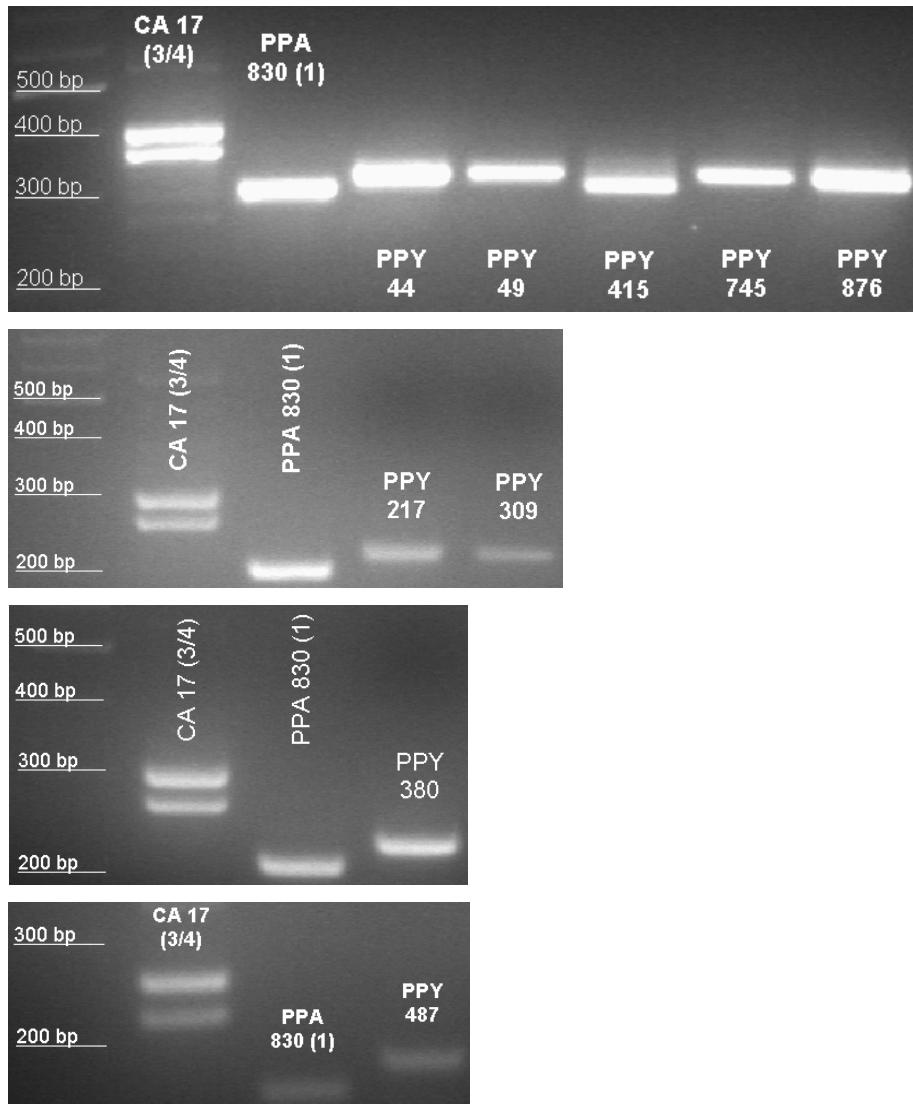
**Abbildung 8:**

Agarosegel des MAOA- VNTR der 10 Gorilla gorilla

#### 4.4.3. Pongo pygmaeus und Theropithecus gelada

Eine Probe (PPY 415) der Pongo pygmaei hatte ein zur menschlichen VNTR-Sequenz identisches Repeat. Alle anderen Pongo pygmaei zeigten ein 18 bp langes Repeat, dessen Sequenz ca. 75% homolog zu beiden

Rhesusaffen VNTR und dem ersten 18 bp des menschlichen VNTR war.

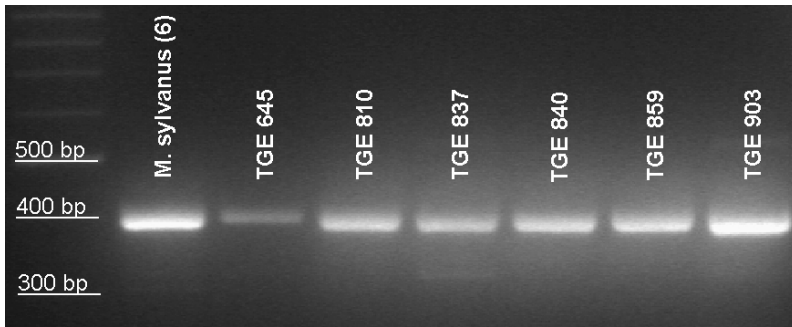


**Abbildung 9:**

Agarosegele der MAOA-VNTR der *Pongo pygmaeus*

Alle Proben der *Theropiteci geladae* besaßen 6 Repeats vom Rhesusaffen-VNTR.

Mit den zum Einsatz gekommenen Primern konnte die MAOA-Promotorregion der untersuchten *Ateles geoffroyi* und *Lemur catta* nicht amplifiziert werden.



**Abbildung 10:**

Agarosegel des MAOA-VNTR der Theropiteci geladae

#### 4.4.4. MAOA-VNTR-Sequenzen

Die erhaltenen Sequenzen wurden untereinander verglichen und in einen Stammbaum eingetragen.

<i>Probe</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Anzahl der VNTR-Repeats</i>	<i>VNTR Sequenz</i>
PTR 271	w	1	
PTR 794	m	1	
PTR 847	w	0/1	untere Bande: kein Repeat; obere Bande: 5'-ACCGGC ACCGGC ACCAGT ACCCGC ACCAGT-3'
PTR 854	m	1	
PTR 861	w	1	5'-ACCGGC ACCGGC ACCAGT ACCCGC ACCAGT-3'
PPA 99	w	1	
PPA 785	w	1	
PPA 830	w	1	5'-ACCGGC ACCGGC ACCAGT ACCCGC ACCAGT-3'
PPA 869	m	1	
PPA 906	m	1	
GGO 353	m	4	5'-ACCGGC ACCGGC ACCAGT -3'
GGO 355	w	2	
GGO 425	w	2/4	5'-ACCGGC ACCGGC ACCAGT -3' (obere und untere Bande)
GGO 461	w	4	
GGO 475	w	2	
GGO 655	m	2	5'-ACCGGC ACCGGC ACCAGT -3'
GGO 673	m	2	
GGO 779	m	2	
GGO 797	m	2	
GGO 826	m	2	



PPY 44	w	3	5'-ACCG(G/T)C AC(C/G)GGC ACC(A/G)G(C/T)-3'
PPY 49	w	3	5'-ACCG(G/T)C AC(C/G)GGC ACC(A/G)G(C/T)-3'
PPY 217	w	3	
PPY 309	m	3	
PPY 380	m	3	
PPY 487	f	3	5'-ACCG(G/T)C AC(C/G)GGC ACC(A/G)G(C/T)-3'
PPY 745	f	3	
PPY 876	m	3	5'-ACCG(G/T)C AC(C/G)GGC ACC(A/G)G(C/T)-3'
TGE 645	m	6	
TGE 810	m	6	5'-ACCGGC ACTGGC AC(A/C)ACT-3'
TGE 837	m	6	5'-ACCGGC ACTGGC AC(A/C)ACT-3'
TGE 840	f	6	5'-ACCGGC ACTGGC AC(A/C)ACT-3'
TGE 859	f	6	5'-ACCGGC ACTGGC AC(A/C)ACT-3'
TGE 903	f	6	5'-ACCGGC ACTGGC AC(A/C)ACT-3'

**Tabelle 3:** VNTR Genotyp und Sequenzen der Promotorregion des MAOA Gens.

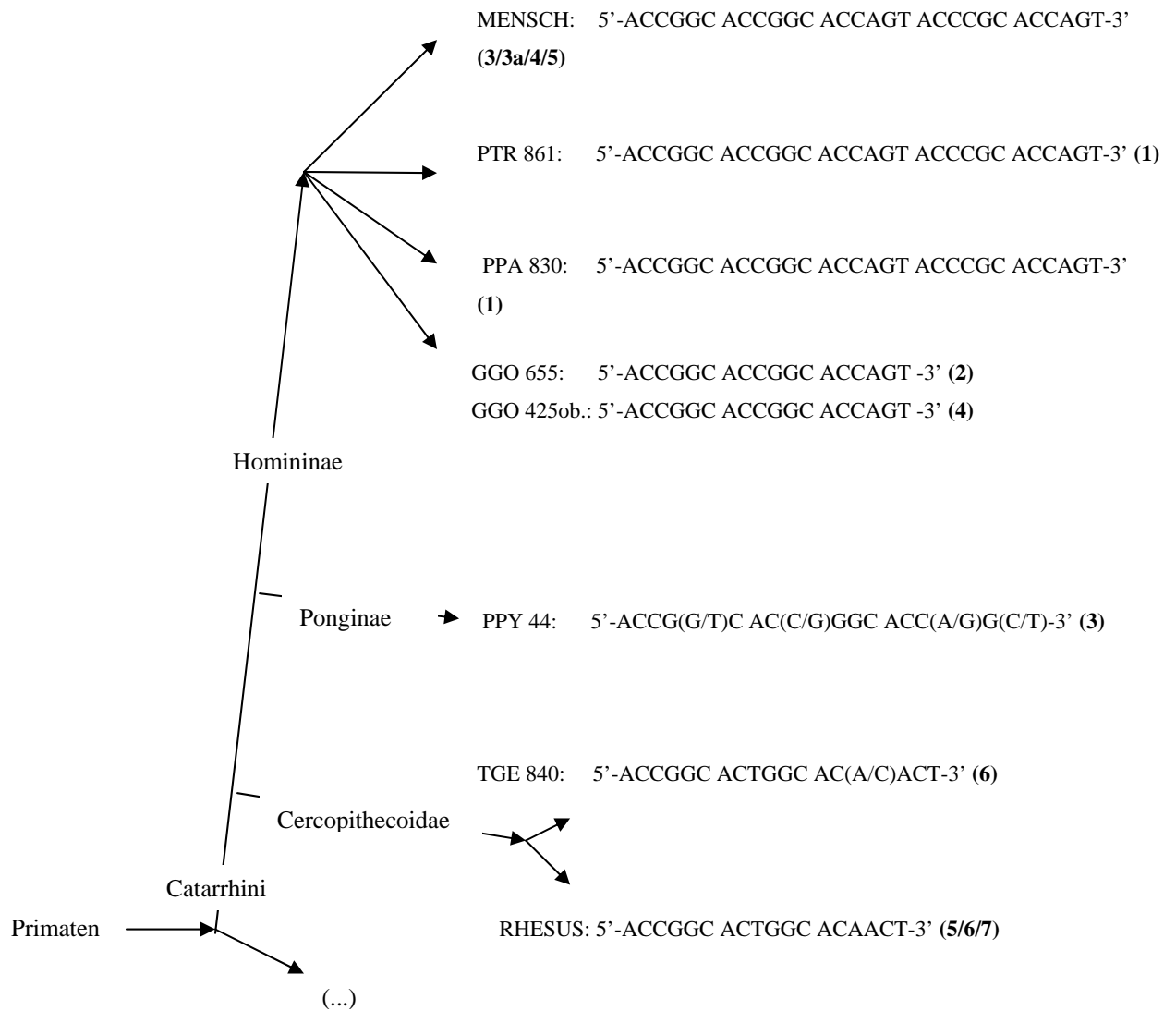


Abbildung 11:  
 Ausgewählte MAOA-VNTR-Sequenzen der untersuchten Primaten innerhalb des Stammbaums der Primaten. In Klammer ist die Anzahl der bekannten Repeats angegeben. (vgl. auch 1.3: Stammbaum der Primaten).

## 5. Diskussion

Die oben erwähnten Polymorphismen stellen sich im Vergleich mit den menschlichen Genabschnitten als unterschiedlich und vielseitig dar. Um eine eindeutige Aussage über die evolutionsgenetische Entwicklung der einzelnen Allele zu treffen, bedarf es noch weiterer Untersuchungen mit größerer Anzahl von Individuen, um weitere Allele zu finden und die erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen.

Es stellt sich die Frage, wie sich die einzelnen Polymorphismen entwickelten und wie die Sequenzen der einzelnen hier untersuchten Genabschnitte zu Beginn der Evolution lauteten. Was war am Anfang? Gab es zu Beginn wenig oder viele Repeats? Wurden die einzelnen Genabschnitte reduziert oder ergänzt? Welche Auswirkungen haben diese Insertionen oder Deletionen auf das Verhalten der untersuchten Individuen und können die Erkenntnisse auf den Menschen übertragen werden?

Um die Verbindungen zwischen Allel und Verhaltensdisposition nachvollziehen zu können, ist es wichtig eine Kategorisierung von Verhaltensdispositionen der Primaten vorzunehmen (vgl. Thierry et al., [13]). Als Beispiel soll die besondere Situation des *Macaca sylvanus* aus Gibraltar dienen: Fossile Reste von Berberaffen wurden an verschiedenen Stellen in Europa gefunden. Sie zeigen, dass diese Tiere zu Urzeiten nicht nur im nördlichen Afrika, sondern auch in Europa vorgekommen waren. Klimatische Veränderungen dürften später dazu geführt haben, dass sich die Berberaffen aus Europa zurückziehen mussten. Heute findet man auf dem europäischen Kontinent keine dieser dickfelligen Affen mehr in freier Wildbahn, ausgenommen jene rund 40 Individuen, welche auf dem Felsen von Gibraltar in Halbfreiheit leben. Ob es sich bei den Affen von Gibraltar um die letzten Nachkommen der europäischen Berberaffen handelt oder ob es afrikanische Tiere sind, welche einst dort ausgesetzt wurden, vermag heute niemand mehr zu sagen.

Einer Überlieferung zufolge sollen englische Besatzer Anfang des 20. Jahrhunderts Angst gehabt haben ihre bedeutende Festung am Eingang des Mittelmeers zu verlieren, sobald der letzte Affe von dort verschwunden sei. Jedes Mal, wenn es schlecht um die Affen auf Gibraltar bestellt war, wurden neue Tiere aus Nordafrika eingeführt. Die Berberaffen Gibaltars werden auch heute noch gefüttert und es wird über die Tiere genau Buch geführt [47]. Diese Umsorgung der Berberaffen und der damit verbundene Kontakt mit den Menschen hat sicherlich auch Auswirkung auf ihr Verhalten. Dies verdeutlicht, wie schwierig es ist, spezifische Verhaltensdispositionen mit einer genetischen Ursache zu verknüpfen.

Durch Umwelteinflüsse wie die Reduktion und Aufspaltung des Lebensraumes oder das Leben in Gefangenschaft können Populationen von ihrer genetischen Variabilität einbüßen. Es entstehen Subpopulationen, die genetisch isoliert werden und so von ihrer genetischen Varianz einbüßen, was auf lange Sicht auch das Überleben einzelner Subpopulationen bedrohen kann [4,7]. *Macaca sylvanus* zeigte bei den untersuchten Individuen eine im Vergleich zum schon bekannteren *Macaca mulatta* ebensolche geringere Varianz (vgl. Tabelle 4).

<b>Gene</b>	<b>Macaca mulatta</b>	<b>Macaca sylvanus</b>
<b>5HTT</b>	S,L,XL (het)	XL (hom)
<b>MAOA</b>	5,6,7 (het)	6 (hom)
<b>DRD4</b>	5 (hom)	4 (hom)
<b>DAT</b>	12 (hom) SNP (het)	12 (hom) SNP (hom)

**Tabelle 4:**

Allelfrequenzen für die 4 untersuchten Genabschnitte von *Macaca sylvanus* im Vergleich mit *Macaca mulatta*.

Betrachtet man die in dieser Arbeit untersuchten Primatenarten, so werden deutliche Variationen in Länge und Struktur der VNTR-Sequenz des MAOA-Gens erkennbar. Bei den Schimpansen und Bonobos war die Sequenz mit nur einem Repeat identisch mit dem menschlichen Repeat und das sowohl in der Länge als auch in der Nukleotidzusammensetzung. Der Unterschied zur menschlichen Sequenz und auch zu denen der untersuchten Primaten besteht in dem höchstens einfachen Repeat. Die Gorilla gorilla-Proben zeigten zwei Allele mit je zwei und vier Repeats und eine um 12 Basenpaare verkürzte Sequenz.

Bei der Promotorregion von MAOA zeigte sich, dass im Vergleich von Homo sapiens, Pan troglodytes und Pan paniscus mit Gorilla gorilla, Pongo pygmaeus, Theropithecus gelada und Macaca mulatta die zuletzt genannten eine reduzierte VNTR-Sequenz mit nur 18 bp statt 30 bp besitzen. Die Anzahl der Repeats variierte und war bei den Cercopithecoidea mit 5 bis 7 größer als bei den Hominae und Ponginae mit 0 bis 4. Eine Möglichkeit für eine solche Insertion könnte ein im Laufe der Evolution viral eingeschleuster DNA-Abschnitt sein. Der Zeitpunkt läge demnach vor ca. 20 Millionen Jahren (vergleiche hierzu 1.3).

Die Rhesusaffen offenbarten unter den untersuchten nichtmenschlichen Primaten die höchste Variabilität innerhalb des MAOA-Promotors. Geht man von einer funktionellen Signifikanz dieser Ergebnisse und der vermuteten Beeinflussung aggressiven Verhaltens durch MAOA aus, kann man in dem relativ hohen Grad von Polymorphismus einen Grund für die ausgesprochen weite geographische Verbreitung der Rhesusaffen sehen. Diese geographische Verbreitung könnte demnach mit Hilfe von genetischen Gegebenheiten entstanden sein, die zu einem größeren Spektrum aggressiver Verhaltensmuster bis hin zu einer im Vergleich zu anderen nichtmenschlichen Primaten höheren sozialen Anpassungsfähigkeit führten.

Der Grad der Sequenzunterschiede des MAOA-Gen VNTR geht über den einer anderen vergleichbaren Untersuchung mit dem Dopamin-Transporter-Gen 3'-UTR hinaus [48]. Bisher zeigten Primaten mit dem menschlichen Repeat nur selten Längenvariationen

und die Genotypen mit 0 und 1 Repeat sind beim Menschen noch nicht beobachtet worden [37,38,49].

Sollte sich der relative Mangel an Variation in einigen Affenarten bestätigen, wäre dies ein weiterer Hinweis auf die mitbestimmende Rolle von MAOA und dessen Allel-Variationen bei spezifischen menschlichen Charakterzügen. (vgl. hierzu Pääbo et al., 2003,[4]). Im Hinblick darauf versprechen weitere Untersuchungen über Genvariationen und deren evolutionsgenetische Entwicklung Erkenntnisse über Verbindungen zwischen Genen und Verhaltensmerkmalen und damit auch über die menschliche Natur.

## 6. Zusammenfassung

Die Verbindungen zwischen Genvariationen und Verhaltensmerkmalen bzw. psychiatrischen Störungen sind in den letzten Jahren in den Blickpunkt vieler Studien gelangt. Auf der Suche nach neuen Polymorphismen bieten sich dem Menschen verwandte Affenarten an. Zeigen sich bei diesen Primaten den Menschen orthologe Polymorphismen, könnten so neue Erkenntnisse über deren evolutionsgenetische Entwicklung und die Übertragbarkeit auf menschliche Gen-Merkmal-Assoziationen gewonnen werden. Vergleicht man die unterschiedliche Transkriptionsaktivität des Monoaminoxidase A Gens beim Menschen, beeinflussen Längenvariationen innerhalb der repetitiven Sequenz (VNTR) des MAOA Promotors vor allem aggressive und antisoziale Verhaltensmerkmale. Zudem erhöht sich das Risiko für psychiatrische Störungen. In dieser Arbeit wurde die Anwesenheit und Variabilität der repetitiven Sequenz des MAOA Promotors bei mehreren Arten von nichtmenschlichen Primaten ausgewertet. Bei einigen Affenarten konnten Längenvariationen innerhalb der repetitiven Sequenz (VNTR) gefunden werden. Die Sequenzanalyse dieser Kontrollregion zeigte das Vorkommen von VNTRs in *Pan troglodytes*, *Pan paniscus*, *Gorilla gorilla*, *Pongo pygmaeus*, *Macaca mulatta* und *Theropithecus gelada*. Die Mehrheit von *Pan troglodytes* und *Pan paniscus* hatten ein einfaches Repeat mit einer der menschlichen VNTR Sequenz identischen Sequenz. Die VNTR Sequenz von *Macaca mulatta* zeigte die häufigsten Längenvariationen mit Allel-frequenzen von 35%, 25% und 40% entsprechend den 5-, 6- und 7-Repeatvarianten. Das Ausmaß der Repeatvariationen des MAOA Promotors stützt die Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression von MAOA und aggressiven und antisozialen Verhaltensmerkmalen bei Menschen und auch Rhesusaffen besteht. Neben dem MAOA Promotor wurden auch das Dopamin-Rezeptor-Gen D4 (DRD4), das Dopamin-Transporter-Gen (DAT) und der Promotor des Serotonin-Transporter-Gens (5-HTTLPR) untersucht. Ein *Macaca mulatta* (NIH Primate Center), der eine XL/L-Bande aufwies, zeigte bei der Sequenzanalyse des Promotors des Serotonin-Transporter-Gens (5-HTTLPR) eine 21 bp große Insertion kurz vor dem Int1- Primer. Sollten sich die Ergebnisse in weiteren Untersuchungen bestätigen, wäre dies ein erneuter Hinweis auf

die mitbestimmende Rolle von MAOA und 5-HTTLPR und deren Allel-Variationen bei spezifischen menschlichen Charakterzügen.



## 7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum über die beobachteten Unterschiede zwischen Spezies
- Abbildung 2: Stammbaum der Primaten
- Abbildung 3: Ausschnitt aus dem Foto des Gels des Dopamin-Rezeptor-Gens mit 63 *Macaca sylvani*
- Abbildung 4: Ausschnitt aus dem DAT-Agarose-Gel der *Macaca sylvani*, jeweils mit Enzymschnitt und ohne Enzymschnitt für den snp nebeneinander
- Abbildung 5: Ausschnitt aus dem entwickelten Röntgenfilm des 5-HTTLPR
- Abbildung 6: Ausschnitt des Agarosegels für MAOAgen VNTR der *Macaca sylvani* und *Macaca mulatta*
- Abbildung 7: Agarosegel des VNTR-Repeats der 5 *Pan troglodytes* und 5 *Pan panisci*
- Abbildung 8: Agarosegel des MAOA- VNTR der 10 *Gorilla gorilla*
- Abbildung 9: Agarosegele der MAOA-VNTR der *Pongo pygmaei*
- Abbildung 10: Agarosegel des MAOA-VNTR der *Theropiteci geladae*
- Abbildung 11: Ausgewählte MAOA-VNTR-Sequenzen der untersuchten Primaten

## 8. Abkürzungsverzeichnis

5-HTTLPR	Promotorgen des Serotonin-Transporters
AGE	Geoffroy-Klammeraffe: <i>Ateles geoffroyi</i>
bp	Basenpaar
DAT	Dopamin-Transporter-Gen
DRD4	Dopamin-Rezeptor-Gen D4
GGO	Gorilla: <i>Gorilla gorilla</i>
LCA	Katta: <i>Lemur catta</i>
MAOA	Gen der Monoamino-Oxidase der A-Form
MSY	Berberaffen: <i>Macaca sylvanus</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPA :	Bonobo: <i>Pan paniscus</i>
PPY:	Orang-Utan: <i>Pongo pygmaeus</i>
PTR:	Schimpansen: <i>Pan troglodytes</i>
RFLP:	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
TGE :	Blutbrustpavian: <i>Theropithecus gelada</i>
VNTR :	Variable-Number-of-Tandem-Repeats

## 9. Literaturverzeichnis:

1. Lesch, K.P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S.Z., Greenberg, B.D., Petri, S., Benjamin, J., Muller, C.R., Hamer, D.H., Murphy, D.L., *Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region*. Science, 1996. **274**: p. 1527-1531.
2. Ebstein, R.P., Novick, O., Umansky, R., Priel, B., Osher, Y., Blaine, D., Bennett, E.R., Nemanov, L., Katz, M., Belmaker, R.H., *Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the personality trait of Novelty Seeking*. Genetics, 1996. **12**: p. 78-80.
3. Balciuniene, J., Syvanen, A.C., McLeod, H.L., Pettersson, U., Jazin, E.E., *The geographic distribution of monoamine oxidase haplotypes supports a bottleneck during the dispersion of modern humans from Africa*. J Mol Evol, 2001 Feb. **52**(2): p. 157-63.
4. Pääbo, S., *The mosaik that is our genome*. Nature, 2003 Jan. **421**: p. 409-412.
5. Lewis, R., *The Scientist*, 2003. **17**(2): p. 18 ff.
6. Passarge, E. and J. Wirth, *Taschenatlas der Genetik*. George Thieme Verlag Stuttgart, 1994.
7. Hirsch-Kaufmann, M. and M. Schweiger, *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. George Thieme Verlag Stuttgart, 1996(3. Auflage).
8. Enard, W., I. Ebersberger, and Pääbo S., *Functional genomics in the chimpanzee*. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2004;5:351-78.
9. Ebersberger, I., Metzler, D., Schwarz, C., Pääbo, S., *Genomwide comparison of DNA Sequences between humans and chimpanzees*. Am J Hum Genet, 2002. **70**: p. 1490-1497.
10. Kaessmann, H. and S. Pääbo, *The genetic history of humans and great apes*. J Intern Med, 2002. **251**: p. 1-18.
11. Kaessmann, H., Wiebe, V., Weiss, G., Pääbo, S., *Great ape DNA sequences reveal a reduced diversity and an expansion in humans*. Nature Genetics, 2001. **27**: p. 155-156.
12. Kaessmann, H., V. Wiebe, and S. Pääbo, *Extensive nuclear DNA sequence diversity among chimpanzees*. Science, 1999 nov. **5**.
13. Thierry, B., Iwaniuk, A.N. & Pellis, S.M., *The influence of Phylogeny on the Social Behavior of Macaques (Primates: Cercopithecidae, genus Macaca)*. Ethology, 2000. **106**: p. 713-728.

14. Brocke, B., Spinath, F. M. & Strobel, A. Verhaltensgenetische Ansätze und Theorien der Persönlichkeitsforschung. In Pawlik, K. (Hrsg.), *Theorien der Differentiellen Psychologie (Band 5, Serie VIII der Enzyklopädie der Psychologie)*. Göttingen: Hogrefe..
15. Birbaumer, N. and R.F. Schmidt, *Biologische Psychologie*. Berlin: Springer, 1997.
16. Cooper, J.R., Bloom, F. E. & Roth, R. H., *The biochemical basis of neuropharmacology*. New York: Oxford University Press, 1996. **7th Edition**.
17. Vallone, D., R. Picetti, and E. Borelli, *Structure and function of dopamine receptors*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2000. **24**(1): p. 125-32.
18. Le Moal, M. and H. Simon, Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev.*, 1991. **71**(1): p. 155-234.
19. Dulawa, S.C., Grandy, D. K., Low, M. J., Paulus, M. P. & Geyer, and M. A., *Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli*. *Journal of Neuroscience*, 1999. **19**(21): p. 9550-9556.
20. Okuyama, Y., Ishiguro, H., Toru, M. & Arinami T., *A genetic polymorphism in the promoter region of DRD4 associated with expression and schizophrenia*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. **258**: p. 292-295.
21. Van Tol, H.H.M., Wu, C. M., Guan, H.-C., O'Hara, K., Bunzow, J. , C. R., O., Kennedy, J., Seeman, P., Niznik, H. B. & Jovovic, , and V., *Multiple dopamine D4 variants in the human population*. *Nature*, 1992. **358**: p. 149-152.
22. Paterson, A.D., Sunohara, G. A. & Kennedy, J. L., *Dopamine D4 receptor gene: novelty or nonsense?* *Neuropsychopharmacology*, 1999. **21**(1): p. 3-16.
23. Ebstein, R.P., Novick, O., Umansky, R., Priel, B., Osher, Y., Blaine, and B. D., E. R., Nemanov, L., Katz, M. & Belmaker, R. H., *Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the personality trait of Novelty Seeking*. *Nature Genetics*, 1996. **12**: p. 78-80.
24. Cloninger, C.R., A systematic method for clinical description and classification of personality variants. *Archivs of General Psychiatry*, 1987. **44**(573-588).
25. Depue, R.A., Collins, P.F., *Neurobiology of the structure of personality: dopamine, facilitation of incentive motivation, and extraversion*. *Behavioral and Brain Sciences*, 1999. **22**(491-569).
26. Vandenbergh, D.J., Thompson, M. D., Cook, E. H., Bendahhou, , et al., Human dopamine transporter gene: coding region conservation among normal, Tourette's

disorder, alcohol dependence and attention-deficit hyperactivity disorder populations. *Molecular Psychiatry*, 2000. **5**: p. 283-292.

27. Vandenberg, D.J., Persico, A. M., Hawkins, A. L., Griffin, C. A., and X. Li, Jabs, E. W. & Uhl, G. R., *Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR*. *Genomics*, 1992. **14**: p. 1104-1106.

28. Jorm, A.F., Henderson, A. S., Jacomb, P. A., Christensen, H., and A.E. Korten, Rodgers, B., Tan, X. & Easteal, S., *Association of a functional polymorphism of the monoamine oxidase A gene promoter with personality and psychiatric symptoms*. *Psychiatric Genetics*, 2000. **10**: p. 87-90.

29. Cook, E.H. Jr., Stein, M.A., Krasowski, M.D., Cox, N.J., Olkon, D.M., Kieffer, J.E., Leventhal, B.L., *Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene*. *American Journal of Human Genetics*, 1995. **56**: p. 993-998.

30. Miller, G.M., D.L.G.R.n., Novak, M.A., Madras, B.K., *Single nucleotide polymorphisms distinguish multiple dopamine transporter alleles in primates: implications for association with attention deficit hyperactivity disorder and other neuropsychiatric disorders*. *Mol Psychiatry*, 2001. **6**(1): p. 50-8.

31. Baumgarten, H.G., *Control of vigilance and behavior by ascending serotonergic systems*. 1993: p. 231-268.

32. Davids, E., Lesch, K.P., *The 5-HT1A receptor: a new effective principle in psychopharmacologic therapy?* *Fortschr Neurol Psychiatr.*, 1996. **64**(11): p. 460-72.

33. Greenberg, B.D., Li Q, Lucas, F.R., Hu S, Sirota, L.A., Benjamin, J., Lesch, K.P., Hamer, D., Murphy, D.L., *Association between the serotonin transporter promoter polymorphism and personality traits in a primarily female population sample*. *American Journal of Medical Genetics*, 2000. **96**: p. 202-216.

34. Lesch, K.P., Meyer, J., Glatz, K., Flugge, G., Hinney, A., Hebebrand, J., Klauck, S.M., Poustka, A., Poustka, F., Bengel, D., Mossner, R., Riederer, P., Heils, A., *The 5-HT transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) in evolutionary perspective: alternative biallelic variation in rhesus monkeys*. *Rapid communication.: J Neural Transm*, 1997. **104**(11-12): p. 1259-66.

35. Levy, E.R., Powell, J.F., Buckle, V.J., Hsu, Y.P., Breakefield, X.O., Craig, I.W., *Localization of human monoamine oxidase-A gene to Xp11.23-11.4 by in situ hybridization: implications for Norrie disease*. *Genomics*, 1989. **5**: p. 368.

36. Shih, J.C., Chen, K., Ridd, M.J., *Monoamine oxidase: from genes to behavior*. *Anni. Rev. Neurosci.*, 1999. **22**: p. 197.

37. Sabol, S.Z.H., S. Hamer, D., *A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter*. *Hum Genet*, 1998. **103**: p. 273-279.

38. Deckert, J., Catalano, M., Syagailo, Y.V., Bosi, M., Okladnova, O., Di Bella, D., Nothen, M.M., Maffei, P., Franke, P., Fritze, J., Maier, W., Propping, P., Beckmann, H., Bellodi, L., Lesch, K.P., *Excess of high activity monoamine oxidase A genepromotor alleles in female patients with panic disorder*. *Molecular Genetics*, 1999. **8**(4): p. 621-624.
39. Brunner HG, N.M., Breakefield XO, Ropers HH, van Oost BA, *Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A*. *Science*, 1993. **262**(5133): p. 578-80.
40. Caspi, A., McClay, J., Moffitt, T.E., Mill, J., Martin, J., Craig, I.W., Taylor, A., Poulton, R., *Role of genotype in the cycle of violence in maltreated children*. *Science*, 2002 Aug. **297**(5582): p. 851-4.
41. Tyrer P, S.C., *Monoamine oxidase inhibitors in anxiety disorders*. *J Psychiatr Res.*, 1987. **22**: p. 87-98.
42. Murphy, D.L., Mitchell, P.B. & Potter, W.Z., *Novel pharmacological approaches to the treatment of depression*. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*, 1994: p. 1143-1153.
43. Bennett, A.J., L.K., Heils, A., Long, J.C., Lorenz, J.G., Shoaf, S.E., Champoux, M., Suomi, S.J., Linnoila, M.V., Higley, J.D., *Early experience and serotonin transporter gene variation interact to influence primate CNS function*. *Mol Psychiatry*, 2002. **7**(1): p. 118-22.
44. Champoux, M., B.A., Shannon, C., Higley, J.D., Lesch, K.P., Suomi, S.J., *Serotonin transporter gene polymorphism, differential early rearing, and behavior in rhesus monkey neonates*. *Mol Psychiatry*, 2002. **7**(10): p. 1058-63.
45. Newman, T.K., Syagailo, Y., Barr, C.S., Wendland, J.R., Bennett, A.J., Champoux, M., Graessle, M., Suomi, S.J., Higley, J.D. & Lesch, K.P., *MAOA gene promotor variation and rearing experience Influences aggressive behavior in rhesus monkeys*.
46. Newton, C. and A. Graham, *PCR*. Spektrum Akademischer Verlag, 1994(2. Auflage).
47. Kappeler, M., WWF Conservation Stamp Collection, Groth AG, 1998.
48. Inoue-Murayama M, A.S., Mishima N, Mitani H, Takenaka O, Terao K, Hayasaka I, Ito S, Murayama Y., *Variation of variable number of tandem repeat sequences in the 3'-untranslated region of primate dopamine transporter genes that affects reporter gene expression*. *Neurosci Lett.*, 2002. **334**(3): p. 206-10.
49. Eley, T.C., T.E., Angleitner, A., Harriss, K., McClay, J., Plomin, R., Riemann, R., Spinath, F., Craig, I., *Association analysis of MAOA and COMT with neuroticism assessed by peers*. *Am J Med Genet*, 2003. **120B**(1): p. 90-6.

## 10. Veröffentlichung

J. R. Wendland, M. Hampe, T. K. Newman, Y. Syagailo, J. Meyer, W. Schempp, A. Timme, S. J. Suomi, K. P. Lesch, Structural variation of the *monoamine oxidase A* gene promoter repeat polymorphism in nonhuman primates, *Genes, Brain & Behavior* OnlineEarly, doi:10.1111/j.1601-183X.2005.00130.x

## Lebenslauf

## Michael Hampe

### PERSÖNLICHES

Name: Michael Hampe  
Adresse: Wendelinstraße 7, 63856 Bessenbach

Geburtsdatum: 26/02/1976  
Geburtsort: Aschaffenburg  
Religionsangehörigkeit: römisch katholisch  
Familienstand: ledig

### SCHULE

09/1983 - 07/1987 Grund- und Hauptschule in Hösbach Bhf  
09/1987 - 06/1995 Karl - Theodor - von Dalberg - Gymnasium in Aschaffenburg  
Allgemeine Hochschulreife

### ZIVILDIENTST

08/1995 – 09/1996 Zivildienstleistender beim Roten Kreuz Aschaffenburg

### STUDIUM

10/1996 - 07/2002 Studium der Zahnmedizin an der Universität Würzburg,  
07/2002 Approbation als Zahnarzt

### BERUF

04/2003- Vorbereitungsassistent in der Zahnarztpraxis Dr. Schäfer und Dr.  
Thielecke in Haibach

Bessenbach den 14.11.2005