

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik  
und Psychotherapie der Universität Würzburg  
Direktor: Universitätsprofessor Dr.med. J. Deckert

ANALYSE DER FREQUENZ POLYMORPHER  
REPETITIVER ELEMENTE INNERHALB  
DER PROMOTERREGION DES *PAX 7* GENS  
BEI PATIENTEN MIT SCHIZOPHRENIE  
UND EINER GESUNDEN VERGLEICHSPOPULATION

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Ella Willenbacher

aus Innsbruck

Würzburg, Januar 2009

**Referent:** Prof. Dr. K-P. Lesch

**Koreferent:** Prof. Dr. H. Einsele

**Dekan:** Prof. Dr. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 22.12.2009

**Die Promovendin ist Ärztin**

**WIDMUNG**

**Meine Jerry**

# INHALTSVERZEICHNISS

	SEITE
<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>001</b>
I.1.1 Das Krankheitsbild der Schizophrenie	005
I.1.2 Ursachen der Schizophrenie	010
I.1.3 Biomarker der Schizophrenie	011
I.2.1 Die Familie der <i>PAX</i> Gene	013
I.2.2 <i>PAX 7</i>	013
I.2.3 Die <i>PAX 7</i> Promoterregion	014
I.3. Aufgabenstellung und Ziele	019
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>020</b>
II.1 Material	020
II.1.1.1 DNA-Proben (Patienten und Probanden)	021
II.1.1.2 DNA-Proben (Nukleotide)	021
II.1.1 Geräte	022
II.1.2 Verbrauchsmaterial	023
II.1.3 Chemikalien, Puffer	023
II.2. Methoden	025
II.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA	025
II.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	026
II.2.3 Längenstandards	027
II.2.4 Southern Blotting	027
II.2.5 Radioaktive Markierung von DNS-Sonden	028
II.2.6 Aufreinigung radioaktiver DNS-Sonden	029
II.2.7 Radioaktive Sequenzierung mit [ $\alpha$ -S <sup>35</sup> ]dATP	030

	<b>SEITE</b>
II.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)	031
I.2.9 Statistik	035
<b>III. ERGEBNISSE</b>	<b>035</b>
III.1 <i>PAX7</i> - Promotorpolymorphismenfrequenz in der Kontrollgruppe	035
III.2 <i>PAX 7</i> Promotorpolymorphismenfrequenz bei Patienten mit Schizophrenie	036
III.3 Statistische Analyse der Unterschiede in der Frequenz der <i>PAX 7</i> Promotorpolymorphismen zwischen den Kontroll- und Untersuchungsgruppe	037
<b>IV. DISKUSSION</b>	<b>039</b>
IV.1 Interpretation der Verteilungsunterschiede der quantitativen Trinukleotidpromotorpolymorphismen des <i>PAX7</i> Promotors zwischen Kontroll- und Untersuchungsgruppe	039
IV.2 Zukünftige Anwendung der <i>PAX 7</i> Promotoranalyse	040
IV.3 Perspektiven der Biomarkersuche, insbesondere in der Psychiatrie	041
<b>V. SUMMARY &amp; ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>042</b>
<b>VI. ABBILDUNGSVERZEICHNISS</b>	
<b>VII. DANKSAGUNG</b>	

**SEITE**

**VIII. CURRICULUM VITAE**

**045**

**IX. LITERATURVERZEICHNISS**

**046**

## I. EINLEITUNG

### I.1.1 Das Krankheitsbild der Schizophrenie

#### Definition

Der Begriff der Schizophrenie wurde von *Bleuler*<sup>1</sup> 1911 in Ersatz des zuvor üblichen Terminus *Dementia praecox (Kraepelin)* geprägt. Er beschrieb 4 Grundsymptome (Assoziationslockerung, Affektstörung, Autismus und Ambivalenz), die er als Ausdruck einer Spaltung der Persönlichkeit und Verselbständigung seelischer Teilfunktionen interpretierte. Der moderne Schizophreniebegriff ist im Gegensatz hierzu in den gängigen Diagnosesystemen ICD-10<sup>2</sup> und DSM-IV<sup>3</sup> symptomorientiert und hat von der falschen Vorstellung einer *Persönlichkeitsspaltung* im engeren Sinne Abstand genommen.

#### Diagnose

Die schwerwiegende Diagnose einer Schizophrenie wird heute durch Überprüfung des Vorliegens definierter Kriterien verschiedener Wertigkeit, die das Auftreten positiver psychischer Phänomene (Wahn, Halluzinationen, ..), negativer Symptome (Sprachverarmung, Apathie, ..), aber z.B. auch sozial-berufliche Aspekte umfassen, gestellt (s. Tabelle 1).

#### Inzidenz

Untersuchungen zur Prävalenz der Schizophrenie ergeben kulturübergreifend Raten von 1.4 – 3.9/1000 Einwohner/Jahr. Auch die Inzidenz von Neuerkrankungen von ca. 0.1/1000 Einwohner/Jahr ist annähernd konstant (*Jablensky*<sup>4</sup>). Das Lebenszeitrisiko an einer schizophrenen Psychose zu erkranken liegt bei ca. 1%.

Es liegt zwar keine Geschlechtsdominanz vor, doch erkranken Männer durchschnittlich früher. Die Manifestationsformen sind soziokulturell überformt. Es handelt sich also um eine häufige Erkrankung.

## **Behandlung**

Die moderne Behandlung der Schizophrenie kombiniert medikamentöse, psychoedukative und psychotherapeutische Ansätze.

Insbesondere in der Akutphase steht die medikamentöse Therapie im Vordergrund. Leitsubstanzen sind mit dem Neurotransmitterstoffwechsel interagierende Neuroleptika (Dopaminantagonisten = typische Neuroleptika), neuerdings auch atypische Neuroleptika (Antipsychotika der 2-ten Generation) mit weniger ausgeprägten extrapyramidal-motorischen Nebenwirkungen. Auch Antidepressiva und Tranquillantien kommen zur Anwendung.

Unter dem Begriff Psychoedukation werden regulierende Absätze wie Sozio-, Arbeits-, und Ergotherapie subsumiert, wobei rehabilitative Aspekte hier im Vordergrund stehen.

Als psychotherapeutisch geeignet gelten strukturierte Vorgehensweisen z.B. mit verhaltenstherapeutischen Elementen, Gruppen- und Familientherapie.



**TABELLE 1 Diagnosekriterien der Schizophrenie nach ICD-10 & DSM-IV**

ICD	10 (F20)	DSM	IV
mindestens 1 Symptom	<p>Gedankenlautwerden, Gedankeneingebung Gedankenentzug, Gedankenausbreitung</p> <p>Kontrollwahn, Beeinflussungswahn Wahnwahrnehmung</p> <p>Gefühl des Gemachten</p> <p>kommentierende oder dialogische Stimmen</p> <p>bizzarrer Wahn</p>	mindestens 1 charakteristisches Symptom	<p>bizzarrer Wahn</p> <p>kommentierende oder dialogische Stimmen</p>
Oder mindestens 2 der Symptome	<p>anhaltende Halluzinationen jeder Sinnesmodalität</p> <p>Neologismen</p> <p>Gedankenabreißen Zerfahrenheit</p> <p>katatone Symptome -Haltungstereotypien -wächserne Biegsamkeit -Mutismus -Stupor, -Negativismus</p> <p>negative Symptome -Apathie, -Sprachverarmung -Affektverflachung -sozialer Rückzug, -verminderte soziale Leistungsfähigkeit</p> <p>eindeutige und durchgängige Veränderung des Verhaltens -Ziellosigkeit -Trägheit -Selbstverlorenheit, -sozialer Rückzug</p>	Oder mindestens 2 der Symptome	<p>Wahn</p> <p>Halluzinationen</p> <p>desorganisierte Sprechweise</p> <p>grob desorganisiertes oder katatones Verhalten</p> <p>negative Symptome -flacher Affekt -Alogie -Willensschwäche</p>
fast ständig oder während eines Monats oder länger		soziale/berufliche Leistungseinbußen in einem oder mehreren Funktionsbereichen	<p>Arbeit</p> <p>soziale Beziehungen</p> <p>Selbstfürsorge</p>
		Krankheitszeichen anhaltend für mindestens sechs Monate, davon mindestens ein Monat mit florider Symptomatik	

## **Verlauf & Prognose**

Als Faustregel aus vielen epidemiologischen Studien (*Ciampi*<sup>5</sup>, *Sartorius*<sup>6</sup>) kann extrahiert werden, daß sich bei ca. einem Drittel der Patienten die Psychose komplett zurückbildet, bei einem weiteren Drittel Residualsymptome verbleiben oder erneute Schübe auftreten, während das verbleibende Drittel der Patienten chronifiziert und häufig auch dauerhaft institutionalisiert werden muß.

Als günstige Prognosefaktoren gelten eine kurze floride Phase nach akutem Beginn der Symptome bei guter prämorbidem Anpassung, das Fehlen einer familiären Belastung, Beginn in höherem Lebensalter, Vorhandensein auslösenden Ereignisse, weibliches Geschlecht, Abwesenheit hirnstruktureller Abweichungen, gute Anpassung zwischen Krankheitsepisoden und das Vorhandensein begleitender affektiver Störungen.

Zusammen mit den Tatsachen, daß schizophrene Patienten, selbst im Vergleich zu anderen chronisch Kranken, eine subjektiv sehr niedrige Lebensqualität angeben und nur 20% schizophrener Patienten dauerhaft einer bezahlten Arbeit nachgehen (*Krüger*<sup>7</sup>), erschließt sich hier die enorme Multidimensionalität des Krankheitsbildes, das einen Bogen von individuellem und familiärem Leid bis zu gesundheitspolitischen, ja volkswirtschaftlich relevanten Größenordnungen spannt. So ist die Schizophrenie z.B. die häufigste Ursache von Frühverrentungen in Deutschland bei unter 40-jährigen (*Schnabe & Clouth*<sup>8</sup>)!

Möglichkeiten der Frühdiagnose mit der Möglichkeit der putativen Frühintervention würden daher eine potentiell überragende Bedeutung haben.

### I.1.2 Ursachen der Schizophrenie

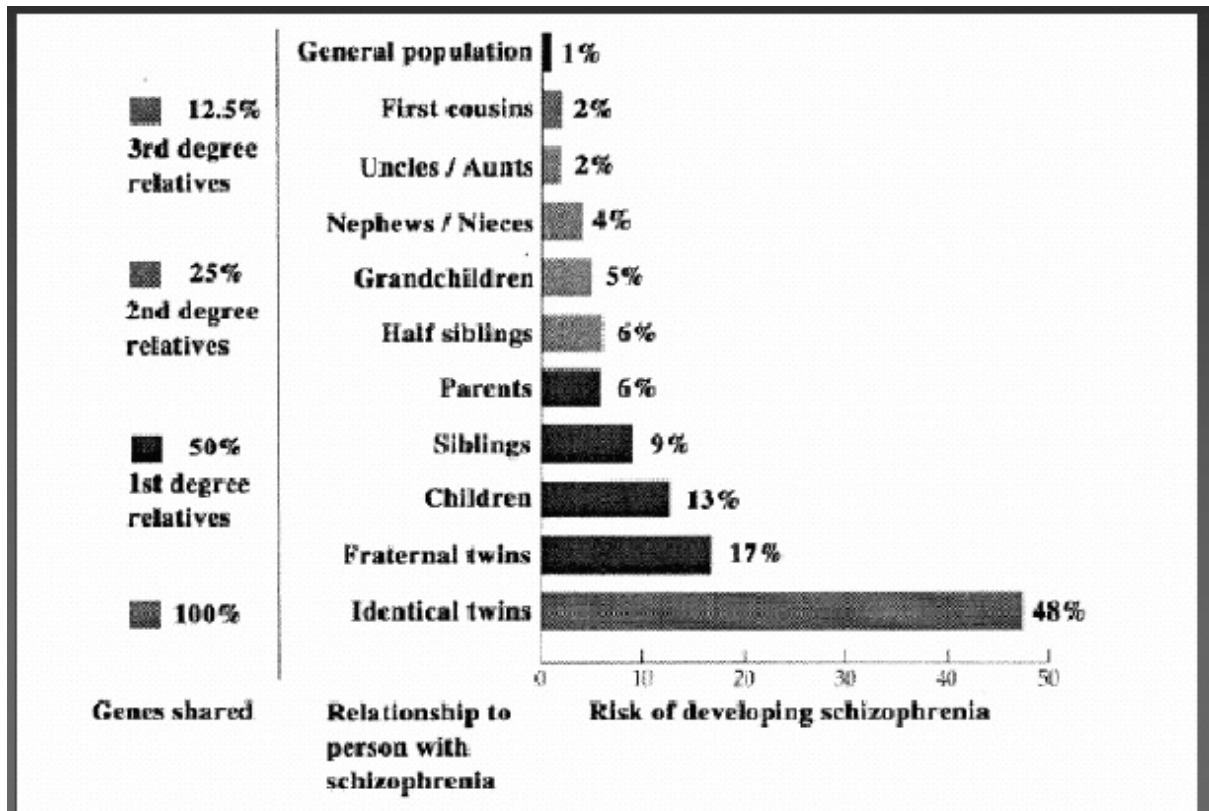
Aktuell gilt die Schizophrenie als multifaktoriell verursachte Erkrankung. Als zentrale Hypothese gilt das sogenannte Vulnerabilitäts-Streß-Modell (*Zubin*<sup>9</sup>, *Ciampi*<sup>10</sup>, *Nuechterlein*<sup>11</sup>), das im Sinne einer „soil and seed“ Hypothese postuliert, das die Psychose auf dem Boden genetischer und biographischer Risikofaktoren durch belastende Lebenssituationen und Umweltereignisse (z.B. Drogenmißbrauch) zum Ausbruch komme. Im Zentrum der Vulnerabilitätsforschung steht insbesondere die Funktion/Überfunktion der hypothalamisch–hypophysär-adrenalen Achse (*Thompson*<sup>12</sup>).

Der zentrale Beitrag genetischer Faktoren an der Genese schizophrener Psychosen wird durch die Ergebnisse der Zwillings-; Verwandtenforschung untermauert. So tragen eineiige Zwillinge eines Patienten eine 48%ige Krankheitskonkordanz, Nicht-Zwillingsgeschwister eine 9%ige und Cousinen, Onkel, Tanten etc. lediglich eine 2%iges Risiko ebenfalls an einer Schizophrenie zu erkranken (*Markon*<sup>13</sup>; vergleiche Abbildung 1).

Alle vorliegenden Befunde deuten auf ein polygenes Risiko-Ursachenprofil. Als Kandidatengene einer schizophrenen Veranlagung werden insbesondere das Dysbindin-Gen, das Neuroregulin-1 Gen und das G72/DAOA Gen postuliert (*Falkai*<sup>14</sup>). Die Expression bestimmter Haplotypen des Neuroregulin-1-Genes scheint nach diesen Ergebnissen mit kleineren Hypocampi-Volumina zu korrelieren. Interessanterweise sind strukturell anatomische Besonderheiten gerade für diese Hirnregion, ebenso wie im Bereich der Amygdala, des limbischen Systems und des Temporallappens beschrieben (Übersicht bei *Shenton*<sup>15</sup>). Bei der funktionellen PET-Untersuchung (Übersicht bei *Gross & Huber*<sup>16</sup>) zeigt sich häufig eine korrespondierende Minderaktivität frontaler Hirnregionen (sog. *Hypofrontalität*).

## Abbildung 1 Erkrankungsrisiko an Schizophrenie in Anhängigkeit vom Verwandtschaftsgrad

nach Markon, 2002<sup>13</sup>



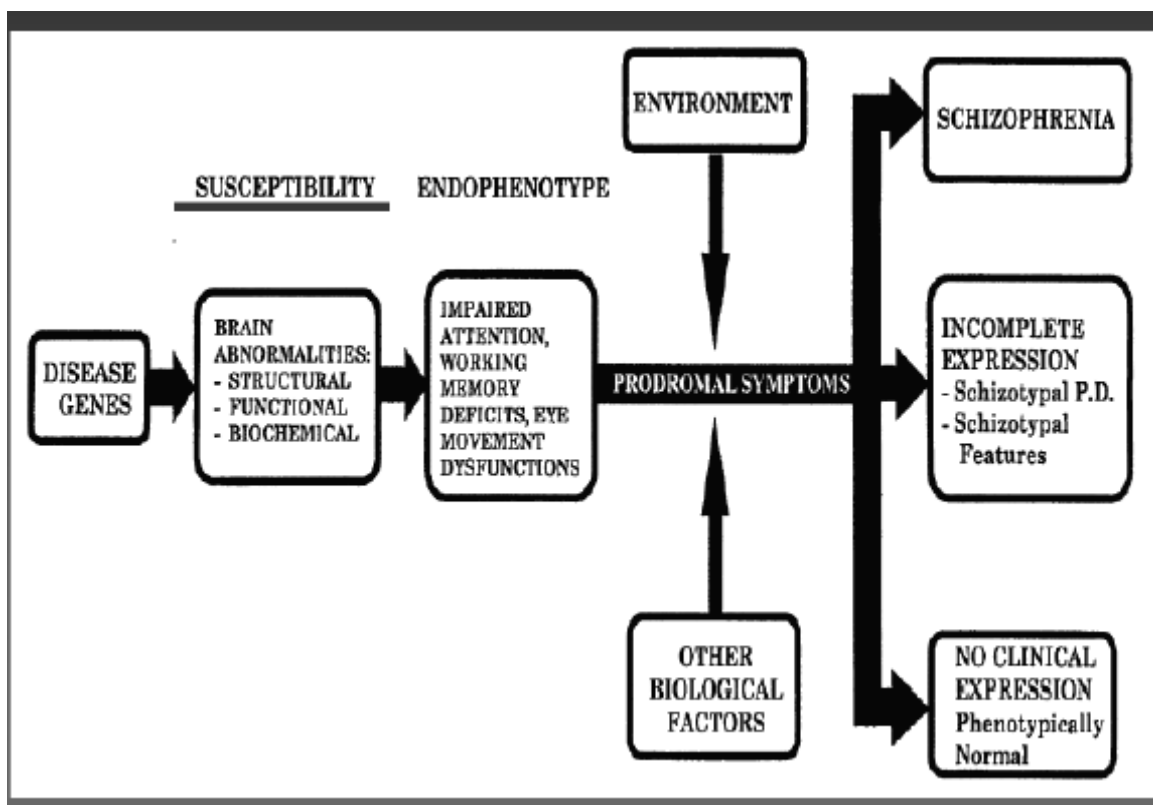
### I.1.3 Biomarker der Schizophrenie

Während einer schizophrenen Episoden kommt es auch zu erheblichen Stoffwechselveränderungen im Gehirn, wobei Änderungen des Neurotransmitter-metabolismus und hier vor allem des Dopamins zentrale Bedeutung zugeschrieben wird. Angenommen wird eine dopaminerge Überaktivität im limbischen System bei gleichzeitiger dopaminergischer Unteraktivität im Frontalhirn. Die Dopaminhypothese wird untermauert durch die therapeutische Wirksamkeit von den Dopamin D2-Rezeptor blockierenden Antipsychotika. Neben Störungen des Dopamin- werden auch Dysfunktionalitäten des Glutamat- (Théberge<sup>17</sup>) und Serotoninstoffwechsels (Roth<sup>18</sup>) diskutiert.

Unter Integration aller biochemischen, funktionell-bildgebenden, anatomischen und sonstigen Befunde wird die Schizophrenie heute häufig als Folgestörung einer *minimal brain dysfunction*, d.h. als Ausdruck einer neuro-genetischen Entwicklungsstörung interpretiert (Cornblatt & Malhotra<sup>19</sup>, Abbildung 2).

## Abbildung 2                      Neuro-Entwicklungsstörungsmodell der Schizophrenie

nach Cornblatt & Malhotra, 2001<sup>19</sup>.



### I.2.1 Die Familie der *PAX* Gene

*PAX* Gene (*paired-box-genes*) sind eine Familie gewebsspezifischer Transkriptionsfaktoren, die eine *paired-Domäne* (eine hochkonservierte 128-Aminosäuren umfassende saure DANN-bindende Domäne, die initial in Segmentationsgenen von *Drosophila* beschrieben wurde [Bopp et al.<sup>20</sup>]) und meistens auch eine *Homöodomäne* enthalten. Ein oktapeptidisches Sequenzmotiv ist i.d.R. vorhanden. *PAX* - Proteine sind in frühen Entwicklungsstadien wichtig bei der Steuerung, aber auch der tumorigenen Fehlsteuerung (Mercado & Barr<sup>21</sup>) der Differenzierung verschiedener Gewebe (Buckingham<sup>22</sup>) bzw. auch im Falle epimorpher Regeneration (Sato & Chernoff<sup>23</sup>) oder der Regeneration verletzter peripherer Nerven (Dezawa<sup>24</sup>).

Innerhalb der Klasse der Säugetiere gibt es 4 Gruppen von *PAX*-Genen:

<i>PAX</i> - Gruppe	1	( <i>PAX</i> 1 , 9)
<i>PAX</i> - Gruppe	2	( <i>PAX</i> 2, 5, 8)
<i>PAX</i> - Gruppe	3	( <i>PAX</i> 3, 7)
<i>PAX</i> - Gruppe	4	( <i>PAX</i> 4, 6)

### I.2.2 *PAX* 7

Auch für *PAX* 7 sind wichtige Funktionen bei der Steuerung der Gewebdifferenzierung von Skelettmuskulatur (Buckingham<sup>22</sup>, Péault et al.<sup>25</sup>), aber auch neuronaler Gewebe (Thompson et al.<sup>26</sup>, Ziman et al.<sup>27</sup>), sowie im Rahmen der Entstehung und Propagation maligner Tumore gut belegt (Mercado & Bar<sup>21</sup>, Béland & Bouchard<sup>28</sup>, Blake & Ziman<sup>29</sup>). Im Mäuseembryo wird *PAX* 7 ab dem 9ten Tag nach Empfängnis (d.p.c.) in der ventrikulären Zone des Neuralrohrs, in der neuronale Stammzellen für das gesamte ZNS und dermomyotomale Elemente, aus dem sich Muskelzellen ableitend generiert werden, exprimiert (Jostes et al.<sup>30</sup>). In frühen Entwicklungsstadien wird *PAX* 7 in allen

Hirnbläschen exprimiert, ab 11 d.p.c. findet sich PAX 7 Aktivität lediglich im Mesencephalon (*Jostes et al.*<sup>30</sup>). Die Wichtigkeit von PAX 7 zeigt sich auch darin, daß bisher keine Spontanmutationen beschrieben wurden. Homozygote Knock-out Mäuse, die innerhalb der ersten 3 postnatalen Wochen sterben, zeigen Mißbildungen im Gesichtsschädel (*Mansouri*<sup>31</sup>). Die Expression von PAX 7 wird in der normalen Gewebsgenese strikt in bestimmte Zelltypen (s.g. Satellitenzellen in der Muskulatur) reguliert, während Dysregulation oder das Auftreten veränderter PAX 7 Konstrukte (s.g. Fusionsprotein aus PAX 7 und FKHR) im Rahmen der Translokation t(1;13) beim alveolären Rhabdomyosarkom (*Davis et al.*<sup>32</sup>) mit pathologischen Zuständen vergesellschaftet ist.

### 1.2.3 Die PAX 7 Promoterregion

Angesichts der notwendigen (s.o.) restriktiven Regulation der Genexpression von PAX 7 lies eine intensive Charakterisierung der strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Promotorregion des Gens samt flankierender regulatorischer Abschnitte, Einblicke in generelle Regulationsmechanismen erwarten (*Syagilo et al.*<sup>33</sup>). In einer Serie eleganter Experimente konnten in dieser Arbeit folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

1. Mittels *Primer-Extension Analysis* und 5'-RACE wurden 2 Transkriptionsstartpunkte 640 bp und 664 bp stromauf des ATG Kodon in mRNA adulter Skelettmuskelzellen identifiziert. Das kleinere Extensionsprodukt könnte einem alternativen Synthesestartpunkt oder einem sekundären mRNA Degradationsprodukt entsprechen. Mittels 5'-RACE wurde der Transkriptionsinitiiierungspunkt mit einer geringen Diskrepanz im Verhältnis zu den Primär-Extensionsanalysergebnissen bei 655 bp (-9 bp) lokalisiert. Dies erklärt sich vermutlich aus der Anwesenheit GC-reicher Abschnitte in der mRNA

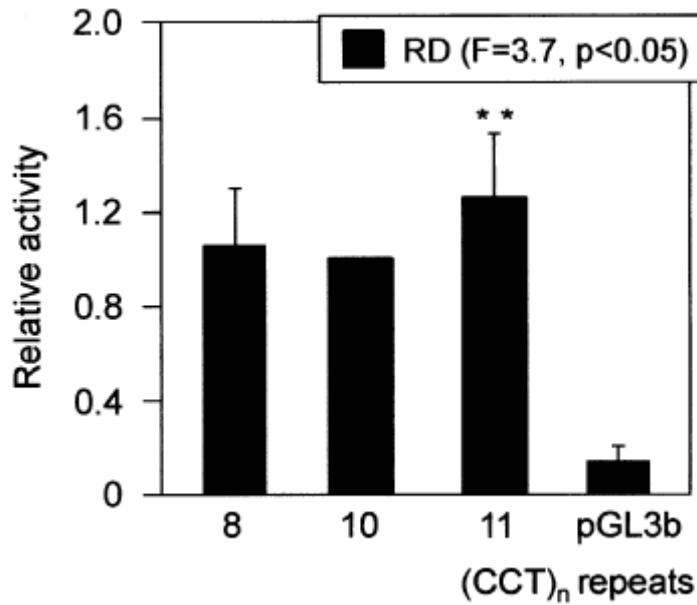
Sequenz, die zum vorzeitigem Abbruch der reversen Transkription des langen mRNA-Stranges vom poly(dT) Primer im Rahmen der 5'-RACE Prozedur führen kann. Die PAX 7 mRNA enthält also einen langen 5'-UTR von 664 Nukleotiden. Zelluläre mRNAs die komplexe 5'-UTR enthalten, unterliegen posttranskriptionellen Regulationen und kodieren in der Regel für regulatorische Proteine, Proto-Onkogene, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren und Homöodomänen von Transkriptionsfaktoren (*van der Velden & Thomas*<sup>34</sup>).

2. Mittels funktioneller in-vitro Analyse konnte das Fehlen einer klassischen Promotorstruktur in den Abschnitten stromauf des mRNA Initiierungspunktes gezeigt werden. Der PAX 7 Promotor ermangelt im Gegensatz, z.B. zur Struktur des humanen PAX 3 Genes (*Okladovna et al.*<sup>35</sup>), eine kanonische TATA Box und erinnert damit an die humanen PAX 2 und Maus PAX 4 genregulatorischen Regionen (*Stayner et al.*<sup>36</sup>, *Brink et al.*<sup>37</sup>).
3. Zahlreiche potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren konnten nach Sequenzierung stromab- und stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle identifiziert werden: Sp1, AP-2, AP-4, NF-1, MyoD, Oct1, Nkx2.5, CREB, sowie eine CCAAT- Bindungsstelle (negativer Orientierung). (s. Abbildung 3).
4. Die minimale Basisaktivität des PAX 7 Promotors wird von einer Region zwischen -70 und +373 bp erhalten. Die maximale Promotoraktivität für die Expression eines pBN Konstruktes findet sich zwischen -403 und +373 bp.  
Die gewebsspezifische Regulationssequenz findet sich also in erheblicher Entfernung vom Transkriptionsstartpunkt.
5. Die Aktivität von PAX 7 Gene konnte im Rahmen der o.g. Publikation erstmals im humanen Nicht-Embryonen Gehirn nachgewiesen werden. Mittels RT-PCR mit paired-Box-spezifischen Primern konnten PAX 7 Transkripte in cerebellärem,



temporalem und frontalem Kortex, subthalamischen Nuclei, Thalamus, Amygdala und Putamen nachgewiesen werden.

6. Des Weiteren konnte ein polymorphes repetitives Element (CCT)<sub>n</sub> 107 Basenpaare stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle, innerhalb der zentralen regulativen Zone, identifiziert werden. Diese zeigte Längenvariationen, im Sinne fixer Repetitionen in acht-, zehn- oder elffacher Wiederholungssequenz (CCT)<sub>8/10/11</sub>, innerhalb einer westeuropäischen Population (N = 277). Tripletwiederholungen finden sich zahlreich in eukaryoten Genomen und können Ursachen von Tripletexpansionkrankheiten sein (*Mitas*<sup>38</sup>). Die Ausbildung oder Behinderung der Ausbildung von Intrastrang- oder Interstrangfaltstrukturen, wie Haarnadelschleifen, tetraplexen und triplexen Komplexen ist für Tripletexpansionsstörungen beschrieben (*Kashi*<sup>39</sup>). Die Anwesenheit solcher Strukturen kann potentiell zu sterischen Interferenzen mit der DNS Replikation führen. So kann die DNS-Polymerase beim „Überfahren“ dieser Hindernisse kurzzeitige Kontaktverluste zwischen den Matrizen- und Kopierstrang erleiden, was wiederum Rasterverschiebungen (*frameshifts*) begünstigen kann. Auch die RNS-Polymerase kann potentiell entsprechend gestört werden.
7. Aufgrund der fixen Wiederholungssequenzen (CCT)<sub>8</sub>, (CCT)<sub>10</sub>, und (CCT)<sub>11</sub>, ergeben sich im diploiden Genom typische Permutationsmuster (Allele), die als 8/8, 8/10, 8/11, 10/10, 10/11 und 11/11 bezeichnet werden und in unterschiedlicher Häufigkeit vorliegen (Abbildung 4).
8. Die unterschiedlichen Allele gehen mit in Luciferase-Reportergen-Assays mit signifikant unterschiedlichen Promotoraktivitäten einher, wobei die (CCT)<sub>11</sub> Konstrukte eine signifikant höhere Promotoraktivität ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zu den (CCT)<sub>8</sub> und (CCT)<sub>10</sub>-haltigen Tripletkonstrukten (*Syagilo et al.*<sup>33</sup>, *Abbildung 3*) zeigt.

**Abbildung 3      Transkriptionsaktivität der PAX-7-LPR Allele***Y.V. Syagailo et al. / Gene 294 (2002) 259–268*Nach <sup>33</sup>

1.0 kB *EcoRI-NaeI* Fragmente, die die repetitiven 8-10 oder 11 (CCT)<sub>n</sub> Einheiten enthalten wurden mit einem Luciferase-Expressionsvektor fusioniert und in RD Zellen transfiziert. Luciferaseaktivitäten allelischer Konstrukte wurden relativ zum Allel (CCT)<sub>10</sub> berechnet und als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Allel 11 vs. 8 , bzw. 10 \*\*  $p < 0.05$  , ANOVA gefolgt von Fishers Exact-Test (PLSD).

## Abbildung 4 Nukleotidsequenz der PAX 7 Promotorregion

Y.V. Syagailo et al. / Gene 294 (2002) 259–268

265

```

      EcoRI      Nkx2.5      SmaI
-632  gaattcctcc cttcaagtca ccctaggccg gttcccgggg agcctcactg gaggaatttc
      Sp1
-572  agagggtgta agacgagggga gaagatgaga aatagggcgg actctggccc tcgagggcc
      AP4
-512  gagaaaaggc gagactccag agaggcgccg gacccgaggc agacattccc atacagccgg
      AP4      MyoD      BamHI
-452  gactccgaga gcagccgtgg gcacctgggg gccggggact cgccggatcc gccccattca
      NF-1      AP2
-392  tcaaaggaag gactgggac aaagtggcc ccctcccctt ctccccagc ccccaactcg

-332  ccgggatcgt ccctctcttt tcacggcggg tcaaattctc ccccaaaacg aggtcgagcc
      Oct1 / NF-1      CCAAT (-)
-272  ggggattaga aaagagggaa aaaaatattc gttggcgatt tcttttcgtt attggctctc
      NF-1      TATA-like motif
-212  cgctcccttg cgccctggcc cccttcctc ctcatgaata aaagaaaagt cgaacctat
      RsaI
-152  cagatcgcgc tactgcctc ctcctcctcc tctcctcct cctcctcgta cttcggtgaa
      PvuII/MyoD;AP4      AP2
-92   cacttttgca caacttacc agctgatcac tcgcgcccc tcgcttttcc atttctcttt
      Pe (+1) ↓ Race ↓ Pe
-32   ccccaacccc gtcacccct gtctcctccg tccagccctg aaaccgagg aggtccttc
      SmaI
+29   ttccgtctgt ccccgggtct cctaggggac ggggtgtGA AAGCTGGTGT GGAGGGAGAA
      ← P7-6 P7-7
+89   GCGAGTGTGG TCCGAGAGAA GAAGCGTGG AGAAGAGGGA GGGAGCGAGA AGCGGAGAAT

+149  AAATATATAA ATAATACGA GAACGAAATC CACTCCGAG TCTCCGGGCT CGGAACTTT
      NF-1;AP2
+209  GGCCCCGAGC GCCAGAGCGC CAGAGCGCGA GAGCGCGGCG CTCGCCACTC TGAGGCTGGC
      AP2      SacII
+269  GGCCTCGATT CCGGCCGCGT TCCCCCGGCC CCCCTCCGCC GCGGGCCTG GTCTCCGGT
      AP4      NaeI
+329  TCTGCCAGGC GCATCAGCCC GCACAATTC TGGCCGAGGC CAGCCGGCAG AGGCGGACTT

+389  GGGGTGGAG TGTGTGTTG TTTGAACTTC CTCGTCGTCG CCACCTTCCC TCCCCCAAC
      PstI
+449  CTCCACCCCA CCTCACCCCC CTCCCAGCT TCTGGACGCG TTTGACTGCA GCCAGGGGTG

+509  GGGGGTGGGG GTAGGGAGTG TGTGTGGAGG GGAGGGAGAA GAGGTAAAA AAAAGAAGAC

+569  GAAGAAGACG GAAAGAAAGA GATCGCAGCA GGGTGAAGG GAGCGGACGG GAAGCGATTT

+629  TTGCCGACTT TGGATTCGTC CCCGGCGTGC GCAAGAATGG CGGCCCTTCC CGGCACGGTA
      ←
+689  CCGAGAATGA TGCGGCCGGC TCCGGGGCAG AACTACCCCC GCACGGGATT CCCTTTGGAA
      P7-5      M A A L P G T V
      P R M M R P A P G Q N Y P R T G F P L E

```

Fig. 5. Nucleotide sequence of the first exon in uppercase and a partial 5'-flanking region of the human *PAX7* gene (EMBL/GenBank accession number: AJ130875). Restriction endonuclease sites used to generate deletion constructs are indicated. The transcription start sites detected by primer extension and 5'-RACE assays are denoted by arrows. Numbering of the sequence is relative to the major upstream transcription start site (+1). Consensus sequences for DNA-binding proteins (TATA-like motif; AP-2; AP-4; NF-1; MyoD; Oct1; Sp1; CCAAT (-) and the (CCT)<sub>n</sub> repeat are underlined.

### 1.3. Aufgabenstellung und Ziele

Die bisherigen Ausführungen können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

- A) Schizophrene Psychosen haben eine hohe Inzidenz, Morbidität und Mortalität und gehen mit erheblichem Leid und Folgekosten für Patient, Familie und Gesellschaft einher.
- B) Eine Frühdiagnose mit potentiell möglicher konsekutiver Frühintervention ist derzeit nicht möglich.
- C) Molekulare Biomarker des Erkrankungsrisikos (prospektive Marker) sind bisher nicht verfügbar.
- D) Die Erkrankung kann im multifaktoriellen Konzept auch als „*neurodevelopmental disorder*“ im Sinne einer minimalen Hirndysfunktion aufgefaßt werden.
- E) PAX 7 ist ein eng regulierter Transkriptionsfaktor, der eine große Rolle in der Steuerung der frühen ZNS-Entwicklung spielt und potentiell auch eine Rolle an Fehlentwicklungen beteiligt sein kann.
- F) In der Promotorregion von PAX 7 existieren potentiell mit der Funktion und gesichert mit der Expressionsaktivität interferierende Polymorphismen, deren Eignung als Biomarker der Schizophrenie zu überprüfen ist, zumal andere quantitativen Trinukleotidpolymorphismen im Verdacht stehen mit der Entstehung von Psychosen assoziiert zu sein (*Sasaki<sup>40</sup>, et al.*)

Ziel der Dissertation war also die Überprüfung der Korrelation der Häufigkeitsverteilung verschiedener PAX 7 Promotorpolymorphismen mit der Diagnose Schizophrenie im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation ausreichender Größe, und damit die Beantwortung der Frage ob mit den PAX 7 Promotorpolymorphismen ein prospektiver Biomarker der Schizophrenie zur Verfügung steht. Als Methode fungierten Test auf DNS-Ebene (s. II).

**Abbildung 5 Allelfrequenz von PAX 7-LPR**

nach Syagailo, 2002<sup>33</sup>.

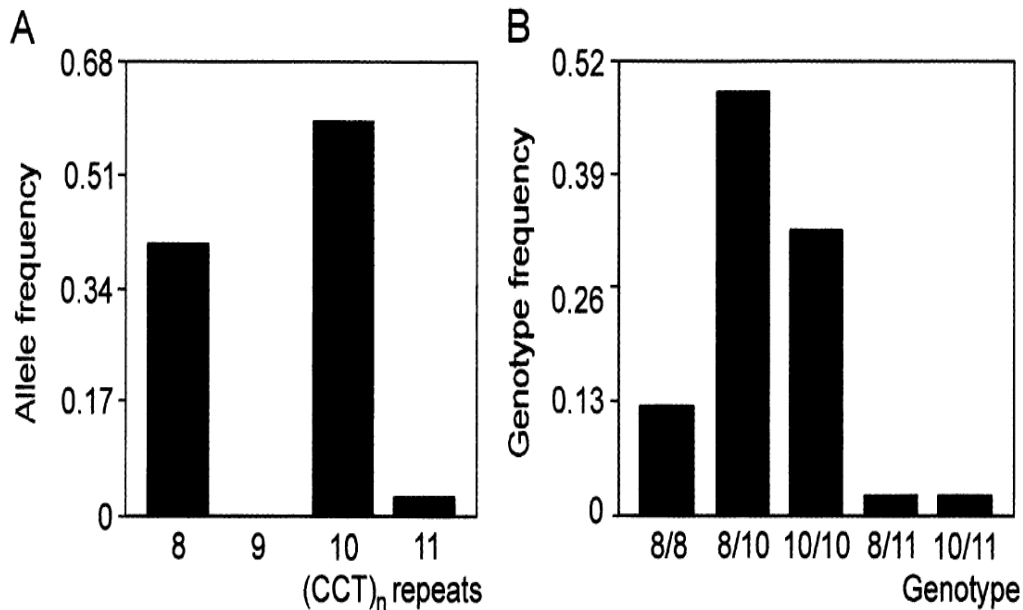


Fig. 7. (A) Allele frequencies of the PAX7-LPR in unrelated individuals ( $N = 227$ ). (B) Genotype frequencies of the PAX7-LPR.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### II.1 Material

#### II.1.1.1 DNA-Proben (Patienten & Probanden)

Für die Assoziationsstudie wurde DNA von 280 Patienten mit Schizophrenie entsprechend der Klassifikation nach DSM-IV<sup>3</sup> aus Blutproben isoliert. Es handelt sich um Proben von Patienten der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg und des psychiatrischen Krankenhauses in Lohr am Main. Entsprechendes Kontrollmaterial konnte von 229 gesunden Blutspendern (134 Männer, 95 Frauen, Alter 29.9 +/- 10.1 Jahre) aus dem Blutspendezentrum der Universitätsklinik Würzburg gewonnen werden. Alle Probanden waren ethnische Kaukasier und nicht untereinander verwandt. Die Kontrollgruppe kann als repräsentativ für Region der Untersuchung eingeschätzt werden mit einer epidemiologischen Wahrscheinlichkeit von c. 1% für das Auftreten einer psychischen Erkrankung. Unter den Patienten (174 Männer; 107

Frauen) betrug das durchschnittliche Erkrankungsalter bei Erstdiagnose 26.8 +/- 9.4 Jahre. Die Diagnose wurde gemäß den OPCRIT-Kriterien auf der Basis eines semistrukturierten klinischen Interviews und der Anamnese gestellt (*Williams et al.*<sup>41</sup>). Die Erkrankung wurde entsprechend den DSM-IV Kriterien als paranoider Untertyp (295.3, n=84), desorganisierter, katatoner oder nicht-differenzierter schizophrener Untertyp (295.1, 295.2, 295.6, 295.9, n=142) bzw. als schizoaffektive Psychose (295.7, n=55) subklassifiziert. Für die molekulargenetischen Studien an material schizophrener Patienten lag ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Universität Würzburg vor. Alle Probanden erteilten ihre ausdrückliche, schriftliche Zustimmung zur Teilnahme an der Untersuchung nach entsprechender, ausführlicher ärztlicher Aufklärung.

#### II.1.1.2 DNA-Proben (Nukleotide)

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen und standardisiert in einer Konzentration von 100µM gelöst. Die Primer zur Erfassung der PAX-7 LPR Polymorphismen wurden als **p7 Rep V** (P7-5) und **p7 Rep L** (P7-9) bezeichnet. Sie trugen die folgenden Nukleotidsequenzen:

**P7 Rep V (P7-5):**      5' CGT TAT TGG TCC TCC GCTC 3'

**P7 Rep L(P7-9):**      3' TAC CCA GCT GAT CAC TCG CG 5'

Die Bezüge dieser Sequenzen zur PAX-7 Promotorregion , insbesondere den repetitiven (CCT)<sub>n</sub>-Triplet-Elementen sind Abbildung 5 zu entnehmen.

**Abbildung 6 Genomische Struktur der 5' flankierenden Region des humanen PAX-7 Gens mit Lokalisation der verwendeten Primer**  
nach Syagailo, 2002<sup>33</sup>

262

Y.V. Syagailo et al. / Gene 294 (2002) 259–268

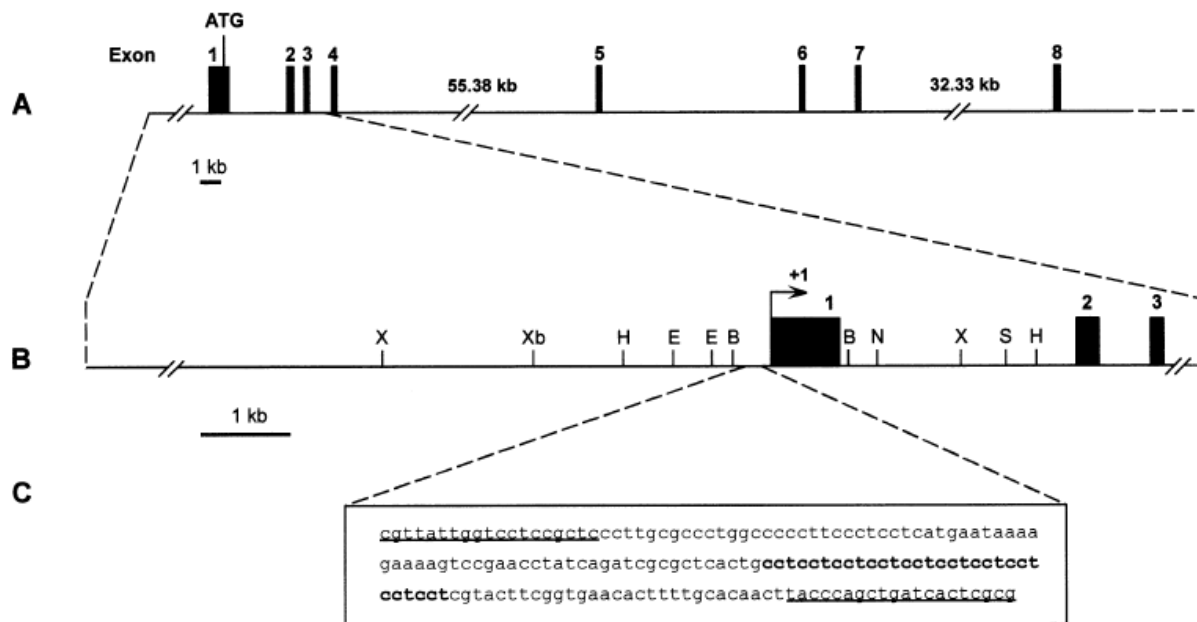


Fig. 1. Genomic structure of the 5'-flanking regulatory region of the human PAX7 gene. (A) Schematic representation of the PAX7 gene physical map based on the Homo sapiens DNA sequence from PAC 394P21 (Accession number: AL021528). Exons are shown as black boxes. (B) Partial restriction map of the human PAC genomic clone RPCIP704B248Q25. X, XhoI; Xb, XbaI; H, HindIII; E, EcoRI; B, BamHI; N, NotI; S, Sall restriction sites. The transcription start site is indicated. (C) Nucleotide sequence of the PAX7 gene-linked polymorphic region (PAX7-LPR; underlined sequences represent PCR primers P7-8 and P7-9). The (CCT)<sub>n</sub> repeat is shown in boldface type.

## II.1.2 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer  
Geltrockner  
Sorvall Zentrifuge Typ RC5C  
Polaroidkamera  
Polyacrylamid-Gelelektrophoresekammer  
Szintillationszähler (LS 5000 TD)  
Thermoblock  
Thermocycler  
Software MacMolly<sup>TM</sup>Analyse  
Tischzentrifuge (Biofuge pico)  
Spektralphotometer Typ 552S  
SpeedVac  
UV Tansilluminator

Peqlab Biotechnologie, Erlangen  
Biometra, Göttingen  
Kendro, Hamburg  
Sigma, Deisenhofen  
Stratagene, Amsterdam, NL  
Beckmann  
Renner GmbH, Darmstadt  
Biometra, Göttingen  
Biometra, Göttingen  
Heraeus, Hanau  
PE, Applied Biosystems, Heidelberg  
Schütt Labortechnik, Göttingen  
MWG Biotech, Ebersberg

### II.1.3 Verbrauchsmaterial

Blottingpapier GB-003	Schleicher & Schüll, Dassel
Erlenmeyerkolben	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Autoradiographiefilme X-OMAT AR	Kodak
Membranfilter	Millipore, Eschborn
Hybond-N Membran	Amersham-Buchler, Braunschweig
Petrischalen	Greiner-Nunc, Frickehausen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polaroid-Filme (665, 667)	Sigma, Deisenhofen
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
„Sephadex G-50-NICK“-Säule	Amersham-Buchler; Braunschweig
3MM-Whatman-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Zentrifugengefäße und –Röhrchen	Beckmann, München

### II.1.4 Chemikalien, Puffer, Enzyme, Biochemika

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck KGa (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) in p.a. Qualität bezogen.

Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose-Seakem	Biozym, Olendorf
Agarose-NuSieve	Biozym, Olendorf
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
BSA	GIBCO BRL, Karlsruhe
dNTP Sets (100mM)	MBI Fermentas , St.Leon-Rot
NTP	MBI Fermentas , St.Leon-Rot
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Merck KGa , Darmstadt
Formaldehyd	GIBCO BRL, Karlsruhe
Formamid	Fluka, Neu-Ulm
<i>Gel slick Solution</i>	BMA, Rockland, USA
<i>Gene Ruler<sup>TM</sup> 100 bp_DNA-Leiter</i>	MBI Fermentas , St.Leon-Rot
<i>Genetic Analyzer Buffer 10x</i>	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Glycerin	GIBCO BRL, Karlsruhe
Glukose	Merck KGa , Darmstadt
Goldstar <sup>TM</sup> , <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Eurogentec, SDeiraing, Be
$\lambda$ -DNS Marker 15	MBI Fermentas , St.Leon-Rot
pUC19 DNS Marker 23	MBI Fermentas , St.Leon-Rot
Isopropanol	Merck KGa , Darmstadt
PBS	GIBCO BRL, Karlsruhe
Radioaktiv markierte Nuklide:	Hartmann Analytic GmbH
$[\alpha\text{-P}^{32}]$ dCTP, $[\gamma\text{-P}^{32}]$ ATP, $[\alpha\text{-P}^{32}]$ UTP,	Braunschweig
$[\alpha\text{-S}^{35}]$ dATP $\alpha$ S	
Restriktionsendonukleasen	BioLabs, GIBCO, Roche
i.E.	<i>Eco91I</i> , <i>MspI</i>
T3-RNS-Polymerase	MBI Fermentas , St.Leon-Rot



T7-DNS Polymerase	MBI Fermentas , St.Leon-Rot
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Wasser, HPLC Qualität	Merck KGa, Darmstadt
Xylencyanol	Sigma, Deisenhofen

### Reagenziensätze „Kits“

Advantage 2 PCR Kit	Clontach Paolo Alto, USA
„Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Expand™ Long Template PCR System	Roche, Mannheim
Prima-a-Gene Labeling Kit	Promega, Mannheim
<sup>17</sup> T Sequencing™ Mixes	Amersham-Buchler, Braunschweige

### Puffer & Stammlösungen

MgCl <sub>2</sub> -CaCl <sub>2</sub> -Lösung	80 mm	MgCL <sub>2</sub>
	20 mm	CaCl <sub>2</sub>
Stopp-Puffer	97.5 %	Formamid
	10 mM	EDTA (pH 8.0)
	0.3 %	Bromphenolblau
	0.3 %	Xylencyanol
1 x TAE-Puffer	40 mM	Tris-Acetat
	1 mM	EDTA (pH 8.0)
1 x TBE-Puffer	90 mM	Tris-Borat
	2 mM	EDTA (pH 8.0)
10 x TE-Puffer (pH 7.5)	100 mM	Tris-HCL (pH 8.0)
	10 mM	EDTA (pH 8.0)
1 x TE-Puffer	10 mM	Tris-HCL (pH 8.0)
	1 mM	EDTA (pH 8.0)
6 x Probenpuffer	0.25 %	Brompenolblau
	0.25 %	Xylencyanol
	30 %	Glycerin
	50 mM	EDTA

Harnstoff-Acrylamid Lsg.(6%)	120	ml	Konzentrat
(Rotiphorese-Sequenziersystem)	330	ml	Verdünner
	50	ml	Pufferkonzentrat

### Southern Blotting

Depurinierungslösung	0.2	M	HCl
Denaturierungslösung	1.5	M	NaCl
	0.5	M	NaOH
Neutralisierungslösung	1	M	Tris-HCl (pH 7.4)
	1.5	M	NaCl
20 x SSC	3.0	M	NaCl
	0.3	M	Na-Citrat (pH 7.0) eingestellt mit 14 N HCl

### Radiomarkierung

Reaktionspuffer 5 x	235	mM	Tris-HCl (pH 8.3)
	15	mM	MgCl <sub>2</sub>

## II.2. Methoden

Standardmethoden wurden, wenn nicht anders angegeben nach (*Sambrock & Russell*<sup>42</sup>) oder (*Ausubel*<sup>43</sup>), durchgeführt. Reagenzien und Proben zur Durchführung enzymatischer Reaktionen wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt und sofern nicht anders beschrieben, mit den mitgelieferten Puffern verwendet.

### II.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA

Die exakte Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren ist zur Durchführung molekularbiologischer Analysen in der Regel unabdingbar. Die Konzentrationen wurden mit einem Spektralphotometer (s. Material) bestimmt. Nach Abgleich des Nullwertes wurde das Adsorptionsmaximum der Nukleinsäuren (260 nm) bzw. von verunreinigenden Proteinen (280 nm) oder Salzen (230 nm) bestimmt.

Die Nukleinsäurekonzentration ergibt sich dann nach der Formel:

$$C = E_{260} \times f \times c, \text{ wobei}$$

$C$  = Konzentration der Probe in  $\mu\text{g/ml}$

$E$  = Messwert der Extinktion bei 260 nm

$c$  =  $\text{Konzentration}_{\text{Standard}} / \text{Extinktion}_{\text{Standard}}$

$f$  = Verdünnungsfaktor

für doppelsträngige DNS  $c = 50 \mu\text{g/ml}$

für einzelsträngige DNS  $c = 33 \mu\text{g/ml}$

$E_{230}$  Adsorptionsmaximum von Salzen

$E_{260}$  Adsorptionsmaximum von RNS/DNS

$E_{280}$  Adsorptionsmaximum vieler Proteine

Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  beschreibt die Reinheit einer Nukleinsäureprobe und sollte 2.0 +/- 0.2 betragen.

## II.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Identifikation von DNS-Fragmenten wurde eine analytische bzw. präparative horizontale Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen in Seakem-Agarose (II.1.4) verwendet. Diese wurde, je nach zu analysierender Fragmentgröße in Konzentrationen zwischen 0.8 – 2.0 % verwendet. Für eine feine Auflösung von PCR-Produkten wurde NuSieve-Agarose (II.2.4) in 3-4%iger Konzentration eingesetzt. Zur Gel-Herstellung wurde die Agarose mit entsprechender Menge des 1 x TAE-Puffer aufgekocht und Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0.4  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt. Nach Abkühlen der Lösung unter 60°C wurde das Gel in die entsprechenden Gelträger gegossen. Nach Verfestigung des Gels konnte, dann die Elektrophorese bei konstanter

Spannung (5-10 V/cm) in einer mit 1xTAE Puffer gefüllten Gelkammer durchgeführt werden. Die DNS Proben wurden vor ihrem Auftrag mit 1/5 Volumen des 6x Probenpuffer versetzt. Durch den Zusatz von Ethidiumbromid fluoresziert die DNS unter UV-Licht bei 312 nm, was die Identifikation spezifischer Bandenmuster, ihre Photodokumentation mit einer Polaroidkamera (II.1.2) auf Polaroidfilm (II.1.3) und gegebenenfalls ihre Re-Isolierung ermöglicht. Zur Vermeidung von DNS-Schäden wurde im letzten Falle nur langwelliges UV-Licht (365 nm) eingesetzt.

### II.2.3 Längenstandards

Zur Zuordnung der Größe von DNS-Fragmenten wurden Proben bekannter Größe zwischen in Mengen von 300-600 ng als Marker aufgetragen. Als Marker DNS dienten *Eco91I* (*Bst* EII) geschnittene  $\lambda$ -DNS (II.1.4). Zur Abschätzung diente kleiner Fragmente mit *MspI* (*HpaII*) geschnittene pUC19 Plasmide (II.1.4). Bei diesen Spaltungen traten die ff. Fragmente auf:

1)  $\lambda$ -DNS/ *Eco91I* (*Bst* EII) Verdau:

8453 bp, 7242 bp, 6369 bp, 5687 bp, 4822 bp, 4324 bp, 2323 bp, 1371 bp, 1929 bp, 1371 bp, 1264 bp, 702 bp, 117 bp.

2) pUC19-DNS/ *MspI* (*HpaII*) Verdau:

501 bp, 489 bp, 404 bp, 331 bp, 242 bp, 190 bp, 147 bp, 111 bp, 110 bp, 67 bp, 34 bp, 26 bp.

### II.2.4 Southern Blotting

Mit Hilfe des *Southern-Transfers*<sup>44</sup> wurden DNS-Fragmente aus Agarosegelen auf Nylonmembranen übertragen. Zuerst wurden die Gele nach Abschluß des elektrophoretischen Trennprozesses bei 312 nm fotodokumentiert, um eine spätere

Zuordnung der Röntgenfilmschwärzungen zu den DNS-Bandenmustern im Agarosegel zu gewährleisten.

Es folgten:

- eine 15-minütige Schüttelinkubation in Depurinierungslösung (II.1.4)
- Inkubation 30 Minuten in Denaturierungslösung (II.1.4)
- 2 x 15 minütige Waschschrte in Neutralisierungslösung (II.1.4)
- der luftblasenfreie Transfer auf 10 x SSC (II.1.4) befeuchtetes Filterpapier
- Abdecken der Gelränder mit Haushaltsfolie (so kann der Kapillartransport des Puffers nur durch das Gel erfolgen)
- Auflegen einer passend zugeschnittenen *Hybon-N Membran* und 2er weiterer ebenfalls 10x SSC getränkten Filterpapiere
- Auflage mehrerer Lagen saugfähigen Zellstoffes zur Steigerung der Kapillardiffusion
- Auflegen einer Glasplatte und Beschweren mit einem 500g schweren Gewicht

Der Transfer erfolgte nun über mindestens 6 h bei RT. Nach Markierung der Geltaschen auf der Membran wurde diese abgenommen, 2 x in SSC kurz gewaschen und auf frischem Filterpapier luftgetrocknet. Zur Immobilisierung der DNS die Membran schließlich 30 s in einem Transilluminator (254 nm) bestrahlt. Die Membranen wurden in Haushaltsfolien gewickelt bei 4° c gelagert.

## II.2.5 Radioaktive Markierung von DNS-Sonden

Zur radioaktiven Markierung der DNS-Sonden wurde der „*Prima-a-Gene Labeling Kit*“ (II.1. 4) verwendet, der auf der Methode des „*random priming*“<sup>45</sup> beruht. Diese Methode ermöglicht eine hohe Ausbeute an spezifisch radioaktiv markierten DNS-Sonden ( $> 1 \times 10^9$  cpm/ $\mu$ g DNS). Die Markierung erfolgte mit [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>] dCTP durch

Synthese des komplementären DNS-Stranges einer Einzelstrang-DNS mit Klenow-polymerase und *Random*-Hexanukleotid –Primers (II.1.4)

Der Markierungssatz wurde folgendermaßen angesetzt:

X	µg	DNS	(25-50 µg)
Y	µl	dH <sub>2</sub> O	
10	µl	5 x Reaktionspuffer	
2	µl	dNTPs Mischung	enthält die 3 nicht markierten Nuklide
2	µl	Nuklease-freies BSA	
5	µl	[α-P <sup>32</sup> ]dCTP	(3000 Ci/mmol; 10 mCi/µl)
2	µl	Klenow-Polymerase	(5 U)

Die DNS wurde mit der entsprechenden Menge bindet für 2 min. bei 95-100°C denaturiert, zügig auf Eis überführt und die restlichen Komponenten zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 60 min. bei RT. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 95°C/2 Minuten beendet und nicht verbrauchte Nukleotide über eine „*Sephadex G-50-NICK*“-Säule abgetrennt. Die Einbaurate markierter Nukleotide liegt im Mittel bei 40-80% .

### II.2.6 Aufreinigung radioaktiver DNS-Sonden

erfolgte mittels Gelfiltration über eine „*Sephadex G-50-NICK*“-Säule (II.1.4), wobei nicht verbrauchte Nukleotide und andere niedermolekulare Substanzen abgetrennt wurden. Dazu wird die Säule mit 3 ml TE-Puffer (pH 7.5) (II.1.4) äquilibriert und 100 µl Markierungsreaktion aufgetragen. Danach werden 400 µl 1 x TE-Puffer (pH 7.5) pipettiert, der Durchlauf gesammelt und verworfen. Nach Auftrag weiterer 400 µl 1x TE-Puffer wird das Eluat in Fraktionen á 3 Tropfen gesammelt und mittels Geiger-

Müllerschem Zählrohr markierte Fraktionen identifiziert. Aktivität und Qualität der Probe, sowie die Bestimmung der nötigen Verdünnung bei weiteren Analysen, wurde die Messung einer Probe von 1 µl im Szintillationsmeßgerät (II.1.2) bestimmt.

### **II.2.7 Radioaktive Sequenzierung mit [ $\alpha$ -S<sup>35</sup>]dATP**

Für die radiomarkierte Sequenzierung wurde ein kommerzieller Voll-Sequenzierungskit (II.1.4) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

Zur Erzeugung von Einzelstrang DNS wurden 1.5 – 2 µg Plasmid DNS in 10 µl dH<sub>2</sub>O mit 8 µl 1N NaOH versetzt und bei RT 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 3 Vol.% 96% Ethanol wurde die DNS für 20 min bei -70°C ausgefällt. Die Proben wurden im Anschluß 15 min bei 12 000 g und 4°C zentrifugiert, das Pellet mit kaltem 70%igem Ethanol (300 µl) gewaschen und in einer *Speed Vac* getrocknet. Dem in 10 µl eiskaltem dH<sub>2</sub>O resuspendierten Pellet auf Eis 2 µl Primer (1 pmol/l) und 2 µl Annealingpuffer zugesetzt, dann die Reaktion bei 37° C für 20 min gestartet. Der Ansatz wurde dann mit 1 µl dH<sub>2</sub>O, 3 µl Labelling-Mix-dATP, 1 µl [ $\alpha$ -S<sup>35</sup>]dATP (10 µCi/µl) sowie 2 µl verdünnter T7-DNS Polymerase(1.5 U/µl) (II.1.4) gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Je 4.5 µl dieser Reaktionsgemische wurden zu je 2.5 µl der bei 37° C für 1 min vorgewärmten „Stop-Mixe“ A, C, G und T zugesetzt und vorsichtig vermischt. Nach weiteren 5 min bei 37° C wurden je 7 µl Stoppuffer hinzu gegeben. Die Sequenzierungsreaktionsansätze wurden bis zum Auftrag auf das Sequenzierungsgel bei -20° C aufbewahrt. Kurz vor der eigentlichen Sequenzierungselektrophorese wurden die Analyte bei 95° C 3 min denaturiert, sofort eisgekühlt und dann á 6 µl auf ein 6%iges denaturierendes Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen.

## II.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

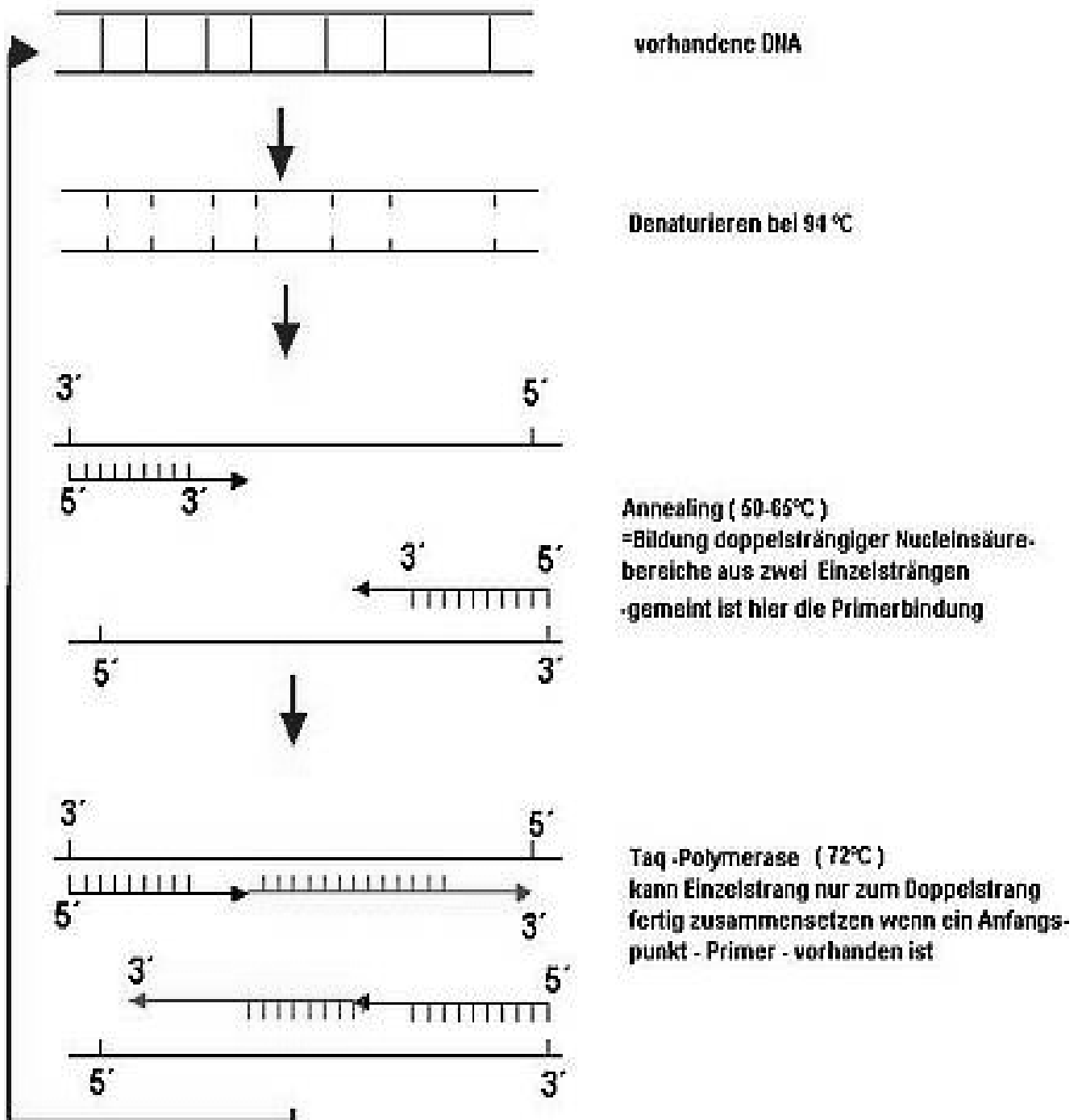
Mit Hilfe der PCR können kleinste Mengen an genetischem Material vervielfältigt (amplifiziert) werden, was dessen weitere Untersuchung ermöglicht<sup>46</sup>. Dazu werden 2 synthetische Oligonukleotide benötigt, die jeweils komplementär zu den 3' und 5' Enden des zu amplifizierenden DNS-Fragments sind. Die Elongation dieser Primer wird durch die Taq-DNS-Polymerase in 5' -> 3'-Orientierung katalysiert. Die Taq-DNS-Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus*<sup>47</sup>, das eine optimale Amplifizierungstemperatur von 72° C besitzt. Durch repetitive Zyklen die aus : Denaturierung der DNS, nachfolgendem Annealing der Primer und Synthese des jeweils zweiten DNS-Stranges bestehen, wird der DNS-Abschnitt, der durch die beiden Primer begrenzt ist, amplifiziert. Dabei dient der neugebildete Strang als Matrize für folgende Synthese eines weiteren, so daß insgesamt ein exponentieller Anstieg der Menge des gesuchten DNS-Abschnittes erzielt wird. Nach 30-40 Zyklen liegt die c. 10<sup>6</sup>-fache Kopienzahl im Vergleich zur Ausgangsprobe vor (!).

Ein Reaktionsansatz enthielt 1/10 Volumen 10 x Taq-Polymerasepuffer, 1 – 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM jedes dNTP, 0.4 pmol/µl jeden Oligonukleotidprimers, 0.5 – 1.5 U Taq-DNS-Polymerase und 60-250 ng Plasmid-DNS bzw. genomische DNS, als Matrize. Die Annealingtemperatur wurde computergesteuert (II.1.2) durch Berechnung der DNS-Schmelztemperatur der Oligonukleotidprimer bestimmt und anschließend experimentell verifiziert. Die Extensionszeiten richten sich nach der Größe des Amplifikates und der Zahl der Interstrang Wasserstoffbrücken (G:C 3; A:T 2). Im Allgemeinen wurde für Reaktionen mittels Taq-DNS-Polymerase eine Elongationszeit von 1 min/1000 bp gewählt.



**Abbildung 7a Prinzip der PCR**

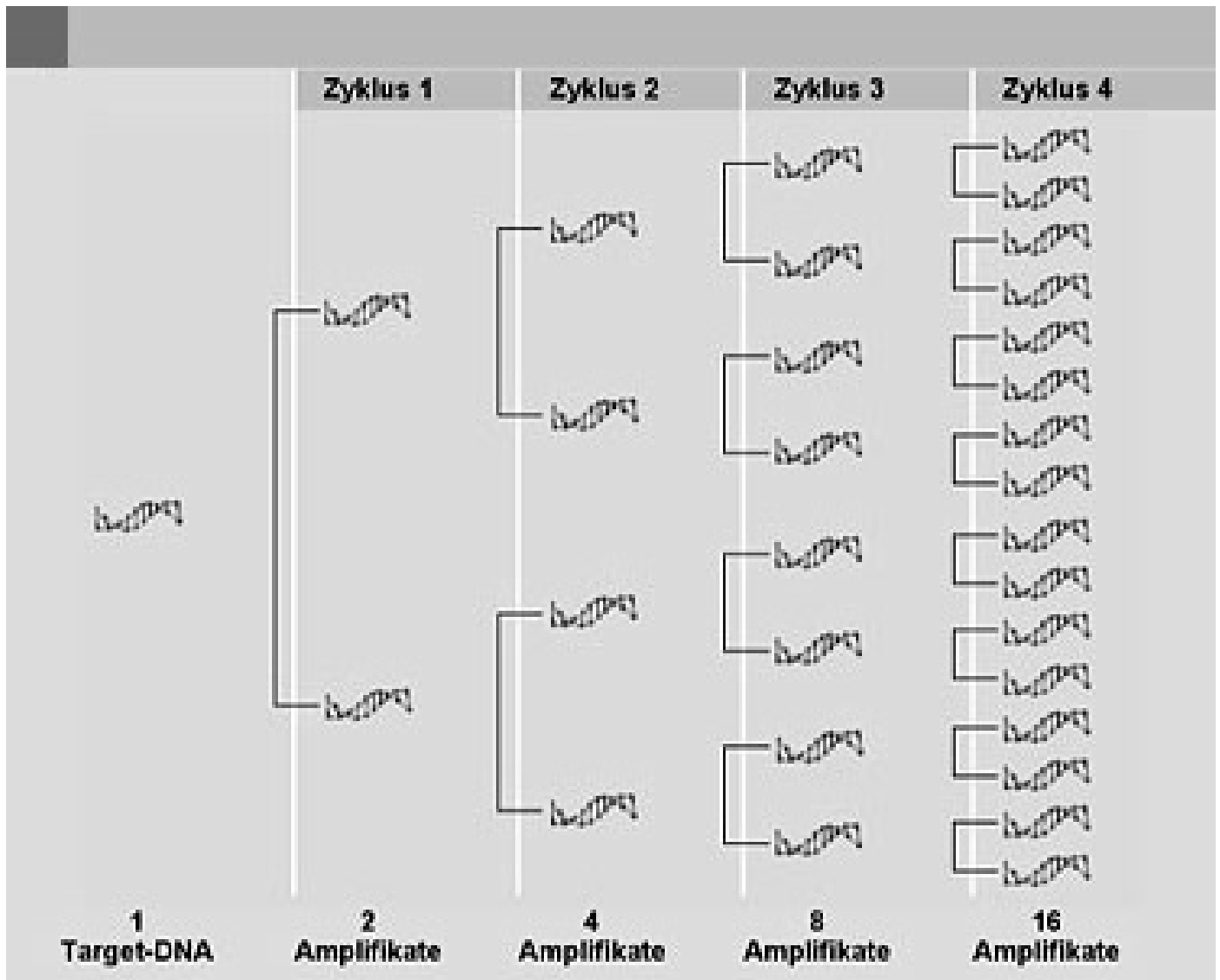
Nach [http://www.bioron.net/uploads/RTEmagicC\\_PCR\\_Prinzip.JPG.jpg](http://www.bioron.net/uploads/RTEmagicC_PCR_Prinzip.JPG.jpg)



Für die Radioaktiv-markierte-PCR, noch höherer Sensitivität, wurde ein 25  $\mu$ l Ansatz unter zusätzlicher Zugabe von 2  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>]dCTP (3000 Ci/mmol, 10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) verwendet.

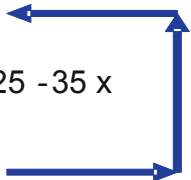
**Abbildung 7b Effizienz der PCR**

Nach: [http://www.roche.de/diagnostics/infektionsdiagnostik/images/pcr\\_prinzip\\_Ampli\\_013\\_kl.jpg](http://www.roche.de/diagnostics/infektionsdiagnostik/images/pcr_prinzip_Ampli_013_kl.jpg)



Jeweils optimale  $MgCl_2$  Konzentrationen wurden experimentell ausgewählt. Sie lag üblicherweise bei 1.5 mM. Für lange Templates wurde neben der Taq-Polymerase, auch das „Expand<sup>TM</sup> Long Template PCR System“ (II.1.4) eingesetzt.

Die Reaktionszyklen wurden in einem Thermocycler (I.1.2) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1	3	min	95 ° C	Denaturierung	
Schritt 2	40	s	94 ° C	Denaturierung	
Schritt 3	30 -60	s	50 -65 ° C	Annealing	
Schritt 4	40 -90	s	72 ° C	Elongation	
Schritt 5	5	min	72 ° C	Elongation	

Nach Durchführung der Amplifikationszyklen wurden je 1/10 der Ansätze mit 6 x Probenpuffer versetzt und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die radioaktiv-markierte PCR wurde grundsätzlich für alle Genotypisierungen verwendet. Dafür wurden 2 µl des PCR-Produkts mit 8 µl Stoppuffer gemischt, bei 95° C denaturiert, sofort auf Eis überführt und dann 5 µl auf ein 6%iges denaturierendes Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Nach der Geltrocknung unter Vakuum erfolgte die autoradiographische Belichtung bei – 70°C über Nacht und die Entwicklung des geschwärzten Filmes am Folgetag. Anhang dieser Daten wurden die Allelverteilung- und Frequenz errechnet.

### **II.2.3 Statistik**

Der  $\chi^2$ -Test wurde verwendet um die Signifikanz der unterschiedlichen Genotypverteilungen und Allelfrequenzen in Untersuchungs- und Kontrollgruppe zu berechnen. Ein 2-seitiger Fehler erster Art von 5% Prozent wurde, wie entsprechend der biomedizinischen Konvention als Signifikanzniveau gewählt. Das statistische Softwarepaket SPS wurde zur Datenaufbereitung eingesetzt. Eine Korrektur für multiples Testen wurde wegen des explorativen Ansatzes bei der Analyse einer genetisch komplexen Erkrankung bei der Bezug zwischen Phänotyp und Genotyp ungeklärt ist, nicht durchgeführt (*Perneger*<sup>48</sup> 1998).

## **III. ERGEBNISSE**

### **III.1 PAX7 - Promotorpolymorphismenfrequenz in der Kontrollgruppe**

Im folgenden werden die 3 unterschiedlich langen repetitiven Elemente (CCT)<sub>8,10,11</sub> im PAX7 Promotor als Allele 8, 10 und 11 bezeichnet. Bei 229 gesunden Vergleichspersonen (II.1.1.1) trat das Allel 8 mit einer Häufigkeit von 0.38 (38%) und das Allel 10 mit einer Frequenz von 0.59 auf, während das Allel 11 nur selten auftrat (0.03). Die Allelverteilung auf genotypischer Ebene betrug 0.12 (homozygot 8/8), 0.48 (heterozygot 8/10), 0.03 (8/11), 0.34 (10/10) und 0.03 (10/11). Ein homozygoter Genotyp 11/11 wurde nicht beobachtet. Der Anteil heterozygoter Genotypen in der Auswertung betrug 54 %. Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen und Allele ist in den Tabellen 2 & 3 dargestellt.

### **III.2 PAX7 Promotorpolymorphismenfrequenz bei Patienten mit Schizophrenie**

Bei 280 Patienten (II.1.1.1) trat das Allel 8 mit einer Häufigkeit von 0.38 (38%) und das Allel 10 mit einer Frequenz von 0.58 auf, während das Allel 11 nur selten auftrat (0.04). Die Allelverteilung auf genotypischer Ebene betrug 0.16 (homozygot 8/8), 0.39 (heterozygot 8/10), 0.03 (8/11), 0.36 (10/10) und 0.05 (10/11). Ein homozygoter Genotyp 11/11 wurde nicht beobachtet. Der Anteil heterozygoter Genotypen in der Auswertung betrug 47 %. Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen und Allele ist in den Tabellen 2 & 3 dargestellt.

Bei der Subgruppe von 86 Patienten (II.1.1.1) mit paranoider Schizophrenie trat das Allel 8 mit einer Häufigkeit von 0.39 (39%), und das Allel 10 mit einer Frequenz von 0.56 auf, während das Allel 11 nur selten auftrat (0.05). Die Allelverteilung auf genotypischer Ebene betrug 0.16 (homozygot 8/8), 0.43 (heterozygot 8/10), 0.02 (8/11), 0.30 (10/10) und 0.08 (10/11). Ein homozygoter Genotyp 11/11 wurde nicht beobachtet. Der Anteil heterozygoter Genotypen in der Auswertung betrug 53 %. Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen und Allele ist in den Tabellen 2 & 3 dargestellt.

Bei der Subgruppe von 114 Patienten (II.1.1.1) mit Nicht-paranoider Schizophrenie trat das Allel 8 mit einer Häufigkeit von 0.35 (35%), und das Allel 10 mit einer Frequenz von 0.60 auf, während das Allel 11 nur selten auftrat (0.05). Die Allelverteilung auf genotypischer Ebene betrug 0.13 (homozygot 8/8), 0.38 (heterozygot 8/10), 0.06 (8/11), 0.38 (10/10) und 0.05 (10/11). Ein homozygoter Genotyp 11/11 wurde nicht beobachtet. Der Anteil heterozygoter Genotypen in der Auswertung betrug 59 %. Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen und Allele ist in den Tabellen 2 & 3 dargestellt.

Bei der Subgruppe von 53 Patienten (II.1.1.1) mit schizoaffektiver Störung trat das Allel 8 mit einer Häufigkeit von 0.41 (41%), und das Allel 10 mit einer Frequenz von 0.58 auf, während das Allel 11 nur selten auftrat (0.01). Die Allelverteilung auf genotypischer Ebene betrug 0.23 (homozygot 8/8), 0.38 (heterozygot 8/10), 0.00 (8/11), 0.38 (10/10) und 0.01 (10/11). Ein homozygoter Genotyp 11/11 wurde nicht beobachtet. Der Anteil heterozygoter Genotypen in der Auswertung betrug 40 %. Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen und Allele ist in den Tabellen 2 & 3 dargestellt

### **III.3 Statistische Analyse der Unterschiede in der Frequenz der *PAX7***

#### **Promotorpolymorphismen zwischen Kontroll- und Untersuchungs- Gruppe**

Ein Vergleich der Genotypen- und Allelverteilung zwischen Patienten mit Schizophrenie bzw. deren paranoider, nicht-paranoider und schizoaffektiver Unterform zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede der Verteilungsmuster der quantitativen Trinukleotidpolymorphismen (CCT)<sub>8-10-11</sub> des *PAX7* Promotors. Ein homozygoter Genotyp 11/11 wurde bei insgesamt 509 untersuchten Proben nicht nachgewiesen. Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen und Allele, sowie die Ergebnisse der statistischen Tests ist in den Tabellen 2 & 3 dargestellt.

**Tabelle 2 Genotypverteilung von PAX 7 – LPR bei Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation**

DIAGNOSE		GENOTYPEN FREQUENZ										STATISTIK		
		8/8		8/10		8/11		10/10		10/11		$\chi^2$	df	p
n	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%				
Schizophrene (alle)	280	45	16	110	39	10	3	100	36	15	5	6.015	4	0.198
paranoider Subtyp	86	14	16	37	43	2	2	26	30	7	8	6.116	4	0.191
Nicht-paranoider Subtyp	141	19	13	53	38	8	6	54	38	7	5	5.547	4	0.236
Schizoaffektiver Subtyp	53	12	23	29	38	0	0	20	38	7	5	6.162	4	0.187
Kontrollgruppe	229	28	12	110	48	7	3	78	34	6	3			

Die Ergebnisse des  $\chi^2$  – Quadrattestes sind im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgetragen.

**Tabelle 3 Allelverteilung von PAX 7 – LPR bei Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation**

DIAGNOSE		ALLELFREQUENZEN						STATISTIK		
		8		10		11		$\chi^2$	df	p
n	n	%	n	%	n	%				
Schizophrene (alle)	280	210	38	325	58	25	4	1.868	2	0.393
Paranoider Subtyp	86	67	39	96	56	9	5	2.372	2	0.305
Nichtparanoider Subtyp	141	99	35	168	60	15	5	3.177	2	0.204
Schizoaffektiver Subtyp	53	44	41	61	58	1	1	1.607	2	0.448
Kontrollgruppe	229	173	38	272	59	13	3			

Die Ergebnisse des  $\chi^2$  – Quadrattestes sind im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgetragen.

## IV. DISKUSSION

### IV.1 Interpretation der Verteilungsunterschiede der quantitativen Trinukleotidpromotorpolymorphismen des *PAX7* Promotors zwischen Kontroll- und Untersuchungsgruppe

Während die klassische Humangenetik den überwiegenden Teil der monogen determinierten Erbkrankheiten aufgedeckt hat, stehen heute die i.d.R. epidemiologisch viel wichtigeren polygen-beeinflussten komplexen Erkrankungen, wie die Schizophrenie im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Deren Aufklärung gestaltet sich trotz zusehends sensitiverer und spezifischerer molekularbiologischer Methoden schwierig, was der enormen bio-psychischen Komplexität dieser Störungen zuzuschreiben ist.

Trotz einer Vielzahl klassischer Kopplungsstudien („*linkage analysis*“) an den verschiedensten Psychosen und psychischen Störungen gibt es nur eine begrenzte Anzahl an in der Literatur konsistent reproduzierten Befunden. Das methodologische Grundprinzip der Kopplungsanalyse bleibt auch dem „*ein Gen – eine Erkrankung* „ Axiom gedanklich verhaftet. Komplex determinierte Erkrankung kommen nach heutigen Vorstellungen unter dem Einfluß auslösender Umweltfaktoren bei Personen, die eine kritische Anzahl (*Summationseffekt*) den Phänotyp beeinflussender Genvarianten tragen zum Ausbruch, während gesunde Personen nur als Träger einzelner prädisponierender Krankheitsallele auftreten (*Risch & Merikangas*<sup>49</sup>). Eine der methodischen Alternativen stellen daher Assoziationsstudien von Genen dar, die eine Detektion der Kopplungsanalyse entgangener Kandidatengene einer komplexen Erkrankung erlaubt (*Weeks & Lathrop*<sup>50</sup>). Die Neuroentwicklungshypothese der Schizophrenie (I.1.2) liegt es nahe insbesondere Gene, die an der Steuerung der frühen Hirnentwicklung beteiligt sind, wie *PAX 7*, bezüglich Ihrer Relevanz für die Manifestation einer Schizophrenie zu untersuchen. Im Fokus der vorgestellten Arbeit standen Analysen von



Trinukleotidpolymorphismen vom (CCT)<sub>n</sub> Typ im expressionsniveaurelevanten Promotorbereich des PAX7 Gens, da Aktivitätsniveauunterschiede, insbesondere ontogenetisch wichtiger Gene, ähnlich krankheitsmitverursachend wie klassische Punktmutationen wirken können.

Da es Hinweise auf eine genetische Heterogenität von Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises gibt (*Tsuang & Faraone*<sup>51</sup>), erfolgte zusätzlich eine Assoziationsanalyse gemäß den diagnostischen Subkategorien nach DSM-IV<sup>3</sup> in paranoide, nicht-paranoide und schizoaffektive Psychosen.

Der Vergleich von Allelhäufigkeiten und Genotyffrequenzen des PAX7 Promotortrinukleotidpolymorphismus bekannter funktionsniveaurelevanter Bedeutung zwischen gesunden Probanden und an schizophrenen Psychosen erkrankten Patienten ergab weder für die Gesamtheit der Stichprobe noch bei den Subgruppenanalysen signifikante Unterschiede. Dies könnte zwar auch Ausdruck einer zu kleinen oder inhomogenen Stichprobe sein, ein signifikanter Zusammenhang, der sich in einer Untersuchungsgruppe von 280 Patienten nicht darstellt. Es wäre allerdings nur unter ätiologischen Gesichtspunkten von Interesse und scheidet als potentieller prospektiver Biomarker eines schizophrenen Potentials definitiv aus.

#### **IV.2 Zukünftige Anwendung der PAX7 Promotoranalyse**

Trotz des Ausschlusses signifikanter Assoziationen der Trinukleotidpolymorphismen in der Promotorregion von PAX 7 mit einer schizophrenen Prädisposition sollten diese mit der Höhe der Genexpression verknüpften Polymorphismen in anderen PAX 7 verknüpften Zusammenhängen (Sarkome, Muskelentwicklung, Extremitätenregeneration, ....) weiter untersucht werden. Auch die dargestellten Techniken sind auf zahlreiche andere Fragestellungen der biomedizinischen Forschung jederzeit übertragbar.

### IV.3 Perspektiven der Biomarkersuche, insbesondere in der Psychiatrie

Während in der dargestellten Arbeit ein typischer „monogener“ Zugang zur Fragestellung gewählt wurde, stehen heute auch Techniken zur Erfassung komplexer Genmutations- und Expressionsmuster auf genomischer, RNS-, Protein- und epigenetischer Ebene zur Verfügung (Genexpressionanalysen, DNS-Array-Technik, *Genchips* komparative Genomhybridisierung [CGH], SNIP Analyse, Methylierungsmustererfassung..), die eher in der Lage scheinen hochkomplexe ätiologische Prozesse aufzulösen (*Sequeira & Turecki*<sup>52</sup>; *Benes*<sup>53</sup>, *Ivamoto & Kato*<sup>54</sup> ). All diese Applikationen erfordern einen hohen Aufwand bzgl. der biomathematischen Aufbereitung der Daten und Diskrimination von *upstream* und *downstream* Prozessen identifizierter Gencluster (*pathway analysis*) (*Mirnics et al.*<sup>55</sup>, *Konradi*<sup>56</sup>).

Biomarker sollten Krankheitsdispositionen mit maximaler Spezifität (zur Vermeidung einer Stigmatisierung Nichtbetroffener d.h. falsch positiver Ergebnisse) und sehr hoher Sensitivität nachweisen (*Bernard et al.*<sup>57</sup>). Der sinnvolle Einsatz eines Biomarkers setzt darüber hinaus die Existenz einer nachgeordneten dem Betroffenen therapeutischen Konsequenz voraus, wobei im diskutierten Falle der Wert von Frühinterventionen zur Vermeidung der Manifestation einer schizophrenen Prädisposition erst in entsprechenden klinischen Studien gezeigt werden müßte. In diesem Zusammenhang stellen sich selbstverständlich auch komplexe ethische Fragen (Recht auf Nichtwissen, Zugang zu Testergebnissen; ...).

## V. ZUSAMMENFASSUNG

*PAX 7* ist ein Gen mit, neben anderen Funktionen, ausgeprägter neuroentwicklungsgeschichtlicher Bedeutung. Schizophrenie wird heute als primär genetisch bedingte Neuroentwicklungstörung aufgefaßt (I.1.2, Abbildung 2). Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Assoziation zwischen den drei repetitiven Trinukleotidpolymorphismen vom (CCT)<sub>n</sub> Typ und ihren fünf korrespondierenden Genotypen in der regulatorischen Sequenz der *PAX 7* Promotorregion, die bekannterweise die Expressionshöhe des *PAX 7* Genproduktes beeinflussen und einer Prädisposition zur Entwicklung einer Schizophrenie oder einer Ihrer Subkategorien nach DSM-IV<sup>3</sup> (paranoid, nicht-paranoid, schizoaffektiv) mittels eines Polymerasekettenreaktions-basierten Assays in Proben von 280 an Schizophrenie erkrankten Patienten und 229 Kontrollproben gesunder Blutspender untersucht. Weder auf der genotypischen noch auf der allelischen Ebene konnte eine statistisch signifikante Korrelation nachgewiesen werden. Die *PAX 7* Promotor Polymorphismen stellen also keine nützlichen Biomarker einer schizophren Polymorphismen Prädisposition dar. Die Rolle dieser Polymorphismen in anderen *PAX 7* abhängigen Mechanismen bedarf weiterer Aufklärung, während polygen orientierte „Komplettgenom“ Techniken (z.B. *genexpression profiling*) besser geeignet sein könnten um das multifaktorielle Netz der Schizophrenie-Entwicklung aufzuklären.

**VI. ABBILDUNGSVERZEICHNISS**

		SEITE
Tabelle 1	Diagnosekriterien der Schizophrenie	003
Tabelle 2	Genotypverteilung von PAX 7-LPR bei Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation	033
Tabelle 3	Allelverteilung von PAX 7-LPR bei Patienten Mit Schizophrenie im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation	033
Abbildung 1	Erkrankungsrisiko an Schizophrenie in Abhängigkeit vom Verwandtschaftsgrad	006
Abbildung 2	Neuro-Entwicklungsstörungsmodell der Schizophrenie	007
Abbildung 3	Transkriptionsaktivität der PAX-7-LPR Allele	012
Abbildung 4	Nukleotidsequenz der PAX 7 Promotorregion	013
Abbildung 5	Allelfrequenz von PAX 7-LPR	015
Abbildung 6	Genomische Struktur der 5' flankierenden Region des humanen PAX-7 Gens mit Lokalisation der verwendeten Primer	017
Abbildung 7a	Prinzip der PCR	027
Abbildung 7b	Effizienz der PCR	028

## I. LITERATURVERZEICHNISS

- 
- <sup>1</sup> Bleuler E. *Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien*. Deuticke (ed) Leipzig & Wien, 1911.
- <sup>2</sup> ICD-10; WHO, 2007  
<http://www.who.int/classifications/icd/en/>
- <sup>3</sup> APA – American Psychiatric Association: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – DSM-IV-TR* (4th edition, Text Revision). American Psychiatric Association, Washington, DC 2000. deutsch: Saß, H. et al.: *Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen – Textrevision – DSM-IV-TR. Hogrefe, Göttingen 2003*  
<http://www.dsmivtr.org/index.cfm>
- <sup>4</sup> Jablensky A., Sartorius N., Korten A., Ernberg G., Anker M., Cooper J., Day R. *Incidence worldwide of schizophrenia*. Br J Psychiatry 151: 408-9, 1987.
- <sup>5</sup> Ciompi L., Müller C. *Lebensweg & Alter der Schizophrenen*, Springer Verlag, Berlin 1976
- <sup>6</sup> Sartorius N., Jablensky A., Shapiro R. *Cross cultural differences in the short term-prognosis of schizophrenic psychoses*. Schizo Bull 4: 102-13, 1978.
- <sup>7</sup> Krüger T, Schönhoff M, Dettling M., *Neurocognition, psychosocial outcome and vocational integration*. Psychiatr Prax. 31(S2): 224-9, 2004.
- <sup>8</sup> Schnabel R., Clouth J. *Die Kosten der Frühverrentung – das Beispiel der Schizophrenie*. Gesundheitsökonomie und Qualitätsmanagement 6: 381-388, 2002.
- <sup>9</sup> Zubin J., Spring B. *Vulnerability – a new view of schizophrenia*. J Abnorm Psychol 86: 103-26, 1977.
- <sup>10</sup> Ciompi L. *Affect logic. Principle of psychoanalysis and genetic epistemology*. Psyche 36: 226-66, 1982.
- <sup>11</sup> Nuechterlein K., Dawson M., Gitlin M, Ventura J., Goldstein M., Snyder K, Yee C., Minz J. *Developmental processes in schizophrenic disorders: Longitudinal studies of vulnerability and stress*. Schizo Bull, 18: 387-425, 1992.
- <sup>12</sup> Thompson KN, Phillips LJ, Komesaroff P, Yuen HP, Wood SJ, Pantelis C, Velakoulis D, Yung AR, McGorry PD. *Stress and HPA-axis functioning in young people at ultra high risk for psychosis*. J Psychiatr Res. 2007 Oct;41(7):561-9. Epub 2006 Jul 10
- <sup>13</sup> Markon K., Krueger R., Bouchard T., Gottesman I. *Normal and abnormal personality traits: evidence for genetic and environmental relationships in the Minnesota study of twins reared apart*. J Pers. 70: 661-93, 2002.
- <sup>14</sup> Falkai P., Maier W. *Advances in neurobiological understanding of schizophrenia. Perspectives for new therapeutic concepts*. Nervenarzt 77: (S2) 65-74, 2006.
- <sup>15</sup> Shenton M, Dickey C., Frumin M, McCarley R. *A review of MRI findings in schizophrenia*. Schizophr Res. 15: 1-52, 2001.
- <sup>16</sup> Gross G, Huber G. *Psychopathology of schizophrenia and brain imaging*. Fortschr Neurol Psychiatr. 2008 May;76 Suppl 1:S49-56.
- <sup>17</sup> Théberge J., Al-Semaan Y., Williamson P., Menon R., Neufeld R., Rajakumar N., Schaefer B., Densmore M., Drost D. *Glutamate and glutamine in the anterior cingulate and thalamus of medicated patients with chronic*

- 
- Schizophrenia and health subjects measured with 4.0-T proton MRS.*  
Am J Psychiatry 160: 2231-3, 2003.
- <sup>18</sup> Roth B., Xia Z. *Molecular and cellular mechanisms for the polarized sorting of serotonin receptors: relevance for genesis and treatment of psychosis.*  
Crit Rev Neurobiol. 16: 229-36, 2004.
- <sup>19</sup> Cornblatt B., Malhotra A., *Impaired attention as an endophenotype for molecular genetic studies of schizophrenia.*  
Am J Med Genet 8: 11-15, 2001.
- <sup>20</sup> Bopp D., Burri M., Baumgartner S., Frigerio G., Noll M. *Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of Drosophila.*  
Cell 47: 1033-1040, 1986.
- <sup>21</sup> Mercado G.E., Barr F.G. *Fusion involving PAX and FOX genes in the molecular pathogenesis of alveolar rhabdomyosarcoma: recent advances.*  
Curr Mol Med 1: 47-61, 2007.
- <sup>22</sup> Buckingham M. *Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes.*  
C R Biol 330:530-3, 2007 Epub  
2007 Jun 13
- <sup>23</sup> Sato K., Chernoff E.A. *The short toes mutation of the axolotl.*  
Dev Growth Differ. 49: 469-78, 2007.
- <sup>24</sup> Dezawa M. *Future views and challenges to the peripheral nerve regeneration by cell based therapy.*  
Rinsho Shingei-gaku 45: 877-9, 2005.
- <sup>25</sup> Péault B., Rudnicki M., Torrente Y., Cossu G., Tremblay J.P., Partridge T., Gussoni E., Kunckel L.M., Huard J. *Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance and therapy.*  
Mol Ther 15: 867-77, 2007.
- <sup>26</sup> Thompson J., Lovicu F., Ziman M. *The role of Pax 7 in determining the cytoarchitecture of the superior colliculus.*  
Dev Growth Differ 46: 213-8, 2004.
- <sup>27</sup> Ziman M.R., Rodger J., Chen P., Papadimitriou J.M., Dunlop S.A., Beazley L.D. *Pax genes in development and maturation of the visual system: implications for optic nerve regeneration.*  
Histol Histopathol 1: 239-49, 2001.
- <sup>28</sup> Béland M., Bouchard M. *Pax gene function during kidney tumorigenesis: a comparative approach.*  
Bull Cancer 93: 875-82, 2006.
- <sup>29</sup> Blake J., Ziman M.R. *Aberrant PAX3 and PAX7 expression. A link to the metastatic potential of embryonal rhabdomyosarcoma and cutaneous malignant melanoma.*  
Histol Histopathol 2: 529-39, 2003.
- <sup>30</sup> Jostes B., Walther C., Gruss P. *The murine paired box gene, Pax 7, is expressed specifically during the development of the nervous system.*  
Mech Dev 33: 27-37, 1991.
- <sup>31</sup> Mansouri A., Stoykova A., Torres M., Gruss P. *Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax 7 -/- mutant mice.*  
Development 122: 831-838, 1996.
- <sup>32</sup> Davis R.J., D'Cruz C.M., Lovell M.A., Biegel J.A., Barr F.G. *Fusion of PAX 7 to FHKR by the variant t(1; 13) (p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma.*  
Cancer Res 54: 2869-2872, 1994.
- <sup>33</sup> Syagilo Y.V., Okladnova O., Reimer E., Gräßle M., Mössner R., Gattenlöhner S., Marx A., Meyer J., Lesch

- 
- K.P. *Structural and functional characterisation of the human PAX 7 5'-flanking rregulatory region.* Gene 294: 259-268, 2002.
- <sup>34</sup> van der Velden A.W., Thomas A.A., *The role of 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development.* Int. J Biochem Cell Biol 31: 87-106, 1999.
- <sup>35</sup> Okladovna O., Syagailo Y.V., Tranitz M., Riederer P., Stober G., Mossner R., Lesch K.P. *Functional characterisation of the human Pax 3 gene regulatory region.* Genomics 57: 110-119, 1999.
- <sup>36</sup> Stayner C.K., Cunliffe H.E., Ward T.A., Eccles M.R. *Cloning and characterisation of the human PAX 2 promoter.* J Biol Chem 273: 25472-25479, 1998.
- <sup>37</sup> Brink C., Chowdhury K., Gruss P. *Pax 4 regulatory elements mediate beta cell specific expression in the pancreas.* Mech Dev 100: 37-43; 2001.
- <sup>38</sup> Mitas M. *Trinucleotide repeats associated with human disease.* Nucleic Acid Res 25: 2245-2254, 1997.
- <sup>39</sup> Kashi Y., King D., Soller M. *Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation.* Trends Genet 13: 74-78, 1997.
- <sup>40</sup> Sasaki T., Billet E., Petronis A., Ying D., Parsons T., Macciardi F.M., Meltzer H.Y., Lieberman J., Joffe R.T., Ross C.A., McInnis M.G., Li S.H., Kennedy J.L. *Psychosis and genes with trinucleotid repeat polymorphism.* Hum Genet 97: 244-46, 1996.
- <sup>41</sup> Williams J., Farmer A.E., Ackenheil M., Kaufmann C.A., McGuffin P. *A multicenter inter-rater reliability study using the OPCRIT computerized diagnostic system.* Psychol Med 26: 775-83; 1996
- <sup>42</sup> Sambrook J., Russell D.W. *Molecular cloning: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- <sup>43</sup> Ausubel F.M. *Current protocols in molecular biology.* Wiley & Sons Inc., Bwe York, 1992.
- <sup>44</sup> Southern E.M. *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.* J Mol Biol 98: 503-17, 1975
- <sup>45</sup> Feinberg A.P., Vogelstein, B. *A technique for radiolabelling DNA restriction enzyme fragments to high specic activity.* Anal Biochem 132: 6-13, 1983.
- <sup>46</sup> Mullis K.B., Faloona F.A. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.* Methods Enzymol 155: 335-50, 1987.
- <sup>47</sup> Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. *Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus.* J Bacteriol 127: 1550-7, 1976
- <sup>48</sup> Perneger T.V. *What's wrong with Bonferoni adjustements.* BMJ 316: 1236-38, 1998.
- <sup>49</sup> Risch N., Merikangas K. *The future of genetic studies of complex human diseases.* Science 273: 1516-7, 1996.
- <sup>50</sup> Weeks D.E., Lathrop M. *Poygenic diseases: methods for mapping complex disease traits.*

---

Trends Genet 11: 513-19, 1995.

- <sup>51</sup> Tsuang M.T., Faraone S.V. *The case for heterogeneity in the etiology of schizophrenia.* Schizophr Research 17: 161-75, 1995.
- <sup>52</sup> Sequeira A., Turecki G. *Genome wide gene expression studies in mood disorders.* OMICS 10:444-54, 2006.
- <sup>53</sup> Benes F.M. *Strategies for improving sensitivity of gene expression profiling: regulation of apoptosis in the limbic lobe of schizophrenics and bipolars.* Prog Brain Res. 158:153-72; 2006.
- <sup>54</sup> Iwamoto K., Kato T. *Gene expression profiling in schizophrenia and related mental disorders.* Neuroscientist 12: 349-61, 2006.
- <sup>55</sup> Mirnics K., Levitt P., Lewis D.A. *Critical appraisal of DNA microarrays in psychiatric genomics.* Biol Psychiatry. 60:163-76. Epub 2006 Apr 17, 2006.
- <sup>56</sup> Konradi C. *Gene expression microarray studies in polygenic psychiatric disorders: applications and data analysis.* Brain Res Brain Res Rev. 50:142-55. Epub 2005 Jun 20., 2005.
- <sup>57</sup> Bernard R. Greystoke A., Brünner N., Duffy P. et al. *Discovery of biomarkers in cancer.* E J C 5 (Suppl): 105-151, 2007.



## DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. K-P. Lesch für regelmäßige Unterstützung und fachlichen Rat. Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank für die intensive Betreuung im Labor Frau Dr. rer. nat. Yanna Syagailo.

# CURRICULUM VITAE

<b>Persönliche Daten</b>	<b>Name Vorname</b>	Ella Willenbacher	
	<b>Geburtsdatum</b>	22.09.73	
	<b>Geburtsort</b>	Taschkent, Usbekistan	
	<b>Vater</b>	Nigmat Abdukadirov, Ingenieur für Elektrotechnik	
	<b>Mutter</b>	Naffissa Abdukadirova, Krankenschwester	
	<b>Familienstand</b>	verheiratet	
	<b>Ehemann</b>	Dr. med. Wolfgang Willenbacher	
	<b>Staatsangehörigkeit</b>	Deutsch	
<b>Schulbesuch</b>	<b>Grundschule</b>	1980 - 1983	Georgievka, Kasachstan
	<b>Weiterf. Schule</b>	1983 - 1990	Georgievka, Kasachstan
	<b>Abitur</b>	21.07.1990	Georgievka, Kasachstan
<b>Medizinstudium</b>	<b>1991 – 1995</b>	Kirgisische Medizinische Universität, Bischkek	
	<b>1997 – 2000</b>	Julius – Maximilians Universität, Würzburg	
	<b>2000 – 2002</b>	Albrecht – Ludwigs Universität, Freiburg	
<b>Praktisches Jahr</b>	<b>1.10.2001–30.09.2002</b>	Abt. für Innere Medizin, Allgemein; Thorax & Gefäßchirurgie und Anästhesiologie des Städtischen KH Villingen – Schwenningen	
<b>Dissertation</b>	<b>1999-2001</b>	experimentelle Promotion: <i>Analyse der Frequenz polymorpher repetitiver Elemente Innerhalb der PAX 7 Promotorregion bei Patienten mit Schizophrenie und einer gesunden Vergleichspopulation</i>	
	<b>Eingereicht</b>	Psychiatrische Fakultät der Universitätsklinik Würzburg Prof. Dr. med. P. K. Lesch <b>12/2008</b>	
<b>Berufstätigkeit</b>			
<b>Ärztin im Praktikum</b>	<b>14.11.2002–14.05.2004</b>	Abteilung für Unfallchirurgie, Allgemein- und Viszeralchirurgie an der Helios Klinik, Titisee – Neustadt	
	<b>Vollapprobation</b>	15. 05. 2004	
<b>Assistenzärztin</b>	<b>15.05.2004 - 30.06.2004</b>	Asklepios, Klinik Triberg. Klinik für Onkologische Rehabilitation.	
	<b>01.07.2004 - 31.03.2006</b>	Abteilung für Innere Medizin, KH Stühlingen	
	<b>01.04.2006 – 30.04.2007</b>	Sanafontis Klinik, Freiburg	
	<b>seit 01.05.2007</b>	Universitätsklinik Innsbruck, Abt. Hämatologie-Onkologie	
<b>Diplome, etc.</b>	<b>2006</b>	Fachkunde Rettungsdienst (D)	
	<b>2007</b>	klinischer Prüfartz (A)	