

Aus der Klinik und Poliklinik für  
Psychiatrie und Psychotherapie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. H. Beckmann

Östrogenrezeptor-Gen-Varianten bei Patienten mit Panikstörung

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Kirsten Schlurmann  
aus München

Würzburg, Februar 2004

Referent: Professor Dr. techn., Dipl.-Ing. P. Riederer  
Koreferent: Professor Dr. med. J. Böning  
Dekan: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 07.Juli 2004

Die Promovendin ist Ärztin im Praktikum

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Definition: Panikstörung und Agoraphobie.....	1
1.2	Genetische und hormonelle Einflussgrößen bei der Panikstörung.....	2
1.3	Östrogenrezeptoren und Östrogenwirkung.....	4
1.4	Bekannte Östrogenrezeptorpolymorphismen und Befunde zur Assoziation mit neuropsychiatrischen Erkrankungen .....	7
2	Ziele.....	12
3	Methoden.....	13
3.1	<i>In silico</i> -Methoden.....	15
3.1.1	Homologie-basiertes Erstellen von Clustern und lokales Sequenz alignment .....	16
3.1.2	Multiples Sequenz-Alignment .....	17
3.2	<i>In vitro</i> -Verifizierung .....	19
3.2.1	Charakterisierung der Stichproben .....	19
3.2.2	PCR.....	20
3.2.2.1	Primerauswahl .....	21
3.2.2.2	PCR-Bedingungen.....	21
3.2.3	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Assay.....	23
3.2.3.1	Restriktionsverdau .....	23
3.2.3.2	Agarose-Gel-Elektrophorese und native Polyacrylamid-Gel- Elektrophorese .....	24
3.2.4	SSCP .....	26
3.3	Statistische Auswertung .....	27
3.3.1	Hardy-Weinberg-Äquilibrium .....	27
3.3.2	Fisher's-Exact-Test.....	28
3.3.3	Power-(Teststärke-)Analyse .....	29
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Östrogenrezeptor $\alpha$ -Gen .....	30
4.1.1	Genomische Organisation.....	30
4.1.2	Genotypverteilungen und Allelfrequenzen.....	32

4.1.2.1	<i>MspI</i> -Polymorphismus .....	32
4.1.2.2	<i>PvuII</i> -Polymorphismus .....	34
4.1.2.3	<i>XbaI</i> -Polymorphismus .....	36
4.1.3	Identifizierung eines polymorphen Mikrosatelliten .....	38
4.2	Östrogenrezeptor $\beta$ -Gen .....	40
4.2.1	Genomische Organisation .....	40
4.2.2	Allelfrequenzen und Genotypverteilungen .....	42
4.2.2.1	<i>AluI</i> -Polymorphismus .....	42
4.2.2.2	<i>Fnu4HI</i> -Polymorphismus .....	44
5	Diskussion .....	47
5.1	Östrogenrezeptor $\alpha$ -Gen .....	47
5.1.1	Genomische Organisation .....	47
5.1.2	Allelfrequenzen und Genotypverteilungen .....	48
5.1.2.1	<i>MspI</i> -Polymorphismus .....	48
5.1.2.2	<i>PvuII</i> -Polymorphismus .....	49
5.1.2.3	<i>XbaI</i> -Polymorphismus .....	50
5.1.3	Intron 5-Mikrosatellit .....	51
5.2	Östrogenrezeptor $\beta$ -Gen .....	53
5.2.1	Genomische Organisation .....	53
5.2.2	Allelfrequenzen und Genotypverteilungen .....	54
5.2.2.1	<i>AluI</i> -Polymorphismus .....	54
5.2.2.2	<i>Fnu4HI</i> -Polymorphismus .....	55
6	Zusammenfassung .....	57
7	Literatur .....	58
8	Appendix .....	69
8.1	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....	69
8.1.1	Tabellenverzeichnis .....	69
8.1.2	Abbildungsverzeichnis .....	70
8.2	Verwendete Materialien / Geräte etc. ....	70
8.2.1	Chemikalien / Materialien .....	70
8.2.2	Lösungen .....	71
8.2.3	Geräteverzeichnis .....	73

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition: Panikstörung und Agoraphobie

Die Panikstörung ist eine der häufigsten Angststörungen und mit erheblichen, oft langjährigen psychosozialen Beeinträchtigungen verbunden. In der Allgemeinbevölkerung beträgt die Lebenszeitprävalenz der Panikstörung 1-3% (Eaton et al., 1994), wobei Frauen etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Männer. Gewöhnlich liegt der Erkrankungsbeginn zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr.

Die Panikstörung ist charakterisiert durch kurzdauernde, intensive Angstzustände, die wiederholt und ohne erkennbaren äußeren Anlass auftreten. Panikattacken werden zu meist von vegetativen Beschwerden begleitet. Häufigste akzessorische Symptome sind dabei Atemnot (Dyspnoe) oder Beklemmungsgefühl, Benommenheit, Gefühl der Unsicherheit oder Ohnmachtsgefühle, Erstickungsgefühle, Herzrasen, Zittern, Schweißausbrüche und Hitzewallungen oder Kälteschauer, Übelkeit bzw. abdominelle Beschwerden, Taubheitsgefühl oder Parästhesien sowie Schmerzen oder Druck in der Brust. Parallel hierzu besteht häufig die Furcht zu sterben, verrückt zu werden oder etwas Unkontrolliertes zu tun, zum Teil auch in Verbindung mit Depersonalisationserleben. In vielen Fällen treten mehr als sechs der genannten Begleitsymptome in Erscheinung (DSM-III-R)<sup>1</sup>. Typischerweise entwickelt sich nach der ersten oder weiteren Attacken eine Angst vor der Angst (Phobophobie), die zu ausgeprägtem Vermeidungsverhalten und sozialem Rückzug führen kann. Zu den möglichen Komplikationen der Erkrankung zählt das Auftreten einer Depression in 50-65% der Fälle. Ferner kommt bei 25-50% der Patienten der Missbrauch von Alkohol und Anxiolytika hinzu (Regier et al., 1990).

Bei Patienten mit Panikstörung besteht häufig zugleich eine Agoraphobie. Agoraphobie bezeichnet die Angst vor Orten oder Situationen, aus denen eine Flucht im Falle einer Panikattacke schwierig erscheint oder in denen Hilfe nicht erreichbar ist.

---

<sup>1</sup> DSM-III-R: revidierte 3. Auflage des „Diagnostic and statistical manual of mental disorders“ der American Psychiatric Association

Die Agoraphobie kann als Steigerung der Panikstörung aufgefasst werden (Schneier et al., 1991; Noyes et al., 1986), da bei Betroffenen das Vermeidungsverhalten und der soziale Rückzug besonders ausgeprägt sind. Sie tritt bei 30-50% der Panikpatienten meist innerhalb des ersten Jahres der Panikstörung auf (Regier et al., 1990).

Die Panikstörung kann episodenhaft verlaufen, häufiger bleibt sie jedoch über Jahre in unterschiedlicher Intensität bestehen. Besonders die Panikstörung mit Agoraphobie neigt zu chronischem Verlauf.

## **1.2 Genetische und hormonelle Einflussgrößen bei der Panikstörung**

Die Panikstörung tritt familiär gehäuft auf (Crowe et al., 1983; Finn und Smoller, 2001) und auch Zwillingsstudien zeigen eine erhöhte Konkordanz bei eineiigen gegenüber zweieiigen Zwillingen (Torgersen, 1983; Skre et al., 1993). Diese Ergebnisse deuten auf eine genetische Komponente bei der Entstehung der Panikstörung, die Heritabilität wird mit ca. 43% angegeben (Hettema et al., 2001).

Zur Identifizierung ursächlicher Gene wurden u.a. mehrere genomweite Kopplungsstudien durchgeführt. Hierbei handelt es sich um Familienstudien, in denen mehrere hundert verschiedene Polymorphismen (=DNA-Sequenzvarianten) bei Erkrankten und Angehörigen untersucht werden, um die chromosomale Region des defekten Gens einzugrenzen. In der ersten derartigen Untersuchung konnte keine einzelne Chromosomenregion gefunden werden, die eine statistisch signifikante Kopplung mit der Panikstörung aufwies (Knowles et al., 1998). Vielmehr wurden Bereiche auf verschiedenen Chromosomen als Lokalisation des für die Panikstörung verantwortlichen Gendefekts angegeben (Crowe et al., 2001; Smoller et al., 2001; Gelernter et al., 2001; Hamilton et al., 2003). Da Kopplungsbefunde nicht in eine einheitliche Richtung weisen, ist am ehesten von einem Zusammenspiel vieler verschiedener Gene, d.h. einem polygenen Erbgang auszugehen.

Positive Assoziationsbefunde wurden bislang u.a. berichtet für eine Variation im Gen des Adenosin A<sub>2A</sub>-Rezeptors (Deckert et al., 1998), einen Polymorphismus im Bereich der MAO-A-Promotor-Region (Deckert et al., 1999), Gene im Cholecystokinin-System (Kennedy et al., 1999; Wang et al., 1998) sowie kürzlich für das Catechol-O-Methyl-

transferase-Gen (Domschke et al., 2003), wobei sich in mehreren dieser Studien der gefundene Zusammenhang auf das weibliche Geschlecht bezieht (Deckert et al., 1999; Deckert et al., 2003).

Es gibt Hinweise darauf, dass das Auftreten der Panikstörung durch hormonelle Faktoren beeinflusst wird (Faravelli und Pallanti, 1989). So kann die Panikerkrankung in der hormonellen Umstellungsphase von Müttern nach der Geburt eines Kindes beginnen (Sholomskas et al., 1993). Gelegentlich tritt die Panikstörung erstmals in der Pubertät oder in der Menopause auf (Hayward et al., 1992; Swales und Sheikh, 1992). Bei einer bestehenden Panikerkrankung wird oftmals eine Beschwerdezunahme nach der Geburt eines Kindes beobachtet (Cohen et al., 1994; Northcott und Stein, 1994). Zudem wurde von einer Exazerbation nach Einnahme hormoneller Kontrazeptiva (Progesteron und Östrogen) und Östrogenersatz-Therapie berichtet (Deci et al., 1992; Dembert et al., 1994). Viele Frauen berichten über eine Zunahme der Paniksymptome vor der Menstruation (Cameron et al., 1988). Ein vermehrtes Auftreten von Panikattacken in der späten Lutealphase konnte ebenfalls festgestellt werden (Kaspi et al., 1994). Berücksichtigt man ferner, dass die Beschwerden der Panikattacken den vegetativen Veränderungen im Klimakterium teilweise sehr ähnlich sind, so spricht vieles für einen Zusammenhang zwischen östrogenvermittelten Störungen und der Pathophysiologie der Panikerkrankung.

Es existiert darüber hinaus eine Reihe von tierexperimentellen Befunden, die einen Einfluss von Östrogenen auf das Angstverhalten belegen. Zur Angstmessung bei Mäusen oder Ratten dienen u.a. der „Open-Field“- (OF) Test und der „Elevated Plus Maze“-Test. Im OF-Test meiden ängstlichere Tiere die Mitte eines Testfeldes und bewegen sich bevorzugt in Nähe zur Käfigwand, sie zeigen zudem ein gehemmtes Explorationsverhalten. Im Paradigma des „Elevated Plus Maze“ wird das Explorationsverhalten von Tieren gemessen, die zwischen geschlossenen und offenen Bereichen einer Laufstegkonstruktion wählen können. Ängstlichere Tiere halten sich bevorzugt in den geschlossenen Gängen auf. Galeeva und Touhimaä zeigten, dass weibliche Mäuse kurz nach der Ovulation, d.h. in einer Phase mittlerer Östrogenkonzentration, am ängstlichsten sind, während sie in der Zyklusphase der geringsten Östrogenkonzentration am wenigsten Angst zeigen. Exogen zugeführtes Progesteron führt bei ovariectomierten Mäusen zu vermehrter Angst (Galeeva und Touhimaä, 2001). Mora und Mitarbeiter beobachteten

bei Ratten in der Phase kurz nach dem Ovulationstermin vermehrte Angst, wohingegen sie bei ovariectomierten Ratten durch Progesteronbehandlung eine Angstreduktion feststellten. Letztere konnte durch Zufuhr von Östradiol antagonisiert werden (Mora et al., 1996). Weitere Versuche demonstrieren eine zyklusabhängige anxiolytische Wirkung von Diazepam bei Ratten: demnach ist dieser Effekt in der Phase der geringsten Östrogenkonzentration und in der Phase ansteigender Östrogenkonzentration vor der Ovulation deutlich gemindert (Bitran und Dowd, 1996). Exogenes Östrogen bewirkt in verschiedenen Provokations-Versuchen eine verstärkte Angstantwort bei ovariectomierten Mäusen sowie eine Bewegungsunruhe bei Tieren in neutraler Umgebung (Morgan und Pfaff, 2001 und 2002).

Die Befundlage verdeutlicht somit einen Östrogeneinfluss auf das Angstverhalten bei einer komplexen hormonellen Reaktionslage, zu deren besseren Verständnis es weiterführender Untersuchungen bedarf.

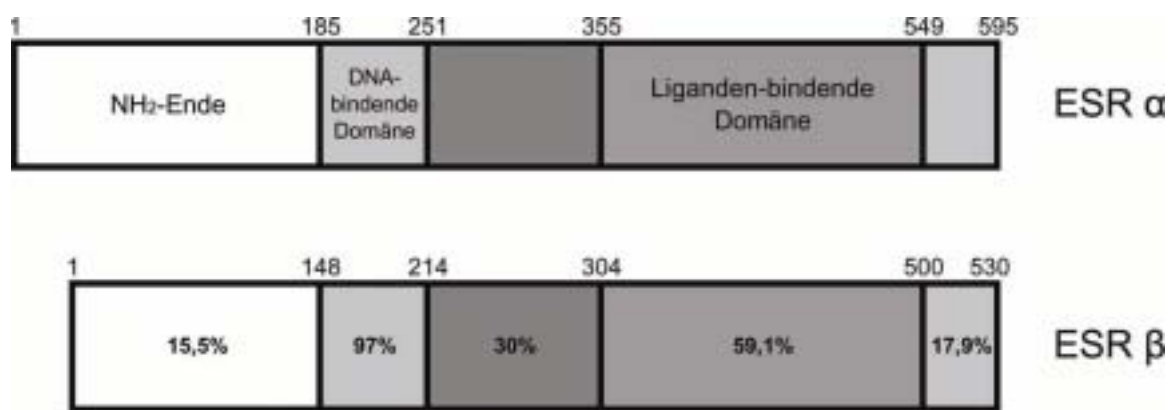
### **1.3 Östrogenrezeptoren und Östrogenwirkung**

1923 wurde von Allen und Doisy erstmals eine Östrogenaktivität in biologischen Extrakten beschrieben (Allen und Doisy, 1923). Bei Östrogenen handelt sich um Steroidhormone, die die Entwicklung der weiblichen Reproduktionsorgane fördern sowie anabole Effekte auf zahlreiche andere Gewebe wie Knochen und Zentralnervensystem ausüben. 17-beta-Östradiol ist das vorherrschende Östrogen bei prämenopausalen Frauen. Östradiol wird in reifenden Ovarfollikeln synthetisiert. Es kann durch reversible Oxidation zu Östron, einem schwächer wirksamen Östrogen, und dann hepatisch weiter zu Östriol metabolisiert werden. Östron kann zudem durch Aromatisierung von Androstendion entstehen. Bei Androstendion handelt es sich um einen Androgenvorläufer, der in den Nebennieren und bei Frauen in den Ovarien bzw. bei Männern in den Hoden synthetisiert wird. Die Aromatisierung von Androstendion geschieht primär im Fettgewebe und ist der Hauptsyntheseweg von Östrogenen bei Männern sowie postmenopausalen Frauen. Das hierzu erforderliche Enzym, eine Aromatase, ist zudem im embryonalen Gehirn im Bereich von Kortex, Hippocampus, Hypophyse und Mittelhirn aktiv und sorgt hier für lokale Östrogensynthese. Dieser Effekt ist bei männlichen



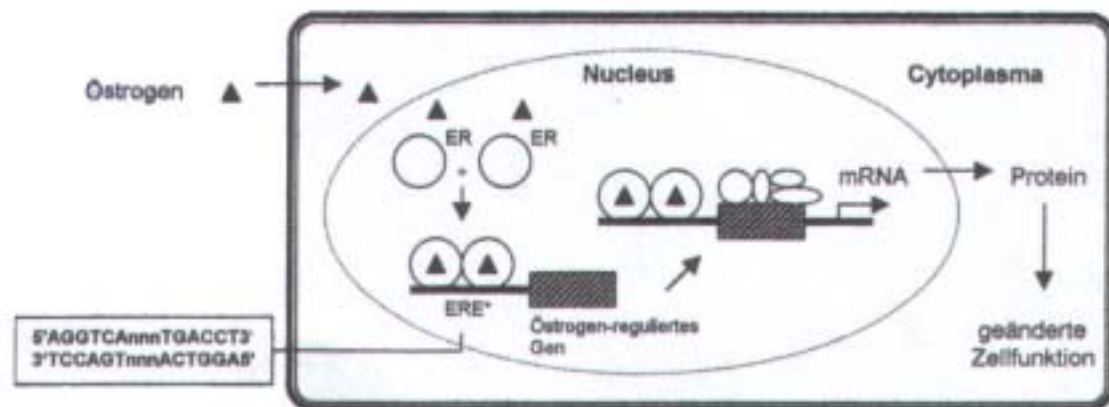
Embryonen ausgeprägter als bei weiblichen (Hutchinson et al., 1995). Die Östrogenkonzentrationen im Blut schwanken bei prämenopausalen Frauen zyklusabhängig ca. um den Faktor 20.

Östrogene entfalten ihre Wirkung durch die Interaktion mit speziellen Rezeptoren, den Östrogenrezeptoren. Östrogenrezeptoren sind nukleäre Rezeptoren und gehören zur Familie der Steroidhormonrezeptoren. Diesen gemeinsam sind drei unabhängige funktionelle Domänen (Beato et al., 1995): der NH<sub>2</sub>-Terminus, die Desoxyribonucleinsäure (DNA)-bindende Domäne und die Liganden-bindende Domäne (Abbildung 1).



**Abbildung 1:** Vergleich der Primärstruktur der Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  (schematisch). Die Zahlen über den Rezeptor-Darstellungen geben die Aminosäureposition an, Prozentzahlen geben den Grad der Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen innerhalb entsprechender Domänen an (nach Gustafsson, 1999).

Der Wirkmechanismus der Östrogene auf zellulärer Ebene sei kurz wiedergegeben: Östrogen diffundiert durch die Zell- und Kernmembran, bindet an die Liganden-bindende Domäne des Östrogenrezeptors und bewirkt eine Strukturänderung des Östrogenrezeptors mit Bildung von Rezeptor-Dimeren. Diese Östrogenrezeptordimere nehmen in der Folge über DNA-Bindungsstellen Einfluss auf die regulatorischen Bereiche nachgeschalteter Gene, die sogenannte Östrogen-responsive Elemente (ERE) enthalten. Östrogenrezeptoren interagieren zugleich mit diversen Transkriptionsproteinen an spezifischen Aktivierungsdomänen und vermögen hierdurch auf komplexe Weise Genexpression und Zellfunktion zu modulieren (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Mechanismus der Östrogenwirkung (schematisch). Östrogenrezeptoren (ER) modulieren die Transkription von Genen mit spezifischen Erkennungssequenzen (ERE).

Die beiden bekannten Östrogenrezeptoren sind sich in weiten Bereichen sehr ähnlich, im Bereich der DNA-bindenden Domäne besteht eine über 95%ige Übereinstimmung der Aminosäure-Sequenz, im Liganden-bindenden Bereich eine nahezu 60%ige.

1985 gelang die Klonierung des ersten Östrogenrezeptors (Walter et al., 1985), der heute als Östrogenrezeptor  $\alpha$  (*ESR $\alpha$* ) bezeichnet wird. 1996 wurde ein weiterer Östrogenrezeptor entdeckt (Kuiper et al., 1996), der Östrogenrezeptor  $\beta$  (*ESR $\beta$* ). Die entsprechenden Gene für *ESR $\alpha$*  und *ESR $\beta$*  wurden in der Folge den Chromosomen 6q25.1 (Gosden et al., 1986) bzw. 14q22-24 (Enmark et al., 1997) zugeordnet. Phylogenetische Untersuchungen legen nahe, dass sich die Gene beider Östrogenrezeptoren vor mindestens 450 Millionen Jahren per Duplikation aus einem gemeinsamen Vorläufergen entwickelt haben (Kelley und Thackray, 1999) und jeweils spezielle Funktionen übernommen haben.

Im Bereich des Zentralnervensystems findet sich der Östrogenrezeptor  $\alpha$  vorwiegend im Hypothalamus, Hippocampus und der Amygdala. Der Östrogenrezeptor  $\beta$  wird im Cortex, Hippocampus, Hypothalamus, Kleinhirn, Bulbus olfactorius sowie in Kernen des basalen Vorderhirns exprimiert (Gustafsson, 1999; Muramatsu und Inoue, 2000).

Im Mausmodell wurden ontogenetische Unterschiede in der Expression der beiden Östrogenrezeptoren entdeckt. So lässt sich der Östrogenrezeptor  $\beta$  bereits ab dem 12. Gestationstag in der Hypophyse nachweisen, während der Östrogenrezeptor  $\alpha$  im Gehirn erst ab dem 17. Tag exprimiert wird. Im Erwachsenenalter ist der Östrogenrezeptor  $\alpha$  über den gesamten Hypophysenvorderlappen verteilt, während die

Expression des Östrogenrezeptors  $\beta$  auf bestimmte Regionen des Hypophysenvorderrlappens beschränkt bleibt (Muramatsu und Inoue, 2000).

Zusätzliche Hinweise auf ZNS-Effekte der *ESR $\alpha$*  und  $\beta$  leiten sich ab aus Verhaltenstests an „knock-out“-Mäusen. Bei „knock-out“-Modellen wird die Information eines bestimmten Gens gezielt ausgeschaltet, um spezifische Auswirkungen auf den Phänotyp erfassen zu können. So unterschieden sich weibliche homozygote *ESR $\alpha$* -„knock-out“-Mäuse von weiblichen Wildtypmäusen sowie heterozygoten *ESR $\alpha$* -„knock-out“-Tieren in ihrer sexuellen Aktivität (Ogawa et al., 1997, 1998a, 1998b). Man beobachtete bei ihnen eine geringere Nachkommenzahl, geringer ausgeprägte Brutpflege, zum Teil aggressiveres Verhalten und einen erhöhten Angstpegel. Bei männlichen homozygoten *ESR $\alpha$* -„knock-out“-Mäusen wurden verminderte Angst und reduzierte Aggressivität registriert, während die sexuelle Aktivität im Vergleich zu heterozygoten *ESR $\alpha$* -„knock-out“-Tieren und Wildtypmäusen kaum beeinflusst wurde. Krężel und Mitarbeiter beobachteten primär bei weiblichen *ESR $\beta$* -„knock-out“-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen verstärkte Angst, während männliche *ESR $\beta$* -„knock-out“-Mäuse sich in ihrem Verhalten nicht von der Wildtypvariante unterschieden (Krężel et al., 2001). Beide *ESR* beeinflussen somit das Angstverhalten von Mäusen, wenngleich geschlechtsspezifisch unterschiedliche Effekte auftreten.

#### **1.4 Bekannte Östrogenrezeptorpolymorphismen und Befunde zur Assoziation mit neuropsychiatrischen Erkrankungen**

Für beide Östrogenrezeptorgene sind mehrere genetische Polymorphismen<sup>2</sup> beschrieben. Es existieren zahlreiche Studien, die sich auf Zusammenhänge zwischen den bekannten Östrogenrezeptor-Gen-Polymorphismen und gynäkologischen Erkrankungen beziehen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll.

Die folgenden Tabellen (Tabelle 1 und 2) geben einen Überblick über bekannte *ESR $\alpha$* - und *ESR $\beta$* -Gen-Polymorphismen und das Spektrum der Assoziationsbefunde mit neuropsychiatrischen Erkrankungen:

---

<sup>2</sup> Polymorphismus=DNA-Variation mit einer Häufigkeit  $\geq 1\%$  bzw. ohne gesicherte funktionelle Effekte; Mutation=seltene DNA-Variation ( $<1\%$ ) bzw. mit nachweislich krankheitsrelevanten Effekten.

**Tabelle 1:** Bekannte Östrogenrezeptorgenpolymorphismen und Assoziationsbefunde

Polymorphe Region	Assoziationsbefund
<p><i>ESRα</i>-Gen Intron 1 <i>PvuII</i>-Schnittstelle</p> <p>2 Allele, je nach Vorhandensein der Schnittstelle mit p (vorhanden) bzw. P (nicht vorhanden) bezeichnet</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ Multiple Sklerose bei P-Allel (Kikuchi et al., 2002)</li> <li>+ <i>M. Parkinson</i> kombiniert mit Demenz bei P-Allel (Isoe-Wada et al., 1999)</li> <li>+ <i>M. Alzheimer</i> bei PP-Genotyp (Isoe-Wada et al., 1999)</li> <li>+ <i>M. Alzheimer</i> bei PP-Genotyp (Brandi et al., 1999)</li> <li>+ <i>M. Alzheimer</i> mit spätem Beginn bei P-Allel (Ji et al., 2000)</li> <li>+ kognitive Defizite im Alter bei p-Allel (Yaffe et al., 2002)</li> <li>+ präseniler <i>M. Alzheimer</i> bei Kombination von pp-Genotyp und Apolipoprotein ε4-Allel (Mattila et al., 2000)</li> <li>- Multiple Sklerose (Savettieri et al., 2002)</li> <li>- bipolare Erkrankungen und Erkrankungsbeginn im Wochenbett (Jones et al., 2000)</li> <li>- <i>M. Parkinson</i> und Demenz (Mattila et al., 2002)</li> <li>- <i>M. Parkinson</i> (Maraganore et al., 2002)</li> <li>- <i>M. Alzheimer</i> (Maruyama et al., 2000)</li> <li>- <i>M. Alzheimer</i> (Lambert et al., 2001)</li> <li>- Alkohol-assoziierte Demenz (Ji et al., 2000)</li> <li>- vaskuläre Demenz (Ji et al., 2000)</li> <li>- familiärer <i>M. Alzheimer</i> (Ji et al., 2000)</li> <li>- präseniler <i>M. Alzheimer</i> (Ji et al., 2000)</li> <li>- Ängstlichkeit (Prichard et al., 2002)</li> <li>- <i>Anorexia nervosa</i> (Eastwood et al., 2002)</li> <li>- Schizophrenie (Ouyang et al., 2001)</li> </ul>
<p><i>ESRα</i>-Gen Intron 1 <i>XbaI</i>-Schnittstelle</p> <p>2 Allele, je nach Vorhandensein der Schnittstelle mit x (vorhanden) bzw. X (nicht vorhanden) bezeichnet</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>+ <i>M. Alzheimer</i> bei XX-Genotyp (Isoe-Wada et al., 1999)</li> <li>+ <i>M. Alzheimer</i> bei XX-Genotypen (Brandi et al., 1999)</li> <li>+ <i>M. Alzheimer</i> mit spätem Beginn bei X-Allel (Ji et al., 2000)</li> <li>+ kognitive Defizite im Alter bei x-Allel (Yaffe et al., 2002)</li> <li>+ präseniler <i>M. Alzheimer</i> bei Kombination von xx-Genotyp und Apolipoprotein ε4-Allel (Mattila et al., 2000)</li> <li>- Multiple Sklerose (Kikuchi et al., 2002)</li> <li>- Multiple Sklerose (Savettieri et al., 2002)</li> <li>- bipolare Erkrankungen und Erkrankungsbeginn im Wochenbett (Jones et al., 2000)</li> <li>- <i>M. Parkinson</i> (Maraganore et al., 2002)</li> <li>- <i>M. Alzheimer</i> (Maruyama et al., 2000)</li> </ul>

<i>ESRα</i> -Gen Intron 1 <i>Xba</i> I-Schnittstelle	- <i>M. Alzheimer</i> (Lambert et al., 2001) - Ängstlichkeit (Prichard et al., 2002) - <i>Anorexia nervosa</i> (Eastwood et al., 2002) - Schizophrenie (Ouyang et al., 2001)
<i>ESRα</i> -Gen (TA) <sub>n</sub> - Mikrosatellit 5' von Exon 1 (18 Allele)	+ Ängstlichkeit bei vielen TA-Repeats (Comings et al., 1999) + keine Assoziation mit Ängstlichkeit; aber: Ängstlichkeit steigt bei Kombination von wenigen TA-Repeats und XX- und/oder PP-Genotyp (Prichard et al., 2002) - ADHD, ODD, CD (Comings et al., 2000) - <i>Anorexia nervosa</i> (Eastwood et al., 2002)
<i>ESRβ</i> -Gen Exon 8 A1730G im 3'- untranslatierten Be- reich (2 Allele)	+ Assoziation mit <i>M. Alzheimer</i> nur bei Berücksichtigung der Interaktion zwischen <i>ESRα</i> - und <i>β</i> -Gen-Polymorphismen (Lambert et al., 2001) - <i>Anorexia nervosa</i> (Eastwood et al., 2002) - bipolare Erkrankungen (Kealey et al., 2001) - Essstörungen (Rosenkranz et al., 1998)
<i>ESRβ</i> -Gen (CA) <sub>n</sub> - Mikrosatellit (14 Allele)	+ keine Assoziation mit <i>M. Alzheimer</i> beim Vergleich aller Allele; aber: Allel 5 (= (CA) <sub>18</sub> ) ist protektiver Faktor für <i>M. Alzheimer</i> (Forsell et al., 2001) - <i>Anorexia nervosa</i> (Eastwood et al., 2002)
<i>ESRβ</i> -Gen G1082A (2 Allele)	+ Überrepräsentierung des heterozygoten G1082A-Genotyps bei Patientinnen mit <i>Anorexia nervosa</i> (Eastwood et al., 2002) + <i>Anorexia nervosa</i> bei G-Allel (Rosenkranz et al., 1998)

(ADHD = attention deficit hyperactivity disorder = hyperkinetisches Syndrom; ODD = oppositional defiant disorder = Störung mit oppositionellem Trotzverhalten; CD = conduct disorder = Störung des Sozialverhaltens)

+ bedeutet Assoziation mit dem entsprechenden Allel/Genotyp

- bedeutet keine signifikante Assoziation mit einem der Allele/Genotypen

**Tabelle 2:** Kollektive der Studien aus Tabelle 1

Autoren	Kollektive
Brandi et al., 1999	193 Patienten mit <i>M. Alzheimer</i> und 202 Kontrollpersonen; keine Angabe zu Geschlecht und Herkunft
Comings et al., 2000	326 nicht-verwandte Kaukasier, davon 271 Patienten mit Tourette-Syndrom sowie 55 gesunde Kontrollen; keine Angabe zum Geschlecht
Comings et al., 1999	179 Männer mit Alkohol-, Drogen- oder Medikamentenmissbrauch aus kalifornischen Krankenhäusern
Eastwood et al., 2002	170 kaukasische Patientinnen mit <i>Anorexia nervosa</i> und 152 kaukasische weibliche Kontrollpersonen

Autoren	Kollektive
Forsell et al., 2001	336 <i>M. Alzheimer</i> -Patienten (214 Frauen, 122 Männer) und 110 gesunde Kontrollpersonen (37 Männer, 73 Frauen) aus Schweden
Isoe-Wada et al., 1999	13 Patienten mit <i>M. Parkinson</i> und Demenz; 71 Patienten mit <i>M. Parkinson</i> ohne Demenz; 86 Patienten mit <i>M. Alzheimer</i> und 51 gesunde Kontrollpersonen; keine Angabe zum Geschlecht
Ji et al., 2000	223 <i>M. Alzheimer</i> -Patienten, 66 Patienten mit vaskulärer Demenz, 17 Patienten mit Alkohol-assoziiertes Demenz, 134 gesunde Kontrollpersonen; in Japan lebend; keine Angabe zum Geschlecht
Jones et al., 2000	219 Patienten mit bipolaren Erkrankungen (92 Männer, 127 Frauen) und 219 Kontrollpersonen (94 Männer, 125 Frauen) aus Großbritannien
Kealey et al., 2001	102 Patienten mit bipolarer Erkrankung (53 Männer, 49 Frauen) aus Irland sowie deren Eltern
Kikuchi et al., 2002	116 Patienten mit Multipler Sklerose (31 Männer, 85 Frauen) und 101 Kontrollpersonen (21 Männer, 80 Frauen) aus Japan
Lambert et al., 2001	186 <i>M. Alzheimer</i> -Patienten (73 Männer, 113 Frauen) und 405 Kontrollpersonen (190 Männer, 215 Frauen) aus Großbritannien
Maraganore et al., 2002	319 <i>M. Parkinson</i> -Patienten (197 Männer, 122 Frauen) und 196 Kontrollpersonen (74 Männer, 122 Frauen) überwiegend europäischer Abstammung
Maruyama et al., 2000	183 Patienten mit <i>M. Alzheimer</i> (54 Männer; 129 Frauen) sowie 133 Kontrollpersonen (48 Männer; 85 Frauen) aus Japan; 156 Patienten mit <i>M. Alzheimer</i> (70 Männer; 86 Frauen) sowie 120 Kontrollpersonen (63 Männer; 57 Frauen) aus England
Mattila et al., 2002	41 Patienten mit <i>M. Parkinson</i> und Demenz (21 Männer, 20 Frauen) und 59 Kontrollpersonen (33 Männer, 26 Frauen) aus Finnland
Mattila et al., 2000	214 <i>M. Alzheimer</i> -Patientinnen und 290 gesunde weibliche Kontrollpersonen aus Schweden und Finnland
Ouyang et al., 2001	125 Schizophrene (50 Männer, 75 Frauen) und 142 psychiatrisch Gesunde (60 Männer, 82 Frauen); Han-Chinesen aus Taiwan
Prichard et al., 2002	Längsschnittstudie mit 680 Australiern im Alter von 4-8 Monaten bis zum Alter von 15-16 Jahren; keine Angabe zum Geschlecht
Rosenkranz et al., 1998	153 (91 Jungen, 62 Mädchen) extrem übergewichtige deutsche Kinder und Jugendliche; 143 (83 Männer, 63 Frauen) gesunde untergewichtige Studenten; 116 (10 Männer, 106 Frauen) Patienten mit <i>Anorexia nervosa</i> ; 90 (7 Männer, 83 Frauen) Patienten mit Bulimie
Savettieri et al., 2002	132 Patienten mit Multipler Sklerose (51 Männer, 81 Frauen) und 129 Kontrollpersonen (63 Männer, 66 Frauen) aus Süditalien
Yaffe et al., 2002	Längsschnittstudie: untersucht wurden 2625 Frauen aus den USA (Alter: >65 Jahre), Beobachtungsintervall: 6-8 Jahre

In Ergänzung zu diesen Assoziationsstudien ist nach Mutationen und Polymorphismen im Bereich der Östrogenrezeptorgene in verschiedenen psychiatrischen Patientenkollektiven gefahndet worden. So wurden bei Patienten mit Schizophrenie vier seltene „missense“-Mutationen<sup>3</sup> des *ESRα*-Gens identifiziert, deren Relevanz für ZNS-Erkrankungen noch an größeren Kollektiven zu klären ist (Feng et al., 2001). Bei Patienten mit Essstörungen wurden einzelne ebenfalls seltene *ESRβ*-Genvarianten entdeckt, für die bislang keine Assoziation mit einem spezifischen Krankheitsbild nachgewiesen wurde (Rosenkranz et al., 1998).

---

<sup>3</sup> mit Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz

## 2 Ziele

Ziel der Arbeit war es, die Häufigkeit ausgewählter Polymorphismen beider Östrogenrezeptorgene in einem Patientenkollektiv mit Panikstörung sowie einem gesunden Kontrollkollektiv zu bestimmen und eine mögliche genetische Assoziation mit der Erkrankung unter Berücksichtigung der Komorbidität mit Agoraphobie zu prüfen.

Ziel der Arbeit war es weiterhin, die komplexe genomische Organisation der Östrogenrezeptorgene  $\alpha$  und  $\beta$  vergleichend zu analysieren und anhand zusätzlicher Sequenzinformationen zu aktualisieren.

In Ergänzung zu Daten für bereits bekannte Sequenzvarianten sollten dabei auch erste Angaben zu neuen Polymorphismen des Östrogenrezeptor  $\alpha$ - und  $\beta$ -Gens gemacht werden.



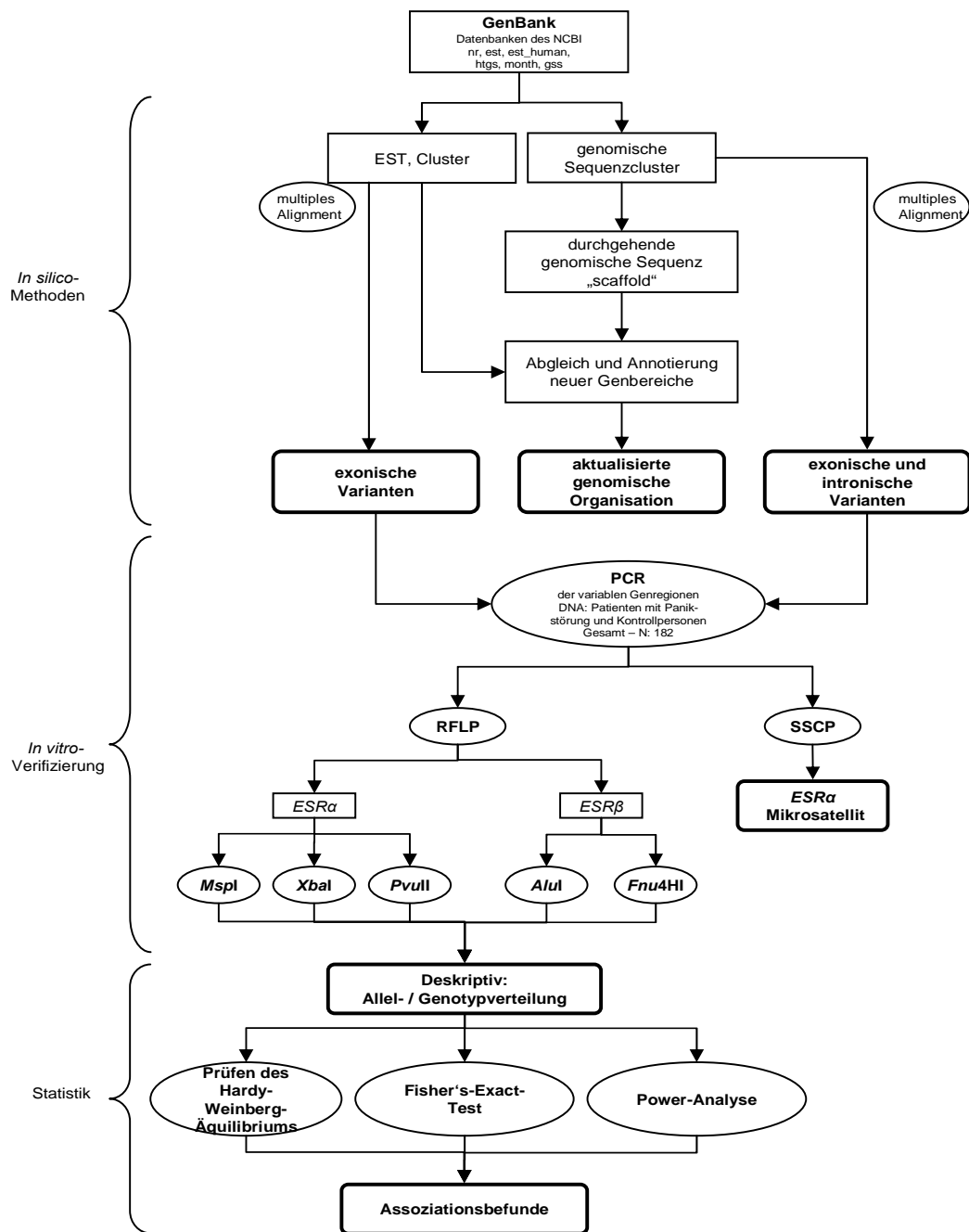
### 3 Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden zunächst *in silico*- (=informatische) Methoden herangezogen, um die Exon-Intron-Strukturen der Östrogenrezeptorgene  $\alpha$  und  $\beta$  anhand öffentlicher Datenbanken zu aktualisieren sowie potentielle Polymorphismen zu identifizieren.

In einem zweiten Schritt wurde die Existenz mehrerer repräsentativer Polymorphismen mittels PCR-basierter Verfahren *in vitro* an genomischer DNA verifiziert. Ermittelt wurden die jeweiligen Allel- und Genotypfrequenzen für ein Patientenkollektiv mit Panikstörung und ein gesundes Kontrollkollektiv.

Diese wurden in einem dritten Schritt im Hinblick auf eine mögliche Assoziation mit der Panikstörung bzw. mit Panikstörung und Agoraphobie statistisch untersucht.

Folgendes Schaubild gibt einen Überblick über die Strategie und die hierbei verwendeten Techniken:



**Abbildung 3:** Methodik-Schaubild

NCBI=National Center for Biotechnology Information; nr=non redundant sequences; est=expressed sequence tags; est\_human=human expressed sequence tags; htgs=high throughput genomic sequences; gss=genome survey sequences; PCR=Polymerasekettenreaktion; DNA=Desoxyribonukleinsäure; RFLP=Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus; SSCP=single strand conformation polymorphism

### 3.1 *In silico*-Methoden

Zur *in silico*-Identifizierung von potentiellen Polymorphismen in den Östrogenrezeptor-genen dienten vergleichende Sequenzanalysen. Hierzu wurden zunächst homologe Gen-sequenzen aus GenBank bezogen, einer Datenbank des National Center for Biotechno-logy Information (NCBI). Es handelt es sich um eine öffentliche online-Datenbank am Campus des US National Institute of Health (NIH), die 1999 gegründet wurde und über die homepage des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) frei zugänglich ist. Innerhalb mehrerer Kategorien enthält sie eine Vielzahl bekannter Nukleotid- und Proteinsequen-zen (August 1999: 4,6 Millionen Nukleotidsequenzen) von über 55000 verschiedenen Organismen. Die Daten stammen von individuellen Autoren und großen Sequenzier-konsortien und werden täglich mit den Datenbanken des European Molecular Biology Laboratory (EMBL) bzw. der DNA Databank of Japan (DDBJ) abgeglichen (Benson et al., 2000).

**Tabelle 3:** Charakterisierung der genutzten GenBank-Ressourcen

Datenbank-Bezeichnung	Beschreibung
est (expressed sequence tags)	enthält kurze (ca. 100-900bp) cDNA-Sequenzfragmente, die aus mRNA abgeleitet sind, jedoch zumeist nicht den kompletten transkribierten Bereich eines Gens enthalten
est_human (human expressed sequence tags)	entspricht der est-Datenbank mit Einträgen ausschließlich vom menschlichen Genom
gss (genome survey sequences)	enthält Arbeitssequenzen meist niedriger Güte direkt aus einem Genomprojekt als Ergebnis eines einzelnen Sequenzierdurchgangs
htgs (high throughput genomic sequences)	enthält genomische DNA-Sequenzen, die überwiegend von den großen Sequenzierzentren bereitgestellt werden
nr (non redundant sequences)	vereinigt Daten aus mehreren Datenbanken, wobei redundante Sequenzeinträge initial herausgefiltert wurden
month	enthält die innerhalb der letzten 30 Tage neu aufgenommenen Einträge

Durch die Beschränkung auf Sequenzinformation, die *in vitro* generiert wurde, sollten dabei falsch positive, hypothetische Annotationen vermieden werden. Auf Verfahren

zur Genvorhersage mittels Mustererkennung - wie z.B. in Gene Recognition and Assembly Internet Link (GRAIL) implementiert - wurde bewusst verzichtet. Die per Homologiesuche erhaltenen genomischen und transkribierten Gensequenzen wurden zu Sequenzclustern zusammengefasst. Nach Erstellen einer durchgehenden genomischen Konsensussequenz aus sich überlappenden Clustern („genomic scaffold“) wurde innerhalb der einzelnen Cluster mittels multipler Alignments nach Sequenzvarianten gefahndet.

### **3.1.1 Homologie-basiertes Erstellen von Clustern und lokales Sequenzalignment**

Als Vorlage für die Annotierung der Östrogenrezeptorgenbereiche dienten genomische Sequenzdaten und Transkriptsequenzen (ESTs) des NCBI. Letztere werden zu sog. UniGene-Clustern zusammengefasst, wenn ihre Ähnlichkeit einen Schwellenwert überschreitet. Bei der Erstellung des UniGene Clusters verhindern Filter den Einschluss kontaminierender Sequenzen (repeats, mitochondriale Sequenzen, low complexity). Auf die restlichen Sequenzen innerhalb des Clusters, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zu demselben Gen gehören, bietet UniGene einen schnellen Zugriff (Schuler, 1997). Diese Sequenzdaten wurden in Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) eingegeben, ein Programm zur Homologiesuche, das 1990 entwickelt wurde und wie UniGene im Datenverbund des NCBI frei zugänglich ist (Altschul et al., 1990). BLAST vergleicht paarweise die eingegebene Sequenz mit Sequenzen aus den genannten GenBank-Teildatenbanken und trifft eine Auswahl anhand des lokalen Übereinstimmungsgrades. Auf diese Weise können ähnliche ESTs sowie homologe genomische DNA-Sequenzen identifiziert werden und zu EST-Clustern bzw. genomischen Sequenz-Clustern zusammengefasst werden. Der BLAST-Algorithmus ist heuristisch und arbeitet in drei Schritten: zunächst wird anhand der eingegebenen Sequenzvorlage eine Liste erstellt, die Fragmente (Worte) bestimmter Länge ( $w$ ) enthält, wobei die Standardwortlänge 11 Buchstaben (entspricht 11 Basen bei Nukleinsäuresequenzen) beträgt. Anschließend wird nach Übereinstimmungen zwischen den Worten der Liste und Einträgen der genannten Datenbanken gesucht, wodurch Wortpaare generiert werden. Abschließend werden die gefundenen Wortpaare in beiden Richtungen fortlaufend zeichenweise erweitert, bis die Kosten des momentan erweiterten Wortpaares die Kosten anderer

Erweiterungen des zugrunde liegenden Wortpaares übersteigen. Die Kosten  $w(a,b)$ , um ein Zeichen  $a$  eines Alignments in ein Zeichen  $b$  eines anderen Alignments zu überführen, sind dabei wie folgt definiert:

- $w(a,a)=0$
- $w(a,b)=1$ , falls  $a \neq b$
- $w(a,-)=w(-,b)=1$  (-=Lücke)

Die Gesamtkosten eines paarweisen Alignments sollen möglichst gering sein und setzen sich aus der Summe der Einzeloperationen über die gesamte Sequenzvorlage zusammen. Dabei ist die Verwendung von Leerstellen als Erweiterung möglich. Dieses Verfahren spart Zeit, da unergiebigere Erweiterungen frühzeitig abgebrochen werden.

Um die Qualität des Alignments zu erhöhen und Vektor-kontaminierte Sequenzen bzw. Sequenzen von Pseudogenen (Sequenzen ohne Geneigenschaften, die jedoch Ähnlichkeit mit Genen aufweisen können) zu eliminieren, wurden für die hier dargestellten Analysen ausschließlich Sequenzen mit >98% Übereinstimmung zur Ausgangssequenz ausgewählt.

### 3.1.2 Multiples Sequenz-Alignment

Methoden für das multiple Sequenzalignment stellen eine Erweiterung paarweiser Sequenzalignments dar; sie eignen sich zur Visualisierung von Sequenzvarianten, zur Identifizierung konservierter Regionen beim Vergleich verwandter Gene oder des gleichen Gens bei verschiedenen Organismen sowie zur Identifizierung von Strukturmotiven. Hier dienen multiple Alignments zur Untersuchung der bereits bekannten sowie der neu zugeordneten genomischen und messenger-Ribonukleinsäure- (mRNA)-Sequenzen auf homologe Sequenzblöcke und zur Annotation von exprimierten Genregionen durch den Abgleich genomischer Sequenzdaten mit sequenzierten Transkripten (ESTs). Dabei erfolgte für alle Exon-Intron-Grenzen ein manueller Abgleich unter Berücksichtigung der GT-AG-Regel, derzufolge Introns am 5'- und 3'-Ende definierte Konsensussequenzen aufweisen (Brown, 1999). Die Konsensussequenzen lauten dabei für die 5'-Spleißstelle: 5'-AGGTAA↓GT-3', für die 3'-Spleißstelle: 5'-(Py)<sub>6</sub>NCAG↓-3' (Py=Pyrimidin; N= beliebiges Nukleotid).

Das multiple Aligment wurde mit Hilfe des Programmes MACAW (Multiple Alignment Construction and Analysis Workbench; V.2.0.5) (Schuler et al., 1991) vorgenommen. Die abschließende Annotation der genomischen Sequenz, die sich aus dem Sequenzabgleich ergab, wurde mittels eines Sequenzeditors (GeneTool Lite, V.1.0) erstellt.

Darüber hinaus wurden homologe Cluster auf Varianten (Einzelbasenaustausche und andere variable Abschnitte) überprüft. Sequenzabweichungen wurden als Indiz für das Vorliegen von Polymorphismen gewertet.

## **3.2 *In vitro*-Verifizierung**

Die Existenz der *in silico* identifizierten Polymorphismen wurde für 6 repräsentative Varianten *in vitro* bestätigt. Dazu wurden für jeden biallelischen Polymorphismus an einem Kollektiv von 90 Patienten mit Panikstörung sowie 92 gesunden Kontrollpersonen mittels RFPL (=Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus)-Assays beide Allele bestimmt, der Nachweis eines polymorphen repeats erfolgte bei 40 Patienten mit einem SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)-Assay.

### **3.2.1 Charakterisierung der Stichproben**

Untersucht wurden 90 deutschstämmige Patienten (30 Männer, 60 Frauen) mit Panikstörung (Diagnosen gemäß DSM III-R-Kriterien) und einem Durchschnittsalter von 39,8 Jahren (Standardabweichung 11,1 Jahre). In diesem Kollektiv bestand zusätzlich bei 63 Patienten (48 Frauen und 15 Männern) eine Agoraphobie. Ferner litten 42 Panikpatienten an einer spezifischen Phobie, 29 Patienten an sozialer Phobie, 25 an einer depressiven Störung sowie 16 an einer dysthymen Störung. Bei 13 Patienten mit Panikstörung bestand zusätzlich eine Alkoholabhängigkeit. Die psychiatrischen Diagnosen wurden mittels strukturierter klinischer Interviews von erfahrenen Psychiatern im Vorfeld der Genotypisierung gestellt (SADS-LA für N=42 Patienten sowie CIDI für N=48 Patienten) (Manuzza et al., 1986; Robins et al., 1988). Das Kontrollkollektiv setzte sich zusammen aus 92 nicht miteinander verwandten gesunden Blutspendern (33 Männern, 59 Frauen) mit einem Durchschnittsalter von 34 Jahren (Standardabweichung 12,2 Jahre). Alle Patienten sowie Kontrollpersonen hatten im Vorfeld schriftlich ihr Einverständnis mit den geplanten Untersuchungen erklärt, die Ethikkommission der Universität Würzburg hatte dem Forschungsvorhaben zugestimmt.

### 3.2.2 PCR

Für die Genotypisierung der Stichproben wurden PCR-basierte Verfahren eingesetzt. Die PCR (Polymerase-Chain-Reaction) (Mullis et al., 1986) wurde zur spezifischen Amplifizierung von DNA-Abschnitten entwickelt. Sie besitzt heute vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der biomedizinischen Forschung und Labordiagnostik und erlaubt den Nachweis von Veränderungen der DNA-Sequenz. Für die vorliegende Arbeit erfolgte die DNA-Gewinnung aus EDTA-Blut nach einem Standard-Protokoll (Miller et al., 1988). Für die *in vitro*-Verifizierung von Exon 10 des *ESRβ* wurde eine optimierte Mischung von 37 cDNAs unterschiedlicher menschlicher Gewebe (Human Universal Quick-Clone cDNA, Clontech) verwendet.

Theoretisch ist ein Molekül DNA ausreichend, um den gewünschten DNA-Bereich beliebig oft zu amplifizieren. Benötigt werden folgende Substanzen: Ausgangs-DNA, welche die gewünschte Sequenz enthält, *Taq*-Polymerase, Vorwärts- und Rückwärtsprimer (=Oligonukleotid-Startermoleküle), die vier Desoxynukleotide A, T, G und C (für Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin) sowie  $Mg^{++}$ -haltiger Reaktionspuffer. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Hitze (95°C) denaturiert, d.h. die DNA wird in ihre beiden Einzelstränge getrennt. Anschließend folgt bei geringerer, für die jeweiligen Oligonukleotide spezifischer Temperatur die Anlagerung der Oligonukleotide an die entsprechenden, komplementären Stellen der DNA (=“Primerannealing“). Schließlich wird mittels der hitzestabilen *Taq*-Polymerase, einem Enzym aus *Thermophilus aquaticus*, bei deren Temperaturoptimum (=72°C) eine Primerextension durchgeführt. Dabei werden die Primer durch die bereitgestellten Nukleotide von der *Taq*-Polymerase in 5'→3'-Richtung entsprechend der DNA-Matrize elongiert. Durch 35-40faches Wiederholen dieser drei Schritte lässt sich eine vieltausendfache Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes erreichen, der zwischen den beiden Primern liegt.



### 3.2.2.1 Primerauswahl

Als Vorlage für die Auswahl der Oligonukleotidprimer dienen flankierende Bereiche der zu amplifizierenden Zielsequenz, jeweils einer der beiden Oligonukleotidprimer ist dabei komplementär zum Plus-Strang, der zweite komplementär zum Minus-Strang der doppelsträngigen DNA. Die genomischen DNA-Sequenzen der zu untersuchenden Regionen des Östrogen-Rezeptor  $\alpha$ -Gens sowie des Östrogen-Rezeptor  $\beta$ -Gens wurden noch ohne Annotationen aus öffentlichen Datenbanken bezogen. Für den *Xba*I- und *Pvu*II-Polymorphismus wurden Primer gemäß dem Protokoll von Maruyama (Maruyama et al., 2000) verwendet. Für die übrigen Polymorphismen wurden geeignete Primer mit Hilfe des Programmes Primer3 (Rozen und Skaletsky, 2000; <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>) ermittelt. Bei der Primerauswahl wurde darauf geachtet, dass die Basenfolge keine umfangreichen Wiederholungen beinhaltet, die Primer spezifisch waren, der GC-Gehalt bei ca.50% lag, die Länge gepaarter Primer und die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der beiden Oligonukleotide übereinstimmte.

$T_m$  der Primer errechnet sich näherungsweise wie folgt:

$$T_m = \text{Anzahl der G-C-Bindungen} \times 4^\circ\text{C} + \text{Anzahl der A-T-Bindungen} \times 2^\circ\text{C}$$

Desweiteren wurden zueinander komplementäre Basen am 3'OH-Ende der Primer vermieden, da sich in diesem Fall Primer-Dimere bilden können (Strachan und Read, 1996). Die Länge des PCR-Produktes orientierte sich an den jeweiligen Schnittmustern innerhalb der Zielsequenz und berücksichtigte die Optima für die elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente.

### 3.2.2.2 PCR-Bedingungen

Die Ansätze für die PCR wurden in 0,2 ml Eppendorf-PCR-Tubes pipettiert. Das folgende Pipettierschema mit einem Gesamtvolumen von 26  $\mu$ l wurde für die PCR gewählt (Tabelle 4):

**Tabelle 4:** PCR - Ansatz

Reagenz	Menge	End-Konzentration
dH <sub>2</sub> O	13,0 µl	
dNTP-Mix	4,0 µl	Je 10 µmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP/ ml
Vorwärts-Primer	0,5 µl	10 pmol/µl
Rückwärts-Primer	0,5 µl	10 pmol/µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,5 µl	5 U/µl
PCR-Puffer	2,5 µl	1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
DNA-Probe	5,0 µl	8 ng genomische DNA/ µl

Soweit den untersuchten polymorphen Regionen eine NCBI-Kennung zugeordnet wurde, ist diese angegeben. Lokalisation, Primerpaare und PCR-Produktlänge sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5:** PCR – Primerpaare und Produktlängen

SNP-Kennung bzw. Bezeichnung des Polymorphismus	Lokalisation	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Produkt-Länge
rs2077647	<i>ESRa</i> ; Exon 1, Codon 10	TCGGGCTGTGCTCTTTT	GGCGTTGAACTCGTAGGC	284bp
<i>Xba</i> I und <i>Pvu</i> II (*)	<i>ESRa</i> Intron 1	CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTC CTATTCTCC	TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTC GATTATCTGA	1374bp
(GT) <sub>n</sub>	<i>ESRa</i>	GCTGAAAGGCTGAAAATGCT	CACTGTGTCCCTCTCCTTCC	297bp
rs4134646	<i>ESRβ</i> Exon 15	CAGAGGCTTGCAGGAACCTA	AGGCCATTGAGTGTGGAAAC	774bp
rs1255998	<i>ESRβ</i> Exon 16	GAGGGGCACCAATGTAGAAA	GGGGGTGGTACAGAAACTTG	928bp
ESRB exonspezifische Nachweisreaktion Exon 6-Exon 10	<i>ESRβ</i> Exon 10 (aktuelle Nummerierung)	CCATGATCCTGCTCAATTCC	TCTCTGGCTCAAGGTCTCTCA	448bp
ESRB exonspezifische Nachweisreaktion Exon 6-Exon 10	<i>ESRβ</i> Exon 10 (aktuelle Nummerierung)	CTGAAGCGTGAAGTCCAGTG	TCTCTGGCTCAAGGTCTCTCA	448bp

(\*) übernommen von Maruyama et al., 2000

Im Folgenden ist die Programmierung des Thermocyclers wiedergegeben:

Beginn: 95°C für 5 Minuten (Denaturierung)

- |            |                                      |                        |
|------------|--------------------------------------|------------------------|
| 1. Schritt | 95°C für 30 Sekunden                 | (Denaturierung)        |
| 2. Schritt | Annealing-Temperatur für 30 Sekunden |                        |
| 3. Schritt | 72°C für 1 Minute                    | (Elongation)           |
| Ende:      | 72°C für 5 Minuten                   | (terminale Elongation) |

Schritte 1.-3. wurden jeweils 39fach wiederholt, zu Beginn wurde eine initiale Denaturierung und am Ende eine terminale Elongation durchgeführt.

Die Annealing-Temperatur betrug für den *MspI*-Polymorphismus 57°C, für den *XbaI*-/*PvuII*-Polymorphismus 60°C, für die (GT)<sub>n</sub>-Variante 58°C, für den *AluI*-Polymorphismus 59°C und für den *Fnu4HI*-Polymorphismus 58°C sowie 58°C für die Spleißvariante in Exon 10.

### 3.2.3 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Assay

#### 3.2.3.1 Restriktionsverdau

Anhand eines Restriktionsverdaus lassen sich Rückschlüsse auf die Basenabfolge innerhalb eines DNA-Stranges ziehen. Die erhaltenen PCR-Produkte werden dazu einer Restriktionsanalyse mittels spezifischer Restriktionsendonukleasen unterzogen, die in Abhängigkeit von dem Vorhandensein einer definierten Erkennungssequenz Fragmente unterschiedlicher Größe generieren.

Die Auswahl geeigneter Enzyme, deren DNA-Erkennungssequenzen die polymorphe Genregion beinhalten, erfolgte für die vorliegende Arbeit mittels Webcutter V2.0 (<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>).

Die folgenden beiden Tabellen stellen die Reaktionsbedingungen für die Restriktionsanalysen dar:

**Tabelle 6:** Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau (Gesamtvolumen 15µl)

Reagenz	Menge
PCR-Produkt	5,0 µl
Enzym (10 U/ µl)	0,5 µl
Puffer	1,5 µl
dH <sub>2</sub> O	8,0 µl

**Tabelle 7:** Reaktionsbedingungen

SNP-Kennung des Polymorphismus	Enzym	Puffer	Inkubation	Erkennungssequenzen	Basenaustausch
rs2077647	<i>MspI</i>	MBI G+	12h bei 37°C	C↓CGG	C→T
ohne Kennung	<i>XbaI</i>	MBI Y+	12h bei 37°C	T↓CTAGA	nicht bekannt
ohne Kennung	<i>PvuII</i>	MBI G+	12h bei 37°C	CAG↓CTG	T→C
rs4134646	<i>AluI</i>	MBI Y+	12h bei 37°C	AG↓CT	G→A
rs1255998	<i>Fnu4HI</i>	NEB4	12h bei 37°C	GC↓NGC	C→G

### 3.2.3.2 Agarose-Gel-Elektrophorese und native Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Visualisierung von Schnittstellen für das jeweilige Restriktionsenzym und damit der Polymorphismen erfolgte mittels Größenvergleich der Schnittprodukte in einer Gel-Elektrophorese.

Bei der **Agarose-Gel-Elektrophorese** trennen sich DNA-Fragmente in einem Agarose-Gel entsprechend ihrer Molekülgröße und Ladung in einem Spannungsfeld zwischen Kathode und Anode auf. Die Größenordnung ist durch das gleichzeitige Auftrennen eines Standards (hier: 100bp-Marker) möglich. Das dem Gel zugefügte Ethidium ist ein aromatisches Kation, welches in die DNA interkaliert und es ermöglicht, die unterschiedlich weit gewanderten DNA-Fragmente mittels UV-Transilluminator (302nm) als diskrete Banden auf dem Gel zu erkennen.

Es wurden 3%ige Agarose-Gele verwendet (1,5g Agarose, 50ml TAE-Puffer und 4µl Ethidiumbromid bzw. 3g Agarose, 100ml TAE-Puffer und 5µl Ethidiumbromid). Agarose und TAE wurden aufgekocht, anschließend wurde unter Rühren Ethidiumbromid zugegeben. Dieser Ansatz wurde in eine Gel-Elektrophoresekammer gegossen.

Nachdem das Gel nach ca. 20 Minuten vollständig polymerisiert war, wurde die Gel-Elektrophoresekammer mit 1xTAE-Puffer aufgefüllt. Um die Dichte der Proben zu erhöhen, wurden 8 µl des Produkts des Restriktionsverdau mit 6 µl Blaupuffer gemischt und diese Mischung in die Geltaschen pipettiert. Eine weitere Tasche wurde mit 7,5 µl 100bp-Längenstandard beladen. Für 30-45 Minuten wurde eine Spannung von 60 V bei 50ml- und 80 V bei 100ml-Gelen angelegt. Die Ergebnisse wurden anhand einer Polaroid-Aufnahme der Gele dokumentiert.

Die **Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese** ermöglicht eine im Vergleich zur Agarose-Gel-Elektrophorese höhere Auflösung sowie den Nachweis geringerer DNA-Mengen. Hierzu wurde aus 20ml 10% PAA und 200µl APS ein Gel gegossen. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte vertikale Gel-Elektrophoresekammer eingespannt. Die Taschen wurden mit einer Mischung aus 6 µl des PCR-Produkts (nach Restriktionsverdau) und 6 µl Blaupuffer gefüllt. Als Größenstandard wurde wiederum eine weitere Tasche mit 7 µl der 100 bp-Längenreferenz beladen. Es wurde eine Spannung von 190 V für zwei Stunden angelegt. Um die DNA-Banden sichtbar zu machen, wurden die Gele anschließend einer Silberfärbung unterzogen (Budowle et al., 1991).

Für die Silberfärbung werden die Gele zunächst für zehn Minuten in eine 10% Ethanol-lösung gegeben, worauf die Zugabe von 1%iger Salpeterlösung für fünf Minuten folgt. Dann werden die Gele 20 Minuten in 300ml Silbernitratlösung, die mit 300 µl 37% Formaldehyd versetzt ist, geschwenkt, wodurch sich die positiv geladenen Silberionen an die negativ geladenen Phosphatreste der DNA anlagern. Nach zwei- bis dreimaligem kurzen Waschen der Gele in destilliertem Wasser wird das Silbernitrat mit Natriumcarbonatlösung, die mit Formaldehyd versetzt ist (1000µl 37% Formaldehyd auf ein Liter Natriumcarbonatlösung), reduziert und freies Silbernitrat von den Gelen entfernt. Diese Entwicklerlösung wird so lange erneuert bis die Banden deutlich sichtbar werden. Abschließend wird die Reaktion in einer 10%igen Eisessiglösung gestoppt, zugleich werden die Banden fixiert.

Die Gele wurden anschließend auf ein zugeschnittenes Filterpapier gelegt, mit einer Plastikfolie bedeckt und über Nacht bei 80°C auf dem Geltrockner vakuumgetrocknet.

### 3.2.4 SSCP

DNA-Sequenzvarianten lassen sich u.a. mittels „single strand conformation polymorphism“-Assays (SSCP) visualisieren (Orita et al., 1989a+b) basierend auf der Wanderungsgeschwindigkeit einzelsträngiger DNA im elektrischen Feld. Diese wird beeinflusst von der DNA-Sekundärstruktur, die wiederum von der Nukleotidsequenz (Primärstruktur) bestimmt wird. Durch einen Basenaustausch, -verlust oder -einschub kann die Sekundärstruktur und somit das Wanderungsverhalten des Moleküls in der Gel-Elektrophorese verändert werden. In jeder Spur sind vier Banden zu erkennen, jeweils zwei DNA-Einzelstränge von jedem der beiden Chromosomen. Sich entsprechende Banden der verschiedenen Spuren liegen dabei auf einer Höhe. Weicht die Lokalisation einer Bande von der normalen Lage ab, liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine durch einen Polymorphismus bedingte Konformationsänderung zugrunde, die zu einer veränderten Wanderungsgeschwindigkeit auf dem Gel geführt hat. Die Sensitivität des Verfahrens lässt sich erhöhen durch die Auftrennung bei verschiedenen Temperaturen.

Für diesen Assay wurden 8µl PCR-Produkt und 12µl SSCP-Puffer 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um eine Denaturierung der beiden DNA-Stränge zu erreichen. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und parallel in die Taschen von zwei 10%igen PAA-Gelen pipettiert. An eines dieser Gele wurde bei Raumtemperatur eine Spannung von 100Volt für 12 Stunden angelegt. Das andere Gel wurde bei 4°C für 20 Stunden einer Spannung von 100 Volt ausgesetzt.

Anschließend wurden die Gele mittels Silberfärbung gefärbt und auf dem Geltrockner vakuumgetrocknet.

### 3.3 Statistische Auswertung

#### 3.3.1 Hardy-Weinberg-Äquilibrium

Das Hardy-Weinberg-Äquilibrium ist eine mathematische Erklärung von Genotyp- und Allelhäufigkeiten, die 1908/09 von dem Engländer GH. Hardy und dem Stuttgarter Stabsarzt W. Weinberg abgeleitet wurde. Das Modell basiert auf fünf grundlegenden Annahmen: 1. Die Population ist ausreichend groß, 2. es besteht kein Genfluss zwischen verschiedenen Populationen, 3. Neumutationen sind vernachlässigbar, 4. die Individuen paaren sich zufällig und 5. es besteht keine natürliche Selektion innerhalb der Population. Sind diese Annahmen erfüllt, bleiben die Genotyp- und Allelfrequenzen über Generationen weitgehend unverändert. Nach dem Hardy-Weinberg-Modell kann die Häufigkeit der Heterozygoten ermittelt werden: Für ein Allelpaar A und a sei die Häufigkeit von A gleich p und die Häufigkeit von a gleich q. Daraus folgt:  $p+q=1$ . In der Population können die Genotypen AA, Aa und aa vorkommen. Wenn sie zufallsgemäß untereinander gekreuzt werden, erscheinen in der nachfolgenden Generation die Genotypen nach der folgenden Regel:

$$AA=p^2 \quad Aa+aA=2pq \quad aa=q^2$$

$$\text{Oder } p^2+2pq+q^2=[p+q]^2=\text{konstant}$$

Abweichungen von den errechneten Häufigkeiten können auf eine Verletzung der dem Gleichgewicht zugrunde liegenden Annahmen hinweisen (z.B. zu kleine Stichprobengrößen, Auftreten von Neumutationen) oder auch auf Unstimmigkeiten im Prozess der Genotypisierung. Sie lassen sich durch Vierfeldertests ( $\chi^2$ -Test) analysieren. Dabei ist zu beachten, dass die beobachteten Häufigkeiten gleichzeitig die Grundlage bilden für die Berechnung der nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht zu erwartenden Häufigkeiten und beide Werte somit nicht unabhängig sind. Dem wird Rechnung getragen durch die Zahl der Freiheitsgrade im Vierfeldertest ( $n-2$ , wobei n der Zahl von möglichen Genotypen entspricht). Für die vorliegende Arbeit erfolgte eine Prüfung auf Konformität aller Genotypfrequenzen mit dem HW-Gleichgewicht online ([http://kursus.kvl.dk/shares/vetgen/\\_Popgen/genetik/applets/kitest.htm](http://kursus.kvl.dk/shares/vetgen/_Popgen/genetik/applets/kitest.htm)). Der dem  $\chi^2$ -Wert entsprechende p-Wert verdeutlicht die Wahrscheinlichkeit dieser Aussage und

wurde hier mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel (Version 2002) ermittelt. Als Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde 0,05 gewählt, p-Werte  $<0,05$  bedeuteten somit eine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $<5\%$ .

### 3.3.2 Fisher's-Exact-Test

Der Fisher's-Exact-Test gibt ähnlich dem  $\chi^2$ -Test an, ob die Unterschiede zwischen zwei Merkmalen, im vorliegenden Fall zwischen in den Allelfrequenzen zweier Stichproben, durch zufallsbedingte Streuung zu erklären sind (Nullhypothese,  $H_0$ ) oder ob ein Zusammenhang zwischen Allelfrequenz und Erkrankung wahrscheinlich ist (Alternativhypothese,  $H_1$ ). Die Daten werden hierfür ebenfalls in einer 2x2-Kontingenztabelle erfasst.

**Tabelle 8:** Kontingenztabelle

	Allel 1	Allel 2
Panikstörung: ja	A	B
Panikstörung: nein	C	D

Dazu wurde aus den Allelfrequenzen von Kontrollkollektiv versus Patienten mit Panikstörung bzw. Kontrollkollektiv versus Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie der p-Wert berechnet (PRISM, 2.01). Der p-Wert bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, mit der sich die vorliegenden Ergebnisse zufällig ergeben haben könnten. Ist diese Wahrscheinlichkeit kleiner als das vorab festgelegte Signifikanzniveau  $\alpha$  ( $\alpha=0,05$ ), wird die Nullhypothese  $H_0$  verworfen und das Ergebnis als statistisch signifikant bezeichnet. Zusätzlich wurden Odds Ratio (OR) und Konfidenzintervall (CI) berechnet. Die OR ist ein Maß für die Stärke der Beziehung zwischen zwei Variablen. Die Definition der OR (gemäß den Bezeichnungen aus Tabelle 8) lautet:

$$OR = \frac{axd}{cxb}$$

In dieser Arbeit gibt die OR an, um welchen Faktor das Erkrankungsrisiko einer Person steigt, wenn sie Träger eines bestimmten Allels ist. Um die Genauigkeit der Odds Ratio beurteilen zu können, wurde das zugehörige Konfidenzintervall (CI) ange-



geben. Das Konfidenzintervall ist der Wertebereich, der mit einer vorgegebenen Sicherheit der Schätzung ( $1-\alpha$ ) die approximierte wahre Odds Ratio enthält. Da als Signifikanzniveau  $\alpha$  5% gewählt wurde, wurde jeweils das 95% CI angegeben. Ein enges CI spricht bei einer definierten Stichprobengröße für eine geringe Standardabweichung der Daten (Schlittgen, 1991).

### **3.3.3 Power-(Teststärke-)Analyse**

Die Power einer Untersuchung dient als weiteres Beurteilungskriterium für die Aussagekraft der durchgeführten Studie. Hier wurden die ermittelten Befunde einer Power-Analyse unterzogen zur Prüfung, ob die Stichprobengröße ausreichte, um post-hoc unterschiedliche Allelfrequenzen als signifikant bzw. nichtsignifikant zu werten. Dazu wurde das Programm Power and Sample Size Calculations Version 2.1.25 (Dupont und Plummer, 1990) verwendet. In die Kalkulation der Power fließen ein das Signifikanzniveau  $\alpha$ , die Anzahl der Patienten sowie das Verhältnis von Kontrollpersonen zu Patienten, die OR und die Allelfrequenzen im Kontrollkollektiv. Mit zunehmender Stichprobengröße und zunehmender Effektstärke wächst auch die Power einer Analyse. So beträgt bei einer Power von 80% die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse 20%. Eine starke Streuung der Messwerte reduziert die Teststärke, die Gruppenhomogenität ist damit von besonderer Bedeutung.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Östrogenrezeptor $\alpha$ -Gen

#### 4.1.1 Genomische Organisation

Die Aktualisierung der *ESR $\alpha$* -Genstruktur bestätigte bereits annotierte Genbereiche. Darüber hinaus verhalf sie ausgehend von redundanten Datenbankeinträgen zur Sortierung annotierter jedoch diskontinuierlicher Bereiche (Exon 1E<sub>1</sub>, 1E<sub>2</sub>, 1F). Ferner gelang es, die bekannten Bereiche insbesondere in den nicht translatierten Regionen um neue Annotationen zu erweitern. Durch die Zuordnung von Transkripten zu der genomischen Sequenzvorlage konnte die Organisation des *ESR $\alpha$* -Gens mit ehemals acht und derzeit 15 bekannten Exons aktualisiert werden (Tabelle 9, Abbildung 4).

Die folgenden Sequenzen genügten den Homologie-Kriterien für die Konstruktion einheitlicher *ESR $\alpha$* -Sequenzcluster: AA778727, AA092184, AA164586, AC044828, AC058817, AC008473, AF061181, AF082876, AF123494, AF258449, AF258450, AF258451, AF326912, AI025006, AI630824, AI073549, AI127412, AI274727, AI654044, AI904329, AI962194, AI565481, AI984079, AJ002559, AJ002560, AJ002562, AL356311, AL049821, AL078582, AL590993, AQ418901, AV751208, AW976636, AW951857, BF733032, BF057785, BF058527, BF589895, BG773143, M11457, M12674, M69296, M69297, NM\_002920, NM\_000125, S63345, U68067, U68068, X62463, X63118, X68051, X74439, X86816 und XM\_045967. Sie sind aus DDBJ, EMBL und Gen Bank Nukleotidsequenzdatenbanken entnommen. Darin enthalten sind mehrere Transkripte, die alternative Spleißvorgänge belegen, deren Charakterisierung jedoch über die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit hinausgeht.

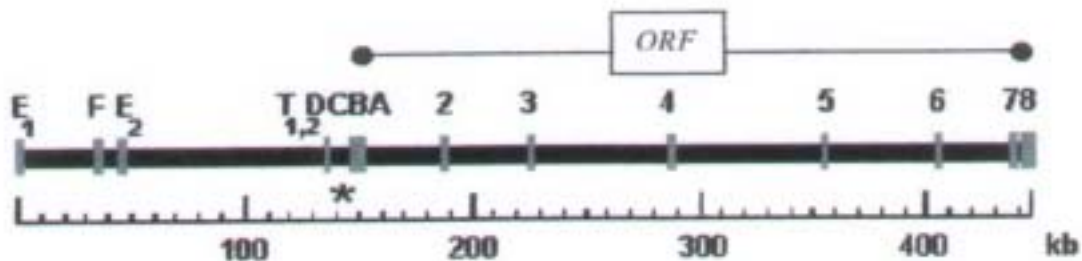
Folgende Sequenzen wurden verworfen, weil sie die Übereinstimmungskriterien nicht erfüllten und Klonierungsartefakte zu enthalten schienen: AA224131, AI343098, AJ340477, AF047463, AQ719425, BC006461, BE313699, BG542160, U47678.

Die solchermaßen überarbeitete *ESRα* Exon-Intron-Struktur diene als Referenz bei der Auswahl repräsentativer Sequenzvarianten für die nachfolgend dargestellte Assoziationsuntersuchung.

**Tabelle 9:** Genomische Organisation des *ESRα*-Gens

Exon	Bisherige Bezeichnung	Größe (bp)	Donor 5'	Intron	Größe (bp)	Akzeptor 3'
[1]	1E2	137	CAAAGAAGgtaagttt	1	<33.778	(athttacc)AAAACCTGA
[2]	1F	>203	CTCTTCAAgttaggtac	2	11.210	aacaaaagGAAGAAGA
[3]	1E1	131	TCACTGAGgtatgtgt	3	<89.368	(cacgagct)CTCTTGCC
[4]	1T1	>86	GTGGAAGTgtgagttc	4	101	ttacagagTTTCTGAA
[5]	1T2	150	GCTTTCAGgtaatcca	5	<12.216	(gaacaagc)CTGCAATG
[6]	1D	>96	GAGAGCCAgttaagtca	6	1.677	ctgcctagTTCACACA
[7]	1C	119	CCAGCAGGgttaggctt	7	<1.537	(ggcacat)AAGGCAGC
[8]	1B	>154	AGTAAAGT(aaagtcca)	(?)	<39	(tccaaate)GAGTTGTG
[8]	1A	>814	TTCTACAGgtaccgcg	8	34.232	ccccccagGCCAAATT
[9]	2	191	TATTCAAGgtaaatgt	9	37.785	ttaaatagGACATAAC
[10]	3	117	GAAAGGTGgttaggtac	10	63.401	gttttcagGGATACGA
[11]	4	336	GGTGCCAGgtaagaat	11	67.147	gttttcagGCTTTGTG
[12]	5	139	TTGGACAGgtaagtga	12	49.196	tttcatagGAACCAGG
[13]	6	134	TAATTCTGgtgagttg	13	33.260	gcattcagGAGTGTAC
[14]	7	184	CACATGAGgtgaggca	14	4.163	acctacagTAACAAAG
[15]	8	4.543	AAGAATTAAACTAAAgacaacga			

Exon-Intron-Organisation des Östrogenrezeptor- $\alpha$ -Gens (Großbuchstaben=Exon; Kleinbuchstaben=Intron). Von einigen Exons ist nur eine Mindestlänge bekannt, da nicht alle veröffentlichten ESTs entsprechend der AGGT-Regel bis zu Exon-Rändern reichen. Sequenzen in Klammern konnten nicht zugeordnet werden und zählen vermutlich zu angrenzenden Exons, da Konsensus-Spleißstellen fehlen. Dies schließt eine 39bp lange Sequenz (mit ? markiert) ein, die die Exons 1A+B trennt. Möglicherweise sind Exon 1A+B Teil eines großen (>968 bp) zusammenhängenden, aber teilweise gespleißten Exons. Schattierte Exons sind Teil des offenen Leserasters. Die bisherige Exonnummerierung wurde von Koš et al. (2001) übernommen.

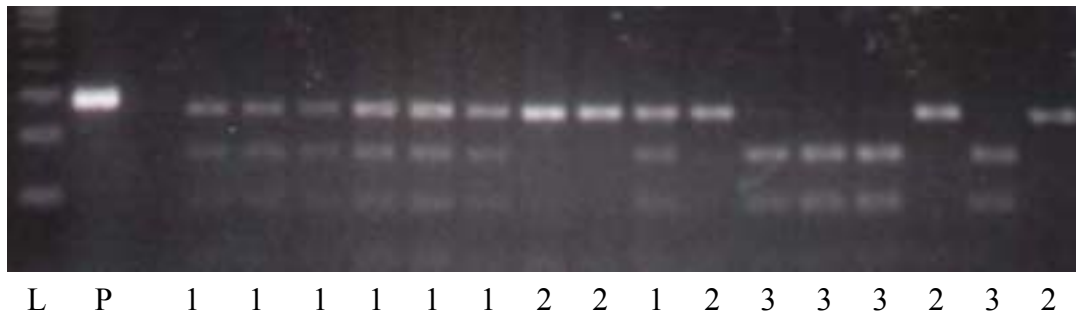


**Abbildung 4:** Genomische Organisation des *ESRα*-Gens. Die Exons sind nummeriert, das offene Leseraster (ORF) ist markiert. Maßstabsgetreue Darstellung in 5'→3'-Richtung

## 4.1.2 Genotypverteilungen und Allelfrequenzen

### 4.1.2.1 *MspI*-Polymorphismus

Bei dem Polymorphismus rs2077647 handelt es sich um eine stumme biallelische Variante in Exon 1, Codon 10 des *ESR $\alpha$* -Gens, deren Häufigkeit mittels *MspI*-RFLP-Assay untersucht wurde. Dabei wurde zunächst ein PCR-Produkt von 284 bp gewonnen. Die elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente von 90bp, 162bp bzw. 252 bp erfolgte mit Agarosegelen (Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Agarosegelelektrophorese: *MspI*-RFLP. L=100 bp-Längenstandard; P=PCR-Produkt; Genotypen: 1=TC (32+90+162+252bp); 2=TT (32+252bp); 3=CC (32+90+162bp)

Für das Kontrollkollektiv wurde eine Frequenz von 0,218 für den Genotyp CC, 0,554 für CT, und 0,228 für TT bestimmt. Im Gesamtkollektiv der an Panikstörung Erkrankten betrug die relative Häufigkeit des Genotyps CC 0,244, die der heterozygoten Allelträger 0,500 und die des Genotyps TT 0,256. Im Teilkollektiv der Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie ergab sich eine Frequenz von 0,270 für den Genotyp CC, 0,460 für TC und 0,270 für TT. Bei allen Genotypisierungen war das Hardy-Weinberg-Äquilibrium erfüllt.

Bei p-Werten von 0,99 bzw. 0,81 im Fisher's-Exact-Test und ORs von 0,99 bzw. 1,06 ergab sich keine Assoziation eines der beiden Allele mit der Panikstörung oder der Panikstörung in Kombination mit Agoraphobie.

Bei der Untersuchung des Gesamtkollektivs der Panikpatienten betrug die Power 0,0501, für die Untergruppe der Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie lag sie bei 0,0543.

**Tabelle 10:** Ergebnisse *MspI*-Polymorphismus

	Kontrollen	Patienten mit Panikstörung	Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie
N	92	90	63
<i>ESRα</i> Codon 10 (TCC/TCC)	0,218	0,244	0,270
<i>ESRα</i> Codon 10 (TCT/TCC)	0,554	0,500	0,460
<i>ESRα</i> Codon 10 (TCT/TCT)	0,228	0,256	0,270
f (Codon 10 TCC)	0,495	0,494	0,500
Hardy-Weinberg: $\chi^2$ -(p-Wert)	1,089 (0,297)	0,000 (1,000)	0,397 (0,529)
p-Wert (Gruppenvergleich)		0,99	0,81
OR		0,99	1,06
95%CI		0,7-1,5	0,7-1,7

Bei getrennter Betrachtung von Männern und Frauen ergab sich für das Kontrollkollektiv eine Frequenz von 0,439 (♂) bzw. 0,542 (♀) für das Allel C. Daraus errechneten sich  $\chi^2$ -Werte von 0,93 (♂) und 0,50 (♀) sowie p-Werte von 0,33 (♂) und 0,44 (♀), welche mit dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium in Einklang stehen. In der männlichen Teilgruppe der Patienten mit Panikstörung betrug die relative Häufigkeit des C-Allels 0,533, bei den Frauen 0,492. In der Untergruppe der Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie ergab sich eine Frequenz von 0,533 (♂) bzw. 0,489 (♀) für das Allel C. Der Gruppenvergleich lieferte p-Werte zwischen 0,37 und 0,50, signifikante Unterschiede zwischen den Allelfrequenzen von Patienten- und Kontrollgruppe wurden demnach nicht beobachtet, Genotypverteilungen erfüllten das Hardy-Weinberg-Äquilibrium.

**Tabelle 11:** *MspI*-Polymorphismus: Vergleich Männer/Frauen

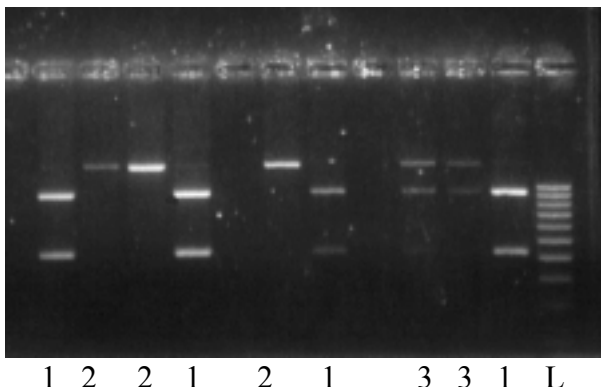
	Kontrollen Männer	Kontrollen Frauen	Panikstörung (Männer)	Panikstörung (Frauen)	Teilkollektiv Panikstörung und Agoraphobie (Männer)	Teilkollektiv Panikstörung und Agoraphobie (Frauen)
N	33	59	30	60	15	48
(TCC/TCC)	0,152	0,271	0,267	0,25	0,333	0,25
(TCT/TCC)	0,576	0,542	0,533	0,483	0,400	0,479
(TCT/TCT)	0,273	0,186	0,200	0,267	0,267	0,271
f (TCC)	0,439	0,542	0,533	0,492	0,533	0,489
Hardy-Weinberg: $\chi^2$ -(p-Wert)	0,939 (0,333)	0,506 (0,477)	0,153 (0,696)	0,066 (0,798)	0,579 (0,447)	0,082 (0,775)

p-Wert (Gruppenvergleich)*			0,37	0,44	0,51	0,49
OR			0,69	1,23	0,69	1,24
95% CI			0,3-1,4	0,7-2,0	0,3-1,6	0,7-2,1

\* jeweils mit gleichgeschlechtlicher Kontrollpopulation

#### 4.1.2.2 *PvuII*-Polymorphismus

Der *PvuII*-Polymorphismus befindet sich im Intron 1 des *ESR $\alpha$* -Gens. Zur Untersuchung dieses Polymorphismus wurde ein 1374bp langes Fragment amplifiziert. Bei Existenz einer *PvuII*-Schnittstelle (mit p bezeichnet) wurden durch den Verdau Produkte von 438 und 936bp Länge generiert, bei Fehlen der Schnittstelle (mit P bezeichnet) blieb das 1374bp-Fragment unverdaut (Protokoll nach Maruyama et al., 2000). Zur Darstellung der Restriktionsfragmente wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Agarosegelelektrophorese: *PvuII*-RFLP. Genotypen: 1= pp (936+438bp); 2= PP (1374bp); 3= Pp (1374+936+438bp); L= Größenstandard

Die ermittelten Häufigkeiten für das P-Allel (0,495 für Kontrollen; 0,456 für die Stichprobe der Panikpatienten und 0,460 für die Teilgruppe der Patienten mit Panik und Agoraphobie) ließen jedoch für keines der beiden Allele eine signifikante Assoziation mit der Panikstörung oder der Panikstörung in Kombination mit Agoraphobie erkennen. Für Kontrollpersonen, die Stichprobe der Patienten mit Panikstörung sowie für die Teilstichprobe mit zusätzlicher Agoraphobie erfüllte die Genotypverteilung jeweils das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (p-Werte zwischen 0,403 und 0,773). Die Power betrug für die Untersuchung des Gesamtkollektivs 0,079 und für die Teilstichprobe 0,075.

**Tabelle 12:** Ergebnisse *PvuII*-Polymorphismus

	Kontrollen	Patienten mit Panikstörung	Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie
N	92	90	63
<i>ESRα PvuII</i> (P/P)	0,228	0,200	0,238
<i>ESRα PvuII</i> (P/p)	0,533	0,511	0,444
<i>ESRα PvuII</i> (p/p)	0,239	0,289	0,318
f (P)	0,495	0,456	0,46
Hardy-Weinberg: $\chi^2$ -(p-Wert)	0,393 (0,531)	0,083 (0,773)	0,701 (0,403)
p-Wert (Gruppenvergleich)		0,45	0,55
OR		0,86	0,87
95%CI		0,6-1,3	0,6-1,4

Die Differenzierung nach Geschlechtern ergab Frequenzen für das P-Allel zwischen 0,450 und 0,530 bei Männern und zwischen 0,458 und 0,475 bei Frauen. Die Genotypverteilung befand sich jeweils in Übereinstimmung mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (p-Werte zwischen 0,37 und 0,83). Für das Gesamtkollektiv der Patienten mit Panikstörung betrug der p-Wert 0,38 für Männer bzw. 0,90 für Frauen bei ORs von 1,38 bzw. 1,07. In der Teilgruppe der Patienten mit zusätzlicher Agoraphobie ergaben sich p-Werte von 0,66 bzw. 0,89 bei ORs von 1,29 bzw. 1,07. Besonders für die kleine männliche Stichprobe mit zusätzlicher Agoraphobie bestand hierbei mit einem 95% CI von 0,54-3,07 eine große Streuung der Daten. Keiner der berechneten Werte wies auf einen Zusammenhang zwischen einem der Allele und einer Form der Panikstörung mit/ohne Agoraphobie hin.

**Tabelle 13:** *PvuII*-Polymorphismus: Vergleich Männer/Frauen

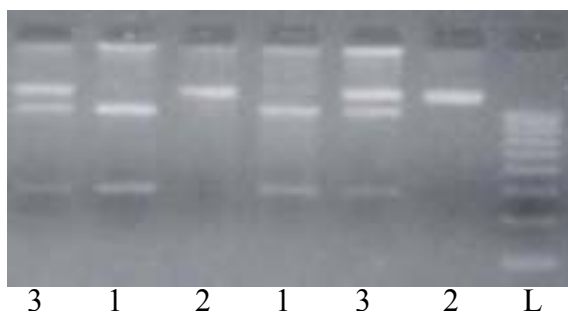
	Kontrollen Männer	Kontrollen Frauen	Panikstörung (Männer)	Panikstörung (Frauen)	Teilkollektiv Panikstörung und Agoraphobie (Männer)	Teilkollektiv Panikstörung und Agoraphobie (Frauen)
N	33	59	30	60	15	48
(P/P)	0,242	0,220	0,167	0,217	0,267	0,229
(P/p)	0,576	0,508	0,567	0,483	0,4	0,458
(p/p)	0,182	0,271	0,267	0,3	0,333	0,312
f (P)	0,530	0,475	0,450	0,458	0,467	0,458

Hardy-Weinberg: $\chi^2$ - (p-Wert)	0,801 (0,371)	0,023 (0,881)	0,629 (0,428)	0,042 (0,837)	0,579 (0,447)	0,284 (0,594)
p-Wert (Gruppenver- gleich)*			0,38	0,90	0,66	0,89
OR			1,38	1,07	1,29	1,07
95% CI			0,7-2,8	0,6-1,8	0,5-3,1	0,6-1,8

\* jeweils mit gleichgeschlechtlicher Kontrollpopulation

#### 4.1.2.3 *Xba*I-Polymorphismus

Der *Xba*I-Polymorphismus ist im Intron 1 des Gens lokalisiert. Das für diese Restriktionsanalyse amplifizierte DNA-Fragment besaß eine Länge von 1374bp, welches durch das Enzym *Xba*I in Fragmente mit Längen von 981 und 393bp unterteilt wurde (Protokoll nach Maruyama et al., 2000). Die Visualisierung der Restriktionsfragmente erfolgte erneut mittels Agarosegelelektrophorese (Abbildung 7).



**Abbildung 7:** Agarosegelelektrophorese: *Xba*I-RFLP. Genotypen: 1 = xx (981 + 393bp); 2 = XX (1374bp); 3 = Xx (1374 + 981 + 393bp); L=Größenstandard

Die Typisierung der Kontrollgruppe, der Panikstichprobe sowie der Teilstichprobe der Patienten mit zusätzlicher Agoraphobie ergab für das X-Allel (ohne *Xba*I-Schnittstelle) Frequenzen von 0,380, 0,361 sowie 0,365. Die Verteilung der Genotypen auf die Kontrollgruppe (XX=0,141, Xx=0,478, xx=0,381), die Gruppe der Patienten mit Panikstörung (XX=0,111, Xx=0,500, xx=0,389) und die Gruppe der Patienten mit zusätzlicher Agoraphobie (XX=0,143, Xx=0,444, xx=0,413) genügte dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium (p-Werte zwischen 0,428 und 0,889). Der Vergleich mit der Kontrollgruppe ergab für das Panikgesamtkollektiv einen p-Wert von 0,7 bei einer OR von 0,92 (95%CI von 0,6-1,4). Für die Untergruppe der Patienten mit zusätzlicher Agoraphobie wurde ein p-Wert von 0,78 mit einer OR von 0,94 (95%CI von 0,6-1,4) errechnet.



Somit sprechen die Daten für den *XbaI*-Polymorphismus bei einer Power von 0,058 und 0,055 nicht für einen Zusammenhang dieses Polymorphismus mit der Panikstörung.

**Tabelle 14:** Ergebnisse *XbaI*-Polymorphismus

	Kontrollen	Patienten mit Panikstörung	Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie
N	92	90	63
<i>ESRα XbaI</i> (x/x)	0,381	0,389	0,413
<i>ESRα XbaI</i> (x/X)	0,478	0,500	0,444
<i>ESRα XbaI</i> (X/X)	0,141	0,111	0,143
f (X)	0,380	0,361	0,365
Hardy-Weinberg: $\chi^2$ -(p-Wert)	0,019 (0,889)	0,629 (0,428)	0,107 (0,743)
p-Wert (Gruppenvergleich)		0,70	0,78
OR		0,92	0,94
95%CI		0,6-1,4	0,6-1,4

Bei getrennter Betrachtung männlicher und weiblicher Individuen wurden für das X-Allel Frequenzen von 0,409 (männliche Kontrollpersonen), 0,364 (weibliche Kontrollpersonen), 0,333 (männliche Patienten mit Panikstörung sowie männliche Patienten mit zusätzlicher Agoraphobie), 0,133 (Patientinnen mit Panikstörung) und 0,375 (Teilkollektiv der Patientinnen mit zusätzlicher Agoraphobie) beobachtet. Die Typisierungen waren konform mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (p-Werte zwischen 0,27 und 0,87). Fisher's-Exact-Test ergab mit p-Werten von 0,46 (männliche Patienten mit Panikstörung), 0,50 (männliche Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie), 0,89 (Patientinnen mit Panikstörung) und 0,88 (Patientinnen mit zusätzlicher Agoraphobie) und ORs zwischen 0,95 und 1,38 keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontrollpopulation.

**Tabelle 15:** *XbaI*-Polymorphismus: Vergleich Männer/Frauen

	Kontrollen Männer	Kontrollen Frauen	Panikstörung (Männer)	Panikstörung (Frauen)	Teilkollektiv Panikstörung und Agoraphobie (Männer)	Teilkollektiv Panikstörung und Agoraphobie (Frauen)
N	33	59	30	60	15	48
(x/x) <i>ESRα XbaI</i>	0,333	0,407	0,4	0,383	0,467	0,396
(x/X) <i>ESRα XbaI</i>	0,515	0,458	0,533	0,483	0,400	0,458

(X/X) <i>ESRα</i> <i>Xba</i> I	0,151	0,136	0,067	0,133	0,133	0,146
f(X)	0,409	0,364	0,333	0,375	0,333	0,375
Hardy-Weinberg: chi <sup>2</sup> -(p-Wert)	0,142 (0,707)	0,009 (0,926)	1,200 (0,273)	0,058 (0,810)	0,150 (0,699)	0,024 (0,878)
p-Wert (Gruppenvergleich)*			0,46	0,89	0,51	0,89
OR			1,39	0,96	1,39	0,96
95% CI			0,7-2,9	0,6-1,6	0,6-3,4	0,6-1,7

\* jeweils mit gleichgeschlechtlicher Kontrollpopulation

### 4.1.3 Identifizierung eines polymorphen Mikrosatelliten

Die Gensequenz des Östrogenrezeptors  $\alpha$  konnte anhand multipler Alignments aus mehreren contigs, die aus Datenbanken des NCBI bezogen wurden, komplett zusammengefügt werden. Dabei wurden für die meisten Genbereiche mehrere Klone mit übereinstimmender Sequenz gefunden und zu genomischen Sequenzclustern zusammengefasst. Innerhalb dieser Cluster wurde dann nach Abweichungen in der Basenfolge gefahndet. Dabei imponierte beim Vergleich der contigs AC058817 und AL356311, die den Bereich 5' des ehemals als 1D bezeichneten Exons enthalten, eine unterschiedliche Anzahl von (GT)-Repeats. AC058817 enthält 17 dieser Repeats, während AL356311 nur 15 Wiederholungen aufweist (Abbildung 8).

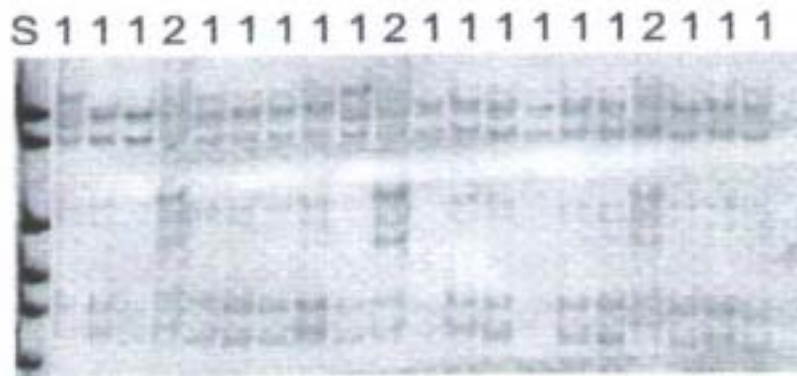
```

AC058817  GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTgtgtAAAGGCCCTTCTT
AL356311.. GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT----AAAGGCCCTTCTT

```

Abbildung 8: MACAW-Ansicht der Repeatregion 5' von Exon 1D (Sequenzausschnitt)

Die Existenz dieses polymorphen (GT)-Repeats konnte in der SSCP-Analyse bestätigt werden. Dazu wurde die polymorphe Region bei einer Teilstichprobe von 40 Patienten mit Panikstörung amplifiziert und nach einem Denaturierungsschritt auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 9). Bei Raumtemperatur sowie bei 4°C konnten auf dem Gel bei 10 Proben abweichende Bandenmuster identifiziert werden, die sich auf eine unterschiedliche Anzahl von (GT)-Repeats zurückführen lassen.



**Abbildung 9:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese des (GT)-Repeats. Einzelsträngige  $(263+2n)$ bp Amplikons (genomische DNA), die den polymorphen Mikrosatelliten enthalten. 1=  $(GT)_n/(GT)_n$ -Genotyp; 2= $(GT)_n/(GT)_{n+x}$ -Genotyp; S=Größenstandard; (N=20)

## 4.2 Östrogenrezeptor $\beta$ -Gen

### 4.2.1 Genomische Organisation

Die Aktualisierung der genomischen Organisation des Östrogenrezeptor  $\beta$ -Gens beruht auf einer durchgehenden genomischen Sequenz, die insbesondere in den nicht translatierten Bereichen bislang lückenhaft war. Zu ihrer Erstellung dienten sich überlappende GenBank-Sequenzeinträge, die in einem zweiten Schritt mit einer Vielzahl einzelner Transkripte unter Beachtung der GT/AG-Regel für Exon/Intron-Übergänge (Brown, 1999) abgeglichen wurden. Nachfolgende Nukleotid-Sequenzen aus DDBJ, EMBL bzw. GenBank lieferten die erforderlichen Informationen zur Erstellung der genomischen Struktur: AB006589, AB006590, AF215937, AF051427, AF051428, AF060555, AF061054, AF061055, AF074598, AF074599, AF191544, AF124790, AF215937, AI917846, AI990922, AL161756, AL122035, AL352983, AL355094, AL359235, AQ184868, AX029400, AX022458, BF510841, BG722442, NM\_001437 und X99101.

Die hieraus errechnete Exon-Intron-Organisation des *ESR $\beta$* -Gens umfasst demnach derzeit 17 Exons (Tabelle 16, Abbildung 10).

**Tabelle 16:** Genomische Organisation des *ESR $\beta$* -Gens

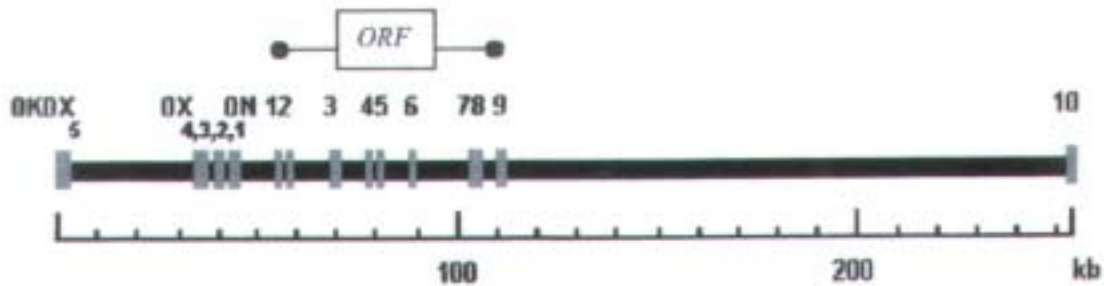
Exon	Bisherige Bezeichnung	Größe (bp)	Donor 5'	Intron	Größe (bp)	Akzeptor 3'
[1]	0K	199	TTCTGAAGgtgcgtgg	1	1.177	cctcttagACATCCAA
[2]	0X5*	308	TTTGTAAGgtaataaa	2	32.753	tccactagAGGGAGAC
[3]	0X4*	184	GAACAGAGgtgaactt	3	1.895	ctccgtagAAATCCTG
[4]	0X3*	213	TAGCCCTGgtaaggag	4	2.884	ttcaacagTATCTGGG
[5]	0X2*	94	GCAGGTAGgtaggtaa	5	672	ttttacagGGTTTTGT
[6]	0X1*	186	GTTGACAGgtaagatg	6	<3.122	(accctcct)CTCGGTCT
[7]	0N	>378	TCTGCAAGgtaagcgc	7	10.959	ctttacagCCATTATA
[8]	1	452	GTAACAGgtaagtcc	8	2.472	ctccctagAGAGACAC
[9]	2	173	CATTCAAGgtacaaga	9	11.070	tgctatagGACATAAT
[10]	3	117	GAAGTGTGgtgagtgc	10	8.046	ctcttcagGCTCCCGG
[11]	4	300	GATTCCCCgtagggct	11	3.080	ttccccagGCTTTGTG
[12]	5	139	CTGGACAGgtgagaaa	12	7.530	ttttgtagGGATGAGG

[13]	6	134	CAATTCCAgtaaagtaa	13	14.414	ttgtccagGTATGTAC
[14]	7	>289	ATGAATGC(ctgaaagg)	14	<1.646	ccccgtagTAACAAGG
[15]	8	294	CTCATTGgtgatggc	15	5.101	ctttacagATGGGGAG
[16]	9	>1.042	AACATGGC(gaaacccc)	16	<141.849	catgcgagCTCTCTCT
[17]	10*	827	ATTGATTAAAAAAcaggccgg			

Großbuchstaben=Exon; Kleinbuchstaben=Intron

Exon-Intron-Organisation des Östrogenrezeptor- $\beta$ -Gens. Von einigen Exons ist nur eine Mindestlänge bekannt, da nicht alle veröffentlichten ESTs Exon-Grenzen gemäß der AGGT-Regel erreichen. Sequenzen in Klammern konnten nicht zugeordnet werden und zählen vermutlich zu angrenzenden Exons, da Konsensus-Spleißstellen fehlen. Schattierte Exons sind Teil des offenen Leserasters. Die bisherige Exon-nummerierung wurde von Hirata et al. (2001) übernommen.

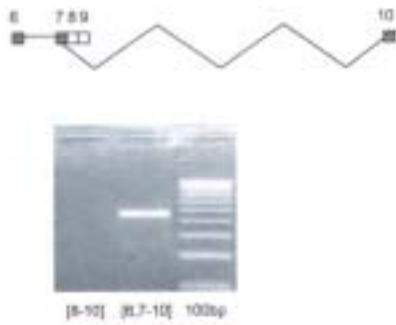
\* Diese Exons wurden neu annotiert.



**Abbildung 10:** Genomische Organisation des *ESR $\beta$* -Gens. Die Exons sind nummeriert, das offene Leseraster (ORF) ist markiert. Maßstabsgetreue Darstellung in 5'-3'-Richtung

Die Analyse von Östrogenrezeptor  $\beta$ -cDNA-Sequenzen mittels multipler Alignments ergab ein zusätzliches Exon (Exon10) 142kb in 3'-Richtung der bisherigen terminalen genomischen Region. Die Annotierung geht zurück auf ein Transkript (AF060555), in dem Exon 7 zu Exon 10 gespleißt ist.

Zur Verifizierung wurde ein cDNA-Pool aus 37 Geweben herangezogen. Hier ergab eine PCR mit Exon-spezifischen Primern (Exons 6,10) ein einziges Produkt in der erwarteten Länge ohne Exons 8,9 (Abbildung 11).

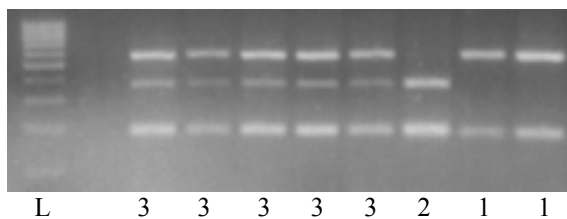


**Abbildung 11:** Agarosegelelektrophorese und schematische Ansicht eines 448bp ER $\beta$  cDNA Amplikons. [Exon6(partiell)-Exon10(partiell)]. Exons 8 und 9 sind nicht enthalten (Spleißvariante). Es ergab sich kein Produkt für ein [Exon8-Exon10]-Primer-Paar. 100bp, DNAMarker.

## 4.2.2 Allelfrequenzen und Genotypverteilungen

### 4.2.2.1 *AluI*-Polymorphismus

Zur Untersuchung dieses im Exon 15 des *ESR $\beta$* -Gens gelegenen Polymorphismus (rs4134646) wurde ein 774bp langes Sequenzstück amplifiziert, anschließend wurden je nach Genotyp durch Inkubation mit dem Enzym *AluI* bis zu vier Fragmente mit Längen von 578, 378, 200 und 196bp generiert.



**Abbildung 12:** Agarosegelelektrophorese: *AluI*-RFLP. L=100bp Längenstandard; Genotypen: 1 = GG (578 + 196bp); 2 = AA (378 + 200 + 196bp); 3 = GA (578 + 378 + 200 + 196 bp) (das 200bp Fragment und das 196bp Fragment sind nicht als zwei diskrete Banden zu erkennen)

Für die Genotypisierung wurde die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Dabei ergab sich für das Kontrollkollektiv eine Frequenz von 0,37 für den Genotyp GG, von 0,467 für heterozygote Allelträger und 0,163 für den Genotyp AA. Bei den Patienten mit Panikstörung trat der Genotyp GG mit einer relativen Häufigkeit von 0,37, GA mit einer relativen Häufigkeit von 0,522 und AA mit einer Frequenz von 0,111 auf. Im Teilkol-

lektiv der Patienten mit Panikstörung und zusätzlicher Agoraphobie betragen die jeweiligen Werte 0,413, 0,444 sowie 0,143. Mit  $\chi^2$ -Werten von 0,0511, 1,2409 und 0,1074 genügten sämtliche Genotyphäufigkeiten dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Der Vergleich zwischen Kontrollgruppe und den Patienten mit Panikstörung bzw. mit Panikstörung und zusätzlicher Agoraphobie ergab keine signifikanten Unterschiede ( $p=0,67$  bzw.  $0,63$ ). Die Power für die genannten Ergebnisse betrug 0,063 bzw. 0,072.

**Tabelle 17:** Ergebnisse *AluI*-Polymorphismus

	Kontrollen	Patienten mit Panikstörung	Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie
N	92	90	63
<i>ESRβ</i> (GG)=homozygot Wildtyp	0,37	0,37	0,413
<i>ESRβ</i> (GA)=heterozygot	0,467	0,522	0,444
<i>ESRβ</i> (AA)=homozygot Variante	0,163	0,111	0,143
f(A)	0,397	0,372	0,365
Hardy-Weinberg: $\chi^2$ - (p-Wert)	0,051 (0,821)	1,241 (0,265)	0,107 (0,743)
p-Wert (Gruppenvergleich)		0,67	0,63
OR		0,90	0,87
95%CI		0,6-1,4	0,6-1,4

Eine Differenzierung hinsichtlich der Geschlechtszugehörigkeit ergab eine relative Häufigkeit für den Genotyp GG von 0,515 (männliche Kontrollpersonen), 0,288 (weibliche Kontrollpersonen), 0,300 (Männer mit Panikstörung), 0,400 (Frauen mit Panikstörung), 0,333 (männliche Patienten mit zusätzlicher Agoraphobie) und 0,4375 (Patientinnen mit zusätzlicher Agoraphobie). Die Genotypverteilungen erfüllten mit  $\chi^2$ -Werten zwischen 0,0348 und 0,5868 das Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg. Für das Allel A betrug die Frequenz 0,288, 0,458, 0,417, 0,35, 0,433 bzw. 0,344. Bei getrennter Betrachtung von Männern und Frauen imponierte ein Trend zu signifikanten Unterschieden (p-Werte zwischen 0,09 und 0,17) zwischen dem Patientenkollektiv und dem entsprechenden Kontrollkollektiv. Das 5%-Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht.

**Tabelle 18:** *AluI*-Polymorphismus: Vergleich Männer/Frauen

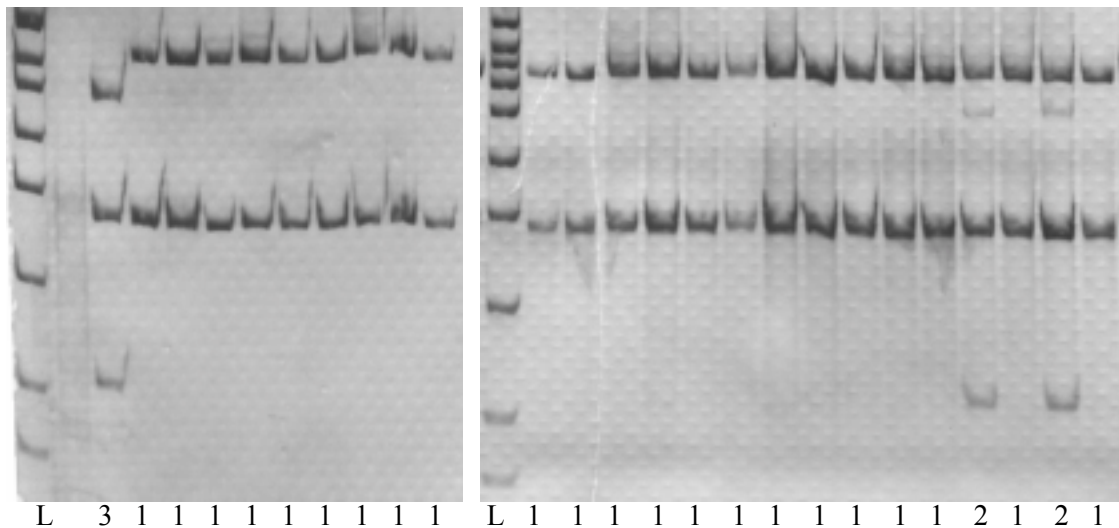
	Kontrollen Männer	Kontrollen Frauen	Panik- störung (Männer)	Panik- störung (Frauen)	Teilkollektiv Panikstörung und Agora- phobie (Männer)	Teilkollektiv Panikstörung und Agora- phobie (Frauen)
N	33	59	30	60	15	48
(GG)	0,515	0,288	0,300	0,400	0,333	0,4375
(GA)	0,394	0,508	0,567	0,500	0,467	0,4375
(AA)	0,091	0,203	0,133	0,100	0,200	0,125
f (A)	0,288	0,458	0,417	0,35	0,433	0,344
Hardy-Weinberg: $\chi^2$ - (p-Wert)	0,051 (0,882)	0,035 (0,852)	0,824 (0,364)	0,587 (0,444)	0,037 (0,847)	0,044 (0,834)
p-Wert (Gruppenvergleich)*			0,14	0,12	0,17	0,10
OR			0,57	1,57	0,53	1,61
95% CI			0,3-1,2	0,9-2,6	0,2-1,3	0,9-2,8

\* jeweils mit gleichgeschlechtlicher Kontrollpopulation

#### 4.2.2.2 *Fnu4HI*-Polymorphismus

Die Auswertung multipler Sequenzvergleiche ergab erste Hinweise auf einen neuen Polymorphismus in Exon 16, der in der Folge experimentell charakterisiert wurde und unabhängig von den hier dargestellten Ergebnissen zwischenzeitlich unter der Kennung rs1255998 in die SNP-Datenbank aufgenommen wurde. Der *Fnu4HI*-Polymorphismus ist im Exon 16 des *ESR $\beta$* -Gens lokalisiert (3' untranslatierte Region). Das für diese Restriktionsanalyse amplifizierte DNA-Fragment besaß eine Länge von 928bp und ergab nach Zugabe des Enzyms *Fnu4HI* wiederum Fragmente mit Längen von 640, 518, 288 oder 122bp (Abbildung 13).





**Abbildung 13:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese: *Fnu4HI*-RFLP. L= Größenstandard; Genotyp: 1 = CC (640 + 288bp); 2 = GC (640 + 518 + 288 + 122bp); 3 = GG (518 + 288 + 122bp)

Die Frequenz des homozygoten Wildtyps (Genotyp CC) betrug 0,793 (Kontrollpersonen), 0,833 (Gesamtkollektiv der Panikpatienten) und 0,888 (Teilkollektiv der Patienten mit zusätzlicher Agoraphobie). 16 von 92 Kontrollpersonen (17,4%) besaßen den heterozygoten Genotyp ebenso wie 14 von 90 Patienten (15,6%) aus der Gesamtgruppe der Panikpatienten und 7 von 63 Patienten (11,1%) aus der Teilgruppe der Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie.  $\chi^2$ -Werte von 2,78, 0,14 und 0,22 standen in Einklang mit dem Hardy-Weinberg-Äquilibrium. Der Gruppenvergleich ergab für das Gesamtkollektiv der Patienten mit Panikstörung keine deutlich von den Kontrollen abweichenden Allelfrequenzen ( $p=0,39$ ) bei einer OR von 0,72 (95% CI 0,36-1,42). Dagegen wurde für die Teilstichprobe mit zusätzlicher Agoraphobie ein grenzwertig signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ( $p=0,07$ ) festgestellt. Die OR betrug für diese Gruppe 0,43 (95% CI 0,18-1,05), die statistische Power erreichte 0,10 (Gesamtkollektiv) bzw. 0,32 (Teilstichprobe).

**Tabelle 19:** Ergebnisse *Fnu4HI*-Polymorphismus

	Kontrollen	Patienten mit Panikstörung	Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie
N	92	90	63
<i>ESRβ</i> (CC)	0,793	0,833	0,888
<i>ESRβ</i> (GC)	0,174	0,155	0,111

<i>ESRβ</i> (GG)	0,033	0,011	0,000
f(G)	0,119	0,088	0,055
Hardy-Weinberg: $\chi^2$ -(p-Wert)	2,780 (0,095)	0,140 (0,708)	0,220 (0,641)
p-Wert (Gruppenvergleich)		0,39	0,07
OR		0,72	0,43
95%CI		0,4-1,4	0,2-1,1

Die Differenzierung nach Geschlechtern der Patienten und Kontrollpersonen ergab Frequenzen für den GG-Genotyp zwischen 0,000 (männliche Patienten mit Panikstörung, männliche Patienten mit zusätzlicher Agoraphobie, Patientinnen mit zusätzlicher Agoraphobie) und 0,061 (männliche Kontrollen). Das Hardy-Weinberg war für die Genotypen jeweils erfüllt. Fisher's-Exact-Test zeigte mit p-Werten von 0,30 (männliche Patienten), 0,88 (Patientinnen), 0,33 (Patienten mit zusätzlicher Agoraphobie) und 0,30 (Patientinnen mit zusätzlicher Agoraphobie), dass die Panikstörung mit keinem der untersuchten Allele geschlechtsspezifisch assoziiert zu sein scheint.

**Tabelle 20:** *Fnu4HI*-Polymorphismus: Vergleich Männer/Frauen

	Kontrollen Männer	Kontrollen Frauen	Panik- störung (Männer)	Panik- störung (Frauen)	Teilkollektiv Panikstörung und Agora- phobie (Männer)	Teilkollektiv Panikstörung und Agora- phobie (Frauen)
N	33	59	30	60	15	48
(CC)	0,727	0,831	0,8	0,85	0,867	0,896
(GC)	0,212	0,153	0,2	0,133	0,133	0,104
(GG)	0,061	0,017	0	0,017	0	0
f(G)	0,167	0,093	0,1	0,083	0,067	0,052
Hardy-Weinberg: $\chi^2$ - (p-Wert)	1,844 (0,175)	0,563 (0,453)	0,370 (0,543)	0,972 (0,324)	0,077 (0,782)	0,145 (0,704)
p-Wert (Gruppenvergleich)*			0,31	0,88	0,33	0,30
OR			0,56	0,88	0,36	0,53
95% CI			0,2-1,6	0,4-2,2	0,1-1,7	0,2-1,6

\* jeweils mit gleichgeschlechtlicher Kontrollpopulation

## 5 Diskussion

### 5.1 Östrogenrezeptor $\alpha$ -Gen

#### 5.1.1 Genomische Organisation

In der vorliegenden Arbeit wurden bereits bekannte *ESR $\alpha$* -Exone sortiert und mit genauen Angaben zu den genomischen Abständen versehen. Kenntnisse über die genomische Organisation der *ESR*-Gene sind entscheidend bei der Suche nach krankheitsrelevanten Sequenzvarianten. Aufgrund der Länge des *ESR $\alpha$* -Gens (ca. 450kb) sind detaillierte Aussagen zur Exon-Intron-Struktur an die Verfügbarkeit umfangreicher Sequenzdaten gebunden, die erst unlängst im Rahmen des Humanen Genom-Projekts generiert wurden. Diesen sind ausgedehnte untranslatierte Genregionen zu entnehmen, die -bedingt durch Spleißvorgänge- zu einer Vielfalt unterschiedlicher Transkripte führen. Im Bereich der hier annotierten 5'untranslatierten Exone sind inzwischen mehrere Transkriptionsstartpunkte und 7 Promotoren identifiziert worden (Koř et al., 2001; Brand et al., 2002). Es wird angenommen, dass der weitreichende Einfluss des Östrogenrezeptors auf viele unterschiedliche physiologische Prozesse, einschließlich Proliferation und Differenzierung von Reproduktionsorganen, auf den Leber-, Fett- und Knochenstoffwechsel sowie kardiovaskuläre und neuronale Differenzierung, diese organisatorische Komplexität voraussetzt. Im Bereich der 5'UnTranslatedRegion (UTR) konnte die Existenz alternativ gespleißter Exons bestätigt werden, wodurch der Translationsstartpunkt zusätzlich variiert werden kann. Die funktionelle Bedeutung der *ESR $\alpha$*  3'UTR bezieht sich dagegen ersten Untersuchungen zufolge auf die mRNA-Stabilität (Keaveney et al., 1993). Lange 3'UTR können zur Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb der mRNA führen, die destabilisierende Eigenschaften besitzen (Scheper et al., 1995). mRNA-turnover sowie steady-state Konzentrationen der mRNA können zur Expressions-Kontrolle des *ESR $\alpha$* -Proteins beitragen (Kenealy et al., 2000). Wie Homologiesuchen innerhalb der Familie der Steroidrezeptoren zudem belegen, sind jeweils ähnliche Strukturelemente auch im Bereich untranslatierter Exone

anzutreffen und können zur Identifizierung neuer Transkripte eingesetzt werden (Hirata et al., 2002). Damit dient die Annotation des *ESR $\alpha$* -Gens als Vergleichsgrundlage für die Aktualisierung der *ESR $\beta$* -Genstruktur (s.u.) und als Referenz für die Auswahl repräsentativer Sequenzvarianten. Insgesamt ist festzuhalten, dass die Struktur des *ESR $\alpha$* -Gens komplexer ist als bislang angenommen. Der stetige Zuwachs an Sequenzdaten wird weitere Aktualisierungen erforderlich machen wie kürzlich neu annotierte Genregionen veranschaulichen: so konnte zwischenzeitlich ein weiteres, untranslatiertes Exon des *ESR $\alpha$* -Gens identifiziert werden (Exon S, Hirata et al., 2002). Die funktionelle Relevanz der komplexen genomischen Organisation ist u.a. im Zusammenhang mit *ESR*-knockout-Modellen unterstrichen worden: werden nicht konstitutive Exons bei der Generierung von *ESR*-knockout-Tieren nicht berücksichtigt, ist nicht auszuschließen, dass weiterhin *ESR* exprimiert werden (Koš et al., 2002). Diese Möglichkeit wirft neue Fragen auf hinsichtlich der Spezifität bereits erhobener *ESR*-knockout-Befunde.

### **5.1.2 Allelfrequenzen und Genotypverteilungen**

Die statistische Power der Resultate zu den hier untersuchten Polymorphismen bewegte sich zwischen 0,05 und 0,32. Die beste Power wurde erzielt bei der Teilstichprobe der Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie für den *Fnu4HI*-Polymorphismus. Um eine Power von  $>0,8$  zu erreichen, wären ORs von 2,36 (*MspI* und *PvuII*), 2,32 (*XbaI* und *AluI*) bzw. 2,92 (*Fnu4HI*) erforderlich gewesen.

Diesen Umstand gilt es bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, zugleich spricht die Wahrung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes in allen Teilstichproben jedoch für die Homogenität der untersuchten Kollektive.

#### **5.1.2.1 *MspI*-Polymorphismus**

Es existieren aktuell keine Studien, die den *MspI*-Polymorphismus im Exon 10, Codon 1 des *ESR $\alpha$* -Gens zu neuropsychiatrischen Erkrankungen in Beziehung setzen. In anderen Stichproben wurden für das TCC-Allel Frequenzen von 0,45 (Roodi et al., 1995) und 0,41 (Kontrollkollektiv) bzw. 0,53 (Patienten mit Prostata-Carzinom) (Tanaka et al., 2003) ermittelt. Die in dieser Arbeit gemessenen Frequenzen für das TCC-Allel

(0,495 für Kontrollpersonen, 0,494 für Patienten mit Panikstörung, 0,500 für Patienten mit Panikstörung und zusätzlicher Agoraphobie) sind dem vergleichbar und unterscheiden sich untereinander nicht signifikant. Bei dem Polymorphismus handelt es sich um einen exonischen Polymorphismus, der auf Proteinebene nicht zu einem Austausch von Aminosäuren führt. Auch „stumme“ Varianten können jedoch eine pathogenetische Relevanz besitzen, wie inzwischen zahlreiche Beispiele belegen: Hierzu zählen u.a. eine Form des X-chromosomalen erblichen Hydrocephalus (Du et al., 1998) und eine Form der spinalen Muskelatrophie (Cartegni und Krainer, 2002). Möglich ist eine Einflussnahme auf die Transkriptionseffizienz (Choong et al., 1996) und auf die Aktivierung von Spleißsignalen (Cartegni et al., 2002). Darüber hinaus kann stummen Varianten eine indirekte Bedeutung zukommen, wenn sie mit den eigentlichen funktionellen Varianten im Kopplungsungleichgewicht stehen und ersatzweise als Marker dienen. Im vorliegenden Fall legen die erhobenen Zahlen eine Eignung als Marker der Panikstörung nicht nahe.

#### **5.1.2.2 *PvuII*-Polymorphismus**

Einer möglichen Assoziation des *PvuII*-Polymorphismus mit neuropsychiatrischen Erkrankungen wurde bereits in mehreren Studien nachgegangen. Die dabei ermittelten Frequenzen für das P-Allel in den Kontrollkollektiven lagen zwischen 0,35 und 0,48 (Brandi et al., 1999; Eastwood et al., 2002; Isoe-Wada et al., 1999; Ji et al., 2000; Jones et al., 2000; Kikuchi et al., 2002; Lambert et al., 2001; Maraganore et al., 2002; Maruyama et al., 2000; Mattila et al., 2000 und 2002; Ouyang et al., 2001; Prichard et al., 2002; Savettieri et al., 2002; Yaffe et al., 2002) und stimmen gut mit dem Ergebnis für das eigene Kontrollkollektiv (Frequenz=0,495) überein. Die unterschiedlichen Werte für  $f(P)$  in den verschiedenen Studien können Ausdruck populationsspezifischer Verteilungsmuster sein, so stammen z.B. die Probanden der Studien mit niedrigeren P-Allelfrequenzen (0,37-0,38) aus Japan (Kikuchi et al., 2002; Ji et al., 2000), während die vorliegende Arbeit Kaukasier untersucht. Einen guten Beleg für diese Hypothese liefern Allelfrequenzen, die systematisch in unterschiedlichen ethnischen Kontrollstichproben erhoben wurden. Hier ergaben sich erhebliche Schwankungen (Kambodschaner:  $f=0,167$ ; Mbuti-Volksstamm/Afrika:  $f=0,9$ ; Rajeevan et al., 2003). Unter den klinischen

Stichproben ist eine Gruppe longitudinal untersuchter Jugendlicher zu nennen, die hinsichtlich ängstlichen Verhaltens aufgeteilt wurde (Prichard et al., 2002). Dabei fand sich keine signifikante Assoziation von Ängstlichkeit mit dem *PvuII*-Polymorphismus, die Autoren berichten aber von einer Assoziation mit dem kombinierten Genotyp (*PvuII/XbaI*). Ähnliche, statistisch wenig valide Signifikanzen wurden auch in anderem Zusammenhang angeführt (Brandi et al., 1999; Mattila et al., 2000). Problematisch sind hier Artefakte, die durch multiples Testen entstehen. Einfluss nimmt möglicherweise auch die Geschlechtszugehörigkeit; die Studie mit der geringsten Frequenz des P-Allels (0,35 für die Kontrollpersonen und 0,31 für die Patienten) befasste sich ausschließlich mit Frauen (Eastwood et al., 2002).

Assoziationen des P-Allels mit dementiellen Erkrankungen wurden mehrfach berichtet (Isoe-Wada et al., 1999; Brandi et al., 1999; Ji et al., 2000). Andererseits wurde allerdings auch das p-Allel mit kognitiven Defiziten in Zusammenhang gebracht (Mattila et al., 2000; Yaffe et al., 2002), während wieder andere Studien keinen Zusammenhang feststellten (Lambert et al., 2001; Maruyama et al., 2000; Mattila et al., 2002).

Bei dem *PvuII*-Polymorphismus handelt es sich um einen intronischen Polymorphismus, dessen Einfluss auf die Genexpression als schwach bezeichnet worden ist (Maruyama et al., 2000). Diese Einschätzung ist aufgrund der Datenlage jedoch als vorläufig zu verstehen. Selbst wenn sich dies erhärten sollte, scheint die Variante für die Pathogenese der Panikstörung von untergeordneter Bedeutung zu sein.

### **5.1.2.3 *XbaI*-Polymorphismus**

Der *XbaI*-Polymorphismus ist dem *PvuII*-Polymorphismus benachbart (Abstand ca. 50bp) und daher in Untersuchungen zur *PvuII*-Variante meist mitberücksichtigt worden (Isoe-Wada et al., 1999; Brandi et al., 1999; Ji et al., 2000; Yaffe et al., 2002; Mattila et al., 2000; Kikuchi et al., 2002; Savettieri et al., 2002; Jones et al., 2000; Maraganore et al., 2002; Maruyama et al., 2000; Lambert et al., 2001; Prichard et al., 2002; Eastwood et al., 2002; Ouyang et al., 2001).

Die hierbei gewonnenen Angaben zur X-Allelfrequenz in Kontrollpopulationen bewegen sich zwischen 0,22 und 0,435 (Ji et al., 2000; Brandi et al., 1999). Sie stehen in Einklang mit der X-Allelfrequenz im eigenen Kontrollkollektiv ( $f=0,38$ ). Untersucht

wurden auch verschiedene psychiatrische Kollektive, darunter vermehrt ängstliche Jugendliche (Prichard et al., 2002). Signifikante Abweichungen der *XbaI*-Allelfrequenzen gegenüber der Kontrollgruppe wurden jedoch nicht berichtet. Mehrere Studien beziehen sich auf kognitive Defizite, wobei die relativen Häufigkeiten für das X-Allel zwischen 0,22 (Ji et al., 2000) und 0,435 (Brandi et al., 1999) für die Patientengruppen liegen. Die dabei beschriebenen Zusammenhänge zwischen X-Allel bzw. XX-Genotyp und *M. Alzheimer* (Isoe-Wada et al., 1999; Brandi et al., 1999; Ji et al., 2000) bzw. zwischen x-Allel oder xx-Genotyp und dementiellen Erkrankungen (Yaffe et al., 2002; Mattila et al., 2000) sind widersprüchlich. Andere Arbeiten wiederum lassen keinen Zusammenhang zwischen dem *XbaI*-Polymorphismus und *M. Alzheimer* erkennen (Maruyama et al., 2000; Lambert et al., 2001). Als Ursache für die unterschiedlichen relativen Allel-Häufigkeiten in den verschiedenen Arbeiten kommen primär ethnische Unterschiede in Betracht. Besonders kritisch zu beurteilen sind erneut positive Assoziationsbefunde für Genlocuskombinationen (Mattila et al., 2000), die oftmals auf sehr kleinen Fallzahlen für jede einzelne Locus-Kombination beruhen und überwiegend unkorrigierten Mehrfachtestungen entnommen sind (Prichard et al., 2002). Postuliert wurden auch geschlechtsspezifische Differenzen des *XbaI*-Genotyps mit einem größeren Anteil männlicher Probanden an Trägern des Genotyps XX (Prichard et al., 2002). In der eigenen Stichprobe der Patienten mit Panikstörung ist dieses Verhältnis jedoch umgekehrt (XX=0,067 bei Männern zu XX=0,133 bei Frauen), der Unterschied jedoch nicht signifikant ( $p=0,63$ ). Eine geschlechtsgebundene Häufung autosomaler Allele ist extrem selten und wäre etwa durch einen starken geschlechtsspezifischen Selektionsvorgang zu erklären. Wahrscheinlicher scheint es, dass entsprechende Vorbefunde auf statistische Artefakte zurückgehen, eine geschlechtsbezogene *XbaI*-Genotypverteilung war zudem in den hier untersuchten Subgruppen nicht nachweisbar (Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie: XX 0,133 Männer zu 0,146 Frauen).

### 5.1.3 Intron 5-Mikrosatellit

Der hier erstmals beschriebene polymorphe (GT)<sub>n</sub>-Mikrosatellit befindet sich im nicht-kodierenden Bereich des Östrogenrezeptor  $\alpha$ -Gens 2,8kb 5' von Exon 1D. Dinukleotid-Mikrosatelliten sind im menschlichen Genom im Vergleich zu den Genomen anderer

Eukaryonten vermehrt anzutreffen (Hancock, 1995). Sie werden zu der Gruppe der short tandem repeats (STRs) gerechnet und finden sich gehäuft in Genen, die Entwicklungsprozesse steuern, so z.B. in Transkriptionsfaktorogenen (Hancock, 1996) einschließlich des Östrogenrezeptor  $\beta$ -Gens (Tsukamoto et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass nicht-transkribierte STRs die Nukleosomen-Positionierung beeinflussen, (Wang et al., 1994), einige scheinen als Protein-Bindungsstellen zu fungieren. Die Proteinbindung ist dabei abhängig von der Fähigkeit der STRs, spezifische sekundäre DNA-Strukturen auszubilden (Richards et al., 1993). Nachgewiesen wurde auch, dass mit steigender Anzahl von STRs offenbar eine stärkere Beeinflussung des Transkriptionsprozesses einhergeht (Gebhardt et al., 2000; Grabzyc et al., 2001; Liquori et al., 2001). Die Variabilität der STR-Länge könnte mit Polymerase-bedingten Fehlern oder Falschpaarungen beim Geschwister-Chromatiden-Austausch zusammenhängen. Bedingt durch diese und andere Mechanismen entwickeln STRs z.T. erhebliche Dynamik: an einigen Loci wurde eine auffallend hohe Keimzellinstabilität von bis zu 15% pro Spermium beobachtet (Vergnaud et al., 1991). Bezüglich des polymorphen *ESR $\alpha$*  (GT)<sub>n</sub>-Mikrosatelliten bedarf es weitergehender Untersuchungen, um Allelfrequenzen, somatische Stabilität und funktionelle Effekte aufzuklären.



## 5.2 Östrogenrezeptor $\beta$ -Gen

### 5.2.1 Genomische Organisation

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere untranslatierte Exons des *ESR $\beta$* -Gens erstmals annotiert, wodurch sich die Anzahl bekannter Exons von 11 auf 17 erhöht hat. In Analogie zur Exon-Intron-Struktur des *ESR $\alpha$* -Gens (s.o.) weist das *ESR $\beta$* -Gen zahlreiche, unterschiedlich transkribierte/gespleißte Regionen 5' des Transkriptionsbeginns auf, die mutmaßlich regulatorische Bedeutung für die Genexpression besitzen. Zu Zahl und möglicherweise gewebespezifischen Nutzung von *ESR $\beta$* -Gen-Promotoren liegen bislang nur unvollständige Angaben vor. Die erste veröffentlichte Charakterisierung eines *ESR $\beta$* -Gen-Promotors bezog sich auf die Region unmittelbar 5' von Exon 0N (Li et al., 2000). Im 3' untranslatierten Bereich des *ESR $\beta$* -Gens wurde ein alternatives terminales Exon (Exon 10) identifiziert, das Datenbanken zufolge in Hoden, Ovar und Brustgewebe exprimiert wird und in einem Transkriptpool aus 37 Geweben ebenfalls enthalten war. Es ist gegenwärtig offen, welche Funktion die beiden alternativen 3'-Enden von *ESR $\beta$*  mRNA besitzen, ebenso sind ihre respektiven Expressionsmuster noch näher zu definieren. Berücksichtigt man die zuvor genannten Zusammenhänge zwischen der 3'UTR des *ESR $\alpha$* -Gens und Parametern der mRNA-Stabilität, so erscheint ein ähnlicher Bezug auch beim *ESR $\beta$* -Gen denkbar. Vor diesem Hintergrund sind auch die Ergebnisse zu den untersuchten Genvarianten (rs4134646 und rs1255998) zu sehen, die beide die *ESR $\beta$*  3'UTR betreffen. Insgesamt weisen zahlreiche Spleißvarianten sowohl im 5'UTR- wie im 3'UTR-Bereich auf eine komplexe Steuerung der Expression hin. Nach der Entwicklung der letzten Jahre zu urteilen, ist anzunehmen, dass weitere Exons entdeckt werden und zugleich die funktionelle Bedeutung bereits bekannter Exons im Gesamtzusammenhang besser erkennbar werden wird.

## 5.2.2 Allelfrequenzen und Genotypverteilungen

### 5.2.2.1 *AluI*-Polymorphismus

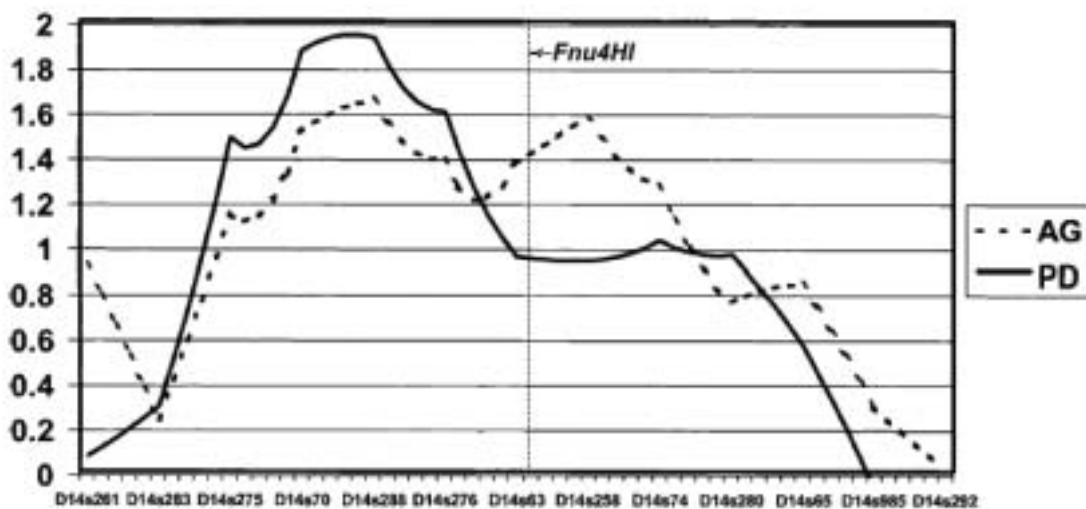
Für den *AluI*-Polymorphismus (rs4134646) existieren bislang keine Untersuchungen zu Assoziationen mit der Panikerkrankung. Erstmals wurde er von Rosenkranz und Mitarbeitern im Rahmen einer systematischen Suche nach Varianten des Östrogenrezeptor  $\beta$ -Gens an einem Kollektiv mit verschiedenen Gewichtsextremen beschrieben. Dabei wurde eine Frequenz von 0,40 bis 0,37 für das A-Allel genannt ohne signifikante Unterschiede zwischen Übergewichtigen, Untergewichtigen oder Patienten mit *Anorexia nervosa* bzw. Bulimie (Rosenkranz et al., 1998). Ähnliche Allelfrequenzen wurden in der vorliegenden Arbeit ermittelt ( $f(A) = 0,397$  für Kontrollpersonen sowie 0,372 für Patienten mit Panikstörung). Deutlich niedrigere Allelfrequenzen wurden von Eastwood et al. bei der Untersuchung von Britinnen mit *Anorexia nervosa* bzw. gesunden Britinnen angegeben (0,199 bzw. 0,142 für das A-Allel, Eastwood et al., 2002). Dies kann einerseits durch unterschiedliche ethnische Zugehörigkeit der untersuchten Kollektive bedingt sein. Ferner könnte die unterschiedliche Geschlechtszusammensetzung (Eastwood und Mitarbeiter untersuchten ausschließlich Frauen) eine Rolle spielen. Nicht auszuschließen sind Stratifizierungsartefakte, zumal von Eastwood et al. eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Äquilibrium festgehalten wurde. Lambert und Mitarbeiter untersuchten diesen Polymorphismus an Patienten mit *M. Alzheimer* im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Dabei kam es allerdings zu einer fehlerhaften Bezeichnung der Allele, so dass das A-Allel irrtümlich als das häufigere Allel bezeichnet wurde. Es wurde eine Häufigkeit für das A-Allel von 0,64 bei den Patienten mit *M. Alzheimer* bzw. 0,60 bei den Kontrollen beschrieben (Lambert et al., 2001). Unter Berücksichtigung der fehlerhaften Allelbezeichnung sind die Werte für die Allelfrequenzen mit den Resultaten der vorliegenden und den meisten übrigen Arbeiten jedoch vergleichbar.

In der eigenen Stichprobe war bei Betrachtung des *ESR $\beta$*  *AluI*-Polymorphismus andeutungsweise ein Unterschied der allelischen Verteilungsmuster zu erkennen ( $p=0,09$ ). Es betraf dies eine Teilpopulation weiblicher Patienten mit zusätzlicher

Agoraphobie, die zu einem geringeren Prozentsatz (34,4%) Trägerinnen des A-Allels waren (weibliche Kontrollgruppe 45,8%). Zwar erreicht der Unterschied nicht das vorgegebene Signifikanzniveau, die Bedeutung dieses Befundes wächst aber mit den unten diskutierten Befunden zu einem weiteren *ESRβ*-Polymorphismus, die sich ebenfalls auf die Teilstichprobe mit Agoraphobie beziehen.

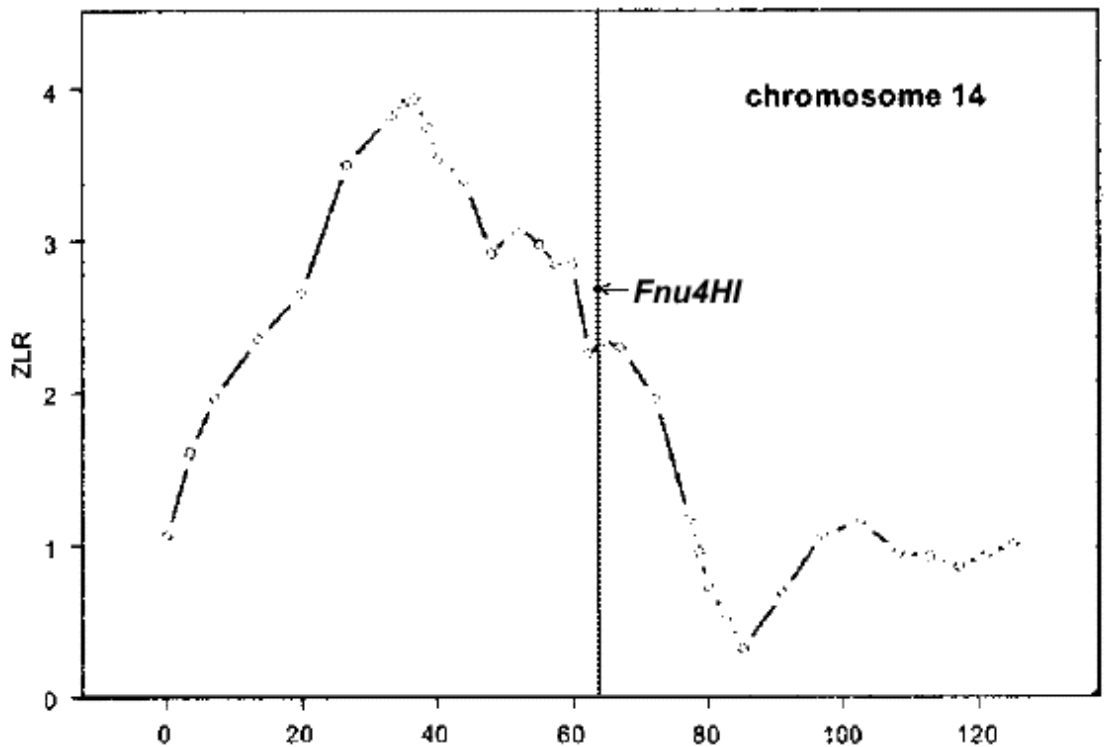
### 5.2.2.2 *Fnu4HI*-Polymorphismus

Der *Fnu4HI*-Polymorphismus wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschrieben, so dass derzeit keine vergleichbaren Daten vorliegen. Mit einer Frequenz für das seltene G-Allel von 0,119 für Kontrollen und 0,055 für Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie zeigte sich ein Trend zur Signifikanz für Unterschiede innerhalb dieser Teilstichproben ( $p=0,07$ ). Aus der einzigen bislang publizierte genomweiten Kopplungsuntersuchung zur Agoraphobie ist, neben einem Vulnerabilitätslocus auf Chromosom 3q, auch ein schwächeres Signal auf Chromosom 14q zu entnehmen (Gelernter et al., 2001, Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Agoraphobie Kopplungsbefund chr14 mit Position des *Fnu4HI*-Polymorphismus. AG = Agoraphobie, PD = Panikstörung (Abb. aus Gelernter et al., 2001, modifiziert)

Eine kürzlich erschienene Arbeit zu Kopplungsbefunden bei einfacher Phobie weist ebenfalls auf Chromosom 14q (Gelernter et al., 2003) (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Phobie Kopplungsbefund chr14 mit Position des *Fnu4HI*-Polymorphismus. ZLR=maximum likelihood ratio z-score, ein Maß für die Kopplungswahrscheinlichkeit= $\sqrt{[2 \log_e(10)LOD]}$  (nach Kong und Cox, 1997) (Abb. aus Gelernter et al., 2003, modifiziert)

Es ist bemerkenswert, dass der *Fnu4HI*-Polymorphismus in der chromosomalen Region zu finden ist, die demnach bereits im Vorfeld mit Agoraphobie, Panikstörung und auch mit einfacher Phobie in Verbindung gebracht wurde. Zwar liegen die Kopplungsmaxima jeweils näher zum Zentromer, sie sind aber breitgipflig und für den Marker D14S63 in unmittelbarer Nachbarschaft zur *Fnu4HI*-Variante noch aussagekräftig. Vor diesem Hintergrund ist zu prüfen, ob *Fnu4HI* selbst oder ein anderer nahegelegener Polymorphismus im Bereich der *ESRβ* 3'UTR einen funktionellen Beitrag zum genetischen Risiko für verschiedene Angststörungen leistet, die neben der Panikstörung i.e.S. auch phobische Störungen betrifft.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte die Existenz der schon beschriebenen *ESR*-Polymorphismen *MspI*, *XbaI*, *PvuII* sowie *AluI* bestätigt werden, eine Assoziation mit der Panikerkrankung war hierfür nicht erkennbar. Allerdings war die statistische Power all dieser Untersuchungen verhältnismäßig gering, so dass es weiterer Studien an deutlich größeren Kollektiven bedarf, um auch schwache Effekte sicher ausschließen können.

Im *ESRβ*-Gen wurde der *Fnu4HI*-Polymorphismus neu beschrieben und für diesen Polymorphismus zugleich eine grenzwertig signifikante Assoziation mit der Panikstörung in Kombination mit Agoraphobie gefunden. Dieses Ergebnis zeigt –vorbehaltlich einer Replikation an weiteren Stichproben– einen ersten möglichen Zusammenhang zwischen einem Östrogenrezeptorgen-Polymorphismus und der Panikstörung.

Da die Panikstörung oft in Phasen hormoneller Umstellung wie nach der Geburt eines Kindes, während der Menopause oder in einer Schwangerschaft erstmals auftritt, ist möglicherweise durch eine engere Auswahl der Stichproben aus solchen Kollektiven eine stärkere Assoziation zum Wirkmechanismus der Östrogene zu erwarten.

Zudem wurde eine aktualisierte Version der genomischen Organisation der Gene für *ESRα* und *β* erstellt. Innerhalb des *ESRα*-Gens fiel dabei ein polymorpher Mikrosatellit im Bereich 5' von Exon 1D auf, dessen funktionelle Relevanz noch zu untersuchen ist. Die aktualisierte genomische Organisation der *ESRα*- und *β*-Gene bildet die Grundlage für weitere Assoziationsstudien zu neuen exonischen Varianten und zu Varianten im Bereich regulatorischer Sequenzen. Es ist anzunehmen, aber noch nicht nachgewiesen, dass die größere Anzahl von Promotoren gewebsspezifische Expressionsmuster der *ESRα* und *β* mitgestaltet.

Vieles spricht gegenwärtig für die Existenz eines dritten membranständigen Östrogenrezeptor (*ESRγ*) (Levin et al., 2002), der für schnelleinsetzende Östrogeneffekte verantwortlich ist und eine Spleißvariante von *ESRα* oder *β* darstellen könnte. Sofern sich dies bestätigt, besitzen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur genomischen Organisation der *ESR* und die untersuchten Polymorphismen betreffend zugleich potentielle Relevanz für das Verständnis östrogenabhängiger-membranvermittelter Signaltransduktion.

## 7 Literatur

- Allen E, Doisy EA (1923): An ovarian hormone: Preliminary report on its localization, extraction and partial purification and action in test animals. *J Am Med Assoc* 81: 819
- Altschul S, Gish W, Miller W, Myers E, Lipman D (1990): "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* 215: 403-410
- Beato M, Herrlich P, Schutz G (1995): Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* 83: 851-57
- Benson D, Karsch-Mizrachi I, Lipman D, Ostell J, Rapp B, Wheeler D (2000): GenBank. *Nucleic Acids Res* 28: 15-18
- Bitran D, Dowd JA (1996): Ovarian steroids modify the behavioural and neurochemical responses of the central benzodiazepine receptor. *Psychopharmacology* 125: 65-73
- Brand H, Kos M, Denger S, Flouriot G, Gromoll J, Gannon F, Reid G (2002): A novel promoter is involved in the expression of estrogen receptor  $\alpha$  in human testis and epididymis. *Endocrinology* 143: 3397-3404
- Brandi ML, Becherini L, Gennari L, Racchi M, Bianchetti A, Nacmias B, Sorbi S, Mecocci P, Senin U, Govoni S. (1999): Association of the estrogen receptor alpha gene polymorphisms with sporadic Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 335-338
- Brown TA (1999): Moderne Genetik. 2. Auflage; *Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin*
- Budowle B, Chakraborty R, Giusti AM, Eisenberg AJ, Allen R. (1991): Analysis of the VNTR locus D1S80 by PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48: 137-144
- Cameron OG, Kuttesch D, McPhee K, Curtis GC (1988): Menstrual fluctation in the symptoms of panic anxiety. *J Affect Disord* 15: 169-174
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002): Listening to silence and understanding non-sense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics* 3: 285-298

- Cartegni L, Krainer AR (2002): Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Rev Genet* 3: 285-298
- Choong CS, Quigley CA, French FS, Wilson EM (1996): A novel missense mutation in the amino-terminal domain of the human androgen receptor gene in a family with partial androgen insensitivity syndrome causes reduced efficiency of protein translation. *J Clin Invest* 98: 1423-1431
- Cohen LS, Sichel DA, Dimmock JA, Rosenbaum JF (1994): Postpartum course in women with preexisting panic disorder. *J Clin Psychiatry* 55: 289-292
- Comings DE, Gade-Andavolu R, Gonzalez N, Wu S, Muhleman D, Blake H, Chiu F, Wang E, Farwell K, Darakjy S, Baker R, Dietz G, Saucier G, MacMurray JP (2000): Multivariate analysis of associations of 42 genes in ADHD, ODD and conduct disorder. *Clin Genet* 58: 31-40
- Comings DE, Muhleman D, Johnson P, MacMurray JP (1999): Potential role of the estrogen receptor gene (ESR1) in anxiety. *Mol Psychiatry* 4: 374-377
- Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzcy J, Golding TS, Lubahn DB, Smithies O, Korach KS (1995): Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. *Mol Endocrinology* 9: 1441-1454
- Crowe RR, Noyes R, Pauls DL, Slymen DJ (1983): A family study of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 40: 1065-1069
- Crowe RR, Goedken R, Samuelson S, Wilson R, Nelson J, Noyes R Jr. (2001): Genomewide Survey of Panic Disorder. *Am J Med Genet* 105: 105-109
- Deci PA, Lydiard RB, Santos AB, Arana GW (1992): Oral contraceptives and panic disorder. *J Clin Psychiatry* 53: 163-165
- Deckert J, Catalano M, Syagailo YV, Bosi M, Okladnova O, Di Bella D, Nöthen MM, Maffei P, Franke P, Fritze J, Maier W, Propping P, Beckmann H, Bellodi L, Lesch KP (1999): Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet* 8: 621-624
- Deckert J, Nöthen MM, Franke P, Delmo C, Fritze J, Knapp M, Maier W, Beckmann H, Propping P (1998): Systematic mutation screening and association study of the A1

- and A2a adenosine receptor genes in panic disorder suggest a contribution of the A2a gene to the development of disease. *Mol Psychiatry* 3: 81-85
- Dembert M, Dinneen M, Opsahl M (1994): Estrogen-induced panic disorder. *Am J Psychiatry* 151: 1246
- Desai UJ, Pfaffle PK (1995): Single-step purification of a thermostable DNA polymerase expressed in Escherichia coli. *Biotechniques* 19: 780-2; 784
- Domschke K, Freitag CM, Kuhlenbäumer G, Schirmacher A, Sand P, Nyhuis P, Jacob C, Fritze J, Franke P, Rietschel M, Garritsen HS, Fimmers R, Nöthen MM, Lesch KP, Stögbauer F, Deckert J (2003): Association of the functional V158M catechol-O-methyl-transferase polymorphism with panic disorder in women. *Int J Neuropsychopharmacol* -im Druck-
- Du YZ, Dickerson C, Aylsworth AS, Schwartz CE (1998): A silent mutation, C924T (G308G), in the L1CAM gene results in X linked hydrocephalus (HSAS). *J Med Genet* 35: 456-462
- Dupont WD, Plummer WD (1990): Power and sample size calculations: a review and computer program. *Controlled Clinical Trials* 11: 116-128
- Eastwood H, Brown KM, Markovic D, Pieri LF (2002): Variation in the ESR1 and ESR2 genes and genetic susceptibility to anorexia nervosa. *Mol Psychiatry* 7: 86-89
- Eaton W, Kessler R, Wittchen H, Magee W (1994): Panic and panic disorder in the United States. *Arch Gen Psychiatry* 40: 1065-1069
- Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA (1997): Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal location and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 4258-4265
- Faravelli C, Pallanti S (1989): Recent life events and panic disorder. *Am J Psychiatry* 146: 622-626
- Feng J, Yan J, Michaud S, Craddock N, Jones IR, Cook EHJr, Goldman D, Heston LL, Peltonen L, Delisi LE, Sommer SS (2001): Scanning of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and thyroid hormone receptor  $\alpha$  (TR $\alpha$ ) genes in patients with psychiatric diseases: four missense mutations identified in ER $\alpha$  gene. *Am J Med Genet* 105: 369-374
- Finn CT, Smoller JW (2001): The genetics of panic disorder. *Curr Psychiatry Rep* 3: 131-137



- Forsell C, Enmark E, Axelman K, Blomberg M, Wahlund LO, Gustafsson JA, Lannfelt L (2001): Investigations of a CA repeat in the oestrogen receptor beta gene in patients with Alzheimer's disease. *Eur J Hum Genet* 9: 802-804
- Galeeva A, Tuohimaa P (2001): Analysis of mouse plus-maze behavior modulated by ovarian steroids. *Behavioural Brain Research* 119:41-47
- Gebhardt F, Burger H, Brandt B (2000): Modulation of EGFR gene transcription by secondary structures, a polymorphic repetitive sequence and mutations – a link between genetics and epigenetics. *Histol Histopathol* 15: 929-936
- Gelernter J, Bonvicini K, Page G, Woods S, Goddard A, Kruger S, Pauls D, Goodson S (2001): Linkage genome scan for loci predisposing to panic disorder or agoraphobia. *Am J Med Genet* 105: 548-557
- Gelernter J, Page G, Bonvicini K, Woods S, Pauls D, Kruger S (2003): A chromosome 14 risk locus for simple phobia: results from a genomewide linkage scan. *Mol Psychiatry* 8: 71-82
- Gosden JR, Middleton PG, Rout D (1986): Localization of the human estrogen receptor gene to chromosome 6q24-q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 43: 218-220
- Grabczyk E, Kumari D, Usdin K (2001): Fragile X syndrome and Friedreich's ataxia: two different paradigm for repeat induced transcript insufficiency. *Brain Res Bull* 56: 367-373
- Gustafsson JA (1999): Estrogen receptor  $\beta$ -a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 163: 379-383
- Hamilton S, Fyer A, Durner M, Heiman G, Baisre de Leon A, Hodge S, Knowles J, Weissman M (2003): Further genetic evidence for a panic disorder syndrome mapping to chromosome 13q. *Proc Natl Acad Sci* 100: 2550-2555
- Hancock JM (1995): The contribution of DNA slippage-like processes to genome evolution. *J Mol Evol* 41: 1038-1047
- Hancock JM (1996): Microsatellites and other simple sequences in the evolution of the human genome. In: Jackson M, Strachnan T, Dover G (Hrsg.) Human genome evolution. *BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp 191-210*

- Hayward C, Killen JD, Hammer LD, Litt IF, Wilson DM, Simmonds B, Taylor CB (1992): Pubertal stage and panic attack history in sixth and seventh-grade girls. *Am J Psychiatry* 149: 1239-1243
- Hettema J, Neale M, Kendler K (2001): A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 158: 1568-1578
- Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K (2002): The novel isoform of the estrogen receptor- $\alpha$  cDNA (ER $\alpha$  isoform S cDNA) in the human testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80: 299-305
- Hirata S, Tomoko S, Kato J, Hoshi K (2001): The multiple untranslated first exons of the human estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) gene. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78: 33-40
- Hutchinson JB, Beyer C, Hutchinson RE, Wozniak A (1995): Sexual dimorphism in the developmental regulation of brain aromatase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53: 307-313
- Isoe-Wada K, Maeda M, Yong J, Adachi Y, Harada H, Urakami K, Nakashima K (1999): Positive association between an estrogen receptor gene polymorphism and Parkinson's disease with dementia. *Eur J Neurol* 6: 431-435
- Ji Y, Urakami K, Wada-Isoe K, Adachi Y, Nakashima K (2000): Estrogen receptor gene polymorphisms in patients with Alzheimer's disease, vascular dementia and alcohol-associated dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 11: 119-122
- Jones I, Middle F, McCandless F, Coyle N, Robertson E, Brockington I, Lendon C, Craddock N (2000): Molecular genetic studies of bipolar disorder and puerperal psychosis at two polymorphisms in the estrogen receptor alpha gene (ESR1). *Am J Med Genet* 96: 850-853
- Kaspi S, Otto M, Pollack M, Eppinger S, Rosenbaum J (1994): Premenstrual exacerbation of symptoms in women with panic disorder. *J Anx Dis* 8:131-138
- Kealey C, Reynolds A, Mynett-Johnson L, Claffey E, McKeon P (2001): No evidence to support an association between the estrogen receptor beta gene and bipolar disorder. *Psychiatr Genet* 11:223-226
- Keaveney M, Parker MG, Gannon F (1993): Identification of a functional role for the 3' region of the human oestrogen receptor gene. *J Mol Endocrinol* 10: 143-152
- Kelley ST, Thackray VG (1999): Phylogenetic analyses reveal ancient duplication of estrogen receptor isoforms. *J Mol Evol* 49: 609-614

- Kenealy MR, Fluriot G, Sonntag-Buck V, Dandekar T, Brand H, Gannon F (2000): The 3' untranslated region of the human estrogen receptor  $\alpha$  gene mediates rapid messenger ribonucleic acid turnover. *Endocrinology* 141: 2805-2813
- Kennedy JL, Bradwejn J, Koszycki D, King N, Crowe R, Vincent J, Fourie O (1999): Investigation of cholecystokinin system genes in panic disorder. *Mol Psychiatry* 4: 284-285
- Kikuchi S, Fukazawa T, Niino M, Yabe I, Miyagishi R, Hamada T, Tashiro K (2002): Estrogen receptor gene polymorphism and multiple sclerosis in Japanese patients: interaction with HLA-DRB1\*1501 and disease modulation. *J Neuroimmunol* 128: 77-81
- Knowles JA, Fyer AJ, Vieland VJ, Weissman MM, Hodge SE, Heiman GA, Haghghi F, de Jesus GM, Rassnick H, Preud'homme-Rivelli X, Austin T, Cunjak J, Mick S, Fine LD, Woodley KA, Das K, Maier W, Adams PB, Freimer NB, Klein DF, Gilliam TC (1998): Results of a genome-wide genetic screen for panic disorder. *Am J Med Genet* 81: 139-147
- Kong A, Cox NJ (1997): Allele-sharing models: LOD scores and accurate linkage tests. *Am J Hum Genet* 61: 1347-1363
- Koš M, Denger S, Reid G, Korach KS, Gannon F (2002): Down but not out? A novel isoform of the estrogen receptor  $\alpha$  is expressed in the estrogen receptor  $\alpha$  knockout mouse. *J Mol Endocrinol* 29: 281-286
- Koš M, Reid G, Denger S, Gannon F (2001): Genomic organization of the human estrogen  $\alpha$  gene promoter region. *Mol Endocrinol* 15: 2057-2063
- Kreżel W, Dupont S, Krust A, Chambon P, Chapman PF (2001): Increased anxiety and synaptic plasticity in estrogen receptor  $\beta$ -deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 98: 12278-12282
- Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925-5930
- Lambert JC, Harris JM, Mann D, Lemmon H, Coates J, Cumming A, St-Clair D, Lendon C (2001): Are the estrogen receptors involved in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 306: 193-197

- Levin ER (2002): Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* 67: 471-475
- Li LC, Yeh CC, Nojima D, Dahiya R (2000): Cloning and characterization of human estrogen receptor  $\beta$  promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 275: 682-689
- Liquori CL, Ricker K, Moseley ML, Jacobsen JF, Kress W, Naylor SL, Day JW, Ranum LPW (2001): Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293: 864-867
- Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O (1993): Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci* 90: 11162-11166
- Manuzza S, Fyer A, Klein D, Endicott J (1986): Schedule for affective disorders and schizophrenia – lifetime version (modified for the study of anxiety disorders): rationale and conceptual development. *J Psychiatr Res* 20: 317-325
- Maraganore DM, Farrer MJ, McDonnell SK, Elbaz A, Schaid DJ, Hardy JA, Rocca WA (2002): Case-control study of estrogen receptor gene polymorphisms in Parkinson's disease. *Mov Disord* 17: 509-512
- Maruyama H, Toji H, Harrington CR, Sasaki K, Izumi Y, Ohnuma T, Arai H, Yasuda M, Tanaka C, Emson PC, Nakamura S, Kawakami H (2000): Lack of an association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms and transcriptional activity with Alzheimer disease. *Arch Neurol* 57: 236-240
- Mattila KM, Axelman K, Rinne JO, Blomberg M, Lehtimäki T, Laippala P, Røyttä M, Viitanen M, Wahlund L, Winblad B, Lannfelt L (2000): Interaction between estrogen receptor 1 and the epsilon4 allele of apolipoprotein E increases the risk of familial Alzheimer's disease in women. *Neurosci Lett* 282: 45-48
- Mattila KM, Rinne JO, Røyttä M, Laippala P, Lehtimäki T (2002): Lack of an association between an estrogen receptor 1 gene polymorphism and Parkinson's disease with dementia. *Acta Neurol Scand* 106: 128-130
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988): A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215

- Mora S, Dussaubat N, Diaz-Veliz G (1996): Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioural indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 21: 609-620
- Morgan MA, Pfaff DW (2002): Estrogen's effects on activity, anxiety, and fear in two mouse strains. *Behav Brain Res* 132: 85-93
- Morgan MA, Pfaff DW (2001): Effects of estrogen on activity and fear-related behaviors in mice. *Horm Behav* 40: 472-482
- Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 263-273
- Muramatsu M, Inoue S (2000): Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions? *Biochem Biophys Res Commun* 270: 1-10
- Northcott CJ, Stein MB (1994): Panic disorder and pregnancy. *J Clin Psychiatry* 55: 539-542
- Noyes R, Crowe R, Harris E, Hamra B, McChesney C, Chaudhry D (1986): Relationship between panic disorder and agoraphobia: A family study. *Arch Gen Psychiatry* 43: 227-232
- O'Farrell (1992): Developmental biology. Big genes and little genes and deadline for transcription. *Nature* 359: 366-367
- Ogawa S, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW (1997): Behavioral effects of estrogen receptor gene disruption in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1476-1481
- Ogawa S, Eng V, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW (1998a): Roles of estrogen receptor-alpha gene expression in reproduction-related behaviors in female mice. *Endocrinology* 139: 5070-5081
- Ogawa S, Washburn TF, Taylor J, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW (1998b): Modifications of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor- $\alpha$  gene disruption in male mice. *Endocrinology* 139: 5058-5069
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989a): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770

- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989b): Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879
- Ouyang WC, Wang YC, Hong CJ, Tsai SJ (2001): Estrogen receptor alpha gene polymorphism in schizophrenia: frequency, age at onset, symptomatology and prognosis. *Psychiatr Genet* 11: 95-98
- Pietras RJ, Szego CM (1977): Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* 265: 69-72
- Pietras RJ, Szego CM (1980): Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. *Biochem J* 191: 743-60
- Prichard Z, Jorm AF, Prior M, Sanson A, Smart D, Zhang Y, Huttley G, Eastaerl S (2002): Association of polymorphisms of the estrogen receptor gene with anxiety-related traits in children and adolescents: a longitudinal study. *Am J Med Genet* 114: 169-176
- Rajeevan H, Osier MV, Cheung KH, Deng H, Druskin L, Heinzen R, Kidd JR, Stein S, Pakstis AJ, Tosches NP, Yeh CC, Miller PL, Kidd KK (2003): ALFRED: the Allele FREquency Database. Update. *Nucleic Acids Res* 31: 270-271
- Regier DA, Narrow WE, Rae DS (1990): The epidemiology of anxiety disorders: the Epidemiologic Catchment Area (ECA) experience. *J Psychiatr Res* 24 Suppl 2: 3-14
- Richards RI, Holman K, Yu S, Sutherland GR (1993): Fragile X syndrome unstable element, p(CCG)<sub>n</sub>, and other simple tandem repeat sequences are binding sites for specific nuclear proteins. *Hum Mol Genet* 2: 1429-1435
- Robins LN, Wing J, Wittchen HU, Helzer JE, Babor TF, Burke J, Farmer A, Jablensky A, Pickens R, Regier DA, Sartorius N, Towle LH (1988): The composite international diagnostic interview: an epidemiologic instrument suitable for use in conjunction with different diagnostic systems and in different cultures. *Arch Gen Psychiatry* 45: 1069-1077
- Roodi N, Bailey LR, Kao WY, Verrier CS, Yee CJ, Dupont WD, Parl FF (1995): Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor-positive and receptor-negative primary breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 87: 446-51
- Rosenkranz K, Hinney A, Ziegler A, Hermann H, Fichter M, Mayer H, Siegfried W, Young JK, Remschmidt H, Hebebrand J (1998): Systematic mutation screening of

- the estrogen receptor beta gene in probands of different weight extremes: identification of several genetic variants. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 4524-4526
- Rozen S, Skaletsky H (2000): Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Hrsg.): Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. *Humana Press, Totowa, NJ, S. 365-386*
- Savettieri G, Cittadella R, Valentino P, Manna I, Andreoli V, La Russa A, La Porta G, Ruscica F, Ragonese P, Pirritano D, Bonavita S, Tedeschi G, Quattrone A (2002): Lack of association between estrogen receptor 1 gene polymorphisms and multiple sclerosis in southern Italy humans. *Neurosci Lett* 327: 115-118
- Scheper W, Meinsma D, Holthuizen PE, Sussenbach JS (1995): Long-range RNA interaction of two sequence elements required for endonucleolytic cleavage of human insulin-like growth factor II in mRNAs. *Mol Cell Biol* 15: 235-245
- Schlittgen R (1991): Einführung in die Statistik, 3.Auflage. *Oldenbourg Verlag, München*
- Schneier F, Fyer A, Martin L, Ross D, Mannuzza S, Liebowitz M, Gorman J, Klein D (1991): A comparison of phobic subtypes within panic disorder. *J Anx dis* 5: 65-75
- Schuler GD, Altschul SF, Lipman DJ (1991): A workbench for multiple alignment and construction analysis. *Proteins* 9: 180-190
- Schuler GD (1997): Pieces of the puzzle: expressed sequence tags and the catalog of human genes. *J Mol Med* 75(10): 694-698
- Sholomskas D, Wickamaratne P, Dogolo L, O'Brien D, Leaf P, Woods S (1993): Postpartum onset of panic disorder: A coincidental event? *J Clin Psychiatry* 54: 476-480
- Skre I, Onstad S, Torgersen S, Lygren S, Kinglen E (1993): A twin study on DSM-III-R anxiety disorders. *Acta Psychiatr Scand* 88: 85-92
- Smoller J, Acierno J Jr., Rosenbaum J, Biederman J, Pollack M, Meminger S, Pava J, Chadwick L, White C, Bulzacchelli M, Slaugenhaupt S (2001): Targeted genome screen of panic disorder and anxiety disorder proneness using homology to murine QTL regions. *Am J Med Genet* 105: 195-206
- Strachan T und Read AP (1996): Molekulare Humangenetik. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford*

- Swales PJ, Sheikh JI (1992): Hysterectomy in patients with panic disorder. *Am J Psychiatry* 149: 846-847
- Torgersen S (1983): Genetic factors in anxiety disorders. *Arch Gen Psychiatry* 40: 1085-1089
- Tsukamoto K, Inoue S, Hosoi T, Orimo H, Emi M (1998): Isolation and radiation hybrid mapping of dinucleotide repeat polymorphism at the human estrogen receptor beta locus. *J Hum Genet* 43: 73-74
- Vergnaud G, Mariat D, Apiou F, Aurias A, Lathrop M, Lauthier V (1991): The use of synthetic tandem repeats to isolate new VNTR loci: cloning of a hypermutable sequence. *Genomics* 11: 135-144
- Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, Chambon P (1985): Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Nat Acad Sci* 82: 7889-7893
- Wang YH, Amirhaeri S, Kang S, Wells RD, Griffith JD (1994): Preferential nucleosome assembly at DNA triplet repeats from the myotonic dystrophy gene. *Science* 265: 669-671
- Wang Z, Valdes J, Noyes R, Zoega T, Crowe RR (1998): Possible association of a cholecystokinin promoter polymorphism (CCK-36CT) with panic disorder. *Am J Med Genet* 81: 228-234
- Wittchen (Hrsg.) (1989): DSM III-R: Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen. *American Psychiatric Association*
- Yaffe K, Lui LY, Grady D, Stone K, Morin P (2002): Estrogen receptor 1 polymorphisms and risk of cognitive impairment in older women. *Biol Psychiatry* 51: 677-682



## 8 Appendix

Berechnungen für die vorliegende Arbeit wurden auf einem Acer Notebook, Betriebssystem Windows XP verfasst.

### 8.1 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

#### 8.1.1 Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Bekannte Östrogenrezeptorgenpolymorphismen und Assoziationsbefunde

**Tabelle 2:** Kollektive der Studien aus Tabelle 1

**Tabelle 3:** Charakterisierung der genutzten GenBank-Ressourcen

**Tabelle 4:** PCR - Ansatz

**Tabelle 5:** PCR – Primerpaare und Produktlängen

**Tabelle 6:** Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau (Gesamtvolumen 15µl)

**Tabelle 7:** Reaktionsbedingungen

**Tabelle 8:** Kontingenztabelle

**Tabelle 9:** Genomische Organisation des *ESRα*-Gens

**Tabelle 10:** Ergebnisse *MspI*-Polymorphismus

**Tabelle 11:** *MspI*-Polymorphismus: Vergleich Männer/Frauen

**Tabelle 12:** Ergebnisse *PvuII*-Polymorphismus

**Tabelle 13:** *PvuII*-Polymorphismus: Vergleich Männer/Frauen

**Tabelle 14:** Ergebnisse *XbaI*-Polymorphismus

**Tabelle 15:** *XbaI*-Polymorphismus: Vergleich Männer/Frauen

**Tabelle 16:** Genomische Organisation des *ESRβ*-Gens

**Tabelle 17:** Ergebnisse *AluI*-Polymorphismus

**Tabelle 18:** *AluI*-Polymorphismus: Vergleich Männer/Frauen

**Tabelle 19:** Ergebnisse *Fnu4HI*-Polymorphismus

**Tabelle 20:** *Fnu4HI*-Polymorphismus: Vergleich Männer/Frauen

### 8.1.2 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Vergleich der Primärstruktur der Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$   
(schematisch)

**Abbildung 2:** Mechanismus der Östrogenwirkung (schematisch)

**Abbildung 3:** Methodik-Schaubild

**Abbildung 4:** Genomische Organisation des *ESR $\alpha$* -Gens

**Abbildung 5:** Agarosegelelektrophorese: *MspI*-RFLP

**Abbildung 6:** Agarosegelelektrophorese: *PvuII*-RFLP

**Abbildung 7:** Agarosegelelektrophorese: *XbaI*-RFLP

**Abbildung 8:** MACAW-Ansicht der Repeatregion 5' von Exon 1D (Sequenzausschnitt)

**Abbildung 9:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese des (GT)-Repeats

**Abbildung 10:** Genomische Organisation des *ESR $\beta$* -Gens

**Abbildung 11:** Agarosegelelektrophorese und schematische Ansicht eines 448bp ER $\beta$   
cDNA Amplikons. [Exon6(partiell)-Exon10(partiell)]

**Abbildung 12:** Agarosegelelektrophorese: *AluI*-RFLP

**Abbildung 13:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese: *Fnu4HI*-RFLP

**Abbildung 14:** Agoraphobie Kopplungsbefund chr14 mit Position des *Fnu4HI*-  
Polymorphismus

**Abbildung 15:** Phobie Kopplungsbefund chr14 mit Position des *Fnu4HI*-  
Polymorphismus

## 8.2 Verwendete Materialien / Geräte etc.

### 8.2.1 Chemikalien / Materialien

Primer wurden von MWG Biotech AG (Ebersberg) bezogen.

0,5M EDTA ph 8 (Sigma, Deisenhofen)

100 bp-Längenstandard (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Acrylamid (Roth, Karlsruhe)

Agarose (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf)

*AluI* und Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Ammoniumpersulfat (Sigma, Deisenhofen)

Borsäure (Sigma, Deisenhofen)  
 Bromphenolblau 0,1% (Merck, Darmstadt)  
 BSA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)  
 dNTP (ABgene, Hamburg)  
 Essigsäure (Merck, Darmstadt)  
 Ethanol 10% (Roth, Karlsruhe)  
 Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen)  
 Ficoll 20% (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)  
 Filterpapier (Whatman International, Maidstone, USA)  
*Fnu4HI* und Puffer (New England Biolabs, Frankfurt am Main)  
 Formaldehyd 37% (Sigma, Deisenhofen)  
 KCl (Sigma, Deisenhofen)  
 MgCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt)  
*MspI* und Puffer (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot)  
 N´N´-Methylenbisacrylamid (Merck, Darmstadt)  
 Natriumcarbonat (Merck, Darmstadt)  
 Polaroidfilm A -97700-83 Typ667B&W  
*PvuII* und Puffer (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot)  
 Salpetersäure (Roth, Karlsruhe)  
 Silbernitrat (Roth, Karlsruhe)  
 Taq-Polymerase (gewonnen aus transgenen E.coli nach Desai und Pfaffle, 1995)  
 N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Merck, Darmstadt)  
 Tris (Calbiochem, Darmstadt)  
 Tris HCl (Merck, Darmstadt)  
 Tween 20 1% (Merck, Darmstadt)  
*XbaI* und Puffer (MBI-Fermentas, St. Leon-Rot)

### 8.2.2 Lösungen

- PCR-Puffer:

1M KCl

500µl

- |                               |       |
|-------------------------------|-------|
| 1M Tris HCl (pH 8,8 bei 25°C) | 100µl |
| Tween 20 1%                   | 250µl |
| BSA                           | 25µl  |
| 1M MgCl <sub>2</sub>          | 150µl |
- TAE-Puffer (50x):

Tris	242g
Essigsäure	57,1ml
0,5M EDTA (pH 8,0)	100ml
ad 1l dH <sub>2</sub> O	
  - TBE-Puffer (5x):

Tris	54g
Borsäure	27,5g
0,5M EDTA (pH 8,0)	20ml
ad 1l dH <sub>2</sub> O	
  - Blaupuffer:

5xTBE	10ml
Ficoll 20%	20ml
Bromphenolblau 0,1%	5ml
dH <sub>2</sub> O	15ml
  - SSCP-Puffer:

Formamid	600µl
Blaupuffer	100µl
  - 10% PAA-Lösung:

N`N`-Methylenbisacrylamid 2x	1g
Acrylamid	49g
TEMED	500µl
ad 500ml 0,5xTBE	
  - APS (10%):

4g Ammoniumpersulfat ad 40 ml dH<sub>2</sub>O
  - Salpetersäure 1% (7,7ml Salpetersäure ad 500ml dH<sub>2</sub>O)
  - Silbernitrat 0,05% (2g ad 1l dH<sub>2</sub>O)

### 8.2.3 Geräteverzeichnis

Thermocycler (MWG Biotech, Primus 96 plus)  
Agarosegelelektrophoresekammer (Owl Separation Systems)  
Polyacrylamidgelelektrophoresekammer (Biometra, Multigel-long)  
Spannungsquelle (Consort, Electrophoresis Power Supply)  
UV-Lampe (UVP, TFM-20 High Performance UV Transilluminator)  
Polaroidkamera (97700-01; Kodak)  
Autoklav (Systec)  
Brutschrank (Heraeus Function Line)  
Geltrockner (Biometra Maxidry)  
Vakuumpumpe (Biometra Membranpumpen System II)

Danksagung:

Die vorliegende Dissertation habe ich an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg angefertigt. Mein Dank gilt allen, die durch freundliche Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. Beckmann dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie anzufertigen
- Herrn Prof. Dr. Riederer für die Überlassung des aktuellen und interessanten Themas
- Herrn PD Dr. Deckert für die Sammlung und freundliche Überlassung des Probandenkollektives
- Herrn PD Dr. Stöber für die zur Verfügung Stellung des Kontrollkollektives
- Herrn Dr. Sand für die unmittelbare Betreuung im Labor und die kritische Korrektur der Rohfassung
- dem gesamten Laborteam für die Unterstützung bei unlösbar erscheinenden Problemen in der täglichen Laborarbeit.

## **Lebenslauf**

Persönliche Daten: Kirsten Schlurmann

Geb. 24.09.1976 in München

Familienstand: ledig

Schul- und Hochschulausbildung:

1983-1987 Grundschule in München

1987-1996 Gymnasium Pullach, neusprachlicher Zweig

1996-1998 Studium der Humanmedizin (Vorklinik) in Regensburg

1998: Ärztliche Vorprüfung

1998-2002 Studium der Humanmedizin (Klinik) in Würzburg

1999: erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2001: zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

2001-2002: Praktisches Jahr; Wahlfach Pädiatrie

2002: dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit:

Seit 5/2003: Ärztin im Praktikum der Medizinischen Klinik I in Landshut