

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

**Studien zur Expression von  
*Megalencephalic leukoencephalopathy  
with subcortical cysts 1 (MLC1/Mlc1)*  
in humanen und murinen Geweben**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Simon Kreuzfeldt**  
aus Hannover

Würzburg, März 2013



Referent: Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch

Koreferent: Prof. Dr. Esther Asan

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2013

Der Promovend ist Arzt.

## **MEINEN FAMILIEN**



---

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1. Die Schizophrenie.....	1
1.1.1. Geschichte der Erkrankung.....	1
1.1.2. Aktuelle Klassifikationssysteme.....	3
1.1.3. Hypothesen zu den Ursachen der Schizophrenie .....	5
1.1.4. Mutationen des Gens <i>Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1</i> als mögliche Ursache der peridischen Katatonie nach Leonhard .....	6
<b>1.2. Die megalenzephal Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten .....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Erstbeschreibung, Symptomatik und Pathogenese.....	9
1.2.2. <i>MLC1</i> -Mutationen als Ursache der megalenzephalen Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten.....	10
<b>1.3. Das <i>MLC1</i>-Gen .....</b>	<b>12</b>
1.3.1. Struktur des Genlokus und biochemische Eigenschaften des Proteins.....	12
1.3.2. Expressionsstudien.....	13
<b>2. FRAGESTELLUNG, ZIELE UND EXPERIMENTELLE STRATEGIE.....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1. Materialien .....</b>	<b>18</b>
3.1.1. Gewebeproben .....	18
3.1.2. cDNA-Plasmide.....	18
3.1.3. Molekularbiologische Kits und vorgefertigte Reagenzien .....	19
3.1.4. Zellkultur.....	19
3.1.5. DNA/RNA-Analytik .....	19
3.1.6. Proteinanalytik .....	22
3.1.7. Laborgeräte.....	23
<b>3.2. Methoden.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.1. Allgemeine Methoden: Nukleinsäuren .....</b>	<b>25</b>
3.2.1.1. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration in wässrigen Lösungen .	25
3.2.1.2. DNA-Gelelektrophorese mit Agarose-Gelen .....	25
3.2.1.3. DNA-Extraktion aus PCR-Ansätzen .....	26
3.2.1.4. DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen.....	27
3.2.1.5. DNA/RNA-Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Phasentrennung ...	27
3.2.1.6. DNA/RNA-Konzentrierung durch Isopropanol/Ethanol-Präzipitation .....	28
3.2.1.7. DNA-Sequenzierung nach Sanger .....	29

---

<b>3.2.2. Allgemeine Methoden: Bakterienkultur .....</b>	<b>30</b>
3.2.2.1. Herstellung chemokompetenter ER2566-Zellen.....	30
3.2.2.2. Transformation chemokompetenter ER2566-Zellen mit Plasmiden.....	30
3.2.2.3. Aufreinigung von Plasmid-DNA (Miniprep).....	31
3.2.2.4. Aufreinigung von Plasmid-DNA (Maxiprep) .....	32
<b>3.2.3. In Situ-Hybridisierung humaner und muriner Gehirnschnitte .....</b>	<b>33</b>
<b>3.2.4. Gewinnung von cDNA aus humanen Geweben .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.5. Bestimmung der gewebespezifischen MLC1-Expression mittels qRT-PCR .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.6. Herstellung eines MLC1-Vakzinierungsproteins .....</b>	<b>48</b>
3.2.6.1. Herstellung des Vakzinierungsplasmids .....	48
3.2.6.2. Transformation des E.coli-Strain ER2566 mit dem ligierten Vakzinierungsvektor und Nachweis der rekombinanten DNA-Sequenz.....	52
3.2.6.3. Expression des Fusionsproteins .....	53
3.2.6.4. Freisetzung der Zellproteine .....	54
3.2.6.5. Isolierung des Vakzinierungsproteins durch Chitinsäulenchromatographie und DTT-induzierte Selbst-Spleißung der Intein-Domäne .....	55
3.2.6.6. Nachweis des Vakzinierungsproteins.....	56
<b>3.2.7. Software .....</b>	<b>59</b>
<b>4. ERGEBNISSE.....</b>	<b>60</b>
<b>4.1. Vergleich der zerebralen MLC1/Mlc1-Expression bei Mensch und Maus mittels In Situ-Hybridisierung .....</b>	<b>60</b>
4.1.1. Herstellung der cRNA-Sonden zur In Situ-Hybridisierung .....	60
4.1.2. In Situ-Hybridisierung humaner und muriner Gehirnschnitte .....	60
<b>4.2. Bestimmung der relativen MLC1-Expression in verschiedenen humanen Geweben durch qRT-PCR.....</b>	<b>64</b>
4.2.1. Erhebung der Primärdaten .....	64
4.2.2. Ergebnisse der qRT-PCR der Housekeeping-Gene .....	66
4.2.3. Ergebnisse der qRT-PCR von MLC1 .....	68
<b>4.3. Herstellung eines MLC1-Vakzinierungsproteins zur Gewinnung eines Anti-MLC1-Antiserums .....</b>	<b>70</b>
4.3.1. Design des MLC1-Vakzinierungsproteins.....	70
4.3.2. Klonierung des MLC1-Vakzinierungsvektors und Transformation von ER2566-Zellen.....	72
4.3.3. Expression des MLC1-Vakzinierungsproteins, Aufreinigung und Nachweistests.....	75

---

<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>82</b>
5.1. Differentielle <i>MLC1/Mlc1</i> -Expression bei Mensch und Maus .....	82
5.2. Funktionelle Bedeutung von <i>MLC1</i> .....	85
5.3. Ausblick.....	93
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>94</b>
<b>7. ANHANG .....</b>	<b>96</b>
7.1. Abkürzungsverzeichnis .....	96
7.2. Abbildungsverzeichnis.....	98
7.3. Tabellenverzeichnis.....	100
7.4. Literatur- und Quellenverzeichnis .....	101

**Danksagung**

**Lebenslauf**



# 1. Einleitung

## 1.1. Die Schizophrenie

### 1.1.1. **Geschichte der Erkrankung**

Mit einer Lebenszeitprävalenz von ca. 1% gehört die Schizophrenie in der modernen Psychiatrie zu den wichtigsten und behandlungsintensivsten, gleichzeitig bezüglich ihrer Ätiologie und Pathogenese jedoch immer noch rätselhaftesten Erkrankungen des menschlichen Geistes (Knapp et al. 2004). Obwohl angenommen werden kann, dass sie kein Phänomen der Neuzeit ist, finden sich erstaunlicherweise in historischen medizinischen Quellen aus Antike und Mittelalter verhältnismäßig wenige klinische Fallbeschreibungen (Kyziridis 2005). Die Interpretationen waren sehr unterschiedlich: Als Grundlage wurden einerseits oft organische Erkrankungen (z.B. in Ägypten insbesondere des Herzens, der Gefäße und des Uterus) oder ein Ungleichgewicht körperlicher Kräfte und Elemente (z.B. im Hinduismus in Indien) vermutet, andererseits sah man in vielen Kulturen (z.B. in China, Griechenland, Rom) das „abnormale“ Verhalten der Betroffenen als Zeichen einer metaphysischen Beeinflussung, wobei die Betroffenen sowohl als „Besessene“ (vom Bösen) oder „Gesegnete“ (z.B. mit prophetischen Gaben) betrachtet wurden.

Als eigenständige Krankheitsentität wurde die Schizophrenie in der Medizin erst im 19. Jahrhundert erkannt und mit wachsendem Interesse untersucht<sup>1</sup>. Ausgehend vom anfänglich von Heinrich Neumann (1814-1884) und Wilhelm Griesinger (1817-1868) begründeten Konzept der Einheitspsychose differenzierte Emil Kraepelin (1856-1926) ab 1893 die „Dementia praecox“ vom „manisch depressiven Irresein“, wobei sich erstere insbesondere durch den langfristig irreversiblen Verlust kognitiver Fähigkeiten auszeichnete (Residuenbildung), während bei letzterer in der Regel nach den Akutphasen der Erkrankung eine vollständige Remission erfolgte (Neumann 1859; Kraepelin 1893). Der Begriff der „Schizophrenie“<sup>2</sup> wurde 1911 von Eugen Bleuler (1857-1939) eingeführt, der mit dieser Bezeichnung in Anlehnung an frühere Arbeiten des deutschen Psychologen Johann Friedrich Herbart (1776-1841) – und im Gegensatz zur landläufigen Fehlübersetzung als „gespaltene Persönlichkeit“ – den im Krankheitsverlauf selektiven („abgetrennten“) Verlust bestimmter kognitiver Funktionen bei gleichzeitigem Erhalt anderer Funktionen (z.B. des Gedächtnisses) betonen wollte, und zudem durch Vermeidung des Begriffes „Demenz“ eine Abgrenzung von den übrigen (alterungsbedingten) dementiellen Syndromen vornahm (Herbart 1816; Bleuler 1911).

In die Diagnostik führte Bleuler die bis heute gebräuchliche Unterteilung in die aus den „vier großen As“ (Affekt- und Assoziationsstörungen, Ambivalenz und Autismus) gebildeten Grundsymptome ein, die durch akzessorische Symptome (z.B. Halluzinationen, Wahnideen und

---

<sup>1</sup> Vereinzelt Beschreibungen von vermutlich retrospektiv als schizophren zu diagnostizierenden Patienten finden sich bereits im 17. und 18. Jahrhundert (Heinrichs 2003).

<sup>2</sup> Etymologisch von altgriechisch „σχιζειν“=„abspalten“ und „φρήν“=„Seele“

Katatonien) ergänzt würden<sup>3</sup>. Hierauf aufbauend führte Kurt Schneider (1887-1967) der Versuch einer verfeinerten Formulierung diagnostischer Kriterien zur Diagnosestellung der Schizophrenie zu dem von ihm entworfenen Konzept der Erst- und Zweitrangsymptome (Schneider 2007, siehe Tabelle 1-1).

**Tabelle 1-1: Erst- und Zweitrangsymptome der Schizophrenie nach K. Schneider**

Erstrangsymptome	Zweitrangsymptome
Stimmenhören <ul style="list-style-type: none"> <li>• dialogische Stimmen</li> <li>• kommentierende Stimmen</li> </ul>	Halluzinationen <ul style="list-style-type: none"> <li>• andere akustische Halluzinationen</li> <li>• optische Halluzinationen</li> <li>• olfaktorische Halluzinationen</li> </ul>
Wahrnehmungen	Wahneinfälle, Wahnideen
Ich-Störungen <ul style="list-style-type: none"> <li>• leibliche Beeinflussungserlebnisse</li> <li>• Gedankeneingebung</li> <li>• Gedankenentzug</li> <li>• Gedankenausbreitung</li> <li>• Gefühl des „Gemachten“</li> </ul>	Affektive Störungen <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ratlosigkeit</li> <li>• Depressive Verstimmung</li> <li>• Euphorie</li> <li>• Affektverflachung</li> <li>• Parathymie</li> </ul>

Eine weitere, heute oft verwendete Klassifikation wurde u.a. von Nancy Andreasen entwickelt und unterscheidet zwischen Positiv- und Negativsymptomatik einer Schizophrenie (Andreasen 1987; siehe Tabelle 1-2). Diese Unterteilung besitzt große klinische Relevanz, da Positivsymptome in erster Linie in den Krankheitsschüben zu beobachten sind, oft remittieren und vergleichsweise gut auf medikamentöse Therapien ansprechen, während negative Symptome in der Regel mit dem Verlauf der Erkrankung zunehmen, auch zwischen den Schüben vorzufinden sind und meist nur unzureichend auf eine Medikation ansprechen.

**Tabelle 1-2: Positiv- und Negativsymptome der Schizophrenie nach N. Andreasen**

Positivsymptome	Negativsymptome
Halluzinationen	Alogie (=Sprachverarmung)
Wahn	Affektverflachung
Formale Denkstörungen	Apathie
Ich-Störungen	Anhedonie
Bizarres Verhalten	Aufmerksamkeitsstörungen
	Asozialität

<sup>3</sup> Interessanterweise entspricht bereits die Bleulersche Aufteilung in Grundsymptome und akzessorischen Symptome in Teilen der späteren Gliederung in Negativ- und Positivsymptomatik, wobei die verstärkte Ausprägung der Grundsymptome wie der Negativsymptomatik mit einer deutlichen Prognoseverschlechterung einhergeht.

### 1.1.2. Aktuelle Klassifikationssysteme

Die Vielgestaltigkeit der Symptomatik schizophrener Patienten führte bereits Bleuler zu der Formulierung der „Gruppe der Schizophrenien“, und die Frage, ob der symptomatischen Heterogenität auch eine ätiologische Heterogenität zugrunde liegt, wird bis heute in der Wissenschaft intensiv diskutiert. Die von der *World Health Organization* (WHO) herausgegebene *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems* in der 10. Ausgabe (ICD-10) unterscheidet neben den klassischen Formen der katatonen, paranoiden und hebephrenen Schizophrenie (F20.0-F20.2) weitere Subtypen wie die undifferenzierte Schizophrenie (F20.3) oder die Schizophrenia simplex (F20.5; siehe Tabelle 1-3). Dabei wird eine operationalisierte Diagnostik in Anlehnung an K. Schneider verwendet, bei der das Auftreten einer bestimmten Symptomkonstellation (mindestens ein Symptom der 1.-4. Symptomgruppe<sup>4</sup> oder mindestens zwei Symptome der 5.-8. Symptomgruppe) über einen Mindestzeitraum von einem Monat unter Berücksichtigung bestimmter Ausschlusskriterien (z.B. organische Hirnerkrankung, Drogenkonsum etc.) eine Diagnosestellung erlaubt. Die von der *American Psychiatric Association* herausgegebene *multiaxiale Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* in der 4. Auflage (DSM-IV), welches alternativ und ergänzend zur ICD-10 verwendet wird, verzeichnet die schizophrenen Störungen auf der 1. Achse, besitzt eine ähnliche Gliederungstiefe und ebenfalls einen operationalisierten Diagnoseansatz, der sich in wenigen Punkten von der ICD-10 unterscheidet<sup>5</sup>.

Parallel zu diesen vergleichsweise groben diagnostischen Klassifikationssystemen wurde in der Tradition von Carl Wernicke (1848-1905) und Karl Kleist (1879-1960) von Karl Leonhardt (1904-1988) anhand nosologischer Kriterien ein weit differenzierteres Diagnosesystem der endogenen Psychosen entworfen, das neben der Schizophrenie im engeren Sinne (F20) u.a. auch schizoaffektive Störungen (F25) und affektive Psychosen (F30-F34) umfasst. Sein wesentlicher Vorteil besteht darin, durch eine verfeinerte diagnostische Zuordnung der Patienten eine unter ätiologischen Gesichtspunkten bessere Einordnung zu erreichen, was einerseits klinisch vergleichsweise verlässliche Prognosen zum Krankheitsverlauf ermöglicht, andererseits im Bereich der Forschung Wege zu einer genaueren Erforschung der Ätiologie in homogenen Patientengruppen eröffnet (Beckmann und Leonhardt 2003). Leonhardt gliederte die endogenen Psychosen anhand des Verlaufes in fünf großen Gruppen: die monopolar phasischen Psychosen, die manisch-depressive Erkrankung (MDE), die zykliden Psychosen, die unsystematischen und die systematischen Schizophrenien. Hierbei entsprechen den Schizophrenien nach ICD-10 (F20) und DSM-IV (295) weitgehend die unsystematischen und systematischen Schizophrenien sowie – in Teilen – die zykliden Psychosen. Die Langzeitprognose dieser drei Gruppen unterscheidet sich jedoch deutlich und reicht von vollständigen Remissionen (zykloide Psychosen) über mittelstarke Residuenbildung (unsystematische Schizophrenien) bis hin zu schwersten Residuen

---

<sup>4</sup> Die Symptomgruppen 1-4 entsprechen weitgehend den Erstrangsymptomen nach K. Schneider.

<sup>5</sup> Beispielsweise bezieht das DSM-IV soziale oder berufliche Probleme in die Diagnosekriterien mit ein und fordert eine Mindestkrankungsdauer von 6 Monaten vor der erstmaligen Diagnose einer Schizophrenie.

(systematische Schizophrenien). Interessanterweise ist die Erbllichkeit der systematischen Schizophrenien deutlich geringer als diejenige der unsystematischen Schizophrenien, obwohl sie sich hinsichtlich ihrer Symptomatik wesentlich homogener und im Verlauf schwerer darstellen. Leonhardt führte dies auf einen starken psychosozialen Einfluss (mangelnde Kommunikation in der frühen Kindheit) in der Pathogenese der Erkrankung zurück, dessen negative Folgen sich erst im höheren Lebensalter zeigten, während im Falle der unsystematischen Schizophrenien der genetische Einfluss stärker sei (Leonhardt 1986).

**Tabelle 1-3: Vergleichende Darstellung aktueller Klassifikationssysteme der Schizophrenie**

	DSM-IV	ICD-10	Leonhard-Klassifikation		
			Zykloide Psychosen	Unsystematische Schizophrenien	Systematische Schizophrenien
Denken	295.30 paranoider Typus	F20.0 paranoide Schizophrenie	Erregt-gehemmte Verwirrtheitspsychose	Kataphasie	Paraphrenie <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypochondrische P.</li> <li>• Phonemische P.</li> <li>• Inkohärente P.</li> <li>• Phantastische P.</li> <li>• Konfabulatorische P.</li> <li>• Expansive P.</li> </ul>
Affekt	295.10 desorganisierter Typus	F20.1 Hebephrenie	Angst-Glücks-Psychose	Affektvolle Paraphrenie	Hebephrenien <ul style="list-style-type: none"> <li>• Läppische H.</li> <li>• Verschrobene H.</li> <li>• Flache H.</li> <li>• Autistische H.</li> </ul>
Motilität	295.20 katatoner Typus	F20.2 katatone Schizophrenie	Hyperkinetisch-akinetische Motilitätspsychose	Periodische Katatonie	Katatonien <ul style="list-style-type: none"> <li>• Parakinetische K.</li> <li>• Manierierte K.</li> <li>• Proskinetische K.</li> <li>• Negativistische K.</li> <li>• Sprechbereite K.</li> <li>• Sprachträge K.</li> </ul>
	295.90 undifferenzierter Typus	F20.3 undifferenzierte Schizophrenie F20.4 Postschizophrene Depression			
	295.60 residualer Typus	F20.5 Schizophrenes Residuum F20.6 Schizophrenia simplex			

FS = Führende Symptomatik. Die zeilenweise Darstellung von Diagnosen der verschiedenen Klassifikationssysteme dient der Darstellung von *Ähnlichkeiten* zwischen diesen und bedeutet keine vollständige Übereinstimmung. Insbesondere bei den zykliden Psychosen nach Leonhard kommt es auch zu Überlappungen mit schizoaffektiven Störungen (F25). Auf die Darstellung der kombiniert-systematischen und frühkindlichen Schizophrenien nach Leonhard wurde verzichtet.

### 1.1.3. Hypothesen zu den Ursachen der Schizophrenie

Seit der Entdeckung der Schizophrenie als medizinisches Krankheitsbild wurde intensiv nach ihren Ursachen geforscht. Nachdem noch im frühen 19. Jahrhundert zur Zeit der sog. „romantischen Psychiatrie“ metaphysische und religiöse Erklärungsmodelle vorgeherrscht hatten, führten Griesinger, Kraepelin, Wernicke und Bleuler die Schizophrenie im Wesentlichen auf eine Erkrankung des menschlichen Gehirns zurück (Hinterhuber 2005; Griesinger 1861; Kraepelin 1883; Wernicke 1894/1900; Bleuler 1911). Im 20. Jahrhundert entwickelten sich unter dem Einfluss Sigmund Freuds (1856-1939, Freud 1894) mehrere psychoanalytische und psychosoziale Erklärungsansätze, die beispielsweise zum (mittlerweile verlassenen) Konzept der „schizophrenogenen Mutter“ (Fromm-Reichmann 1948), der „Double-Bind-Theorie“ (welche ambivalente Kommunikationsstile der Eltern gegenüber dem Kind als belastende Risikofaktoren betrachtet; Bateson et al. 1956) oder der „Expressed-Emotion-Theorie“ (die von einem negativen Einfluss eines kritikbezogenen, feindseligen und generell sehr emotional geprägten innerfamiliärer Kommunikationsstils auf den Krankheitsverlauf ausgeht) führten (Brown et al. 1972, Hooley 2007). Weitere Forschungsansätze konnten ferner einen Einfluss von Drogenmissbrauch (z.B. THC: Semple et al. 2005), Hormonen (z.B. Östrogen: Anita Riecher-Rössler 2002), prä- und perinatale Komplikationen (z.B. Infektionen: Brown 2006a) oder der Lebensumgebung (Stadt vs. Land: van Os 2004) auf Häufigkeit und Verlauf der schizophrenen Erkrankungen nachweisen.

Das aktuell am stärksten verbreitete Paradigma zur Ätiologie der Schizophrenie ist das sogenannte „Diathese-Stress-Modell“ (Zubin und Spring 1977, Corcoran et al. 2003). Demnach beruht die Erkrankung auf zwei Komponenten: einerseits einer in erster Linie genetisch bedingten *Neigung* (Diathese) bzw. Vulnerabilität des Patienten, andererseits dem Einwirken bestimmter *Stressoren*, die schließlich zum Ausbruch der Schizophrenie führen. Hinweise auf einen genetischen Hintergrund der Erkrankung finden sich in der Analyse von Stammbäumen betroffener Familien, Zwillings- und Adoptionsstudien, wobei die beobachteten Konkordanzraten beispielsweise eineiiger Zwillinge je nach Studie zum Teil erheblich (zwischen 11% und 48%) variieren (Koskenvuo et al. 1984 vs. Riley und Kendler 2006).<sup>6</sup> Die Stressoren können vielfältiger Natur sein und reichen von psychosozialen Belastungen im Erwachsenenalter über Substanzmissbrauch, problematische familiäre Interaktionsstile und (insbesondere frühkindliche) Traumata bis hin zu prä- und perinatalen Komplikationen und Infektionen, wobei die Grenze zwischen Diathese und (die Diathese nachhaltig beeinflussenden) Stressoren v.a. in der kindlichen Entwicklungsphase nicht immer scharf bleibt. Als äußerst bedeutsam für den neurobiologischen pathogenetischen Mechanismus der Erkrankung erscheint dabei neben den zu beobachtenden Veränderungen der Neurotransmitter-Systeme (insb. Dopamin und Glutamat; Lang et al.

---

<sup>6</sup> Möglicherweise geht diese Divergenz der gemessenen Erblichkeit in verschiedenen Studien auf die Heterogenität der jeweiligen Studiengruppen bezüglich der schizophrenen Subtypen zurück, wie bereits Leonhard bemerkte. Unter der Annahme unterschiedlicher pathogenetischer Prozesse bei den verschiedenen Subtypen der Schizophrenie sollten sich auch ihre Hereditäten unterscheiden (→ 1.1.4).

2007) die Rolle der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (Corcoran et al. 2003; Walker et al. 2008).

Die in den vergangenen zwei Jahrzehnten intensiv durchgeführte Suche nach der genetischen Grundlage einer schizophrene Diathese hat zur Entdeckung zahlreicher Kandidatengene geführt, darunter die Gene NRG1 und DTNBP1. Es muss jedoch konstatiert werden, dass trotz der großen Zahl der gefundenen, potenziell eine schizophrene Diathese befördernden Gene aufgrund der meist geringen Korrelationsraten bisher nur ein sehr geringer Anteil des nachgewiesenen genetischen Einflusses erklärt werden kann (Manolio et al. 2009).

#### **1.1.4. Mutationen des Gens *Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1* als mögliche Ursache der periodischen Katatonie nach Leonhard**

Die bereits erwähnte stark ätiologische Ausrichtung des Leonhard'schen Klassifikationssystems ermöglicht es, innerhalb eines klinisch homogenen Patientenkollektivs nach pathogenetischen Prozessen zu suchen und diese zu erforschen. Die Gruppe der unsystematischen Schizophrenien stellt hierbei ein besonders geeignetes Forschungsgebiet dar, da sie eine relativ hohe Heredität und somit eine deutliche biologische Komponente aufweist (Beckmann und Leonhard 2003). So konnten Stöber et al. in einer Untersuchung an 139 Betroffenen und 543 Angehörigen nachweisen, dass das Risiko einer Erkrankung unter Verwandten 1. Grades bei der periodische Katatonie (PK) wesentlich höher lag (26,9%) als bei der systematischen Katatonie (4,6%, Stöber et al. 1995). Das dabei relativ erhöhte Risiko von Kindern erkrankter Eltern im Vergleich zu Kindern mit erkrankten Geschwistern sowie das zu beobachtende Phänomen der Antizipation lies die Autoren vermuten, dass den Beobachtungen als Ursache möglicherweise ein (Tri-nukleotid-)Repeat-Element zugrunde liegt. Über eine genomweite Kopplungsanalyse in 137 Patienten und Angehörigen aus 12 deutschen Stammbaumlinien konnten sie eine Assoziation der Erkrankung mit dem Genlokus 15q15 sowie – in einer größeren Familie – mit dem Lokus 22q13 feststellen (Stöber et al. 2000). Während für den ersten Ort in Folgeuntersuchungen Mutationen des Kaliumchloridkanals 3 (*potassium chloride co-transporter 3 gene = SLC12A6, KCC3*) als vermutliche Ursache ausgemacht werden konnten (Meyer et al. 2005), wurde an letzterem Ort anhand weiterer Kopplungsanalysen und vergleichender Sequenzierung bei Patienten und Kontrollpersonen eine C1121A-Mutation des Gens *Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1 (MLC1, ursprünglich als KIAA0027 bzw. WKL1 bezeichnet)* identifiziert, die mit der Erkrankung kosegregierte und zu einem Leu309Met-Aminosäureaustausch in einer putativen Transmembranregion im 11. Exon des Zielproteins führte (Meyer et al. 2001). Bis zu diesem Zeitpunkt waren Mutationen des Gens *MLC1* nur mit dem Auftreten einer anderen neuropsychiatrischen Erkrankung, der megalenzephalen Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC), in Verbindung gebracht worden (siehe 1.2.2).

Die aus diesen Ergebnissen entstandene Vermutung, dass Mutationen im Gen *MLC1* in die Pathogenese der periodischen Katatonie involviert sind, und somit MLC und PK allelische Erkrankungen eines Gens darstellen, lies sich jedoch in ersten Folgeuntersuchungen nicht

bestätigen: Devaney und Mitarbeiter fanden in einer Gruppe von 28 US-amerikanischen Patienten<sup>7</sup> und 15 deutschen PK-Patienten bei 80 amerikanischen Kontrollpersonen keine Schizophrenie-gekoppelte Missense- oder Nonsense-Mutationen im *MLC1*-Gen (Devaney et al. 2002). Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen McQuillin und Mitarbeiter in ihrer Untersuchung von 174 britischen Schizophrenie-Patienten (darunter 22 PK-Patienten) und 178 Kontrollpersonen, bei der sie zwar im 11. Exon mehrere Mutationen identifizieren konnten, die jedoch nicht mit der Erkrankung korreliert waren (McQuillin et al. 2002). Rubie und Mitarbeiter untersuchten 140 deutsche PK-Patienten, 5 italienische und deutsche MLC-Patienten sowie 270 deutschen Kontrollpersonen und entdeckten zahlreiche *short nucleotide polymorphisms* (SNPs) im *MLC1*-Gen mit teilweise eindeutigen Beziehungen zur MLC, jedoch konnten sie ebenfalls keine statistisch signifikanten Kopplungen dieser SNPs zur PK belegen (Rubie et al. 2003). Zudem konnten sie zeigen, dass die L309M-Variante in einem Stammbaum nicht mit der PK kosegregierte, sondern sogar bei einem nicht-erkrankten Elternteil auftrat. Sie argumentierten daher, dass *MLC1*-Mutationen wohl an der Pathogenese der MLC, nicht jedoch der PK beteiligt sind und man daher nicht von allelischen Erkrankungen ausgehen dürfe. In einer Untersuchung an 117 Schizophrenie-Patienten und 176 Kontrollpersonen aus Israel konnten Kaganovich et al. keine Leu309Met-Mutationen finden (Kaganovich et al. 2004). Und auch eine Schizophrenie-SNP-Screening-Studie an 274 Patient-Eltern-Gruppen jüdischer Herkunft von Fallin und Mitarbeitern über 64 Kandidatengene erbrachte zwar den Nachweis von 7 SNPs im *MLC1*-Gen, jedoch keine Kopplungen an eine schizophrene Erkrankung (Fallin et al. 2005).

Demgegenüber konnten Verma et al. in einer Analyse der Exon-Intron-*MLC1*-Sequenz bei 216 MDE-Patienten, 193 Schizophrenie-Patienten und 116 Kontrollpersonen aus Südindien erneut Hinweise für eine Bedeutung von *MLC1*-Mutationen bei schizophrenen (und auch affektiven) Erkrankungen finden (Verma et al. 2005). Unter insgesamt 33 Polymorphismen ließen sich drei SNPs (rs2072874, rs2076137 und rs2235349) im sechsten und siebten Intron identifizieren, die eine signifikante Korrelation zur Schizophrenie aufwiesen. Zudem fanden sich bei 13 SNPs (wovon 12 als Block auftraten) signifikante Korrelationen zur MDE. Zwei seltene Missense-Mutationen traten ausschließlich, eine weitere gehäuft bei der MDE auf. Die Autoren schlussfolgern daher, dass sowohl seltene wie auch häufige Polymorphismen des *MLC1*-Gens in der Pathogenese der bipolar-affektiven Erkrankung und der Schizophrenie eine Rolle spielen. Hierauf aufbauend untersuchten Selch et al. in einer verfeinerten Fragestellung 212 schizophrene Patienten (darunter 56 mit PK), 106 MDE-Patienten und 284 Kontrollpersonen aus Deutschland auf Kopplungen mit den intronischen SNPs rs2235349 und rs2076137 sowie den zwei in der transkriptionellen Kontrollregion (TCR) gelegenen SNPs rs713809 und rs137936 (Selch et al. 2007). Auch hier zeigte sich eine signifikante Assoziation der intronischen SNPs und eine fast signifikante Beziehung der TCR-SNPs mit der Erkrankung – allerdings ausschließlich in der Gruppe der PK-Patienten.

---

<sup>7</sup> Die Patienten wiesen entweder eine katatone Symptomatik auf oder zeigten in ihren Stammbäumen eine gehäufte Co-Segregation der Allele in der 22q13-Region mit der schizophrenen Erkrankung.

Aufgrund der zumindest in der oberflächlichen Betrachtung widersprüchlichen Ergebnisse der Studien lässt sich zusammenfassend aktuell keine abschließende Bewertung der Relevanz des *MLC1*-Gens für die Pathogenese der Schizophrenie und MDE vornehmen. Das Vorkommen der Leu309Met-Variante bei PK-Patienten in zumindest zwei Familien bei weitgehender Abwesenheit dieser Mutation in der übrigen Population sowie die Häufung bestimmter Intron- und TCR-SNPs bei PK-Patienten lässt eine Rolle von *MLC1* in der Pathogenese zumindest in einem Teil der PK-Patienten als durchaus möglich erscheinen, und wird auch durch das Fehlen dieser Mutation in zahlreichen anderen PK-Patienten nicht widerlegt (s. auch Ewald und Lundorf 2002). Zudem ist denkbar, dass nicht die beobachteten SNPs selbst in die Pathogenese involviert sind, sondern ein oder mehrere andere SNPs in nahegelegenen Genen oder genetischen Kontrollbereichen, welche ihrerseits mit den identifizierten SNPs statistisch gekoppelt sind, die wahre Ursache der Erkrankung oder der erhöhten Krankheitsdisposition darstellen.

## 1.2. Die megalenzephalale Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten

### 1.2.1. Erstbeschreibung, Symptomatik und Pathogenese

Die megalenzephalale Leukenzephalopathie (MLC, MIM 604004) ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Erkrankung des zentralen Nervensystems mit auffälligen Veränderungen der weißen Substanz, die beginnend im frühen Kindesalter zu einer Makrozephalie, verschiedenen motorischen Symptomen (Spastiken, Ataxien, Epilepsie u.a.) und einer fortschreitenden motorischen Entwicklungsverzögerung führt (siehe Tabelle 1-4). Histopathologisch zeigen sich in der weißen Substanz des Großhirns Vakuolen in den äußeren Bereichen der Myelinscheiden, wobei offen ist, ob diese im Rahmen einer primären Bildungsstörung während der Ausbildung der Myelinscheide oder als sekundäre Aufspaltung der Lamella myelini intermedia entstehen (van der Knaap et al. 1996). Im Gegensatz zu anderen Leukodystrophien nimmt die MLC einen vergleichsweise milden und langsamen, oft jahrzehntelangen Verlauf. Kognitive Funktionen sind meist gering und erst in einem späten Krankheitsstadium betroffen. Insgesamt ergibt sich bei vielen Patienten eine erstaunliche Diskrepanz zwischen ausgeprägtem radiologischen und histopathologischen Befunden und einer vergleichsweise schwachen klinischen Symptomatik. Der Erkrankungsverlauf innerhalb des Patientenkollektivs ist jedoch uneinheitlich und reicht von Fällen mit geringen motorischen Einschränkungen bei vollen kognitiven Funktionen selbst in fortgeschrittenen Alter bis hin zu bereits im zweiten Lebensjahr auftretenden schweren motorischen und kognitiven Entwicklungsdefiziten und neurologischen Störungen (Topcu et al. 1998). Eine ursächliche Therapie ist bis heute nicht möglich – therapeutische Maßnahmen beschränken sich in der Regel auf die Behandlung des Anfallsleidens, Physiotherapie und ggf. schulische und berufliche Fördermaßnahmen (van der Knaap MS und Scheper GC. 2008).

**Tabelle 1-4: Klinische Befunde der megalenzephalalen Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC)**

Klinische Diagnostik	Apparative Diagnostik
<p><b>Frühstadium</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Makrozephalie</li> <li>• Geringgradige Entwicklungsverzögerung</li> <li>• Krampfanfälle</li> <li>• Verfall motorischer Funktionen:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Spastiken</li> <li>○ Zerebelläre Ataxie</li> </ul> </li> </ul> <p><b>Spätstadium</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evtl. extrapyramidale Symptome (Dystonie, Athetose) und Tics</li> <li>• Verlust der Fähigkeit zum selbständigen Gehen (→ Rollstuhl)</li> <li>• Progrediente Dysarthrie, evtl. Dysphagie</li> <li>• Kognitive Defizite, verringerte schulische Leistung</li> <li>• Evtl. Verhaltensauffälligkeiten</li> </ul>	<p><b>Frühstadium</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Spongiforme Aufhellungen und Schwellungen der weißen Substanz (MR, CT), insbesondere anterior-temporal (vgl. Abbildung rechts). Cerebellum und zentrale Hirnbereiche sind vergleichsweise wenig betroffen.</li> <li>• Subkortikale Zysten (MR, CT), insbesondere anterior-temporal und fronto-parietal (vgl. Abbildung rechts, rote Pfeile)</li> <li>• Abnormales EEG</li> </ul> <p><b>Spätstadium</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evtl. Zunahme der Zystenbildung</li> <li>• Atrophie der weißen Substanz</li> <li>• Evtl. leichte Normalisierung der Signalintensitäten</li> </ul> 

Nach van der Knaap MS und Scheper GC. 2008.

Die erste klinischen Beschreibungen einer Patientengruppe mit dieser Erkrankung erfolgten durch van der Knaap und Singhal (van der Knaap et al. 1995; Singhal et al. 1996). Spätere Berichte aus verschiedenen ethnischen Gruppen folgten (Türkei: Topcu et al. 1998; Portugal, Italien, Tunesien, Australien: Goutières et al. 1996; Mejaski-Bosnjak und Besenski 1997; Mejaski-Bosnjak et al. 1997; Israel: Ben-Zeev et al. 2002; Deutschland, Frankreich, Großbritannien, Japan, Kroatien: Leegwater et al. 2001). In vielen Fällen war eine familiäre Häufung oder ein Gründer-effekt zu beobachten (Singhal et al. 1996; Topcu et al. 1998; Ben-Zeev et al. 2002; Tsujino et al. 2003; Singhal 2005; Gorospe et al. 2004).

### **1.2.2. *MLC1*-Mutationen als Ursache der megalenzephalalen Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten**

Anhand einer Genomanalyse betroffener Familien konnten Topçu und Mitarbeiter nachweisen, dass das verantwortliche Gen für die Erkrankung auf den langen Arm des Chromosoms 22 liegen muss (Topçu et al. 2000). Leegwater und Mitarbeiter grenzten mittels Kopplungsanalysen diesen Bereich weiter ein und zeigten schließlich, dass Mutationen des auf 22q<sub>tel</sub> liegenden Gens *KIAA0027* (welches in der Folge in *MLC1* umbenannt wurde) bei mehreren betroffenen Familien gehäuft auftraten, wobei die an MLC erkrankten Patienten homozygote oder gemischt heterozygote Mutationsträger waren (Leegwater et al. 2001). Daraus folgerten die Autoren, dass die megalenzephalale Leukenzephalopathie durch Mutationen des *MLC1*-Gens verursacht wird und einem autosomal rezessiven Erbgang unterliegt.

In mehreren weiteren Studien wurden sowohl MLC-Patienten wie Kontrollpersonen auf Mutationen innerhalb des *MLC1*-Genlocus untersucht (Ben-Zeev et al. 2002; Tsujino et al. 2003; Leegwater et al. 2002). Die hierbei beobachteten Veränderungen umfassten Missense- und Frameshift-Mutationen, Insertionen, Deletionen und Veränderungen an den Spleißstellen. Auffällig ist dabei zum einen, dass MLC-Patienten in der Regel homo- oder gemischt heterozygote Mutationsträger sind, zum anderen, dass die bei ihnen gefundenen Mutationen zumeist Bereiche innerhalb der prognostizierten Transmembrandomänen betreffen. Bei nicht erkrankten Kontrollpersonen tauchen Mutationen nur selten auf und liegen zudem meist außerhalb der Transmembrandomänen.

Bereits 2001 beschrieb Leegwater zwei Patienten mit dem klinischen Erscheinungsbild der MLC, bei denen keine *MLC1*-Mutationen gefunden werden konnten (Leegwater et al. 2001); 2003 berichteten Blattner und Mitarbeiter und Patrono und Mitarbeiter von vergleichbaren Fällen (Blattner et al. 2003; Patrono et al. 2003). Insgesamt lassen sich unter den MLC-Patienten bei bis zu 20% keine homozygoten oder gemischt heterozygoten *MLC1*-Mutationen nachweisen. Zwar konnte in Kopplungsanalysen bei einigen dieser Patienten dennoch eine Assoziation zum *MLC1*-Locus sowie eine verringerte *MLC1*-mRNA-Expression in lymphoiden Zelllinien gezeigt werden (was nahelegt, dass die gesuchten Mutationen in diesen Fällen außerhalb der kodierenden Regionen im 5'-UTR, 3-UTR oder in Intron-Sequenzen liegen), dennoch erbringt die

Existenz von Patienten ohne Assoziation zum *MLC1*-Locus deutliche Hinweise, dass zumindest ein weiterer Gen-Lokus in die Pathogenese der MLC involviert ist (Boor et al. 2006).

Eine Korrelation zwischen den über 50 bekannten MLC-verursachenden *MLC1*-Mutationen und der Ausprägungsstärke und dem klinischen Verlauf der Erkrankung lässt sich bisher nicht feststellen (Blattner et al. 2003). Diese Beobachtung wird einerseits darauf zurückgeführt, dass die verschiedenen Mutationen in vielen Fällen zu einem gleichermaßen funktionsunfähigen Protein führen (Leegwater et al. 2002; Gorospe et al. 2004; Teijido et al. 2004), andererseits verläuft selbst bei Patienten innerhalb einer Familie und somit mit vergleichbarem genetischen Hintergrund die Erkrankung sehr unterschiedlich schwer, was auf eine modulierende Wirkung von Umgebungseinflüssen und anderen genetischen Faktoren hinweist (Boor et al. 2006).

Das Wissen um die Bedeutung der Mutationen im *MLC1*-Gen bekommt zunehmend klinische Relevanz im Rahmen pränataler Diagnostik in Risikopopulationen wie den Agarwal in Indien (Shukla et al. 2008).

### 1.3. Das MLC1-Gen

#### 1.3.1. Struktur des Genlokus und biochemische Eigenschaften des Proteins

Bereits 1994 veröffentlichte Nomura die cDNA-Sequenz des humanen MLC1-Gens (damals als KIAA0027 benannt) aus der myeloiden Zelllinie KG-1 (Nomura et al. 1994). Leegwater konnte zeigen, dass der humane Genlocus auf dem Gegenstrang bei Chromosom 22q13.33 liegt und knapp 27 kb umfasst (siehe Abbildung 1-1; Leegwater et al. 2001). Die mRNA entsteht durch das Splicing von 12 Exonen und kodiert für ein 377 Aminosäuren (AS) umfassendes Protein.

Steinke charakterisierte analog hierzu den ca. 23 kb umfassenden murinen *Mlc1*-Genlocus auf Chromosom 15 (Steinke et al. 2003). Die ebenfalls aus 12 Exonen gebildete mRNA kodiert hier für ein 382 AS langes Protein.

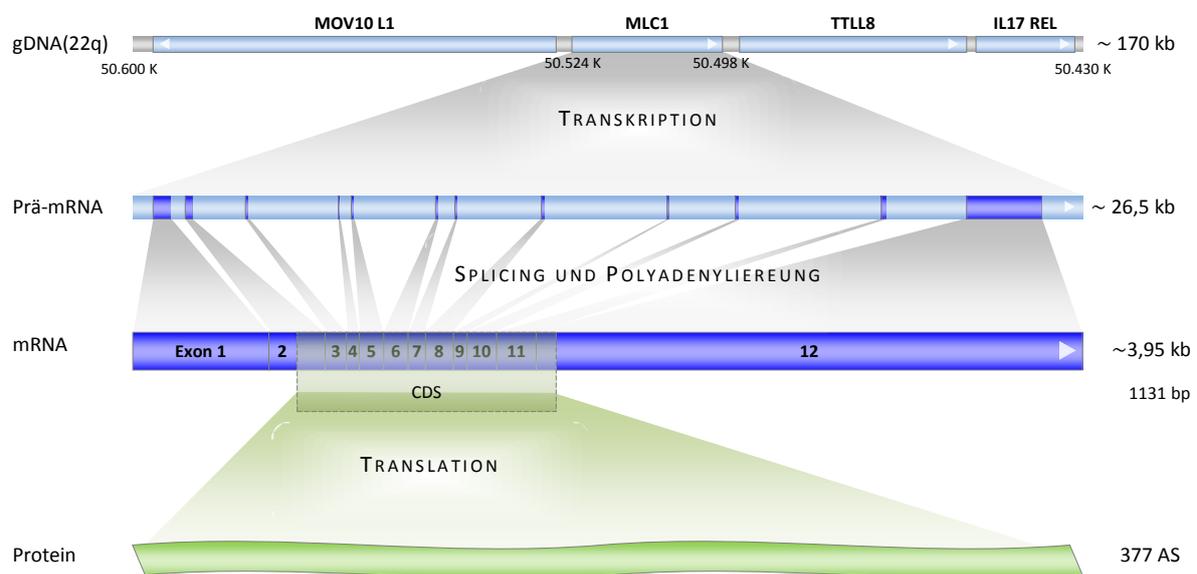


Abbildung 1-1: Aufbau des humanen MLC1-Genlokus

Die biochemischen Eigenschaften des MLC1-Proteins und seine biologische Bedeutung sind in vielerlei Hinsicht noch unklar. Anhand der Analyse der Primärsequenz nimmt man an, dass MLC1 ein membranständiges Protein mit acht Transmembrandomänen ist (Leegwater et al. 2001). Aufgrund einer geringgradigen Homologie zum Ionenkanal KCNA1 (Meyer et al. 2001; Leegwater et al. 2001), einer (für Ionenkanäle typischen) internen Repeat-Struktur (Teijido et al. 2004) und dem krankheitsassoziierten Symptom der Epilepsie, das in einigen Fällen ebenfalls auf Mutationen an Ionenkanälen zurückgeführt werden kann, wird auch für MLC1 eine Funktion als (Kationen-)Kanal diskutiert. Schließlich legen die histopathologische Befunde zur MLC (van der Knaap et al. 1996) sowie die Beobachtung, dass MLC1-orthologe Gene nur bei Myelinbildenden Vertebraten zu finden sind, eine funktionelle Beziehung zum Myelin nahe (Boor et al. 2005).

### 1.3.2. Expressionsstudien

In den vergangenen Jahren wurden mehrere Studien zur Expression von *MLC1* durchgeführt, die sowohl gewebespezifische Expressionsmuster wie auch die veränderten Expressionsraten bei Erkrankungen und unter medikamentösem Einfluss untersuchten.

#### **Differentielle MLC1-Expression in unterschiedlichen Geweben und während der Ontogenese**

In den ersten cDNA-Expressionsstudien ließ sich eine humane *MLC1*-Expression u.a. im Gehirn und – deutlich schwächer – der Milz und im peripheren Blut belegen (Nomura et al. 1994). Northern-Blot-Analysen verschiedener humaner nicht-neuraler Gewebe und Gehirnregionen bestätigten diesen Befund und erbrachten den Nachweis, dass der Hauptexpressionsort für *MLC1* im Gehirn zu finden ist, wobei alle untersuchten Gehirnregionen (Cortex, Hippocampus, Nucleus caudatus, Amygdala, Thalamus und Cerebellum) deutliche Signalstärken aufwiesen (human: Meyer et al. 2001; murin: Steinke et al. 2003). Demgegenüber konnte in extraneuralen Geweben in aller Regel keine (Meyer et al. 2001) oder nur eine sehr geringe Expression detektiert werden (Steinke et al. 2003).

Untersuchungen am Mausmodell mittels *In Situ*-Hybridisierungen (ISH) zeigten, dass die *MLC1*-Expression vorwiegend in den Astrozyten, Ependymzellen und den Bergmann-Gliazellen stattfindet, während eindeutige Signale aus der Oligodendroglia, Mikroglia und Neuronen nicht detektiert werden konnten (Schmitt et al. 2003). Eine quantitative Analyse der *MLC1*-Expression mittels Northern-Blot-Analysen und quantitativer Real-time-PCR (qRT-PCR) zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten ergab, dass die Bildung des Proteins im Gehirn ca. ab dem 14. Tag der murinen Embryonalentwicklung deutlich zunimmt, perinatal ein Maximum erreicht, und von diesem langsam auf ein etwas geringeres Niveau im adulten Gehirn abfällt. Die Expression erfolgt ubiquitär mit Schwerpunkten im Cerebellum und Bulbus olfactorius. Auf zellulärer Ebene ließ sich eine verstärkte *MLC1*-Transkription perinatal in den multipotenten neuralen Vorläuferzellen insbesondere der subventrikulären Areale der Seitenventrikel nachweisen, während im adulten Gehirn die stärksten Expressionsraten in der Bergmann-Glia des Cerebellums zu finden ist.

#### **Tumor-assoziierte Expression von MLC1**

Dong Dong und Mitarbeiter konnten mittels qRT-PCR eine Erhöhung der *MLC1*-Expression in hepatozellulären Karzinomen (HCC) bei 245 von 250 Patienten, sowie einen wachstumsfördernden Effekt einer *MLC1*-Überexpression in der Tumorzelllinie SMMC7721 nachweisen (Dong-Dong 2005). Hingegen fanden Mishra und Mitarbeiter in Studien zum Methylierungsstatus von 82 Genen in drei Prostata-Tumorzelllinien eine Zunahme der Methylierung des *MLC1*-Promotors im Vergleich zu normalen Zelllinien, was üblicherweise auf ein *Gene silencing* hinweist (Mishra et al. 2010). Ob und inwieweit aus diesen formal widersprüchlichen Befunden auf einen Tumor-Suppressor- oder einen onkogenen Charakter des *MLC1*-Gens geschlossen werden kann, ist unklar.

### **Veränderungen der MLC1-Expression bei Suizidalität**

Thalmeier untersuchten im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie die unterschiedliche Expressionsraten von Genen im orbitofrontalen Cortex von Patienten nach einem Suizid (Thalmeier et al. 2008). Hierbei konnten sie unter anderem zeigen, dass *MLC1* im Falle der suizidierten Personen signifikant geringere Expressionsraten aufwies als in der Kontrollgruppe. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass innerhalb der Suizid-Gruppe 6 von 11 Patienten an einer endogenen Psychose (Depression oder Schizophrenie) litten.

### **Veränderungen der Expression von MLC1 unter medikamentöser Therapie**

In einer Studie an *KCNA1<sup>mceph/mceph</sup>*-Mäusen, welche phänotypisch einige Parallelen zur MLC (erhöhtes Gehirnvolumen, Epilepsie) und zudem verringerte *MLC1*-Expressionsraten aufweisen, konnte unter Behandlung mit dem Antikonvulsivum Carbamazepin sowohl eine Reduzierung der neuronalen Hyperplasie wie auch eine Erhöhung der *MLC1*-Expression beobachtet werden (Almgren et al. 2008). Inwieweit diese Befunde aber einen tatsächlichen kausalen Zusammenhang belegen und ob sich die Verstärkung der *MLC1*-Expression unter Carbamazepin-Behandlung auch beim Menschen nachweisen lässt, ist derzeit allerdings offen.

---

## 2. Fragestellung, Ziele und experimentelle Strategie

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zur Aufklärung der funktionellen Bedeutung des Proteins MLC1 in vivo zu leisten. Hierzu wurden drei experimentelle Ansätze verfolgt:

### I. **Vergleichende qualitative Analyse der humanen und murinen zerebralen MLC1/Mlc1-Transkription durch *In Situ*-Hybridisierung**

Um das regionale und zelluläre Verteilungsmuster der *MLC1/Mlc1*-Transkription im Gehirn zu untersuchen, wurden humane und murine Post-mortem-Gewebeschnitte mit Antisense-*MLC1/Mlc1*-DIG-Sonden hybridisiert, mittels Anti-DIG-aP-Antikörpern detektiert, und das Signalmuster bei Maus und Mensch verglichen.

### II. **Quantitative Analyse der humanen MLC1-Transkription in verschiedenen Gehirnarealen und nicht-neuralen Geweben mittels quantitativer Real-time-PCR**

Zur quantitativen Bestimmung der Transkriptionsstärken von *MLC1* in unterschiedlichen humanen Gehirnarealen und nicht-neuralen Geweben wurde aus Post-mortem-Gewebeproben zweier Patienten zuerst Gesamt-RNA und dann cDNA gewonnen. Eine quantitative Real-time-PCR mit *MLC1*-spezifischen Primern und mit Primern für die Housekeeping-Gene *GAPDH*,  $\beta$ -*Aktin*, *L13a*, *ARP* und *Cyclophilin* wurden etabliert und eine anhand der Housekeeping-Genexpression normalisierte Quantifizierung der gewonnenen *MLC1*-cDNA vorgenommen.

### III. **Gewinnung von Antikörpern gegen humanes MLC1**

Um weitergehende Nachweismethoden und Untersuchungen zur gewebsspezifischen, zellulären und intrazellulären Verteilung des MLC1-Proteins zu ermöglichen, sollte ein polyklonales Antiserum gegen humane MLC1-Epitope gewonnen werden. Diese humanen MLC1-Epitope sollten durch Expression eines MLC1-Fusionsproteins in Bakterien hergestellt werden. Hierzu wurden mit computergestützten Analysen geeignete Abschnitte der *MLC1*-cDNA bestimmt und in einen Expressionsvektor kloniert, der zusätzliche Sequenzen für eine Intein-Domäne und eine Chitin-bindende Domäne (CBD) enthielt. Nach Transformation von *E. coli*-Bakterien und Expression des Fusionsproteins (FP) wurde dieses über eine Chitin-Säule aufgereinigt und das Vakzinierungsprotein (VP) von der Intein-Domäne abgetrennt<sup>8</sup>. Anschließend sollte mithilfe des aufgereinigten Proteins eine Vakzinierung von Kaninchen durch Gewinnung eines Antiserums erfolgen.

---

<sup>8</sup> Mit dem Begriff *Fusionsprotein* bzw. FP wird im Folgenden das gesamte vektorkodierte Protein bezeichnet, welches sich aus MLC1-Sequenzen, Intein-Domäne und Chitin-bindender Domäne zusammensetzt. Die Bezeichnung *Vakzinierungsprotein* bzw. VP hingegen bezieht sich lediglich auf den Abschnitt der MLC1-Sequenzen, der im Rahmen der Aufreinigung abgetrennt und zur späteren Vakzinierung verwendet werden sollte.

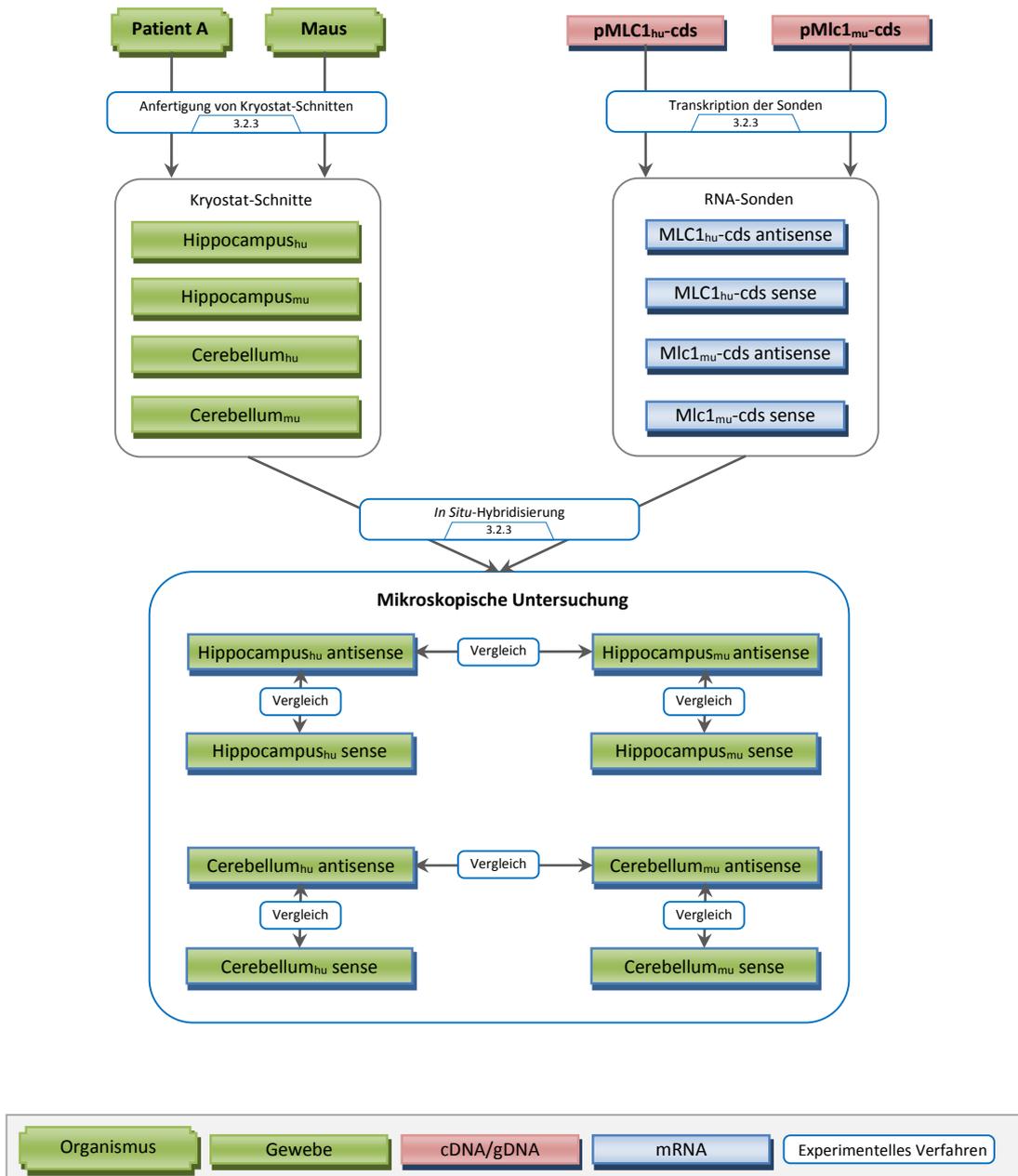


Abbildung 2-1: Übersicht über den experimentellen Ablauf für Zielstellung I

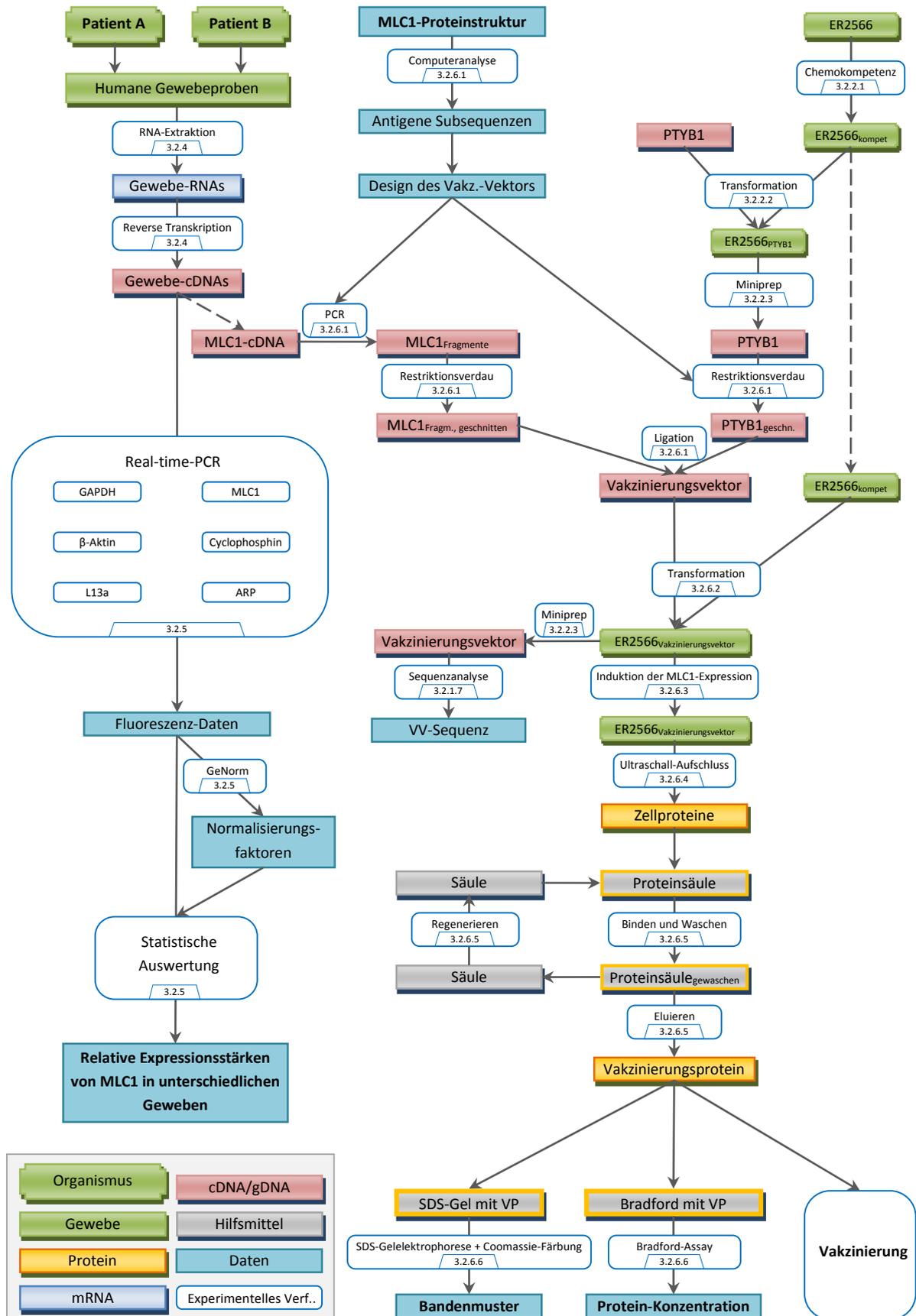


Abbildung 2-2: Übersicht über den experimentellen Ablauf für Zielstellung II und III

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Gewebeproben

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten humanen Proben stammten von zwei Menschen:

- *Mensch A:*
  - Biographische Angaben: unbekannt.
  - *RNA-Proben* aus frontalem, temporalem, okzipitalem und entorhinalem Cortex, Locus coeruleus, Nucleus Raphe, Kleinhirn, Thalamus, Nuclei subthalamici, Substantia nigra, Hippocampus, Corpora mamillaria, Putamen, Nucleus caudatus, Amygdala und Plexus chorioideus
  - *Gewebeschnitte* aus Hippocampus und Cerebellum zur *In Situ*-Hybridisierung
- *Mensch B:*
  - Biographische Angaben:
    - Männlich, 67 Jahre alt, gestorben 2004
    - Todesursache (laut Obduktionsbericht): Globales Herzversagen bei Zustand nach Lysetherapie nach fulminanter Lungenembolie
    - Keine bekannten ZNS-Erkrankungen
  - *Gewebeproben* aus Bulbus olfactorius, frontaler Cortex, Kleinhirn, Hippocampus, Herz, Leber, Lunge, Milz, Nebenniere, Niere zur Gewinnung der mRNA.
  - Die Proben wurden in der Neuropathologie der Universität Würzburg von Prof. Roggendorf entnommen und Frau Dr. Angelika Schmitt freundlicherweise zu Forschungszwecken überlassen.

Darüber hinaus wurden Gehirne zweier adulter C57BL/6-Mäuse für die *In Situ*-Hybridisierung gewonnen.

##### 3.1.2. cDNA-Plasmide

Die Klonierung des MLC1-Vakzinierungsvektors erfolgte unter Verwendung der in einen pBluescript SK<sup>+</sup>-Plasmid einklonierten humanen MLC1-cDNA aus dem Klon KIAA0027, der von der Arbeitsgruppe von Nobumi Kusahara (Kazuza DNA Research Institute, Yana, Japan) zur Verfügung gestellt worden ist.

Im Rahmen der *In Situ*-Hybridisierung wurden die Plasmide pMlc1<sub>mu</sub>-c<sub>ds</sub> und pMlc1<sub>mu</sub>-3-UTR sowie pMlc1<sub>hu</sub>-c<sub>ds</sub> und pMlc1<sub>hu</sub>-3-UTR verwendet, welche aus früheren Arbeiten von Dr. Angelika Schmidt und Viktor Gofferje (Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie, Molekulare und Klinische Psychobiologie) stammten und mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden (Schmitt et al. 2003).

### 3.1.3. Molekularbiologische Kits und vorgefertigte Reagenzien

Kit	Hersteller	Anwendung
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit	AB applied biosystems, Foster City, USA	DNA-Sequenzierung
Bradford Reagent	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA	Quantitative Proteinbestimmung
DIG RNA Labeling Kit	Roche Applied Science, Mannheim	DIG-Markierung von RNA zur <i>In Situ</i> -Hybridisierung
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, München	cDNA-Gewinnung aus RNA
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, München	Real-time-PCR
IMPACT-CN™-System	New England Biolabs, Frankfurt am Main	Klonierung und affinitätschromatographische Reinigung des MLC1-Vakzinierungsproteins
MinElute™ PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden	DNA-Isolierung aus PCR-Ansätzen
QIAquick™ Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden	DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen
QIAprep™ Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden	Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterienlösungen
QIAprep™ Midiprep Kit	Qiagen, Hilden	Plasmid-DNA-Isolierung aus Bakterienlösungen

### 3.1.4. Zellkultur

Medium	Konz.	Inhaltsstoff	Hersteller	Kommentar
LB-Medium	25 g/l	LB-Pulver	AppliChem, Darmstadt	Das Medium wurde vor der Verwendung autoklaviert.
Amp-LB-Medium	25 g/l 50 mg/l	LB-Pulver Ampicillin	AppliChem, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim	Das Medium wurde vor der Verwendung autoklaviert.
Amp-LB-Agar	25 g/l 15 g/l 50 mg/l	LB-Pulver GibcoBRL Select Agar Ampicillin	AppliChem, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim	Das Medium wurde vor Zugabe des Ampizillins in der Mikrowelle auf 100°C erhitzt.
SOC Outgrowth Medium			New England Biolabs, Frankfurt am Main	Fertigmedium vom Hersteller

Alle Medien wurden in H<sub>2</sub>O angesetzt.

### 3.1.5. DNA/RNA-Analytik

#### DNA/RNA-Aufreinigung

Reagenz	Hersteller
RNAzol-B™ RNA-Extraction Kit	Biotech Laboratories (Houston, USA)
Roti®-Phenol	Carl Roth, Karlsruhe
Roti®-Aqua-Phenol	Carl Roth, Karlsruhe
Roti®-C/I	Carl Roth, Karlsruhe

**Reagenzien und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese**

Reagenz	Hersteller
SeaKem LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Ethidiumbromid-Lösung (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphen-anthridiniumbromid, 0,5%)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Puffer	Konz.	Inhaltsstoff	Hersteller	Kommentar
TBE-Puffer	89 mM	TRIS	Merck, Darmstadt	pH=8
	89 mM	Borsäure	Appli Chem, Darmstadt	
	2 mM	EDTA-Na <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim	
TE-Puffer	10 mM	TRIS-HCl	Merck, Darmstadt	
	0,1 mM	EDTA-Na <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim	
Ladepuffer (6x)	50%	Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim	
	1 mM	EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim	
	0,25%	Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim	
	0,25%	Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Steinheim	

Alle Puffer wurden in H<sub>2</sub>O angesetzt.

DNA Fragmentgrößen-Marker	Hersteller
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

**Oligonukleotidprimer für die Polymerase-Ketten-Reaktionen**

Die verwendeten Oligonukleotide stammen – sofern nicht anders angegeben – von MWG Biotech, Ebersberg. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

**Enzyme und Enzypuffer**

Enzym	Hersteller
<i>NcoI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>NdeI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>XhoI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Sall</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>SapI</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main
T4-DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main

Puffer / Zusatz	Hersteller
Puffer G	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Puffer O	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Puffer R	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Puffer Tango™	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA Ligase-Puffer	New England Biolabs, Frankfurt am Main
50% PEG solution	New England Biolabs, Frankfurt am Main

### Puffer und Lösungen für die In Situ-Hybridisierung

Medium	Konz.	Inhaltsstoff	Hersteller	Kommentar
PFA-Lösung	4%	Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt	in PBS, pH 7,5
Ethanol	100%	Ethanol	Merck, Darmstadt	
SSC (2×)	300 mM 30 mM	NaCl Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim	pH 7,0
Acetylierungspuffer	0,25% 0,1 M	Essigsäureanhydrid Triethanolamin	Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt	
Hybridisierungspuffer	50% 4× 10% 1× 250 mg/l	Formamid SSC Dextransulfat Denhardt's Lösung, RNase-frei Lachsspermien-DNA	Carl Roth, Karlsruhe Selbst hergestellt (s.o.) Sigma-Aldrich, Steinheim Selbst hergestellt (s.u.)	vor Zugabe des Lachsspermiums dieses für 5-10 min bei 95°C-100°C denaturieren
RNAse-Puffer	10 mM 500 mM 1 mM	Tris-HCl NaCl EDTA	Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim	pH 7,5-8,0
DIG-1-Puffer	100 mM 150 mM	Tris-HCl NaCl	Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim	pH 7,0
Blockierungspuffer	0,5%	Blocking Reagenz	Roche, Mannheim	In DIG1-Puffer
Antikörperlösung	0,5% 1:500 0,15%	Blocking Reagenz Anti-DIG-aP Triton X-100	Roche, Mannheim Roche, Mannheim Sigma-Aldrich, Steinheim	In DIG1-Puffer
DIG3-Puffer	100 mM 100 mM 50 mM	Tris-HCl NaCl MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim	pH 9,5
DIG4-Puffer	10 mM 1 mM	Tris-HCl EDTA	Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim	pH 7,5
aP-Reaktionsmedium	0,4 mM 0,4 mM	NBT BCIP	Roche, Mannheim Roche, Mannheim	In DIG3-Puffer
Denhardt's Lösung (50 ×)	1% 1% 1%	BSA Polyvinylpyrrolidin Ficoll (steril filtriert)	Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt	

Alle angegebenen Puffer und Lösungen wurden unter Verwendung von DEPC-H<sub>2</sub>O hergestellt.

### 3.1.6. Proteinanalytik

#### Chitinsäulen-Affinitätschromatographie

Medium	Konz.	Inhaltsstoff	Hersteller	Kommentar
<b>Lysepuffer</b>	500 mM	NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim	mit HCl auf pH 8,0 eingestellt
	20 mM	Tris-HCl	Merck, Darmstadt	
	1 mM	EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim	
	0,1%	Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim	
<b>Säulenpuffer</b>	500 mM	NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim	mit HCl auf pH 8,0 eingestellt
	20 mM	Tris-HCl	Merck, Darmstadt	
	1 mM	EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim	
<b>Spaltungspuffer</b>	500 mM	NaCl	Sigma-Aldrich, Steinheim	mit HCl auf pH 8,0 eingestellt
	20 mM	Tris-HCl	Merck, Darmstadt	
	1 mM	EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim	
	50 mM	DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim	
<b>Stripping-Lösung</b>	0,3 mM	NaOH	Sigma-Aldrich, Steinheim	

Hilfsmittel	Hersteller
<b>Mobicol Column 10 ml, Porengröße 35 <math>\mu</math>l</b>	Mo Bi Tec, Göttingen

#### SDS-PAGE

Gel / Reagenz / Puffer / Marker	Hersteller
<b>SDS-NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 12 wells</b>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>NuPAGE® LDS Sample Buffer (4<math>\times</math>)</b>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>NuPAGE® Reducing Reagent (10<math>\times</math>)</b>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20<math>\times</math>)</b>	Invitrogen, Karlsruhe
<b>Mark12™ Unstained Standard</b>	Invitrogen, Karlsruhe

#### Coomassie-Färbung

Medium	Konz.	Inhaltsstoff
<b>Fixierungspuffer</b>	50% (v/v)	Methanol (CH <sub>3</sub> OH)
	2% (v/v)	Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
<b>Inkubationspuffer</b>	34% (v/v)	Methanol (CH <sub>3</sub> OH)
	2% (v/v)	Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
	17% (v/v)	Ammoniumsulfat (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>
<b>Färbepuffer</b>	34% (v/v)	Methanol (CH <sub>3</sub> OH)
	2% (v/v)	Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )
	17% (v/v)	Ammoniumsulfat (NH <sub>4</sub> )SO <sub>4</sub>
	0,066% (w/v)	Coomassie G-250 (kolloidal)

### 3.1.7. Laborgeräte

#### In Situ-Hybridisierung

Gerät	Hersteller	Anwendung
Kryostat HM 500 O	Microm Laborgeräte, Walldorf	Herstellung von Gewebeschnitten
DMRBE	Leica Mikroskopie, Wetzlar	Lichtmikroskopie
Cool Pix 4500	Nikon, Japan	Digitalkamera

#### Elektrophorese/Agarose-Gelfotografie/Gel-Schneiden

Gerät	Hersteller	Anwendung
M32	GLW, Würzburg	Heizplatte mit Magnetrotor
Gene Power Supply 200/400	Pharmacia, Freiburg	Netzgerät
CONSORT E835	Consort, Turnhout, Belgien	Netzgerät
CONSORT E844	Consort, Turnhout, Belgien	Netzgerät
Elektrophorese-Powerpack P24	Biometra, Göttingen	Netzgerät
Novex™ XCELL II™ Mini Cell	Invitrogen, Karlsruhe	Gelkammer für SDS-Gelelektrophorese
Bio-Rad Chemi-Doc	Bio-Rad, München	Durchlicht-UV-Gerät zur Geldokumentation
Bio-Rad Quantity One 4.3.1	Bio-Rad, München	Software zur Geldokumentation
MWG Biotech Fluo-Link	MWG Biotech, Ebersberg	Durchlicht-UV-Gerät zum Gel-Schneiden

#### Thermocycler

Gerät	Hersteller	Kommentar
Bio-Rad iCycler	Bio-Rad	Thermocycler für Real-time-PCRs
Thermocycler T1	Biometra, Göttingen	Konventionelle PCR
Thermocycler T-Gradient	Biometra, Göttingen	Konventionelle PCR

#### Zentrifugen

Gerät	Hersteller	Kommentar
Biofuge fresco	Haereus Instruments, Hanau	
Rotanta 96 RS	Hettich, Tuttlingen	
Sorvall RC5 C	Kendro, Hamburg	Verwendete Rotoren: Rotor Sorvall SM-24 und Rotor GSA

**Messinstrumente**

Instrument		Kommentar
Waage PM 300	Mettler	Messbereich 0,1 g-200 g
Waage HL 52	Mettler	Messbereich 0,1 mg-1 g
pH-Meter pH530	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten	pH-Messung
BioPhotometer	Eppendorf	Messungen mit Uvette®

**Inkubationsschränke/Wasserbäder**

Instrument	Kommentar
Bühler Labortechnik KS-15	0-50°C Luft-Inkubator mit Schüttler (30-420 rpm)
GFL 1083	10-110°C Wasserbad-Inkubator mit Schüttler
LKB Bromma 2219 Multitemp II Thermostatic Circulator	Wasserbad-Inkubator
Haereus B5042 E	37°C-Luft-Inkubationsschrank

**Sonstiges**

Instrument	Hersteller	Kommentar
Branson Digital Sonifier®	Branson	Zell-Disruptor
GLW L46		Vortexer

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Allgemeine Methoden: Nukleinsäuren

#### 3.2.1.1. Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration in wässrigen Lösungen

Die aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen von Nukleinsäuren führen in einer wässrigen Lösung zu einer starken Absorption des Lichtes bei einer Wellenlänge von 260 nm. Daher kann die Konzentration von Nukleinsäuren anhand des Extinktionswertes einer wässrigen Lösung bei 260 nm bestimmt werden. Da die Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration bei niedrigen Konzentrationen annähernd linear ist (Lambert-Beersches Gesetz), lässt sich letztere bei verdünnten Lösungen über einfache Formeln berechnen:

Doppelsträngige DNA:	$C = OD_{260 \text{ nm}} \times 50 \text{ } \mu\text{g/ml}$
Einzelsträngige DNA:	$C = OD_{260 \text{ nm}} \times 40 \text{ } \mu\text{g/ml}$
Einzelsträngige RNA:	$C = OD_{260 \text{ nm}} \times 33 \text{ } \mu\text{g/ml}$

Zur Kontrolle störender Proteinverunreinigungen der Lösung kann zusätzlich der Extinktionswert bei 280 nm (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren) und der Quotient  $\frac{OD_{260 \text{ nm}}}{OD_{280 \text{ nm}}}$  bestimmt werden, der bei ausreichender Reinheit über 1,8 liegen sollte.

Zur Messung der Extinktionswerte wurde ein *BioPhotometer* der Firma Eppendorf verwendet.

#### 3.2.1.2. DNA-Gelelektrophorese mit Agarose-Gelen

Um die Größenverteilung von DNA-Fragmenten zu untersuchen und ggf. bestimmte Fragmente zu eluieren, wurde eine elektrophoretische Auftrennung mit Agarose-Gelen vorgenommen:

DNA-Moleküle besitzen in schwach basischen Medien eine ihrer Größe proportionale negative Ladung. Werden sie auf ein Agarose-Gel aufgetragen und dieses einem elektrischen Feld ausgesetzt, so wandern die DNA-Fragmente von der Kathode zur Anode, wobei sie durch das Netz aus D-Galaktose-Polysacchariden mechanisch gebremst werden. Die resultierende Wanderungsgeschwindigkeit ist linear proportional zur angelegten Spannung und umgekehrt proportional zum Logarithmus der Moleküllänge. Mit zunehmender Agarose-Konzentration nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit ab, die Trennschärfe für kürzere Fragmente jedoch steigt. Hieraus ergeben sich unterschiedliche optimale Gelkonzentrationen für verschiedene Fragmentlängen und Pufferumgebungen:

Trennbereich bei Verwendung von 1×TBE-Puffer				
Agarose-Konzentration	0,85%	1,0%	1,25%	1,75%
Fragmentlängen	100-3.000 bp	200-4.000 bp	300-7.000 bp	400-8.000 bp

### Herstellung der Agarose-Gele

1. Herstellung einer homogenen Agarose-Lösung durch Lösen der Agarose in TBE-Puffer und Erhitzung auf 100°C in der Mikrowelle
2. Abkühlung auf ca. 65°C; anschließend Zugabe von Ethidiumbromid-Lösung zur Endkonzentration von 0,1-0,5 µg/ml (die durch Interkalation in die DNA-Doppelhelix verstärkte Fluoreszenz des Ethidiumbromids bei 590 nm ermöglicht eine Beobachtung der aufgetrennten DNA-Fragmente im UV-Licht)
3. Gießen der Gele in Gelkammern und Abkühlen auf RT
4. Überschichtung des erstarrten Agarose-Gel mit TBE-Puffer

### Auftragen der Proben

5. Auftragen des DNA-Größenmarkers
6. Zugabe von ca. 2 µl Ladepuffer zu 10-20 µl Probenlösung und Auftragen auf das Gel

### Elektrophorese

7. Elektrophoretische Auftrennung je nach erwarteter Fragmentgröße in einem Spannungsfeld von ca. 5-8 V/cm für ca. 30-60 min

### Dokumentation

8. Abschließend wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert

#### **3.2.1.3. DNA-Extraktion aus PCR-Ansätzen**

Zur Aufreinigung der DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen wurde das MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) verwendet. Diese Verfahren beruht auf der Eigenschaft von länger-kettigen DNA-Molekülen, in einer Pufferumgebung mit hoher Salzkonzentration und pH-Werten unter 7,5 an Silikatmembranen zu binden, was in Verbindung mit zwischengeschalteten Waschschriften und abschließender Elution in salzärmeren Puffermedien eine Abtrennung der DNA von den übrigen Bestandteilen des PCR-Ansatzes (Primern, Nukleoiden, Enzymen) ermöglicht (Vogelstein und Gillespie 1979):

1. Zugabe von 5 Vol PB-Puffer zum PCR-Ansatz, Überführen der Lösung auf eine MinElute-Säule und Zentrifugation bei ~18.000 g für 1 min  
→ Bindung der DNA-Fragmente an die Silikat-Membran
2. Waschen mit 750 µl PE-Puffer und Zentrifugation bei ~18.000 g für 1 min  
→ Entfernung von überflüssigen Salzen
3. Erneute Zentrifugation bei ~18.000 g für 1 min

4. Auftragen von 10 µl EB-Puffer auf die Säule, Inkubation bei RT für 1 min, Zentrifugation bei ~18.000 g für 1 min  
→ *Elution der gebundenen DNA*

Abschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (→3.2.1.1) und ggf. eine Isopropanol/Ethanol-Fällung (→3.2.1.5) zur Aufkonzentrierung durchgeführt.

#### **3.2.1.4. DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen**

Um DNA-Fragmente im Anschluss an eine elektrophoretische Auftrennung (→3.2.1.2) aus dem Agarose-Gel herauszulösen, wurde unter UV-Durchlicht die entsprechende Bande ausgeschnitten und mittels des QIAquick™ Gel Extraction Kit entsprechend den Herstellerangaben aus dem Gel herausgelöst (Angaben in Klammern beziehen sich auf Gele mit einer Agarose-Konzentration  $\geq 2\%$ ):

1. Zugabe von 3 (6) Vol QG-Puffer zum extrahierten Gel, Inkubation bei 50°C für 10' unter zwischenzeitlichem Vortexen.  
→ *Lösung des Gels*
2. Zugabe von 1 Vol Isopropanol, Auftragen der Lösung auf eine QIAquick-Säule und Zentrifugation bei ~18.000 g für 1 min  
→ *Bindung der DNA-Fragmente an die Silikat-Membran*
3. Auftragen von 0,75 ml PE-Puffer auf die Säule, Zentrifugation bei ~18.000 g für 1 min  
→ *Entfernung von überflüssigen Salzen*
4. Erneute Zentrifugation bei ~18.000 g für 1 min
5. Auftragen von 50-80 µl EB-Puffer auf die Säule, Inkubation bei RT für 1 min, Zentrifugation bei ~18.000 g für 1 min  
→ *Elution der gebundenen DNA*

Abschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (→3.2.1.1) und ggf. eine Isopropanol/Ethanol-Fällung (→3.2.1.6) zur Aufkonzentrierung durchgeführt.

#### **3.2.1.5. DNA/RNA-Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Phasentrennung**

Zur Isolierung von DNA und RNA aus Geweben, Zellen oder Protein-Nukleinsäuremischungen aus molekularbiologischen Arbeitsschritten (z.B. Restriktionsverdauen) können Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktionen durchgeführt werden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der unterschiedlichen Löslichkeit von Nukleinsäuren und Proteinen in wässrigen und organischen Medien, und die damit einhergehenden unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten in gemischten organisch/wässrigen Systemen, die zu einer weitgehenden Trennung der Nukleinsäuren in der wässrigen Phase von Proteinen in der organischen Phase führt. Durch Optimierung des pH-Wertes und ggf. Zusätze von denaturierenden, chaotropen Salzen (z.B.

Guanidiniumthiocyanat) lassen sich auf diesem Wege DNA und RNA in hoher Reinheit und nahezu quantitativ gewinnen.

Die Durchführung dieser Methode im Rahmen dieser Arbeit erfolgte unter Verwendung des Roti®-Phenol-Systems von Carl Roth:

1. DNA-Isolierung: Zugabe von 1 Vol Roti®-Phenol (pH 7,5-8,0) und 1 Vol Roti®-C/I  
RNA-Isolierung: Zugabe von 1 Vol Roti®-Aqua-Phenol (pH 4,5-5,0) und 1 Vol Roti®-C/I
2. Durchmischen durch kräftiges Schütteln  
→ Zentrifugation für 10 min bei 13.000 g bei 4°C
3. Überführen des wässrigen Überstandes in ein neues Eppendorf-Gefäß,  
Zugabe von 1 Vol Roti®-C/I zum Überstand  
→ Zentrifugation für 5 min bei 13.000 g bei 4°C
4. Überführen des wässrigen Überstandes in ein neues Eppendorf-Gefäß

Zur Konzentrierung der DNA wurde anschließend ggf. eine Isopropanol/Ethanol-Präzipitation (→ 3.2.1.6) durchgeführt.

#### **3.2.1.6. DNA/RNA-Konzentrierung durch Isopropanol/Ethanol-Präzipitation**

Die trotz ihrer Größe vergleichsweise gute Wasserlöslichkeit von DNA- und RNA-Molekülen ergibt sich aus dem Vorhandensein negativ geladener Phosphatgruppen, die die Grundlage einer die DNA umgebenden Hydrathülle bilden. Wird die Wasserlösung mit einem im Vergleich zu Wasser weniger polaren Alkohol versetzt (Ethanol oder noch stärker Isopropanol), so wird diese Hydrathülle gestört, das Löslichkeitsprodukt der Nukleinsäuren sinkt und sie fallen bei Überschreiten desselben aus. Dieser Effekt lässt sich durch niedrige Temperaturen („eiskalter Alkohol“) und durch die vorherige Gabe von Natriumacetat verstärken, dessen Na<sup>+</sup>-Ionen das H<sub>2</sub>O von den Phosphaten verdrängen und so ebenfalls die Hydrathülle stören.

Zum Aufkonzentrieren niedrigkonzentrierter DNA- und RNA-Lösungen wurden Isopropanol-Ethanol-Fällungen mit anschließender Aufnahme der gefällten DNA in TE-Puffer durchgeführt:

1. *optional bei geringer erwarteter Ausbeute:* Zugabe von 0,1 Vol 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) zur DNA- bzw. RNA-Lösung und anschließend gute Durchmischung (vortexen)
2. Zugabe von 1 Vol bei -20°C vorgekühltem Isopropanol, anschließend gute Durchmischung (vortexen) und Lagerung bei -20°C für 15 min bis 2 h
3. Zentrifugation bei 14.000 g für 30 min bei 4°C
4. Verwerfen des Überstandes und Waschen des entstandenen Pellets mit 70%igem eiskaltem Ethanol (DNA) bzw. DEPC-Ethanol (RNA), um überschüssige Salzpräzipitate zu entfernen

5. Zentrifugation bei 14.000 g für 30 min bei 4°C
6. Verwerfen des Überstandes, Lufttrocknung des Pellets und ggf. Wiederaufnahme in TE-Puffer (DNA) bzw. DEPC-H<sub>2</sub>O (RNA).

### 3.2.1.7. DNA-Sequenzierung nach Sanger

Die heute eingesetzten Verfahren zur Bestimmung von DNA-Sequenzen beruhen zumeist auf dem Prinzip der Kettenabbruch-Synthese, welche Frederick Sanger 1977 entwickelte (Sanger et al. 1977). Hierbei wird ein DNA-Template einer PCR unterworfen, wobei im Gegensatz zur klassischen PCR dem Ansatz nur ein Start-Primer sowie neben den dNTPs in weitaus geringerer Konzentration mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) beigefügt werden. Werden diese in den neusynthetisierten DNA-Strang eingebaut, bricht die Polymerisation ab und das Fragment erhält die charakteristische Fluoreszenz des endständigen ddNTPs. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte lässt sich anhand des Fluoreszenzbandenmusters die ursprüngliche DNA-Sequenz rekonstruieren.

Für die im Rahmen dieser Arbeit angefertigten Sequenzierungen der Plasmid-DNA wurde das BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems verwendet und folgender PCR-Ansatz zusammenpipettiert:

Ready Reaction Premix	4 µl
BigDye Sequencing Buffer	2 µl
Template (Plasmid)	1000 ng
Prime	3,2 pmol
H <sub>2</sub> O	Add 20 µl
<b>Gesamtansatz</b>	<b>20 µl</b>

Anschließend wurden die Ansätze folgendem PCR-Zyklus unterworfen:

	96°C × 1 min	Denaturierung (initial)
25 ×	96°C × 10 s	Denaturierung (Zyklus)
	AT × 10 s	Annealing (Zyklus)
	60°C × 4 min	Elongation (Zyklus)
	4°C × ∞	Pause

Die Annealing-Temperatur (AT) lag im Falle des Primers T7 bei 56°C, im Falle des Primers Intein (reverse) bei 72°C.

Im Anschluss an die PCR wurden die Ansätze gefällt, mit Ethanol gewaschen (→ 3.2.1.5) und unter Lichtausschluss getrocknet. Die Sequenzdaten wurden auf einem ABI Prism 310 (Applied Biosystems) mit Hilfe der Software ABI Prism 310 Data Collecting V2.0 erhoben und mit dem Programm ABI Prism DNA Sequencing Analysis 3.4 ausgewertet.

### 3.2.2. Allgemeine Methoden: Bakterienkultur

#### 3.2.2.1. Herstellung chemokompetenter ER2566-Zellen

Da die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten ER2566-Bakterien wie alle E.coli-Stämme extrazelluläre Plasmide nicht oder nur in sehr geringen Mengen (und in der Regel nur im „supercoiled“ Zustand) aufnehmen, war es vor der Einbringung ligierter Plasmide notwendig, die Zellen durch eine chemische Behandlung in einen leichter transformierbaren („chemokompetenten“) Zustand nach folgendem Protokoll zu überführen:

1. Animpfen von 10 ml LB-Medium mit der klonalen Bakterienkolonie einer ausgestrichenen Agarplatte und Inkubation über Nacht bei 37°C.
2. Animpfen von 100 ml LB-Medium mit 100 µl Bakteriensuspension der ÜN-Kultur, ca. 3 h Inkubation bei 37°C bis der O.D 600-Wert bei 0,5 liegt.
3. Verteilen der Suspension auf zwei 50 ml-Falkon-Röhrchen und 15 min auf Eis abkühlen.
4. Zentrifugation 10 min bei 4°C und 4000 rpm.
5. Resuspendieren der Pellets in 25 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung und 5 min Inkubieren auf Eis.
6. Zentrifugation 10 min bei 4°C und 4000 rpm.
7. Resuspendieren der Pellets in 4 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung und 1-2 h Inkubieren auf Eis.
8. Je 1 ml Glycerin zugeben.
9. Aliquotieren zu je 100 µl in 1,5 ml-Epis.
10. Einfrieren in flüssigen Stickstoff und bei -70°C aufbewahren.

#### 3.2.2.2. Transformation chemokompetenter ER2566-Zellen mit Plasmiden

Zur Einbringung von supercoiled oder ligierten Plasmiden in ER2566-Zellen wurde wie folgt vorgegangen:

1. Auftauen eines bei -70°C eingefrorenes 100 µl-Samples chemokompetenter ER2566-Zellen (→3.2.2.1) auf Eis
2. Zugabe des Ligationsansatz (15 µl) oder einer geringen Menge des supercoiled Plasmid (wenige ng), vorsichtiges Schütteln und 30 min Inkubation auf Eis
3. Hitzeschock bei 42°C für 2 min
4. Zugabe von 800 µl SOC-Medium und Inkubation bei 37°C für 30 min bei 200 rpm
5. Zentrifugation bei 4000 g und 4°C für 10 min
6. Verwerfen des Überstandes und vorsichtiges Resuspendieren des Pellets in 300 µl LB-Medium

7. Ausplattieren von 100 µl und 200 µl (im Falle des supercoiled Plasmids nur 10 µl und 20 µl) der Bakteriensuspension auf Ampicillin-Agarplatten und ÜN-Inkubation bei 37°C

Am Folgetag wurden die Kolonien ausgezählt.

### **3.2.2.3. Aufreinigung von Plasmid-DNA (Miniprep)**

Zur Gewinnung kleinerer Mengen an Plasmid-DNA (bis 20 µg) aus Bakteriensuspensionen wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet. Dieses nutzt – wie andere Qiagen-DNA-Extraktionsprotokolle auch – das Prinzip der alkalischen Lyse von Bakterienzellen mit anschließender milieuhängiger Bindung von DNA an Silikatmembranen (→3.2.1.3; Birnboim und Doly 1979) zur Abtrennung der Plasmid-DNA von den umgebenden Bestandteilen. Das Vorgehen entsprach im Wesentlichen dem Herstellerprotokoll:

1. *Anzüchten der Bakterienkultur* durch Animpfen von 5 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) mit einem amp<sup>+</sup>-plasmidtragenden Bakterienklon und Inkubation bei 37°C über Nacht im Schüttler bei 300 rpm.
2. Zentrifugation von 2 ml der Bakteriensuspension bei 5000 g für 5 min bei 4°C
3. Verwerfen des Überstandes, Resuspension des Pellets in 250 µl P1-Puffer (mit RNase) durch Vortexen, Zugabe von 250 µl alkalischem P2-Puffer und vorsichtiges Durchmischen durch Schwenken, Inkubation bei RT für 5 min  
→ *Zellyse und RNA-Verdau*
4. Zugabe von 350 µl saurem N3-Puffer und vorsichtiges Durchmischen durch Schwenken, Zentrifugation bei ~18.000 g für 1 min  
→ *Neutralisation und Erhöhung der Salzkonzentration*  
→ *Fällung und Pelletierung von Proteinen und gDNA (Gesamt-DNA)*
5. Überführung des Überstandes auf eine QIAquick-Säule, Zentrifugation bei ~18.000 g für 30-60 s  
→ *Bindung der Plasmid-DNA an die Silikatmembran der Säule*
6. Waschen der Säule mit 0,5 ml PB-Puffer, Zentrifugation bei ~18.000 g für 30-60 s
7. Waschen der Säule mit 0,75 ml PE-Puffer, Zentrifugation bei ~18.000 g für 30-60 s
8. Zentrifugation bei 18.000 g für 30-60 s
9. *Elution der gebundenen Plasmid-DNA* durch Auftragen von 50 µl EB-Puffer, 1 min Inkubation und Zentrifugation bei 18.000 g für 1 min

Abschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (3.2.1.1).

#### **3.2.2.4. Aufreinigung von Plasmid-DNA (Maxiprep)**

Zur Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA (bis 500 µg) aus Bakteriensuspensionen wurde das QIAprep Maxiprep Kit weitgehend entsprechend den Herstellerangaben verwendet:

1. *Anzüchten der Bakterienkultur* durch Animpfen von 100 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) mit einem amp<sup>+</sup>-plasmidtragenden Bakterienklon und Inkubation bei 37°C über Nacht im Schüttler bei 300 rpm.
2. Zentrifugation der Bakteriensuspension bei 6000 g für 15 min bei 4°C
3. Verwerfen den Überstandes, Resuspension des Pellets in 10 ml P1-Puffer (mit RNase) durch Vortexen, Zugabe von 10 ml alkalischem P2-Puffer und vorsichtiges Durchmischen durch Schwenken, Inkubation bei RT für 5 min  
→ *Zellyse und RNA-Verdau*
4. Zugabe von 10 ml saurem, eisgekühltem N3-Puffer und vorsichtiges Durchmischen durch Schwenken, Inkubation bei 4°C für 20 min  
→ *Neutralisation und Erhöhung der Salzkonzentration*  
→ *Fällung von Proteinen und gDNA*
5. Zentrifugation bei ~20.000 g für 30 min bei 4°C  
→ *Pelletierung von Proteinen und gDNA*
6. Erneute Zentrifugation des Überstandes bei ~20.000 g für 15 min bei 4°C  
→ *weitere Pelletierung von Proteinen und gDNA*
7. Äquilibrierung einer QIAGEN-tip 500-Säule mit 10 ml QBT-Puffer  
→ *Herabsetzung der Oberflächenspannung*
8. Überführung des Überstandes aus (6) auf die äquilibrierte Säule und Abwarten, bis die Lösung schwerkraftbedingt durch den Filter gelaufen ist.  
→ *Bindung der Plasmid-DNA an die Silikatmembran der Säule*
9. 2-maliges Waschen der Säule mit 30 ml QC-Puffer
10. *Elution der gebundenen Plasmid-DNA* durch Auftragen von 15 ml QF-Puffer
11. Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation bei ~15.000 g für 30 min bei 4°C  
→ *Fällung und Pelletierung der Plasmid-DNA*
12. Verwerfen des Überstandes, Waschen des Pellets mit 5 ml Ethanol (70%) und Zentrifugation bei ~15.000 g für 15 min bei 4°C  
→ *Entfernung von überschüssigen Salzen*
13. Verwerfen des Überstandes und Lufttrocknung des Pellets für 5-10 min bei RT
14. Resuspension des Pellets in 100-500 µl TE-Puffer

Abschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt (3.2.1.1).

### **3.2.3. In Situ-Hybridisierung humaner und muriner Gehirnschnitte**

Das Verfahren der *In Situ*-Hybridisierung (ISH) ermöglicht es, die Verteilung von DNA und RNA *in situ*, d.h. in einem Gewebeschnitt qualitativ und semiquantitativ zu ermitteln. Zur Lokalisation spezifischer Gentranskripte und zur Bestimmung der Transkriptionsstärke einzelner Gene werden zu der gesuchten mRNA komplementäre cRNA-Stränge (die sog. *antisense* Sonde) synthetisiert, welche als Einzelstrang nach Auftragung auf das Präparat über Wasserstoffbrückenbindungen spezifisch an die ebenfalls einzelsträngige mRNA binden. Als Kontrollsonden zum Nachweis unspezifischer Bindungen werden zur mRNA sequenzidentische RNA-Stränge (die sog. *sense* Sonde) verwendet. Der Nachweis der hybridisierten Sonden im Gewebe erfolgt durch radioaktive Markierung derselben (klassisches Verfahren) oder durch vorherige Koppelung der Nukleotide der synthetisierten RNA an Markermoleküle wie Digoxigenin, welches seinerseits über spezifische Antikörper detektiert werden kann. An diese Antikörper gebundene Enzyme wie die Alkalische Phosphatase (aP) schließlich ermöglichen durch Zugabe eines entsprechenden Substrates einen farblichen Nachweis (aP: BCIP/NBT → blauer Indigo-Farbstoff).

#### **Anfertigung von Schnitten muriner und humaner Gewebe**

Die Gewinnung der Gewebeschnitte erfolgte mit Unterstützung von Dr. Angelika Schmitt und Claudia Kriegebaum. Zwei adulte C57BL/6-Mäuse wurde narkotisiert und dekapitiert, das Gehirn in 3-5 mm dicke frontale Scheiben geschnitten und bei -70°C gelagert. Für die ISH wurden die Gewebeproben auf -20°C erwärmt und 14 µm dicke Kryostat-Schnitte angefertigt, welche anschließend auf beschichtete Superfrost-Plus-Objektträger übertragen und nach kurzem Antrocknen für 5 min in 4%igem Formaldehyd (in DEPC-PBS) fixiert wurden. Nach der abschließenden Überführung in 100%iges Ethanol wurden die Schnitte bei 4°C gelagert.

Die Anfertigung humanen Schnitte des Menschen B erfolgte – ausgehend von den vorliegenden Schnitten des Cerebellums und Hippocampus – im Wesentlichen entsprechend dem gleichen Protokoll.

#### **Herstellung DIG-markierter cRNA-Sonden mithilfe der In vitro-Transkription**

Als Template zur Herstellung DIG-markierter cRNA-Sonden mittel *In vitro*-Transkription dienten die Plasmide pMlc1<sub>mu</sub>-cds und pMlc1<sub>hu</sub>-cds, welche vom Plamid pGEM<sup>®</sup>-T (Promega) abstammen und in dessen *multiple cloning site* (MCS) jeweils Sequenzabschnitte aus dem kodierenden Abschnitt der murinen Mlc1- bzw. humanen MLC1-cDNA eingefügt worden sind (Schmitt et al. 2003). 5'-seitig der MCS liegt ein T7-Promotor, 3'-seitig ein Sp6-Promotor.

Die Herstellung der DIG-markierten cRNA-Sonden erfolgte entsprechend dem folgenden Protokoll:

### 1. Linearisierung der Plasmide

Zur Vorbereitung der *In-vitro*-Transkription (die zur Herstellung DIG-markierter cRNA-Sonden eingesetzt wurde) mussten die zirkulären Plasmide zunächst mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen linearisiert werden.

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die *in vivo* vermutlich zur Abwehr von fremder (insbesondere viraler) DNA dienen. Von den drei Typen der Restriktionsendonukleasen besitzt vor allem der Typ 2 große Bedeutung für molekularbiologische Arbeiten, da er DNA mit hoher Spezifität nur an bestimmten, meist palindromischen Erkennungssequenzen zerschneidet, wobei die unterschiedlichen Enzyme hinsichtlich Erkennungssequenz, Schnittpunkt und Schnittart („blunt end“ vs. „sticky end“) unterscheiden (Roberts et al. 2003). Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen gehören dementsprechend dem Typ 2 an.

Ansatz	pMlc1 <sub>mu</sub> -cds		pMlc1 <sub>hu</sub> -cds	
	antisense	sense	antisense	sense
Plasmid	1,5 µg	1,5 µg	1,5 µg	1,5 µg
10 × Puffer	3 µl (Puffer O)	3 µl (Tango™)	3 µl (Puffer O)	3 µl (Tango™)
Restriktionsenzym	30 U ( <i>Sall</i> )	30 U ( <i>NcoI</i> )	30 U ( <i>Sall</i> )	30 U ( <i>NcoI</i> )
H <sub>2</sub> O	Add 30 µl	Add 30 µl	Add 30 µl	Add 30 µl
<b>Gesamtansatz</b>	<b>30 µl</b>	<b>30 µl</b>	<b>30 µl</b>	<b>30 µl</b>

Die Ansätze wurden zusammenpipettiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Erfolg des Verdauens gelelektrophoretisch (1,5 µl des Restriktionsansatzes auf 1%igem Agarosegel) überprüft (→3.2.1.2).

### 2. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Reinigung und Ethanol-Präzipitation der linearisierten Plasmide

Zur Reinigung der linearisierten Plasmide von Protein-Verunreinigungen wurden die Restriktionsansätze mit TE-Puffer auf 300 µl aufgefüllt und einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (→ 3.2.1.5) mit anschließender DNA-Präzipitation (→3.2.1.6) unterworfen und anschließend in 21 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

### 3. Transkription der cRNA-Sonden

Ansatz	pMlc1 <sub>mu</sub> -c <sub>ds</sub>		pMLC1 <sub>hu</sub> -c <sub>ds</sub>	
	antisense	sense	antisense	sense
Linearisiertes Plasmid	20,5 µl	20,5 µl	20,5 µl	20,5 µl
Transkriptionspuffer (10 ×)	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
DIG-markierte NTPs (10 ×)	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
RNA-Polymerase (20 U/µl)	3 µl (Sp6)	3 µl (T7)	3 µl (Sp6)	3 µl (T7)
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
<b>Gesamtansatz</b>	<b>30 µl</b>	<b>30 µl</b>	<b>30 µl</b>	<b>30 µl</b>

Die Ansätze wurden zusammenpipettiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 2 µl DNase I (10 U/µl) und Inkubation für 15 min bei 37°C abgebaut und die Transkription gestoppt. Die Transkripte wurden im 1%igen Agarosegel (1,5 µl Transkriptionsansatz + 3,5 µl 0,05% DEPC-H<sub>2</sub>O) überprüft (→3.2.1.2).

### 4. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Reinigung und Ethanol-Präzipitation der cRNA-Sonden

Die Transkriptionsansätze wurden zur Aufreinigung der cRNA-Sonden mit 0,05% DEPC-H<sub>2</sub>O auf 300 µl aufgefüllt, einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (→ 3.2.1.5) mit RNA-Präzipitation (→3.2.1.6) unterworfen und die cRNA in 40 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

Abschließend wurde die Konzentration der gewonnenen cRNA-Lösungen photometrisch bestimmt (→3.2.1.1).

### In Situ-Hybridisierung

Die angefertigten murinen und humanen Kryostat-Schnitte wurden mit den DIG-gekoppelten *Mlc1/MLC1*-antisense- und *Mlc1/MLC1*-sense-cRNA-Sonden entsprechend dem Vorgehen in Tabelle 3-1 hybridisiert. Während die Antisense-Sonden spezifisch an im Gewebe transkribierte *Mlc1/MLC1*-mRNA binden sollten, war im Falle der Sense-Sonden kein spezifischer Bindungspartner zu erwarten, weshalb diese Ansätze in erster Linie der Darstellung des Signalhintergrundes zu Vergleichszwecken (als sog. Negativkontrolle) dienten. Die Detektion der hybridisierten Sonden erfolgte durch Anti-DIG-αP-Antikörper, deren anhängende alkalische Phosphatase die zugegebenen Substrate BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) und NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid) in blaue, unlösliche Farbstoffe umwandelte und so ein Farbsignal im Gewebe erzeugte. Zur Reduzierung des Hintergrundes und Erhöhung der Sensitivität wurden unspezifische RNA-Bindungsstellen vor der Hybridisierung durch Acetylierung und Maskierung mit Lachsspermien-DNA weitgehend entfernt sowie nach der Hybridisierung unspezifisch gebundene, nicht hybridisierte Sonden durch Zugabe von RNase A beseitigt.

Tabelle 3-1: Schritte der *In Situ*-Hybridisierung

Schritt	Lösung	Anzahl	Zeit	Temperatur	Kommentar	
VORBEREITUNG	1	95% Ethanol	1 ×	2 min	RT	Rehydratisierung
	2	80% Ethanol	1 ×	2 min	RT	"
	3	70% Ethanol	1 ×	2 min	RT	"
	4	2 × SSC	2 ×	je 10 min	RT	Waschen
PRÄHYBRIDISIERUNG	5	0,02 N HCl	1 ×	5 min	RT	Leichte Depronteinigung
	6	2 × SSC	2 ×	je 5 min	RT	Waschen
	7	Acetylierungspuffer (frisch angesetzt)	1 ×	20 min	RT	Acetylierung positiv geladener Aminogruppen von Proteinen
	8	2 × SSC	2 ×	je 5 min	RT	Waschen
	9	Hybridisierungspuffer <i>ohne</i> cRNA-Sonde	1 ×	1 h	60°C	Prähybridisierung: Lachsspermien-DNA maskiert potentiell unspezifische cRNA -Bindungsstellen
HYBRIDISIERUNG	10	Hybridisierungspuffer <i>mit</i> cRNA-Sonde (5-14 ng/μl)	1 ×	16 h	60°C	Hybridisierung der Gewebe-RNA mit der cRNA-Sonde im Hybridisierungssofen
POSTHYBRIDISIERUNG	11	2 × SSC	2 ×	je 10 min	RT	Waschen
	12	2 × SSC / 50% Formamid	1 ×	30 min	56°C	Formamid löst Wasserstoffbrückenbindungen und fördert so die Linearisierung der cRNA auch bei geringen Temperaturen
	13	2 × SSC	2 ×	je 10 min	RT	Waschen
	14	RNAse-Puffer + 40 μg/ml RNAse A	1 ×	30 min	37°C	Unspezifisches Schneiden der nicht hybridisierten cRNA. Dies verhindert die unspezifische Bindung negativ geladener cRNA an Aminogruppen und reduziert damit Hintergrundsignale.
	15	RNAse-Puffer	3 ×	je 2 min	RT	Entfernung der cRNA-Fragmente
	16	RNAse-Puffer	1 ×	30 min	58°C	"
	17	DIG-1-Puffer	1 ×	5 min	RT	Waschen
DIGOXIGENIN-NACHWEIS	18	Blockierungspuffer	1 ×	30 min	RT	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für Anti-DIG-Antikörper
	19	DIG-1-Puffer + 0,3% Triton X-100	1 ×	15 min	RT	Erhöhung der Zellpermeabilität
	20	Antikörperlösung	1 ×	60 min	RT	Bindung des Anti-DIG-aP Antikörpers an Digoxigenin-gekoppelte cRNA
	21	DIG-1-Puffer	2 ×	5 min	RT	Waschen
	22	DIG-3-Puffer	1 ×	5 min	RT	Äquilibrierung der Medienumgebung für aP (Mg <sup>2+</sup> als Kofaktor)
	23	aP-Reaktionsmedium	1 ×	Stunden bis Tage	RT (im Dunkeln)	aP dephosphoryliert BCIP, das Produkt wird durch NBT oxidiert und dimerisiert. Dieser Dimer wie das reduzierte NBT präzipitieren als dunkelblaue Farbstoffe.
	24	DIG-4-Puffer	3 ×	5 min	RT	Stoppen der aP-Aktivität und Waschung

### 3.2.4. Gewinnung von cDNA aus humanen Geweben

#### RNA-Extraktion aus Gewebe

Zur Gewinnung von RNA aus Gewebe muss dieses zunächst mechanisch und chemisch aufgeschlossen, und die enthaltene RNA durch Phasentrennung, Fällung und Waschung isoliert werden. Das Prinzip der Phasentrennung beruht darauf, dass RNA in sauren Lösungen wesentlich besser löslich ist als DNA und Proteine. Eine besondere Herausforderung besteht darin, die freigesetzte RNA vor dem Abbau durch ubiquitär vorhandene und gewebstämmige RNAsen zu schützen. Aus diesem Grunde müssen sämtliche eingesetzte Reagenzien und Gefäße durch entsprechende Vorbehandlung RNase-frei sein.

Das Vorgehen folgte im Wesentlichen dem Protokoll des Herstellers von RNazol-B (Biotecx Laboratories):

1. Zerstöselung von ca. 100 mg des bei  $-70^{\circ}\text{C}$  vorgekühlten Gewebes in einem Glas-Teflon-Homogenator
2. Zugabe von 1 ml RNazol-B, vorsichtige Homogenisierung in der Pipette und Überführung in ein vorgekühltes 2 ml Eppendorf-Gefäß
3. Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Chloroform, mehrfaches Schwenken des Ansatzes und Inkubation für 10 min auf Eis
4. Zentrifugieren der Lösung bei 16.000 g/ $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min
5. Überführung der abgesetzten, oberen, wässrigen Phase in ein neues, vorgekühltes Eppendorf-Gefäß. Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), ca. 15 s Schütteln und anschließend erneute Inkubation für 15 min auf Eis
6. Zentrifugieren der Lösung bei 16.000 g/ $4^{\circ}\text{C}$  für 30 min  
→ Bildung eines weißlich-transparenten Pellets
7. Entfernen des Überstandes und Waschen des Pellets mit 1,5 ml 80%igem Ethanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Anschließend erneute Zentrifugation der Lösung bei 16.000 g/ $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min
8. Entfernen des Überstandes und Trocknung des Pellets für ca. 10 min
9. Resuspendierung des Pellets in 50  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$ .

Zum Abschluss wurde eine photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration durchgeführt (siehe 3.2.1.1).

### **Reverse Transkription der mRNA in cDNA**

Das retrovirale Enzym „reverse Transkriptase“ besitzt die Fähigkeit, RNA-Sequenzen in die komplementären cDNA-Sequenzen zu transkribieren. Dieses macht man sich zu Nutze, um die aus Geweben gewonnenen mRNA-Banken in entsprechende cDNA-Banken zu überführen, welche einerseits stabiler und somit leichter handhabbar sind (keine Degradation durch ubiquitäre RNAsen), andererseits bequem mit zahlreichen etablierten Analyseverfahren (z.B. quantitativen PCRs) untersucht werden können. Da die reverse Transkriptase zum Start ein kurzes Stück doppelsträngige DNA benötigt, werden dem Ansatz zusätzlich zu dNTPs Oligo-d(T)-Primer (welche komplementär zum poly-A-3'-Ende der mRNA sind) und Random-Hexamer-Primer zugesetzt.

In dieser Untersuchung wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll das iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories) verwendet, welches eine modifizierte MMLV-reverse-Transkriptase enthält, deren Endoribonuklease H-Aktivität durch Entfernung der RNA aus den RNA(-Primer)/DNA-Hybridbereichen die Sensitivität der anschließenden Analysemethoden zusätzlich erhöhen soll:

1. Verdünnung von 500 ng Nuklease-freier RNA-Lösung in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O
2. Ansetzen des Reaktionsmixes:

Nuklease-freie RNA-Lösung	10 µl
5 × iScript Reaction Mix	5 µl
iScript Reverse Transcriptase	1 µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	4 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>

3. Inkubation für 5 min bei 25°C
4. Inkubation für 30 min bei 42°C
5. Inkubation für 5 min bei 85°C
6. Kurzzeitige Lagerung bei 4°C
7. Permanente Lagerung bei -20°C

Die in diesem Protokoll gewonnene cDNA-Lösung besitzt in der Regel einen Gesamtgehalt von ca. 1 µg cDNA bei einer Konzentration von ca. 50 ng/µl.

### 3.2.5. Bestimmung der gewebespezifischen MLC1-Expression mittels qRT-PCR

#### Theoretische Grundlagen der qRT-PCR und ihrer Auswertung

Klassische Verfahren der quantitativen RNA- und DNA-Bestimmung sind vergleichsweise aufwändig und langsam (z.B. Northern Blot, Southern Blot), weisen eine relativ geringe Genauigkeit auf (z.B. quantitative Reverse-Transkriptase-PCR) und/oder besitzen ein wenig verlässliches Berechnungsmodell aufgrund schwer zu kontrollierender Wechselwirkungen (Multiplex-PCR).

Die quantitative Real-time-PCR (qRT-PCR) erlaubt demgegenüber eine relativ schnelle, präzise und reliable quantitative Bestimmung spezifischer DNA-Sequenzen. Angewendet im Rahmen einer qRT-PCR auf cDNAs eröffnet sie eine Möglichkeit zur Messung der Transkriptionsstärke einzelner Gene in Zell- oder Gewebeproben.

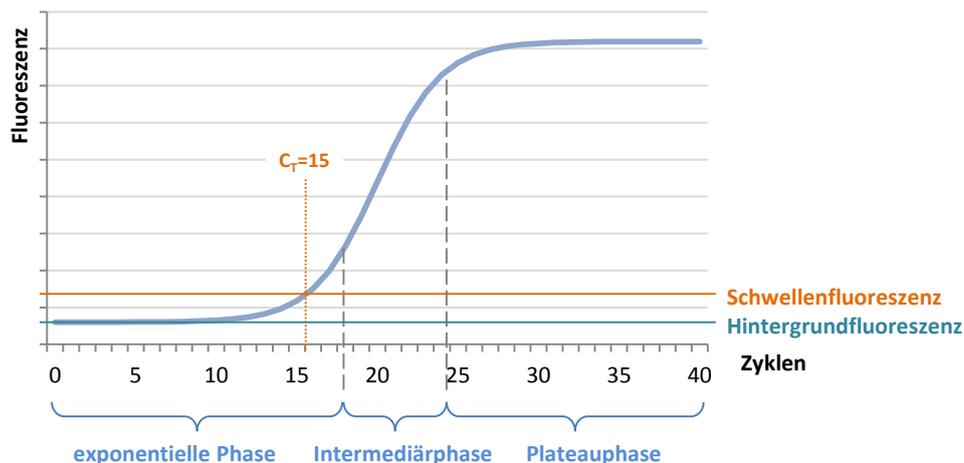
#### Durchführung der qRT-PCR

Der Grundablauf einer qRT-PCR entspricht in weiten Teilen dem der klassischen PCR. Die zyklische Messung der Amplifikatmenge wird durch den Zusatz fluoreszierender Indikatoren ermöglicht, deren Wechselwirkung mit dem doppelsträngigen Amplifikat zu einer messbaren Verstärkung der Fluoreszenz führt. Als Indikatoren werden meist Farbstoffe wie SYBR-Green-1 verwendet, welches sich unspezifisch in DNA-Doppelstränge einlagert und in diesem Zustand ausgeprägte Fluoreszenzeigenschaften zeigt (Absorption<sub>Max</sub> bei  $\lambda=494$  nm, Emission<sub>Max</sub> bei  $\lambda=521$  nm). Alternativ finden sogenannte FRET-Sonden Verwendung, welche einen sequenzspezifischen Nachweis der Amplifikate ermöglichen, jedoch aufwändiger herzustellen und deutlich teurer sind (Wikipedia).

Die Messung der Fluoreszenzwerte erfolgt zu Beginn eines jeden Durchgangs des Hauptzyklus der PCR. Da zu Beginn die Menge der Templates den geschwindigkeitsbestimmenden Faktor darstellt, nimmt die Fluoreszenzkurve zunächst einen weitgehend exponentiellen Verlauf (siehe Abbildung 3-1. Theoretische Maxima: Amplifikationsrate  $F_A = 2$ , Effizienz  $E_A = F_A - 1 = 100\%$ ). Mit zunehmender Zahl der Amplifikate und gleichzeitig abnehmendem Vorrat an Primern und Nukleotiden werden letztere jedoch im Verlauf zu limitierenden Faktoren, was zu einer Abflachung des Wachstums (Intermediärphase) und schlussendlich zu einer asymptotischen Plateaubildung (Plateauphase) führt ( $F_A \rightarrow 1$ ,  $E_A \rightarrow 0\%$ ). Um diese Störeinflüsse ignorieren zu können, ist es wichtig, die zur Quantifizierung der ursprünglich eingesetzten Template-Menge herangezogenen Messwerte möglichst früh in der exponentiellen Phase zu bestimmen. Etabliert hat sich die Verwendung des sog.  $C_T$ -Wertes, der derjenigen Zykluszahl entspricht, bei der erstmals ein definierter Fluoreszenz-Schwellenwert (z.B.  $SF^9 = HF + 10 \times \sigma_{HF}$ , Gibson et al. 1996) überschritten wird.

---

<sup>9</sup> SF = Schwellenwertfluoreszenz, HF = Hintergrundfluoreszenz



**Abbildung 3-1: Idealtypischer Fluoreszenzverlauf einer qPCR mit SYBR-Green I**

Dargestellt ist der theoretische Verlauf der Fluoreszenzkurve (Abszisse: Zykluszahl der PCR, Ordinate: Fluoreszenz bei  $\lambda=521$  nm) einer qPCR bei einer angenommenen initialen Effizienz von 100%. Der  $C_T$ -Wert entspricht der Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz der Probe einen festgelegten Schwellenwert mit signifikantem Abstand zur Hintergrundfluoreszenz überschreitet.

#### Absolute und relative Quantifizierung

Zur Bestimmung der cDNA-Konzentration auf Grundlage dieses  $C_T$ -Wertes kann entweder eine *absolute Quantifizierung* (Bestimmung der genauen Stoffkonzentration des Ausgangstemplates) anhand der  $C_T$ -Werte von Template-Standardlösungen bekannter Konzentrationen durchgeführt werden, oder es erfolgt eine *relative Quantifizierung*, bei der die Bestimmung der Gentranskriptionsstärke relativ zur aus den gleichen Proben ermittelten Transkriptionsstärke eines oder mehrerer Housekeeping-Gene erfolgt. Letzteres Verfahren wird in der Regel bevorzugt, da es den Vorteil besitzt, dass etwaige Varianzen aufgrund unterschiedliche Effektivität der vorge-schalteten RNA-Extraktion aus den Geweben oder der reversen Transkription in gleichen Maße Zielgene und Housekeeping-Gene betreffen und daher nicht gesondert berücksichtigt werden müssen.

Unter der Annahme einer zyklusmäßigen Verdoppelung ( $F_A = 2$ ) lässt sich das Verhältnis  $R$  der Template-Menge eines Zielgens in einer Probe im Vergleich zu einem Kontrollansatz nach jeweiliger Normalisierung mittels der  $C_T$ -Werte des Housekeeping-Gens *HKG* entsprechend der „ $\Delta\Delta C_T$ -Methode“ wie folgt berechnen (Livak und Schmittgen 2001):

$$\Delta C_T = C_{T_{\text{Zielgen}}} - C_{T_{\text{HKG}}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T_{\text{Probe}}} - \Delta C_{T_{\text{Kontrolle}}}$$

**Formel 3-1**  $R = 2^{-\Delta\Delta C_T}$

Bestimmung der PCR-Effizienz

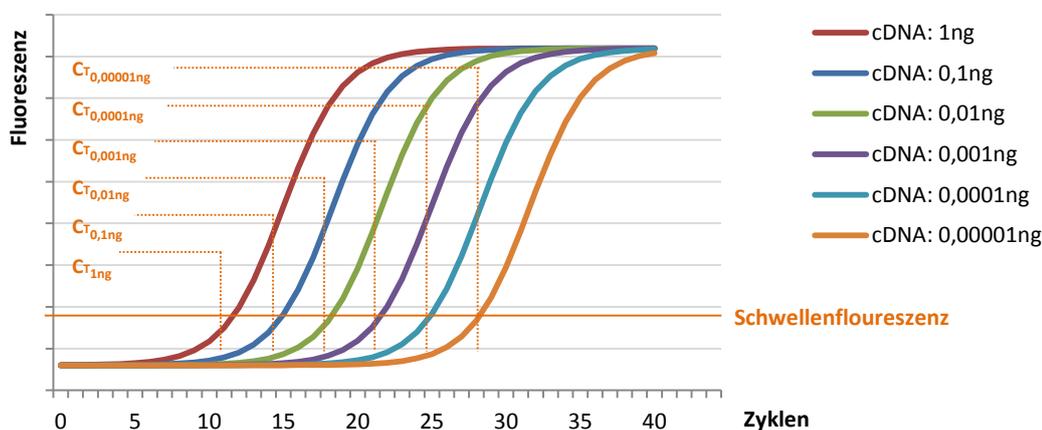
Da der Effizienzfaktor **F** in der Realität jedoch stets unter 2 liegt und bei verschiedenen PCRs variiert, muss die Berechnungsformel diesen Parameter berücksichtigen:

$$\text{Formel 3-2} \quad R = \frac{(F_{A, \text{Zielgen}})^{(C_{T, \text{Zielgen in Kontrolle}} - C_{T, \text{Zielgen in Probe}})}}{(F_{A, \text{HKG}})^{(C_{T, \text{HKG in Kontrolle}} - C_{T, \text{HKG in Probe}})}}$$

Zur Bestimmung von **F** stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung:

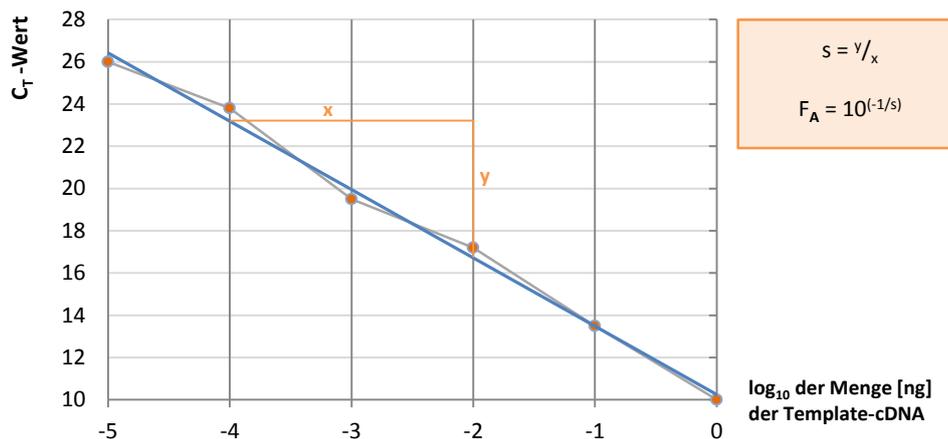
1. *Bestimmung anhand einer Verdünnungsreihe*

Hierbei wird parallel zu den Proben eine dezimale Verdünnungsreihe des Templates angelegt (siehe Abbildung 3-2), und **F<sub>A</sub>** aus der Steigung **S** der logarithmischen Regressionsgeraden der gegen die eingesetzte Template-Menge aufgetragenen **C<sub>T</sub>**-Werte bestimmt (siehe Abbildung 3-3, Meuer et al. 2001).



**Abbildung 3-2: Idealtypische Darstellung der Fluoreszenzkurven einer dezimalen Verdünnungsreihe**

Dargestellt sind die Verläufe der Fluoreszenzkurven (Abszisse: Zykluszahl der PCR, Ordinate: Fluoreszenz bei  $\lambda=521$  nm) der qPCRs einer dekadischen Verdünnungsreihe des Templates von  $10^{-5}$  - 1 ng. Der erwartete Abstand zweier **C<sub>T</sub>**-Werte entspricht bei **F<sub>A</sub>=2** dem Wert  $\log_2 10 \approx 3,32$  Zyklen.



**Abbildung 3-3: Beispielhafte Berechnung von  $F_A$  aus der Steigung  $S$  der Ausgleichsgeraden der logarithmierten  $C_T$ -Werte der Verdünnungsreihe**

Durch logarithmische Regression lässt sich aus den empirisch ermittelten  $C_T$ -Werten der Verdünnungsreihe eine Ausgleichsgerade mit der Steigung  $s$  errechnen, die wiederum entsprechend der angegebenen Formel die Bestimmung des Amplifikationsfaktors  $F_A$  ermöglicht.

Wenngleich diese Methode weit verbreitet ist (und auch in dieser Arbeit verwendet wurde), besitzt sie den Nachteil, dass sie vergleichsweise arbeitsaufwändig ist, probenindividuelle Unterschiede der PCR-Effizienz nicht berücksichtigt und den Amplifikationsfaktor  $F_A$  oft unrealistisch ( $>2$ ) überschätzt (Schiffmann und van der Knaap 2004).

## 2. Bestimmung anhand der maximalen Steigung in der exponentiellen Phase

Deka-logarithmiert man die gemessenen Fluoreszenzwerte, so erhält man im Bereich der exponentiellen Phase näherungsweise eine Gerade, aus deren Steigung  $s$  sich  $F_A$  berechnen lässt (Peccoud und Jacob 1996, Meuer et al. 2001):

<b>Formel 3-3</b>	$F_A = 10^s$
-------------------	--------------

Auf diese Weise lässt sich der Amplifikationsfaktor probenindividuell bestimmen – allerdings führt gerade diese individuelle (durch den Wissenschaftler beliebig festgelegte) Grenzziehung der exponentiellen Phasen in den Proben zu einem hohen Beobachtereffekt und somit geringer Reliabilität der Ergebnisse. Zudem wird  $F_A$  bei diesem Verfahren oft unterschätzt ( $<1,5$ ).

### 3. Bestimmung anhand eines kurvenangepassten parametrischen Modells

Im Rahmen einer komplexen Regressionsanalyse wird eine multi-parametrische Formel bestimmt, die den sigmoidalen Verlauf der Fluoreszenzkurve nachbildet und die einzelnen Komponenten des Graphen (Hintergrundfluoreszenz und spezifische Fluoreszenz) einzeln modelliert (Tichopad et al. 2003). Aus den bestimmten Parametern kann dann der Faktor  $F_A$  berechnet werden. Dieses Verfahren ist das komplizierteste, besitzt jedoch auch die höchste Reliabilität und ist zudem probenindividuell anwendbar.

#### Verwendung mehrerer Housekeeping-Gene

Um die Reliabilität der relativen Quantifizierung bei Messungen in unterschiedlichen Gewebeproben zu erhöhen, wird die Normalisierung in der Regel nicht auf ein einziges, sondern auf mehrere Housekeeping-Gene bezogen. Da den Primärmessdaten (den  $C_T$ -Werten) ein exponentieller Prozess zugrunde liegt, erfolgt die relative Gesamtquantifizierung von  $n$  Housekeeping-Genen durch die Bildung des geometrischen Mittelwertes der Einzelquantifizierungen:

**Formel 3-4**

$$R = \sqrt[n]{\prod_{i=1}^n \frac{(F_{A, \text{Zielgen}})^{(C_{T\text{Zielgen in Kontrolle}} - C_{T\text{Zielgen in Probe}})}{(F_{A, \text{HKG}_i})^{(C_{T\text{HKG}_i \text{ in Kontrolle}} - C_{T\text{HKG}_i \text{ in Probe}})}}} = \frac{(F_{A, \text{Zielgen}})^{(C_{T\text{Zielgen in Kontrolle}} - C_{T\text{Zielgen in Probe}})}}{\sqrt[n]{\prod_{i=1}^n (F_{A, \text{HKG}_i})^{(C_{T\text{HKG}_i \text{ in Kontrolle}} - C_{T\text{HKG}_i \text{ in Probe}})}}$$

#### Auswahl der Gewebe, Gene, Primerpaare und Temperaturprofile

Folgende Gewebeproben von zwei Menschen ( $\rightarrow$ 3.1.1) wurden im Rahmen der qRT-PCR untersucht:

**Tabelle 3-2: Untersuchte Gewebe der Menschen 1 und 2 mithilfe der MLC1-qRT-PCR**

Mensch 1		Mensch 2	
Neurale Gewebe		Neurale Gewebe	Nicht-neurale Gewebe
Frontaler Cortex	Substantia nigra	Frontaler Cortex	Herz
Temporaler Cortex	Amygdala	Hippocampus	Leber
Okzipitaler Cortex	Corpora mamillaria	Cerebellum	Lunge
Entorhinaler Cortex	Thalamus	Bulbus olfactorius	Milz
Hippocampus	Nucleus raphe		Nebenniere
Nucleus caudatus	Locus coeruleus		Niere
Putamen	Cerebellum		
Nucleus subthalamicus	Plexus chorioideus		

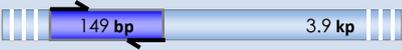
Bestimmt wurde die Transkriptionsstärke des Gens *MLC1* sowie der Housekeeping-Gene *L13a* (60S ribosomales Protein L13a), *ARP* (60S acidic ribosomal protein P0),  $\beta$ -Aktin, *Cyclophilin* und *GAPDH*. Die Primersequenzen wurden teilweise der Literatur entnommen (Simpson et al. 2000),

teilweise selbst anhand der in den Online-Datenbanken verfügbaren cDNA-Sequenz bestimmt. Die Größe der amplifizierten Fragmente lag zwischen 109 bp und 325 bp (siehe Tabelle 3-3).

Die optimale Hybridisierungstemperatur und -zeit sowie die Zykluszahl der qPCRs wurde jeweils in Vorversuchen – ausgehend von einem 2-stufigen Hauptzyklus [95°C × 30 s – (55-65)°C × 30 s] – in einem 10°C-Gradienten um die berechnete Annealing-Temperatur bestimmt.

**Tabelle 3-3: Untersuchte Gene der qRT-PCRs, verwendete Primer und primerspezifische PCR-Parameter**

<p><b>GAPDH</b> (=Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)</p> <p>Ensembl-ID: ENST00000229239</p> <p>Hybridisierungsschritt: 62°C × 45''</p> <p>Zykluszahl: 38</p> <p>Forward Primer: 5' -ATGGG GAAGG TGAAG GTCGG-3'</p> <p>Reverse Primer: 5' -TCATA TTGGA ACATG TAAAC CATG-3'</p>	
<p><b>β-Aktin</b></p> <p>Ensembl-ID: ENST00000445914</p> <p>Hybridisierungsschritt: 63,5°C × 45''</p> <p>Zykluszahl: 38</p> <p>Forward Primer: 5' -CATGG AGAAA ATCTG GCACC ACA-3'</p> <p>Reverse Primer: 5' -GCTGG GGTGT TGAAG GTCTC-3'</p>	
<p><b>L13a</b> (=60S ribosomales Protein L13a)</p> <p>Ensembl-ID: ENST00000391857</p> <p>Hybridisierungsschritt: 54°C × 30''</p> <p>Zykluszahl: 38</p> <p>Forward Primer: 5' -CGAAG ATGGC GGAGG TGCAG-3'</p> <p>Reverse Primer: 5' -TTCTG TAGAA ATTGC CAGAA ATGTT-3'</p>	
<p><b>ARP</b> (=60S acidic ribosomal protein P0)</p> <p>Ensembl-ID: ENST00000228306, ENST00000392514</p> <p>Hybridisierungsschritt: 54°C × 30''</p> <p>Zykluszahl: 38</p> <p>Forward Primer: 5' -CTCCT TTGAG CTGTT TGCAG-3'</p> <p>Reverse Primer: 5' -CACCA CATGC TTGCC ATCC-3'</p>	
<p><b>Cyclophilin</b></p> <p>Ensembl-ID: ENST00000468812</p> <p>Hybridisierungsschritt: 54°C × 30''</p> <p>Zykluszahl: 38</p> <p>Forward Primer: 5' -CTCCT TTGAG CTGTT TGCAG-3'</p> <p>Reverse Primer: 5' -CACCA CATGC TTGCC ATCC-3'</p>	

<b>MLC1</b>		
Ensembl-ID:	OTTHUMT00000316979	
Hybridisierungsschritt:	62°C × 30''	
Zykluszahl:	38	
Forward Primer:	5' - TCAGC CACAA GACGT GGGTC - 3'	
Reverse Primer:	5' - CACAA TTGCC GAGGG GATGC - 3'	

### **Durchführung der qRT-PCR**

Im Anschluss an die Gewinnung der cDNA durch reverse Transkription aus den verschiedenen Gewebeproben (→ 3.2.4) umfasste die qRT-PCR folgende Schritte, die mit Hilfe eines Bio-Rad iCyclers® durchgeführt wurden:

#### **1. Herstellung der Verdünnungsreihen**

Aus der cDNA des Cerebellums wurden mittels klassischer PCR primerspezifische Amplifikate gewonnen, diese über ein MinElute PCR Purification Kit® gereinigt (→3.2.1.3) und die DNA-Konzentration des Eluats bestimmt (→3.2.1.1). Hieraus wurden zunächst Stamm-lösungen (1 ng/μl) und aus diesen eine dekadische Verdünnungsreihe in TE-Puffer (0,1 ng/μl bis 10<sup>-6</sup> ng/μl) erstellt.

#### **2. Zusammenpipettieren des PCR-Ansatzes**

iQ SYBR Green Supermix	12,5 μl
Primer sense (10 mM)	1,0 μl
Primer antisense (10 mM)	1,0 μl
cDNA-Probe aus Gewebe (1 μg)	
bzw. Template-Standardlösung	1,0-10 μl
H <sub>2</sub> O	Add 25,0 μl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25,0 μl</b>

Sämtliche Arbeiten wurden auf einer 96-well Platte auf Eis und - im Falle des SYBR-Green - unter Lichtausschluss (Einwickeln in Alufolie) durchgeführt. Jede Platte wurde mit einem dreifachen Ansatz der Verdünnungsreihe und jeweils dreifachen Ansätzen für jede cDNA-Probe belegt.

### 3. Temperaturzyklus und erwartete PCR-Produkte

Zum Nachweis der verschiedenen Gen-Transkripte wurde ein weitgehend einheitlicher Temperaturzyklus verwendet:

	95°C × 3 min	Denaturierung (initial)	
ZZ	95°C × 30 s	Denaturierung	} Hauptzyklus
	AT × AZ	Hybridisierung + Elongation	
	95°C × 1 min	Denaturierung	
80×	aT – 0,5°C × 10 s	Elongation (final)	} Schmelzkurve
	4°C × ∞	Pause	

AT = Annealing-Temperatur, AZ = Annealing-Zeit, ZZ = Zykluszahl, aT = aktuelle Temperatur

Ausgehend von einem einheitlichen initialen Denaturierungsschritt zur Auftrennung der DNA-Doppelstränge wurden die PCR-Ansätze in einem zweistufigen Hauptzyklus wechselnd denaturiert und hybridisiert, wobei Temperatur und Dauer des Hybridisierungsschrittes sowie Zahl der Hauptzyklen je nach Zielgen variierten (siehe Tabelle 3-3). Ein eigenständiger Elongationsschritt bei 72°C fehlte, da die Amplifikate kurz waren und die verwendete iTaq™-DNA-Polymerase ausreichend temperaturtolerant ist, so dass bereits während der Hybridisierung und der folgenden Aufheizphase eine ausreichende Elongation der DNA erfolgt.

Während der gesamten PCR wurde die Fluoreszenz der Ansätze vom Thermocycler erfasst und aufgezeichnet.

### 4. Schmelzkurvenanalyse

Zur Überprüfung der Spezifität der PCRs wurde im Anschluss an den Hauptzyklus eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hierzu werden die Proben nach 1-minütiger Denaturierungsphase bei 95°C auf 55°C abgekühlt, und anschließend langsam mit 0,5°C/10 s in 80 Schritten wieder auf 95°C erhitzt. Dabei kommt es beim Erreichen der individuellen, im Wesentlichen auf Länge und CG-Gehalt der DNA beruhenden Schmelztemperatur eines doppelsträngigen PCR-Produktes zu einer Auftrennung in die Einzelstränge und damit zu einer Freisetzung des interkalierten SYBR-Green und einem sprunghaften Abfall der Fluoreszenz. Aus dem Verlauf der Fluoreszenzstärke während der Erwärmung kann somit indirekt auf das Vorhandensein von doppelsträngigen DNA-Fragmenten spezifischer Längen geschlossen werden.

**Datenauswertung**

Die Rohmessdaten (emittierte Fluoreszenzwerte) wurden in einem mehrstufigen Prozess ausgewertet: Zunächst wurde mit Hilfe der Schmelzkurven die Spezifität der qRT-PCR verifiziert - nur im Falle eines einzelnen eindeutigen Peaks bei der korrekten Schmelztemperatur wurden die Messdaten eines Ansatzes verwendet.  $C_T$ -Werte, Effizienz (und damit  $F_A$ ) und Korrelationskoeffizient einer qRT-PCR ließen sich direkt über die Software iCycler iQ erheben. Die  $C_T$ -Werte der ausgewerteten Ansätze einer Gewebeprobe wurden arithmetisch gemittelt und hieraus die den eingesetzten Template-Mengen proportionalen primären Quantitäten berechnet:

$$\text{Formel 3-5} \quad pQ = F_A^{-C_T} \quad SD_{pQ} = pQ \times SD_{C_T} \times \ln F_A$$

Zur besseren Vergleichbarkeit der differentiellen Genexpression der Housekeeping-Gene wurden diese primären Quantitäten in (selbst-)normalisierte Quantitäten überführt:

$$\text{Formel 3-6} \quad nF = \frac{1}{\sqrt[n]{\prod_{i=1}^n pQ_i}} \quad nQ = pQ \times nF \quad SD_{nQ} = SD_{pQ} \times nF$$

$nF$  = Normalisierungsfaktor,  $n$  = Anzahl der getesteten Gewebeproben

Schließlich wurde (in Abwandlung der Formel 3-4) die differentielle Genexpression von *MLC1* durch Normalisierung anhand der primären Quantitäten der Housekeeping-Gene der jeweiligen cDNA-Probe bestimmt:

$$\text{Formel 3-7} \quad gQ_{HKG} = \sqrt[m]{\prod_{i=1}^m pQ_{HKG_i}} \quad SD_{gQ_{HKG}} = gQ_{HKG} \times \sqrt{\sum_{i=1}^m (SD_{HKG_i})^2}$$

$$hkQ_{MLC1} = \frac{pQ_{MLC1}}{gQ_{HKG}} \quad SD_{hkQ_{MLC1}} = hkQ_{MLC1} \times \sqrt{\left(\frac{SD_{gQ_{HKG}}}{gQ_{HKG}}\right)^2 + \left(\frac{SD_{pQ_{MLC1}}}{pQ_{MLC1}}\right)^2}$$

$m$  = Anzahl der getesteten Housekeeping-Gene

$gQ_{HKG}$  = geometrischer Mittelwert der primären Quantitäten der Housekeeping-Gene

$hkQ_{MLC1}$  = anhand der Housekeeping-Gene normalisierte Quantität von *MLC1*

Die hierzu notwendigen Berechnungen wurden in Microsoft Excel und zusätzlich unter Zuhilfenahme des Excel-Makroprogramms geNORM 3.5 vorgenommen, welches zudem eine Beurteilung der Stabilität der Expression der Housekeeping-Gene anhand ihrer sog. „M-Werte“ ermöglichte. Hierbei gehen niedrige M-Werte eines Gens mit einer stabilen (d.h. über verschiedenen Zelltypen hinweg relativ konstanten) Genexpression einher. Für nähere Informationen zur statistischen Berechnungsgrundlage der M-Werte sei an dieser Stelle auf die Originalpublikation verwiesen (Vandesompele et al. 2002).

### 3.2.6. Herstellung eines MLC1-Vakzinierungsproteins

Zur Plasmidklonierung, Transformation, Proteinexpression und Proteinaufreinigung wurde das IMPACT™-CN protein purification system von New England Biolabs, Inc. verwendet. Soweit in der Folge nicht anders angegeben, erfolgte die Durchführung der Arbeiten entsprechend den Verfahrensanweisungen des Herstellers.

#### 3.2.6.1. Herstellung des Vakzinierungsplasmids

##### Design des Vakzinierungsvektors

Um die Vakzinierungseigenschaften des exprimierten Proteins und die Spezifität der zu gewinnenden Antikörper zu optimieren, sollten nur diejenigen Sequenzen der MLC1-cDNA verwendet werden, welche ein hohes antigenes Potential und eine gute räumliche Zugänglichkeit besaßen. Hierzu wurde die MLC1-Proteinsequenz mittels mehrerer online verfügbarer automatischer Sequenzanalyseverfahren auf seine wahrscheinliche Domänenstruktur hin getestet:

- "DAS" - Transmembrane Prediction server (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>)
- HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.html>)
- TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)
- TMpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html))
- TopPred (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>)
- SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)

Weiterhin wurde die MLC1-Proteinsequenz auf Regionen mit vermutlichen Antikörper-Epitopen hin überprüft (IEDB Analysis Resource ([http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb\\_input](http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input))):

- Emini Surface Accessibility Prediction
- Karplus & Schulz Flexibility Prediction
- Bepipred Linear Epitope prediction
- Parker Hydrophilicity Prediction

Anhand der Ergebnisse dieser Analysen wurden zwei geeignete Abschnitte des MLC1-Gens am 5'- und 3'-Ende der cDNA bestimmt. Zur Planung und Überprüfung der Sequenzen wurde die Software Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen) benutzt.

Herstellung des Vektors pTYB1 und der MLC1-cDNA-Fragmente

Zur Gewinnung ausreichender Mengen des für die Klonierung benötigten Vektors pTYB1 wurde dieser zunächst in chemokompetente ER2566-Zellen (→ 3.2.2.1) eingebracht (→3.2.2.2) und anschließend nach entsprechender Vermehrung der Bakterien in einem kleinen Ansatz mittels einer Mini-Prep (→ 3.2.2.3) isoliert.

Die ausgewählten MLC1-cDNA-Fragmente wurden aus einem KIAA0027-cDNA-Klon, welcher die humane MLC1-cDNA-Sequenz in einem Bluescript SK<sup>+</sup>-Vektor trägt, mit spezifischen PCR-Primer amplifiziert, die zusätzlich zu ihrem der MLC1-cDNA komplementären 3'-Ende an ihrem 5'-Ende die Erkennungssequenz der benötigten Restriktionsschnittstellen beinhalteten:

**Tabelle 3-4: Primer und primerspezifische Parameter zur MLC1-cDNA-PCR**

<b>MLC1-5'-Fragment</b>		
Forward Restriktionsenzym:	<i>NdeI</i>	
Reverse Restriktionsenzym:	<i>XhoI</i>	
Forward Primer:	5'-GGTGG TCATA TGACC CAGGA GCCAT-3'	
Reverse Primer:	5'-GGTGG TCTCG AGCAG CTCCC CATCA GC-3'	
<b>MLC1-3'-Fragment</b>		
Forward Restriktionsenzym:	<i>XhoI</i>	
Reverse Restriktionsenzym:	<i>SapI</i>	
Forward Primer:	5'-GGTGG TCTCG AGCAT CCACT GCGTG CGCT-3'	
Reverse Primer:	5'-GGTGG TTGCT CTTCC GCACT GGGCC ATTTG CACC-3'	

Folgender PCR-Zyklus wurde verwendet:

	95°C × 5 s	Denaturierung (initial)
30 Zyklen	95°C × 30 s	Denaturierung (Zyklus)
	68°C × 30 s	Annealing (Zyklus)
	72°C × 30 s	Elongation (Zyklus)
	72°C × 10 s	Elongation (final)
	4°C × ∞	Pause

Im Anschluss an die PCR wurden die amplifizierten Fragmente über das MinElute™ PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt (→3.2.1.3).

Schneiden des Vektors pTYB1 und der MLC1-cDNA-Fragmente mit Endonukleasen

Zur Vorbereitung der anschließenden Ligation wurden der pTYB1-Vektor und die amplifizierten MLC1-Fragmente einem Verdau mit drei verschiedenen Restriktionsendonukleasen unterzogen, wobei Pufferumgebung, Temperatur und Inkubationszeit angepasst wurden:

**Tabellen 3-5: Restriktionsenzymatischer Verdau des pTYB1-Plasmids und der MLC1-Fragmente zur Vorbereitung der Ligation des Vakzinierungsvektors**

Name	Erkennungssequenz	Doppelverdau <i>NdeI</i> + <i>SapI</i> (pTYB1)		
<i>NdeI</i>	5' - CA TATG - 3' 3' - GTAT AC - 5'		<i>Start</i>	<i>Nach 2 h</i>
<i>XhoI</i>	5' - C TCGAG - 3' 3' - GAGCT C - 5'	Template	1 µg	1 µg
<i>SapI</i>	5' - GCTCTTCN NNNN - 3' 3' - CGAGAAGNNNN N - 5'	<i>NdeI</i>	-	10 U
		<i>SapI</i>	5 U	5 U
		Tango™-Puffer	1 ×	2 ×
		H <sub>2</sub> O	Add 20 µl	Add 25 µl
		<b>Gesamtansatz</b>	<b>20 µl</b>	<b>30 µl</b>

Doppelverdau <i>NdeI</i> + <i>XhoI</i> (MLC1-5'-PCR-Fragment)		Doppelverdau <i>XhoI</i> + <i>SapI</i> (MLC1-3'-PCR-Fragment)	
Template	1 µg	Template	1 µg
<i>NdeI</i>	10 U	<i>XhoI</i>	10 U
<i>XhoI</i>	5 U	<i>SapI</i>	10 U
R <sup>+</sup> -Puffer	1 ×	G <sup>+</sup> -Puffer	1 ×
H <sub>2</sub> O	Add 20 µl	H <sub>2</sub> O	Add 20 µl
<b>Gesamtansatz</b>	<b>20 µl</b>	<b>Gesamtansatz</b>	<b>20 µl</b>

Die Doppelverdau-Ansätze *NdeI/XhoI* und *XhoI/SapI* wurden wie angegeben zusammenpipetiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Im Falle des Doppelverdaus *NdeI/SapI* wurde zunächst ein *SapI*-Verdau für 2 h bei 37°C durchgeführt, und dann nach Zugabe von *NdeI* und Verdopplung der Pufferkonzentration eine weitere Restriktionsphase von 2 h angeschlossen. Abschließend wurden alle Ansätze zur Inaktivierung der enthaltenen Restriktionsendonukleasen für 20 min auf 80°C erhitzt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Zur Überprüfung des Restriktionsergebnisses wurden die Restriktionsansätze elektrophoretisch in 1%igen (pTYB1) bzw. 2%igem (MLC1-Fragmente) Agarose-Gelen aufgetrennt (→3.2.1.2) und die erwünschten Fragmente aus den Gelen extrahiert (→3.2.1.3).

Da die drei verwendeten Restriktionsenzyme unterschiedliche überhängende Einzelstrangenden („sticky ends“) hinterließen, konnte auf einen anschließenden Desphosphorylierungsschritt zur Vermeidung der Auto-Religation des Plasmids verzichtet werden.

### Ligation der geschnittenen MLC1-cDNA-Fragmentes mit dem linearisierten Expressionsvektor pTYB1

Das virale Enzym T4-DNA-Ligase dient im Rahmen des Replikationszyklus des Bakteriophagen T4 dazu, die während der Polymerisation des Folgestranges entstehenden Okazaki-Fragmente untereinander durch Bildung kovalenter Phosphodiesterbrücken zu verbinden. Aufgrund dieser Fähigkeit wird es in der Molekularbiologie eingesetzt, um auf diese Weise aus spontanen Anlagerungen komplementärer „sticky ends“ oder „blunt ends“ von geschnittenen DNA-Fragmenten eine dauerhafte Verknüpfung zu erreichen.

Zur Ligation des linearisierten pTYB1-Plasmids und der beiden geschnittenen *MLC1*-Fragmente wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

Ligation <sup>10</sup>	
Linearisierter pTYB1	~100 ng <sup>11</sup>
Geschnittenes <i>MLC1</i> -5'-Fragment	~10 ng
Geschnittenes <i>MLC1</i> -3'-Fragment	~10 ng
T4-Ligase	10 Weiss-Units
Ligase-Puffer	1 ×
H <sub>2</sub> O	Add 15 µl
<b>Gesamtansatz</b>	<b>15 µl</b>

Der Ansatz wurde für 12 h bei 4°C inkubiert, zur Inaktivierung der Ligase für 15 min auf 65°C erhitzt und schließlich bei -20°C gelagert.

<sup>10</sup> Die angegebenen Werte entsprechen dem bezüglich der Transformation erfolgreichsten Ligationsansatz. Getestete Settings umfassten Inkubationszeiten von 10 min, 1, 4 und 12 Stunden, Inkubationstemperaturen von 4°C, 16°C und RT, den Zusatz von PEG sowie den Einsatz verschiedener molarer Verhältnisse zwischen Vektor und Inserts.

<sup>11</sup> Das molare Verhältnis von Vektor und Inserts betrug hier ca. 1 : 4 : 4.

### 3.2.6.2. Transformation des E.coli-Strain ER2566 mit dem ligierten Vakzinierungsvektor und Nachweis der rekombinanten DNA-Sequenz

Chemokompetente ER2566-Zellen (→ 3.2.2.1) wurden mit dem durch Ligation des MLC1-cDNA-Fragmentes mit dem vorbereiteten Vektor (siehe oben) entstandenen Vakzinierungsvektor transformiert (→3.2.2.2), anschließend 5-10 Klone der Ampicillin-Agarplatten gepickt und in je 5 ml Ampicillin-LB-Medium überführt und dieses bis zu einer O.D. von 0,5 bei 37°C und 300 rpm im Schüttler inkubiert.

Um die Klone auf erfolgreiche Transformation mit einem korrekt ligierten Vakzinierungsvektor zu testen, wurde direkt aus der Bakteriensuspension eine Screening-PCR durchgeführt, und die entstandenen Produkte im 1,5%igen Agarosegel (→ 3.2.1.2) aufgetrennt:

**Tabelle 3-6: PCR zum Nachweis der erfolgreichen MLC1-5'-3'-Klonierung in den pTYB-Vektor**

Primer	
<b>MLC1-cDNA -5'-3'-Fragment-pTYB1</b> (620 bp)	
Forward Primer: T7	5' -TAATA CGACT CACTA TAGGG-3'
Reverse Primer: Intein (reverse)	5' -ACCCA TGACC TTATT ACCAA CCTC-3'
Zyklus	
	95°C × 5' Denaturierung (initial)
30×	95°C × 15" Denaturierung (Zyklus)
	56°C × 15" Annealing (Zyklus)
	72°C × 45" Elongation (Zyklus)
	72°C × 5' Elongation (final)
	4°C × ∞ Pause

\* = Die SapI-Schnittstelle ging durch die Ligation der geschnittenen Fragmente verloren.

Diejenigen Klone, in denen das erwartete 620 bp-Fragment nachgewiesen werden konnte, wurden anschließend in 100 ml LB-Medium bei 37°C hochgezüchtet, das Plasmid mittels Miniprep isoliert (→ 3.2.2.3) und der Klonierungsbereich zum definitiven Nachweis der erfolgreichen Rekombination und dem Ausschluss von Mutationen auf Basenebene sequenziert (→ 3.2.1.7).

### 3.2.6.3. Expression des Fusionsproteins

Die in die MCS des pTYB1-Plasmids klonierte Sequenz, welche für ein Vakzinierungsprotein kodieren soll, steht unter der Kontrolle eines T7-Promotors und einer stromabwärts gelegenen lac-Operatorsequenz. Im nicht induzierten Zustand ist die Hintergrundexpression des Klonierungsproduktes äußerst gering, da der ebenfalls auf dem Plasmid kodierte lac-Repressor die Expression des Fusionsproteins sowohl direkt durch Bindung an die lac-Operatorsequenz, wie auch indirekt durch Suppression der Expression der chromosomalen Kopie der T7-RNA-Polymerase unterdrückt, welche im Falle des E.coli-Stammes ER2566 in das lacZ-Gen einkloniert wurde und somit ebenfalls unter Kontrolle eines lac-Operons steht. Durch Zugabe von IPTG (=Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside), welches den lac-Repressor bindet, lässt sich die Suppression aufheben und die Expression der T7-Polymerase und damit des Fusionsproteins gezielt induzieren (siehe Abbildung 3-4).

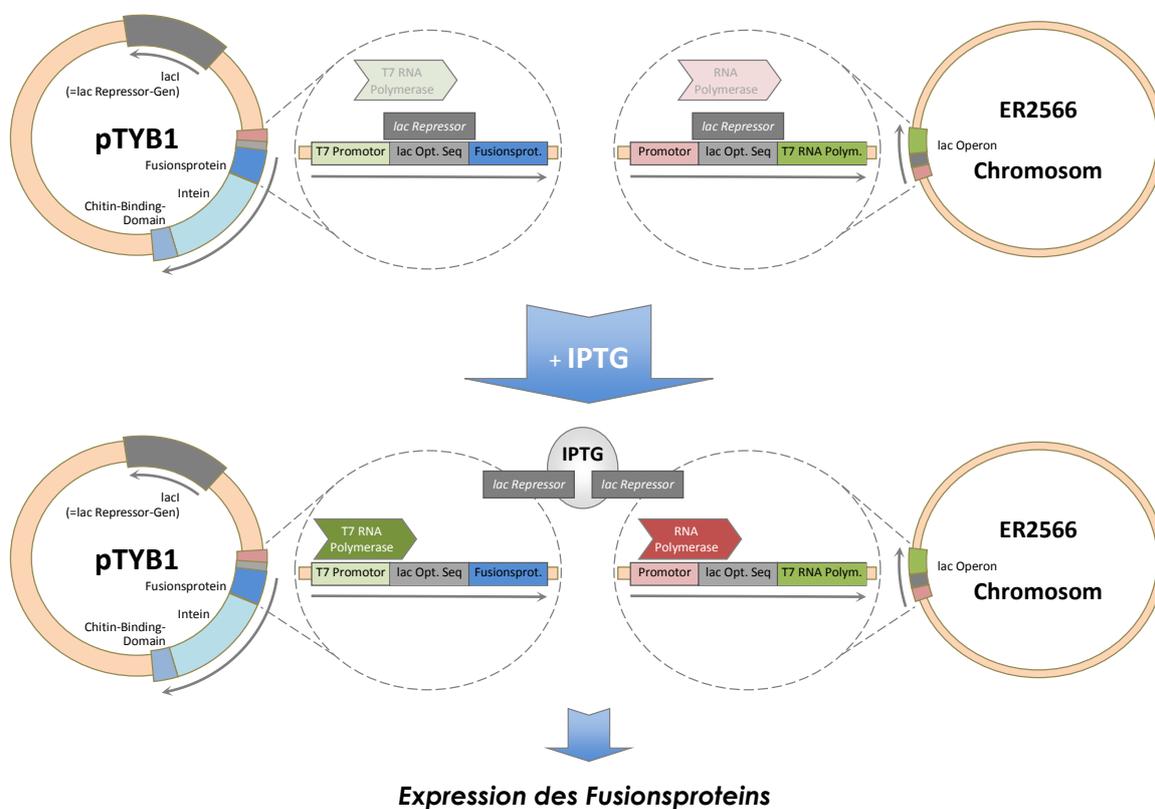


Abbildung 3-4: Übersicht über die genetischen Grundlagen der IPTG-induzierten Expression des Fusionsproteins im Impact-CN-System

Zur Etablierung der optimalen Expressionsbedingungen für eine spätere Aufreinigung des Fusionsproteins wurden e5'-e3'-MLC1-FP-transformierte ER2566-Zellen unter variierenden Inkubationsbedingungen folgendem Protokoll unterzogen:

1. **Anzüchtung:** 400 ml<sup>12</sup> Amp-LB-Medium wurden in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit einer frischen Kolonie e5'-e3'-MLC1-FP-transformierter ER2566-Zellen angeimpft und einige Stunden bis zu einer O.D. von 0,5 bei 37°C im Schüttler bei 150 rpm inkubiert.
2. **Expressionsinkubation:** Je 200 ml der Bakteriensuspension wurden in einen 500 ml Erlenmeyerkolben überführt, einem der beiden Kolben eine definierte Menge an IPTG zugegeben und beide Ansätze (IPTG<sup>+</sup>- und IPTG<sup>-</sup>-Ansatz) bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Um die optimale Inkubationstemperatur und -zeit zu bestimmen wurden verschiedene Inkubationsbedingungen getestet:

**Tabelle 3-7: Getestete IPTG-Konzentrationen und Inkubationstemperaturen und -zeiten zur Expression des Fusionsproteins**

Inkubationstemperatur	Inkubationszeit	IPTG-Konzentration
16°C <sup>#13</sup>	6 h	0,4 mM
	16 h <sup>#</sup>	0,3 mM
		0,4 mM <sup>#</sup>
		0,5 mM
22°C	3 h	0,4 mM
	6 h	0,4 mM
	16 h	0,4 mM
30°C	3 h	0,4 mM
	6 h	0,4 mM

# = vom Hersteller empfohlene Standardbedingungen

3. **Zentrifugation:** Anschließend wurden die Suspensionen in der Sorvall RC5C bei 5.000 g (6.400 rpm im SM-24-Rotor) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei -20°C eingefroren.

#### 3.2.6.4. Freisetzung der Zellproteine

Die Freisetzung der Zellproteine erfolgte über einen Zellaufschluss durch Ultraschallbehandlung. Hierzu wurde das Bakterienpellet zunächst mit 5 ml eisgekühltem Lysepuffer versetzt und durch rasches Auf- und Abpipettieren in Lösung gebracht. Anschließend wurde die Suspension in ein 10 ml Reagenzglas (Ø15 mm) überführt und dieses bis zur Höhe der Lösung in ein eisgekühltes Wasserbad gestellt. Ein 3 mm-Microtip Sonifier® Cell Disrupter (Branson) wurde ca. 5 mm in die Lösung eingetaucht und diese bei 80 W mittels eines Branson Sonifier® W-250 mit einer Ge-

<sup>12</sup> In einer Variation des Expressionsinkubationsansatzes wurde unter Standardinkubationsbedingungen (15°C, 16 h, 0,4 mM IPTG) die Medienmenge auf 800 ml erhöht.

<sup>13</sup> Eine Inkubation bei 15°C wurde durch Aufstellen der Inkubatoreinheit im Kühlraum (4°C) ermöglicht.

samtdosis von 36 kJ ( $\pm$  7,5 min Beschallung) in einem 1 s/2 s-Zyklus<sup>14</sup> beschallt<sup>15</sup>. Die hierbei verwendeten Parameter lehnten sich an die Ergebnisse einer Optimierungsstudie zum Ultraschall-Zellaufschluss aus E.coli-Bakterien von Felio und Mitarbeitern an (Felio et al. 1998). Die Temperatur der Probe stieg dabei maximal auf Werte von ca. 9°C an<sup>16</sup>. Im Anschluss an die Ultraschall-Applikation wurden 40 µl der Suspension entnommen, mit 20 µl 3×SDS-Puffer versetzt und für die spätere Analyse bei -20°C eingefroren (Probe 1), während die restliche Menge für 30 min bei 20.000 g in einer Sorvall RC5C zentrifugiert wurde. Abermals wurden 40 µl des Überstandes entnommen, mit 20 µl 3×SDS-Puffer versetzt und bei -20°C eingefroren (Probe 2). Der restliche Überstand wurde unmittelbar für die folgende Säulenreinigung verwendet. Zur Überprüfung der Löslichkeit des Fusionsproteins wurde in einigen Fällen das Pellet in 3 ml Lysepuffer resuspendiert und wiederum eine Probe von 20 µl mit 40 µl 3×SDS-Puffer versetzt und bei -20°C eingefroren.

### 3.2.6.5. Isolierung des Vakzinierungsproteins durch Chitinsäulenchromatographie und DTT-induzierte Selbst-Spleißung der Intein-Domäne

Zur Gewinnung des Vakzinierungsproteins aus der Gesamtprotein-Suspension wurde zunächst das Fusionsprotein durch Bindung an die Chitinsäule und anschließende Waschung aus der Gesamt-Protein-Menge isoliert. In einem zweiten Schritt konnte das Vakzinierungsprotein durch DTT-induzierte Selbst-Spleißung der Intein-Domäne abgetrennt und eluiert werden. Das Protokoll entsprach weitgehend den Herstellerangaben, die Arbeiten wurden (soweit nicht anders angegeben) bei 4°C ausgeführt.

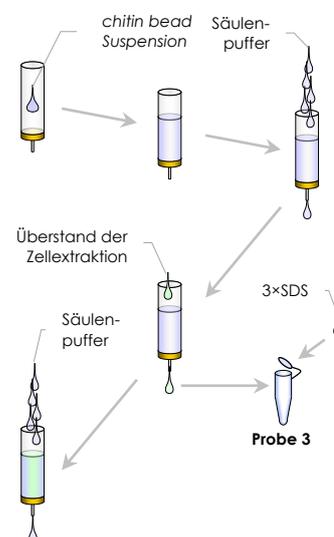
#### 1. Vorbereitung der Chitin-Säule

- Auftragen von 6 ml *chitin bead* Suspension auf eine 10 ml-Mobicol column<sup>17</sup> (Porengröße 35 µm)
- Äquilibrierung mit 60 ml Säulenpuffer

#### 2. Beladen der Chitin-Säule mit dem Fusionsprotein

- Langsames Auftragen des Überstandes (aus 3.2.6.4) auf die Chitin-Säule (ca. 0,5 ml/min)
- Probe 3<sup>18</sup>: 40 µl des Durchflusses

#### 3. Waschen der Chitin-Säule mit 100 ml Säulenpuffer (ca. 1 ml/min)



<sup>14</sup> „1 s/2 s-Zyklus“ bedeutet, dass auf eine Beschallung von 1 s Dauer zur Begrenzung des Temperaturanstieges der Probe eine 2-sekündige Pause folgte.

<sup>15</sup> Weitere getestete Energiedosen bei Standard-Inkubationsbedingungen waren 18 kJ ( $\pm$  3,75 min) und 72 kJ ( $\pm$  15 min).

<sup>16</sup> Ergebnis von Vorversuchen unter gleichen Bedingungen.

<sup>17</sup> Das Säulenvolumen sank durch Sedimentation der beads auf der Säule auf etwa 4,5 ml zusammen.

<sup>18</sup> Diese und folgende Proben wurden im Verhältnis 2:1 mit 3×SDS-Puffer versetzt und zur späteren Analyse bei -20°C eingefroren.

#### 4. Abtrennung des Vakzinierungsproteins:

- Schnelles Durchspülen der Säule mit 18 ml 50 mM DTT<sup>19</sup> oder  $\beta$ -Mercaptoethanol-Lösung<sup>20</sup>
- Probe 4: 40  $\mu$ l des Durchflusses
- Stoppen des Durchflusses und Inkubation bei 4°C ÜN<sup>21</sup>

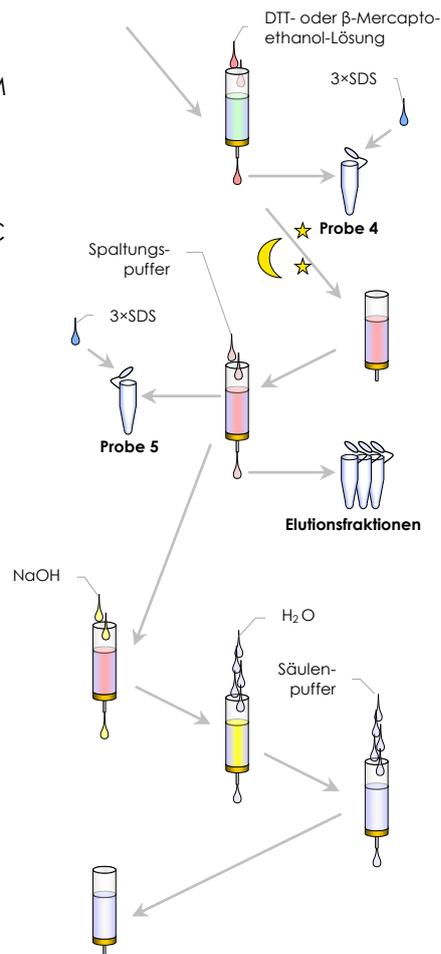
#### 5. Elution des Vakzinierungsproteins

- Auftragen von 18 ml Spaltungspuffer *ohne* DTT  
→ Auffangen von 18  $\times$  1 ml-Elutionsfraktionen
- Probe 5: 100  $\mu$ l der *chitin beads*. Nach Versetzen mit 50  $\mu$ l 3 $\times$ SDS-Puffer Aufkochen für 5 min und Einfrieren bei -20°C

#### 6. Regeneration der Säule

Insgesamt wurde jede Säule fünfmal regeneriert:

- Auftragen von 18 ml 0,3 M NaOH  
→ nach Durchfluss 30 min Inkubation
- Waschen mit 120 ml H<sub>2</sub>O
- Waschen mit 30 ml Säulenpuffer
- Lagerung bei 4°C



Sofern die Elutionsfraktionen nicht unmittelbar zur Konzentrationsbestimmung weiterverwendet wurden ( $\rightarrow$ 3.2.6.6), wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

#### 3.2.6.6. Nachweis des Vakzinierungsproteins

##### Quantitativer Proteinnachweis mittels photometrischer Proteinbestimmung

Um eine erste Bestimmung der Konzentration des Vakzinierungsproteins in den Durchflussfraktionen vorzunehmen, wurden 100  $\mu$ l des Durchflusses in eine Uvette® gegeben und die Extinktion bei 280 nm mit einem Eppendorf Biophotometer bestimmt. Aromatische Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan und in geringerem Umfang Phenylalanin) absorbieren ultraviolettes Licht mit einem Maximum bei 280 nm. Durch Messung der Extinktion bei dieser Wellenlänge kann bei Kenntnis des Gehaltes an aromatischen Aminosäuren und somit des proteinspezifischen Extink-

<sup>19</sup> Frisch angesetzt aus 1 M DTT-Stock-Lösung (0,9 ml) in Cleavage Buffer (17,1 ml)

<sup>20</sup>  $\beta$ -Mercaptoethanol-Lösung wurde nur in zwei Ansätzen als Variation des Standardprotokolls getestet.

<sup>21</sup> Weitere getestete Inkubationsbedingungen (bei Standard-Expressionsinkubationsbedingungen) waren 8 h bei 16°C und 22°C.

tionskoeffizienten, der im Falle des Vakzinierungspeptides  $19.605 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-122}$  betrug, die Proteinkonzentration abgeschätzt werden:

**Formel 3-8**

$$C_{\text{Vakzinierungsprotein}} = \frac{OD_{280 \text{ nm}}}{19.605 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \times 13.287 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \times 1 \text{ cm} = \mathbf{0,678 \frac{\text{g}}{\text{l}} \times OD_{280 \text{ nm}}}$$

#### Quantitativer Proteinnachweis mittels Bradford-Assay

Eine genauere Bestimmung der Proteinkonzentration unabhängig vom Gehalt der aromatischen Aminosäuren ermöglicht der Bradford-Assay (Bradford 1976), der auf dem Prinzip der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G von 465 nm zu 595 nm im Falle einer Bindung des Farbstoffs an Proteine beruht. Hierzu wurden je 50  $\mu\text{l}$  jeder Durchfluss-Fraktion mit 50  $\mu\text{l}$  Bradford Reagent (Sigma) versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Dem gleichen Verfahren wurde eine Standardreihe aus BSA-Lösungen (Zielkonzentrationen in  $\mu\text{g/ml}$ : 0 – 1 – 2,5 – 5 – 10 – 20) unterworfen und nach Messung aller Extinktionswerte bei 595 nm anhand dieser Messreihe die Proteinkonzentration der Durchfluss-Fraktionen errechnet.

#### Qualitativer Proteinnachweis mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Der qualitative Nachweis des Vakzinierungsproteins in den Elutionsfraktionen sollte mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie-Färbung geführt werden:

#### *Konzentrierung der Proteinlösung durch Azetonfällung*

Um die Konzentration des Proteins zu erhöhen, wurden zunächst den Elutionsfraktionen mit den höchsten Absorptionsraten im Bradford-Assay 200  $\mu\text{l}$  entnommen und mit 600  $\mu\text{l}$  Azeton vermischt, gründlich gemischt und für 30 min bei  $-20^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 10.000 g für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet<sup>23</sup> kurze Zeit an der Luft getrocknet und schließlich in 40  $\mu\text{l}$  1 $\times$ SDS-Puffer gelöst.

#### *SDS-PAGE*

Das Prinzip der SDS-PAGE beruht auf der Eigenschaft von SDS, aufgrund seiner amphiphilen Struktur eine Hülle um den Aminosäurestrang zu bilden und so zum einen proteininterne Wasserstoffbrückenbindungen aufzuheben, zum anderen die Eigenladung des Proteins mit einer konstanten, der Proteingröße proportionalen negativen Ladung zu überdecken. Ein so bedeck-

<sup>22</sup> Zur Berechnung siehe <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>

<sup>23</sup> Ein eindeutiges Pellet war nicht in allen Fällen zu sehen.

tes Protein wandert im elektrischen Feld eines Polyacrylamidgels von der Kathode zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zur Ladung und somit zur Größe des Proteins ist. Auf diese Weise lassen sich Proteingemische nach der Größe ihrer Proteine weitgehend unabhängig von Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen auftrennen<sup>24</sup> (Laemmli 1970).

Um ein möglichst großes Proteingrößenspektrum analysieren zu können wurden in dieser Arbeit 4-12%-SDS-Gradientengele auf Bis-Tris-Basis verwendet, deren neutraler pH-Wert im Gegensatz zu den klassischen alkalischen Tris-Glycin-Gelen eine höhere Stabilität der reduzierten Proteine und eine längere Haltbarkeit der Gele verspricht. Der Laufpuffer MES ermöglichte eine Auftrennung von Proteinen bis zu einer Größe von wenigen kDa.

Je 6,5 µl der während der Aufreinigung gewonnenen Proben und der aufkonzentrierten Elutionsfraktionen wurden mit 2,5 NuPAGE® LDS Sample Buffer und 1 µl NuPAGE® Reducing Agent (10×)<sup>25</sup> vermischt und für 10 min auf 70°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzulösen und eine gute SDS-Umhüllung des Aminosäurestranges zu erreichen. Anschließend wurden die Ansätze zusammen mit 5 µl Mark12™-Marker (Invitrogen) auf ein SDS-NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel (1.0 mm, 12 wells; Invitrogen) aufgetragen und das Gel für 35 min in MES-Puffer (Invitrogen) und in einer Novex™ XCELL II™ Mini Cell (Novex) einem elektrischen Feld von 200 V (Biometra Elektrophorese-Powerpack P24, CONSORT E835 und CONSORT E844) ausgesetzt.

### Coomassie-Färbung

Zur Detektion der Proteinbanden in den SDS-Gelen wurden diese mit kolloidalem Coomassie-Brilliant-Blau G-250 (CBB) nach der Methode von Neuhoff gefärbt, welche auf der unspezifischen Bindung von CBB an Proteine beruht und aufgrund der kolloidalen Struktur von CBB eine vergleichsweise geringe Hintergrundfärbung verursacht (siehe Tabelle 3-8; Neuhoff et al. 1988). Die untere Nachweisgrenze bei diesem Verfahren liegt bei ca. 5-20 ng/Bande.

**Tabelle 3-8: Coomassie-Färbung**

Schritt	Puffer	Zeit
Fixierung	Fixierungspuffer	1,5 h
Waschen	H <sub>2</sub> O (Milli-Q-Wasser)	3 × 10 min
Äquilibrierung	Äquilibrierungspuffer	1 h
Färbung	Färbepuffer	2-24 h
Entfärbung	H <sub>2</sub> O (Milli-Q-Wasser)	1-24 h

<sup>24</sup> Eventuell vorhandene Disulfidbrücken können durch Zugabe von reduzierenden Agenzien (z.B. DTT) gelöst werden.

<sup>25</sup> Da das Vakzinierungsprotein drei Cysteinreste enthält, wurde sicherheitshalber ein reduzierendes Agens zugegeben.

Die Färbung wurde gestoppt, sobald eindeutige Banden im Gel gut zu erkennen waren. Die Entfärbung wurde beendet, sobald ein guter Banden-Hintergrund-Kontrast erreicht war.

Im Anschluss an die Entfärbung wurden die Gele im Auflicht vor weißem Hintergrund fotografiert.

### 3.2.7. Software

#### Programme

- geNorm 3.5, Primer design Ltd.
- ABI Prism 310 Data Collecting V2.0
- ABI Prism DNA Sequencing Analysis 3.4
- iCycler IQ Version 3.1.7050, Bio-Rad
- VectorNT Advance 11.0, Invitrogen
- Quantity One 4.6.9, Bio-Rad
- Microsoft Office 2010
- Corel Paint Shop Professional 10.0

#### Online-Tools

*Bestimmung der Antigenität von Proteinabschnitten:*

IEDB Analysis Resource ([http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb\\_input](http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input))

- Karplus & Schulz Flexibility Prediction
- Bepipred Linear Epitope prediction
- Emini Surface Accessibility Prediction
- Parker Hydrophilicity Prediction

*Bestimmung von Transmembrandomänen:*

- "DAS" - Transmembrane Prediction server (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>)
- HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/index.html>)
- TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)
- TMpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html))
- TopPred (<http://bioweb.pasteur.fr/seganal/interfaces/toppred.html>)
- SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Vergleich der zerebralen *MLC1/Mlc1*-Expression bei Mensch und Maus mittels *In Situ*-Hybridisierung

Zur vergleichenden Bestimmung des regionalen und zellulären Verteilungsmusters der Transkription von *MLC1/Mlc1* im humanen und murinen Gehirn wurde eine ISH mit DIG-gekoppelten *MLC1/Mlc1*-Antisense-Sonden in Gewebeschnitten aus dem Cerebellum und dem Hippocampus von zwei C57 BL/6-Mäusen und zweier Menschen durchgeführt<sup>26</sup>. Zur Sicherstellung der Spezifität wurden die Färbungen parallel mit Antisense- und Sense-Sonden vorgenommen.

#### 4.1.1. Herstellung der cRNA-Sonden zur *In Situ*-Hybridisierung

Die Herstellung der benötigten Sonden für die ISH mithilfe der *In vitro*-Transkription erfolgte ausgehend von zwei pGEM®-T-Vektoren, in die jeweils ca. 1,2 kB des kodierenden Bereiches der humanen bzw. murinen *MLC1/Mlc1*-cDNA einkloniert worden waren (Schmitt et al. 2003). Mit Hilfe zweier unterschiedlicher Promotoren (T7 und Sp6), die wenige Basenpaare außerhalb der MCS jeweils stromaufwärts auf dem Sense- bzw. Antisense-Strang lagen, ließen sich gezielt RNA-Transkripte des Antisense- bzw. Sense-Stranges erzeugen.

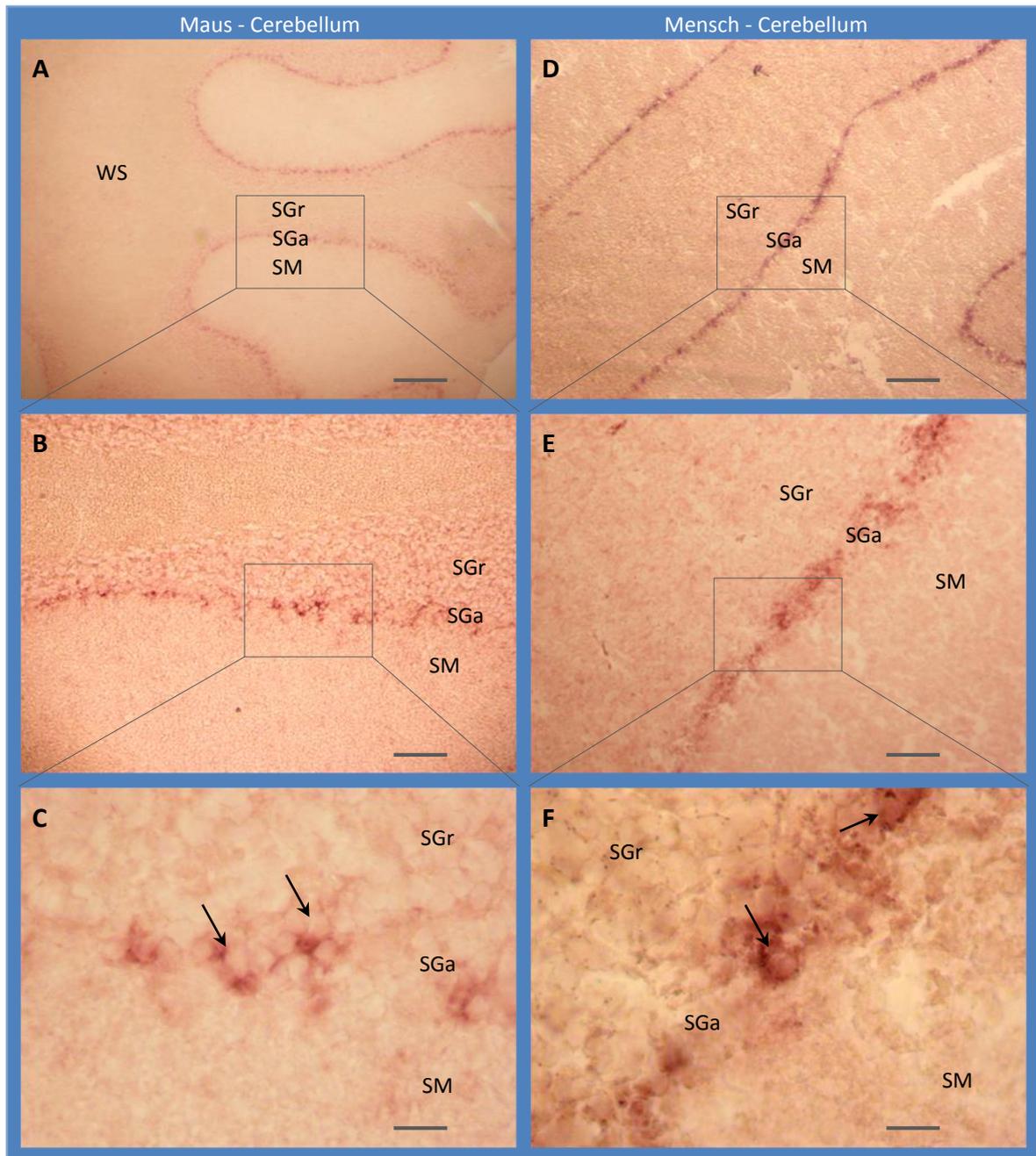
Alle vier Sonden konnten anschließend in der photometrischen Messung in ausreichender Konzentration nachgewiesen werden. Die qualitative Überprüfung in der Gelelektrophorese erbrachte die erwarteten Banden bei ~1,26 kB.

#### 4.1.2. *In Situ*-Hybridisierung humaner und muriner Gehirnschnitte

In der ISH des murinen und humanen Cerebellums zeigte sich bei Verwendung der Antisense-*MLC1/Mlc1*-cRNA-Sonde ein ausgeprägt rötlich gefärbtes Band innerhalb der grauen Substanz, das histologisch der Purkinjezellschicht (Stratum ganglionare) zwischen Körnerzellschicht (Stratum granulosum) und Molekularschicht (Stratum moleculare) entsprach und sich in nahezu gleichbleibender Intensität über das gesamte Cerebellum erstreckte (Abbildung 4-1A/D). Innerhalb der Purkinjezellschicht war die Signalintensität heterogen verteilt: Neben zahlreichen nicht gefärbten Zellen fanden sich etliche Zellen mit deutlicher Färbung, die anhand ihrer Größe, Lage und Form als Bergmann-Gliazellen identifiziert werden konnten (Abbildung 4-1C/F). Intrazellulär besaßen Zellsoma und proximale Fortläufer dabei eine weitgehend gleichmäßige Färbung mit lediglich vereinzelt Regionen höherer Signalstärke und Aussparungen im Bereich der Zellkerne. Distale Fortsätze oder Axone mit Signalhervorhebungen waren nicht zu erkennen.

---

<sup>26</sup> Im Folgenden werden nur repräsentative Aufnahmen je eines Individuums verwendet.



**Abbildung 4-1: Vergleich des Verteilungsmuster von *Mlc1*- und *MLC1*-mRNA in murinen und humanen Kleinhirnschnitten mittels *In Situ*-Hybridisierung.**

Cerebelläre Gefrierschnitte einer Maus (A, B, C) und eines Menschen (D, E, F) wurden mit DIG-markierter *Mlc1/MLC1*-CDS-cRNA (Sense/Antisense) hybridisiert und die cRNA mittels aP-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper sichtbar gemacht.

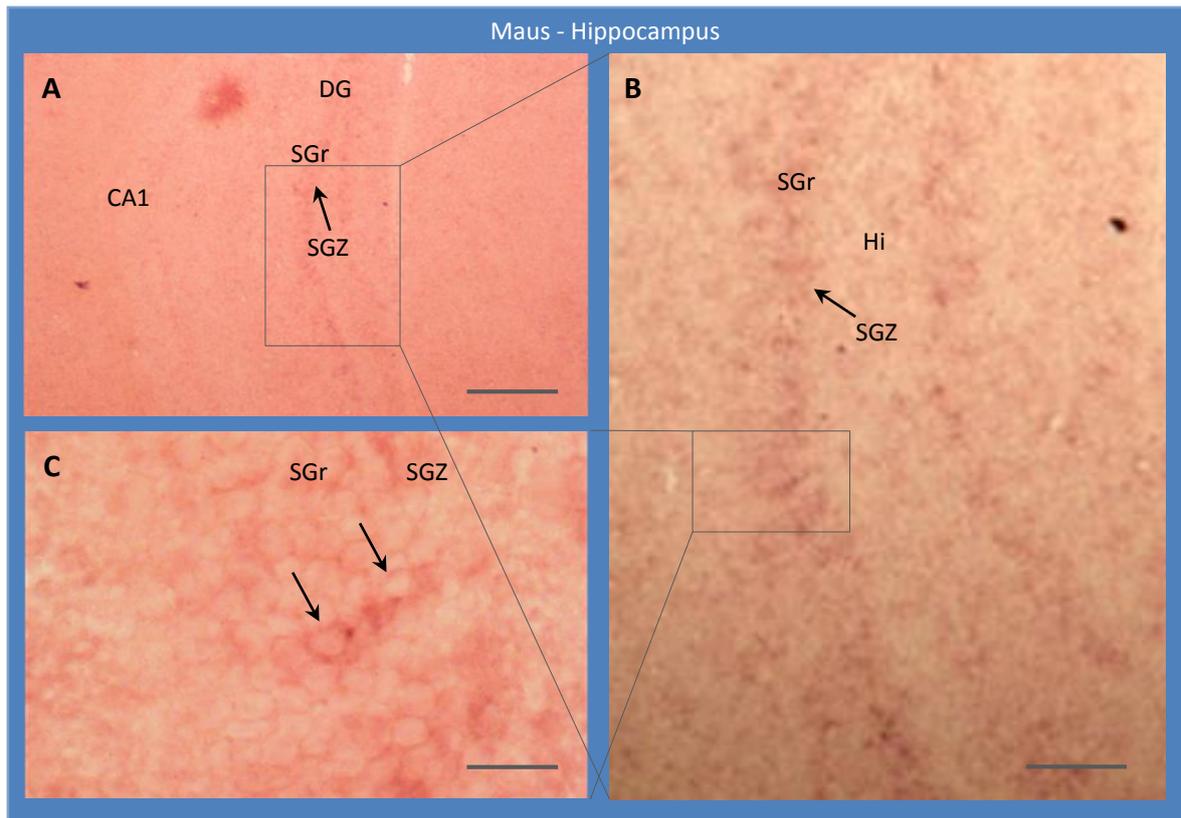
In der *Antisense*-Hybridisierung (A-F) eindeutig zu erkennen sind hohe Signalstärken in der Purkinjezellschicht (Stratum ganglionare = SGa: A, D), die eine heterogene Verteilung (B, E) aufweisen. Sie beschränken sich auf wenige Zellen der Purkinjezellschicht (C, F), die aufgrund ihrer Lage und Größe Bergmann-Gliazellen entsprechen. Intrazellulär findet sich eine gleichmäßige Signalverteilung im Soma und den proximalen Zellfortsätzen mit einer Aussparung der Zellkerns (C/F). Die *In Situ*-Hybridisierungen mit *Sense*-cRNA erbrachten keinerlei Signalhervorhebungen (Bilder werden nicht gezeigt). Regionale und zelluläre ISH-Signalmuster bei Maus und Mensch sind weitgehend identisch.

Länge der Skalenlinie: A/D: 400  $\mu$ m, B/E: 100  $\mu$ m, C/F: 25  $\mu$ m; SGr = Stratum granulosum, SM = Stratum moleculare, SGa = Stratum ganglionare, WS = Weiße Substanz

Andere cerebelläre Bereiche wie die cerebellären Nuclei, die weiße Substanz, oder die übrigen Schichten der grauen Substanz zeigten keine erkennbare Signalhäufungen, wobei gefärbte Zellen, die in Größe und Form meist ebenfalls als Astrozyten einzuordnen sind, vereinzelt und z.T. mit recht schwacher Signalstärke über das gesamte Cerebellum verteilt gefunden werden konnten (z.B. Abbildung 4-1E: AZ).

Die *Mlc1*-Antisense-ISH des Hippocampus bei der Maus zeigte im Vergleich zum Cerebellum geringere Signalstärken. Gefärbte Zellen, die aufgrund der Größe und des Verteilungsmusters wiederum am ehesten als Astrozyten einzuordnen sind, fanden sich verstreut über den gesamten Hippocampus mit einer deutlich erkennbaren Häufung im Bereich der subgranulären Zone des Gyrus dentatus (Abbildung 4-2B/C).

Demgegenüber konnten in der *MLC1*-Antisense-ISH des Hippocampus beim Menschen überraschenderweise keine Signale festgestellt werden (Bilder nicht gezeigt). Dies mag entweder auf einer tatsächlich unterhalb der Detektionsschwelle liegenden Transkriptionsaktivität für *MLC1* im humanen Hippocampus zurückzuführen sein, oder auf einer technisch bedingt geringeren Qualität der humanen Schnitte (längere Post-Mortem-Zeit) und/oder einer möglicherweise geringeren Sensitivität der humanen Antisense-*MLC1*-Sonde beruhen.



**Abbildung 4-2: Darstellung der Verteilungsmuster von *Mlc1*-mRNA in murinen Hippocampus-Gewebeschnitten mittels *In Situ*-Hybridisierung.**

Gefrierschnitte des Hippocampus einer adulten Maus wurden mit DIG-markierter *Mlc1*-CDS-cRNA (Sense/Antisense) hybridisiert und die cRNA mittels aP-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper sichtbar gemacht.

In der *Antisense*-Hybridisierung lassen sich im gesamten murinen Hippocampus verstreut liegende angefärbte Zellen finden. Eine Anhäufung dieser Zellen findet sich in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus, die als heterogen gefärbtes Band erkennbar hervortritt (A, B). Innerhalb dieses Bandes liegen einzelne angefärbte Zellen (Pfeile in C), deren Morphologie und Verteilungsmuster astrozytär erscheint.

Länge der Skalenlinie: A: 400  $\mu$ m, B: 100  $\mu$ m, C: 25  $\mu$ m; CA1 = Cornu Ammonis 1, DG = Gyrus dentatus, Hi = Hilus, SGZ = subgranuläre Zone, SGr = Stratum granulosum

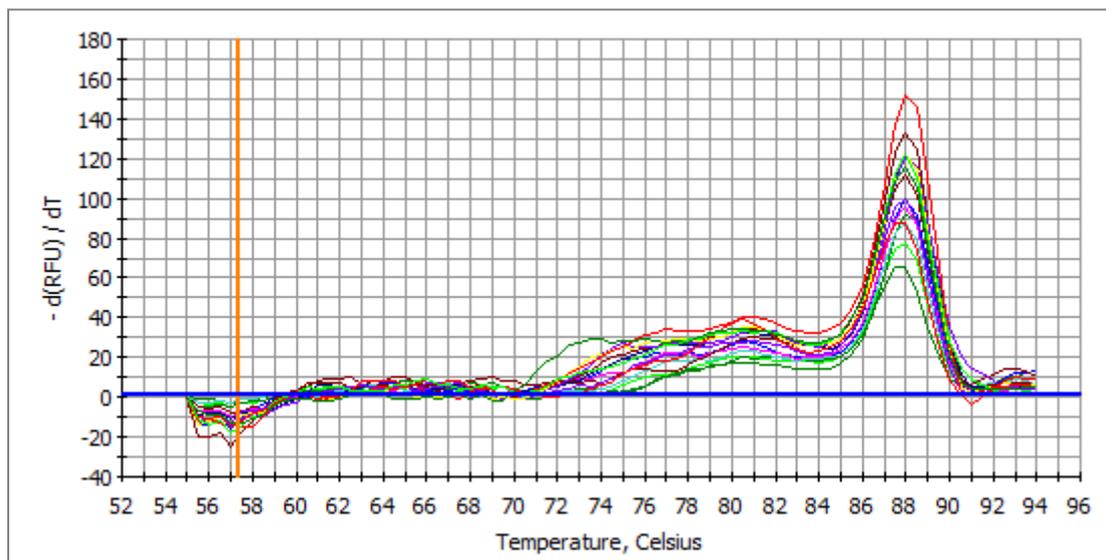
Die zur Überprüfung der Spezifität der Antisense-*MLC1/Mlc1*-Sonden durchgeführte Hybridisierung mit Sense-*MLC1/Mlc1*-Sonden ergab erwartungsgemäß weder im Cerebellum noch im Hippocampus eine erkennbare Signalbildung (Bilder nicht gezeigt). Daraus kann geschlossen werden, dass die festgestellten Färbungen im Falle der Antisense-*MLC1/Mlc1*-Sonden tatsächlich spezifisch die transkribierte *MLC1/Mlc1*-mRNA in den gefärbten Zellen anzeigten.

## 4.2. Bestimmung der relativen *MLC1*-Expression in verschiedenen humanen Geweben durch qRT-PCR

Zur genaueren Charakterisierung der biologischen Bedeutung von *MLC1* wurde seine relative Transkriptionsstärke in cDNA-Proben unterschiedlicher humaner Gewebe mittels qRT-PCR bestimmt. Hierzu wurden Post-Mortem-Proben aus 16 Gehirnregionen eines Menschen A und Proben aus vier Gehirnregionen und sechs nicht-neuralen Geweben eines zweiten Menschen B untersucht. Die gemessenen primären Expressionsraten von *MLC1* wurden anhand der geometrischen Mittelwerte der primären Expressionsraten der Housekeeping-Gene *GAPDH*,  $\beta$ -Aktin und *L13a* (Menschen A und B) sowie *ARP* und *Cyclophilin* (Mensch B) unter Zuhilfenahme der Software geNORM normalisiert und ausgewertet (Vandesompele et al. 2002).

### 4.2.1. Erhebung der Primärdaten

Die Fluoreszenzwerte der einzelnen PCR-Ansätze in ihrem zeitlichen Verlauf wurden mittels der Software iCycler iQ® erfasst und aufgezeichnet. Anschließend wurde der Schmelzkurvenverlauf aller Proben analysiert und die Spezifität der PCR durch den Nachweis einzelner Peaks bei der erwarteten Schmelztemperatur verifiziert ( $\rightarrow$  Abbildung 4-3).



**Abbildung 4-3: Exemplarischer Schmelzkurvenverlauf der Verdünnungsreihe von *MLC1***

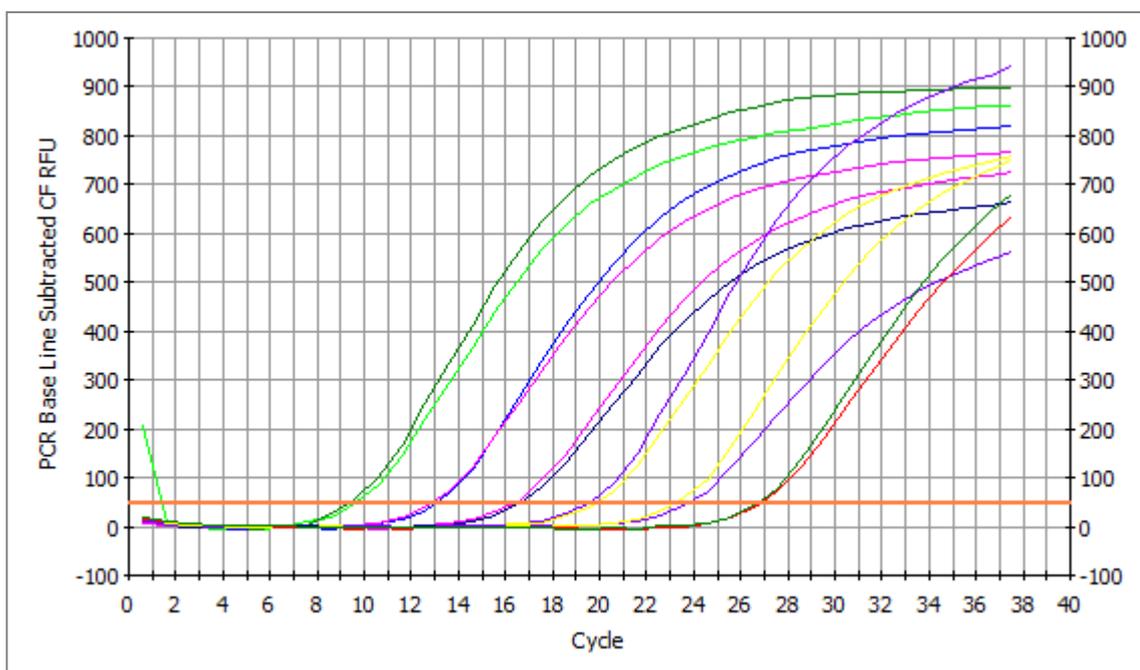
Abszisse: Temperatur [°C], Ordinate: Negative Ableitung der RFU-Werte nach der Temperatur. Das Vorhandensein eines einzelnen Peaks (*MLC1*:  $\sim 88^\circ\text{C}$ ) entspricht gut der spezifischen Amplifikation eines definierten PCR-Fragmentes (*MLC1*: 149 bp) an. [Abbildung übernommen aus iCycler iQ®]

Die anhand einer Standardverdünnungsreihe ( $10^{-1}$  ng/ $\mu\text{l}$  bis  $10^{-6}$  ng/ $\mu\text{l}$ ) gemessenen PCR-Effizienzen lagen zwischen 90,1% und 108,4%, die Korrelationskoeffizienten zwischen 0,986 und 0,999 ( $\rightarrow$  Tabelle 4-1).

**Tabelle 4-1: Effizienzen und Korrelationskoeffizienten der durchgeführten qRT-PCRs**

Gen	Anzahl der Gewebe	Effizienz	Korrelationskoeffizient
<b>Mensch A</b>			
<i>GAPDH</i>	16	108,4%	0,999
$\beta$ -Aktin	16	90,1%	0,996
<i>L13a</i>	16	98,3%	0,998
<i>MLC1</i>	16	96,0%	0,996
<b>Mensch B</b>			
<i>GAPDH</i>	10	107,6%	0,989
$\beta$ -Aktin	10	106,5%	0,991
<i>L13a</i>	10	107,6%	0,987
<i>ARP</i>	10	99,3%	0,995
<i>Cyclophilin</i>	10	94,1%	0,986
<i>MLC1</i>	10	105,4%	0,998

Die Grundlinienzyklen und Schwellenwertfluoreszenzen zur Bestimmung der Ct-Werte wurden automatisch bestimmt und lediglich die Schwellenwerte in wenigen Fällen manuell leicht nachjustiert. Als Analysemethode wurde die Standardeinstellung „PCR Base Line Subtracted Curve fit“ gewählt (→ Abbildung 4-4).



**Abbildung 4-4: Exemplarischer Verlauf einer Verdünnungsreihe (Etablierungsphase ARP)**

Abszisse: Zykluszahl, Ordinate: Relative Fluoreszenzstärke. Die jeweils doppelten Kurven bei einzelnen Verdünnungsstufen entsprechen zwei parallelen PCR-Ansätzen.

Aus den gemessenen Ct-Werten konnten primäre Quantitäten berechnet werden, welche zum Vergleich der differentiellen Genexpression der Housekeeping-Gene in normalisierte Quantitäten überführt wurden.

Abschließend wurden mit Hilfe der Software geNorm die Stabilität der Housekeeping-Gene überprüft und ein Vergleich der differentiellen *MLC1*-Expression in unterschiedlichen neuronalen und nicht-neuronalen Geweben anhand der bezüglich der Housekeeping-Genexpression normalisierten *MLC1*-Expressionswerte durchgeführt (Vandesompele et al. 2002).

#### 4.2.2. Ergebnisse der qRT-PCR der Housekeeping-Gene

Erwartungsgemäß konnten in allen Proben bei allen Housekeeping-Genen spezifische PCR-Amplifikate nachgewiesen werden, wenngleich sich die primären Quantitäten je nach Gen unterschieden (siehe Tabelle 4-2). Innerhalb der Gewebe eines Menschen ließ sich das höchste Expressionsniveau für das Gen *β-Aktin* bestimmen, das niedrigste für *Cyclophilin*. Die Proben des Menschen B enthielten insgesamt weniger Template als die Proben des Menschen A.

**Tabelle 4-2: Geometrische Mittelwerte der primären Quantitäten der Housekeeping-Gene aller getesteten Gewebe**

Gen	Mensch A	Mensch B
<i>GAPDH</i>	$1,18 \times 10^{-6}$	$0,17 \times 10^{-6}$
<i>β-Aktin</i>	$20,64 \times 10^{-6}$	$0,86 \times 10^{-6}$
<i>L13a</i>	$5,33 \times 10^{-6}$	$0,11 \times 10^{-6}$
<i>ARP</i>		$0,10 \times 10^{-6}$
<i>Cyclophilin</i>		$0,02 \times 10^{-6}$

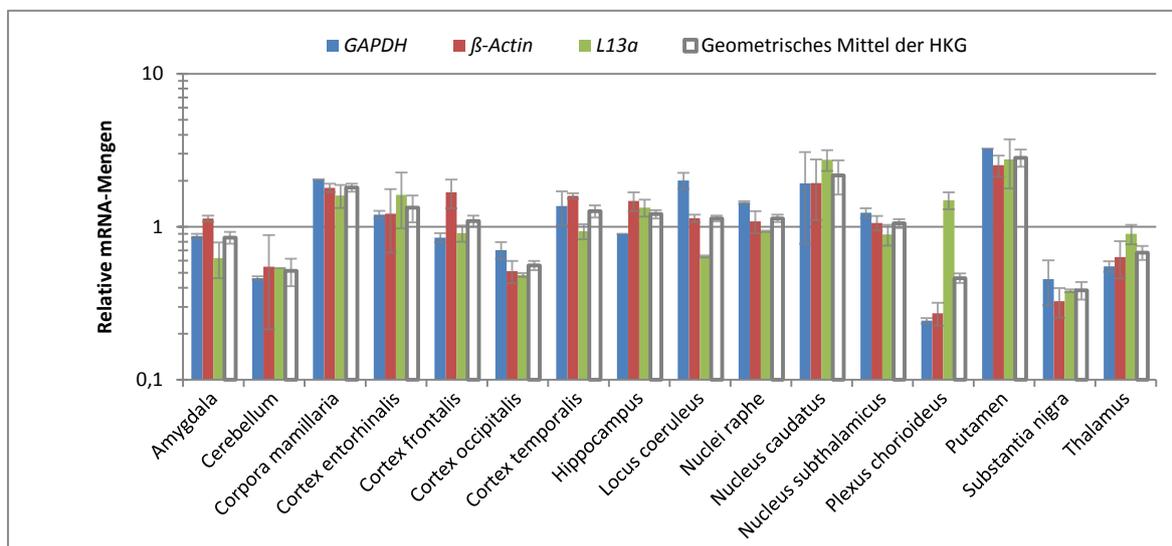
Der Stabilität der ausgewählten Housekeeping-Gene war ausreichend – in allen Fällen unterschritt der M-Wert den angestrebten Grenzwert von 1,5 (siehe Tabelle 4-3). Die größte Stabilität besaßen die Gene *β-Aktin* (Mensch A) bzw. *L13a* (Mensch B), die geringste Stabilität die Gene *L13a* (Mensch A) bzw. *GAPDH* (Mensch B), wobei darauf hinzuweisen ist, dass im Falle des Menschen A die Gewebe mit Ausnahme des Plexus chorioideus ausschließlich neuronalen Ursprungs waren, während bei Mensch B auch nicht-neurale Gewebe getestet wurden.

**Tabelle 4-3: M-Werte als Indikatoren der Stabilität der Gene *GAPDH*, *L13a*, *β-Aktin*, *ARP* und *Cyclophilin***

Gen	Mensch A	Mensch B
<i>GAPDH</i>	0,691	1,233
<i>β-Aktin</i>	0,636	0,821
<i>L13a</i>	0,860	0,790
<i>ARP</i>	-	0,827
<i>Cyclophilin</i>	-	0,953

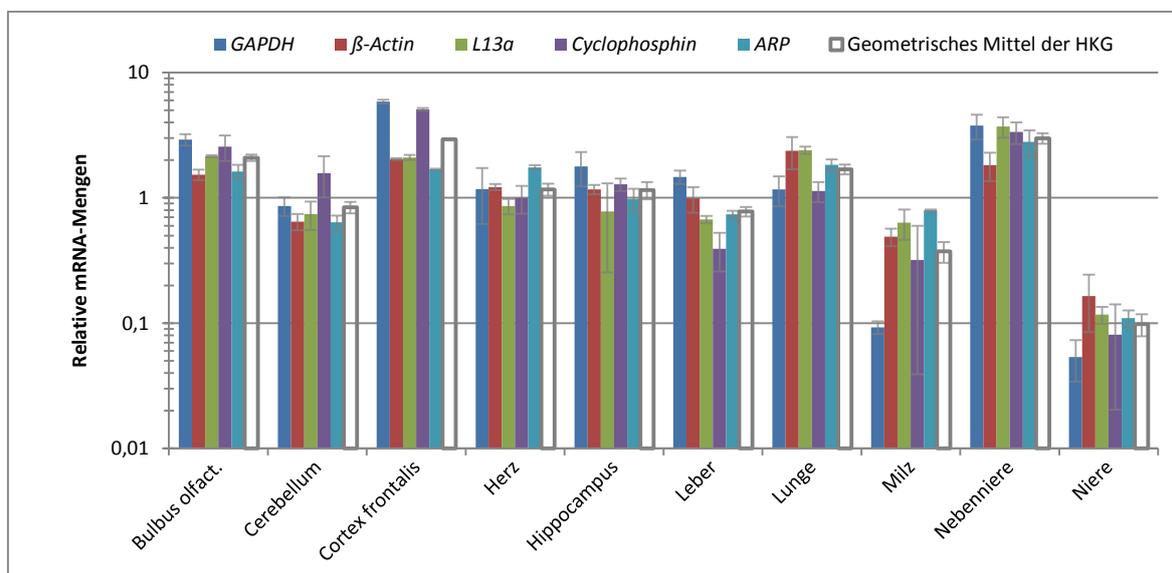
Zielwert:  $M < 1,5$ ; nach (Vandesompele et al. 2002).

Die normalisierten geometrischen Mittelwerte der Housekeeping-Gene und damit die angenommene Template-Menge in den Proben schwankten bei Mensch A (siehe Abbildung 4-5) zwischen  $0,46 \pm 0,03$  (Plexus chorioideus) und  $2,8 \pm 0,36$  (Putamen), bei Mensch 2 (siehe Abbildung 4-6) zwischen  $0,1 \pm 0,02$  (Niere) und  $2,9 \pm 0,30$  (Nebenniere).



**Abbildung 4-5: Normalisierte Quantitäten der Housekeeping-Gene GAPDH,  $\beta$ -Aktin und L13a in verschiedenen Gehirnregionen des Menschen A**

Abszisse: Gewebe, Ordinate: bezüglich der geometrischen Mittelwerte des jeweiligen Gens normalisierte Quantitäten (logarithmiert). Standardabweichungen bei Mehrfachmessungen werden durch Indikatorbalken angezeigt. Berechnungsgrundlagen siehe 3.2.5.



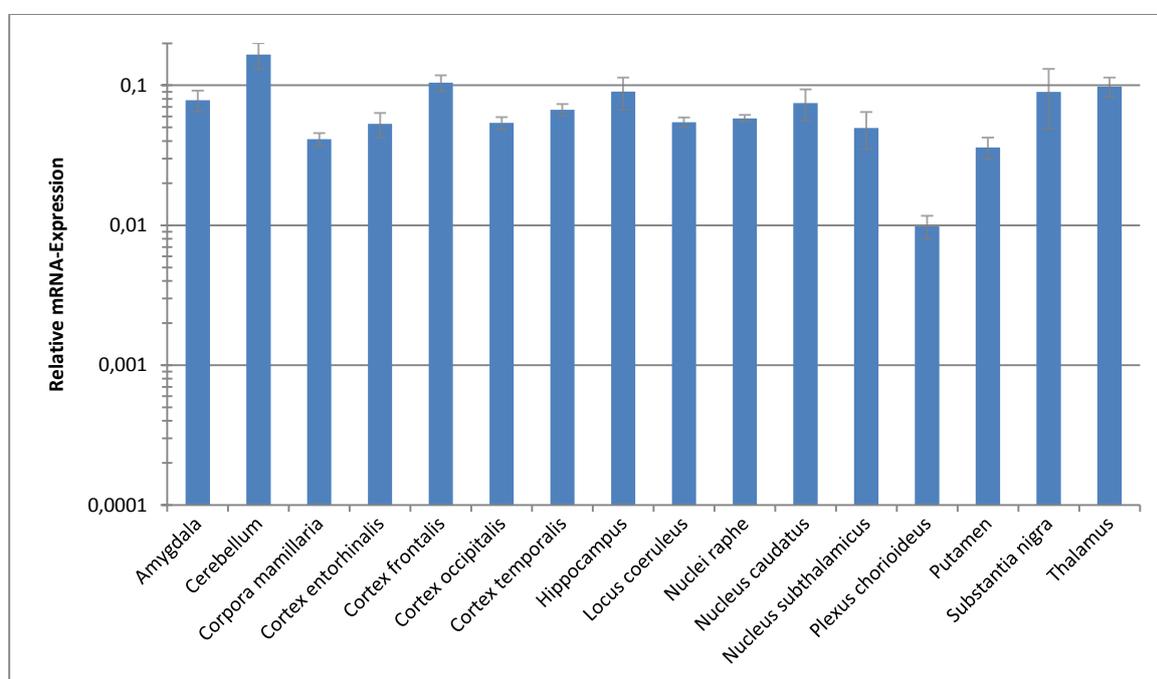
**Abbildung 4-6: Normalisierte Quantitäten der Housekeeping-Gene GAPDH,  $\beta$ -Aktin, L13a, ARP und Cyclophilin in verschiedenen Gehirnregionen und nicht-neuralen Geweben des Menschen B**

Abszisse: Gewebe, Ordinate: bezüglich der geometrischen Mittelwerte eines Gens (bzw. aller Gene) normalisierte Quantitäten (logarithmiert). Standardabweichungen bei Mehrfachmessungen werden durch Indikatorbalken angezeigt. Berechnungsgrundlagen siehe 3.2.5.

### 4.2.3. Ergebnisse der qRT-PCR von *MLC1*

Um die Expressionsstärken von *MLC1* in unterschiedlichen Gehirnregionen und in nicht-neuralen Geweben zu vergleichen, wurden die primären Quantitäten der *MLC1*-qRT-PCRs anhand der Expressionsstärken der Housekeeping-Gene auf ein Skalenniveau normalisiert.

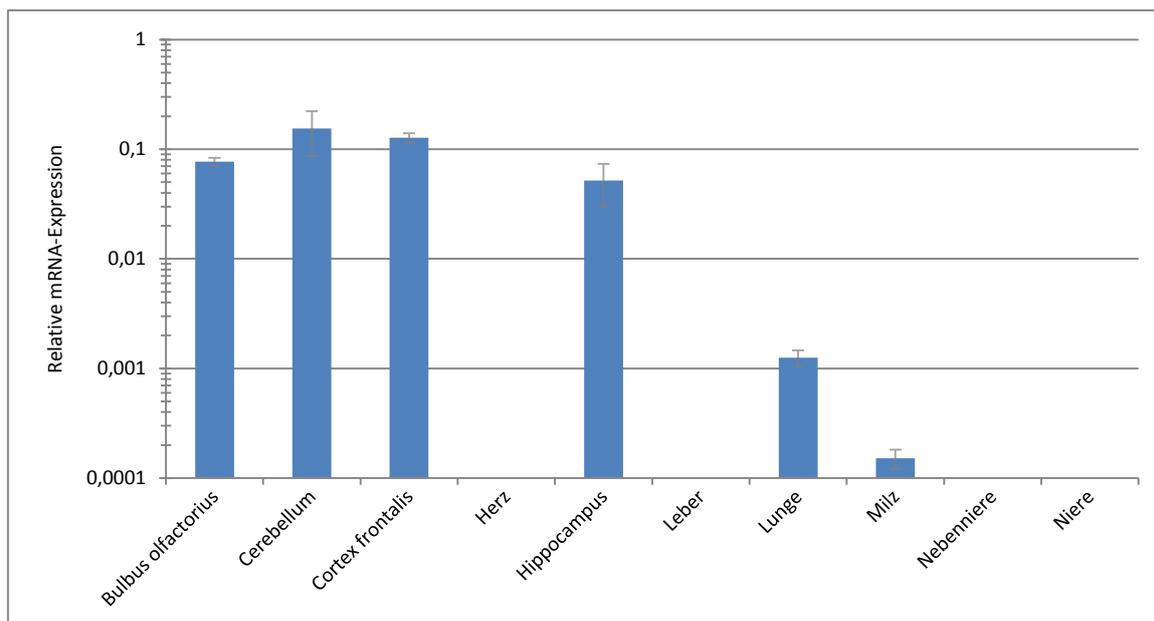
Es zeigten sich beim Menschen A in allen Gehirnregionen spezifische *MLC1*-Amplifikate, wobei die relativen Quantitäten in den neuralen Geweben schwankten (siehe Abbildung 4-7): Die höchsten Expressionsstärken fanden sich im Cerebellum ( $166 \times 10^{-3} \pm 35 \times 10^{-3}$ ) und frontalen Cortex ( $104 \times 10^{-3} \pm 14 \times 10^{-3}$ ), die niedrigsten in den Corpora mamillaria ( $41 \times 10^{-3} \pm 4,3 \times 10^{-3}$ ) und dem Putamen ( $36 \pm 6,2 \times 10^{-3}$ ). Lediglich im Plexus chorioideus (einem weitgehend nicht-neuralen Gewebe) fand sich ein deutlich niedrigerer Wert ( $9,8 \times 10^{-3} \pm 1,8 \times 10^{-3}$ ).



**Abbildung 4-7: Normalisierte Quantitäten von *MLC1*-mRNA in verschiedenen Gehirnregionen des Menschen A**

Abszisse: Gewebe, Ordinate: bezüglich des geometrischen Mittelwerts der Housekeeping-Gene normalisierte Quantitäten (logarithmiert). Standardabweichungen bei Mehrfachmessungen werden durch Indikatorbalken angezeigt. Berechnungsgrundlagen siehe 3.2.5.

Im Falle des Menschen B konnte eine moderate bis starke Expression von *MLC1* in allen neuronalen Geweben nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4-8). Die höchsten Expressionsstärken fanden sich wiederum im Cerebellum ( $154 \times 10^{-3} \pm 68 \times 10^{-3}$ ) und frontalen Cortex ( $127 \times 10^{-3} \pm 13 \times 10^{-3}$ )<sup>27</sup>. Erstaunlicherweise ließen sich auch in sehr geringen Mengen in den nicht-neuralen Gewebeproben aus Lunge ( $1,3 \times 10^{-3} \pm 0,2 \times 10^{-3}$ ) und Milz ( $0,2 \times 10^{-3} \pm 0,03 \times 10^{-3}$ ) *MLC1*-cDNA-Fragmenten nachweisen. In den übrigen nicht-neuralen Geweben (Herz, Leber, Nebenniere, Niere) gelang die Detektion einer *MLC1*-Expression hingegen nicht.



**Abbildung 4-8: Normalisierte Quantitäten von *MLC1*-mRNA in verschiedenen Gehirnregionen und nicht-neuralen Geweben des Menschen B**

Abszisse: Gewebe, Ordinate: bezüglich des geometrischen Mittelwerts der Housekeeping-Gene normalisierte Quantitäten (logarithmiert). Standardabweichungen bei Mehrfachmessungen werden durch Indikatorbalken angezeigt. Berechnungsgrundlagen siehe 3.2.5.

<sup>27</sup> Es sollte beachtet werden, dass die nQ-Werte des Patienten A und B nicht auf einem Skalenniveau liegen, da den Normierungen jeweils unterschiedliche Sets an Housekeeping-Genen zugrunde lagen.

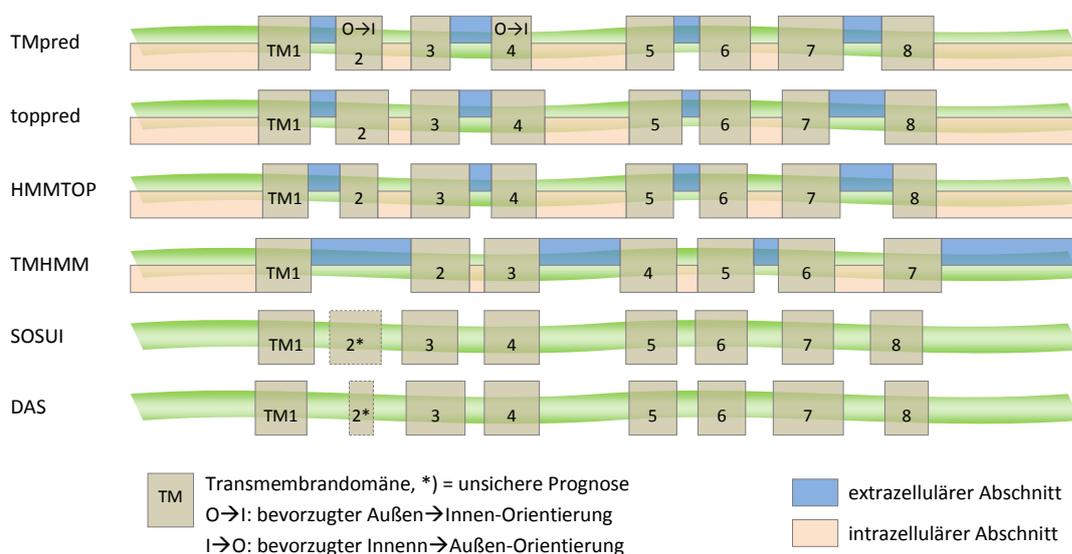
### 4.3. Herstellung eines MLC1-Vakzinierungsproteins zur Gewinnung eines Anti-MLC1-Antiserums

Zur Ermöglichung weitergehender Untersuchungen der biologischen Bedeutung des MLC1-Proteins wurde in einem dritten experimentellen Ansatz versucht, ein aus MLC1 abgeleitetes Teilprotein mit hohem immunogenen Potential zu synthetisieren und in ausreichender Menge aufzureinigen, um es zur Vakzinierung von Kaninchen zur Gewinnung eines Anti-MLC1-Antiserums zu verwenden. Mittels computergestützter Sequenzanalyseverfahren wurden geeignete Teilsequenzen des MLC1-Gens bestimmt und die Klonierung, Expression und Proteinaufreinigung durchgeführt. Hiernach wurde versucht, das synthetisierte und aufgereinigte Vakzinierungsprotein quantitativ mittels Bradford-Assay und qualitativ mittels Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung nachzuweisen. Schließlich sollte bei erfolgreichem Nachweis eine ausreichende Menge des MLC1-Proteins gesammelt und zur Vakzinierung von Kaninchen verwendet werden, um so ein polyklonales Antiserum gegen humanes MLC1 zu gewinnen.

#### 4.3.1. Design des MLC1-Vakzinierungsproteins

Zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität der geplanten Antikörper sollte nicht das gesamte MLC1-Protein zur Vakzinierung verwendet werden, sondern lediglich diejenigen Bereiche, welche ein hohes antigenes Potential besitzen und *in vivo* für Antikörper zugänglich sind.

Hierzu wurde zunächst mit verschiedenen computergestützten Analyseverfahren die vermutliche Domänenstruktur von MLC1 untersucht, um geeignete extra- oder intrazelluläre Proteinbereiche zu bestimmen (siehe Abbildung 4-9).

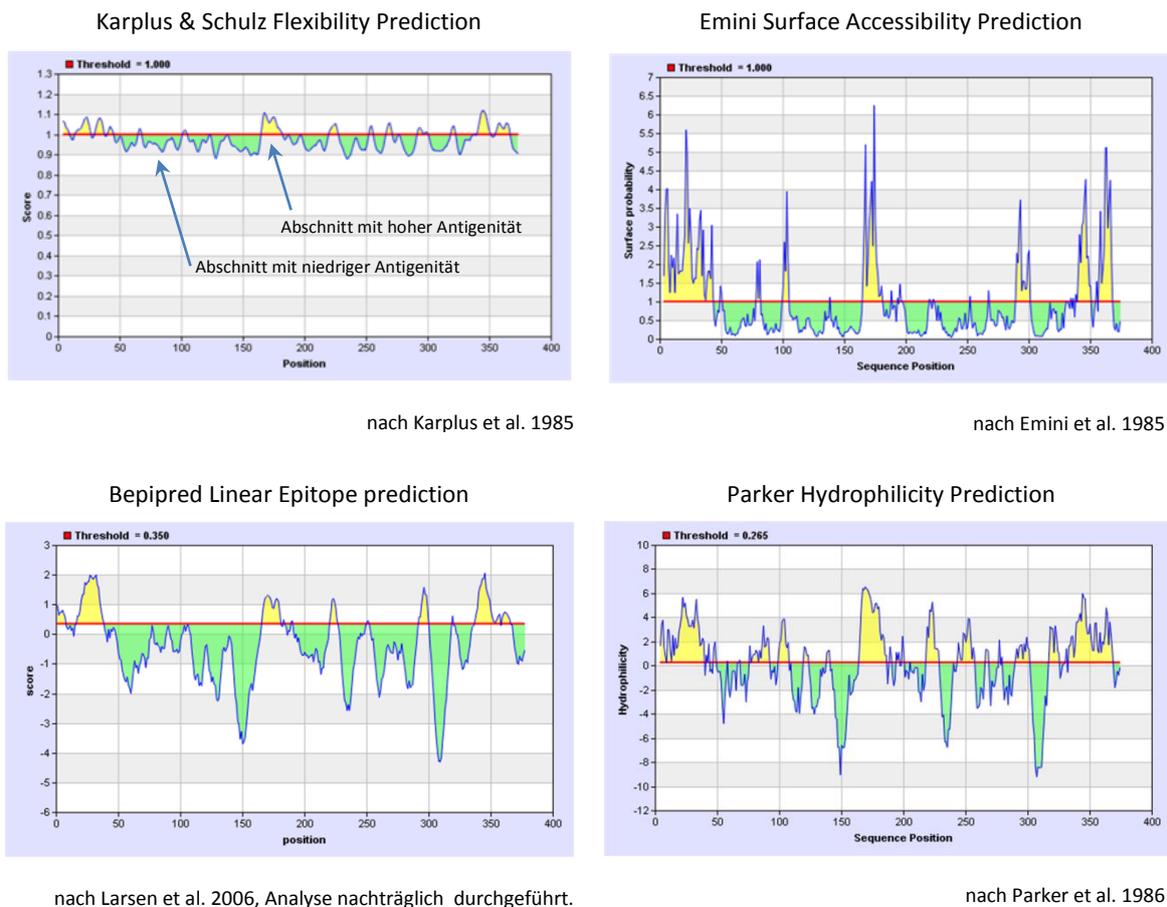


**Abbildung 4-9: Prognose der Domänenstruktur des humanen MLC1-Proteins unter Verwendung von computergestützten Strukturanalyseverfahren**

Im Falle mehrerer Prognosen eines Programmes wird nur diejenige mit der höchsten Wahrscheinlichkeit dargestellt. Zu den Quellen der Analyseprogramme siehe 3.2.7.

Die Anzahl der dabei prognostizierten Transmembrandomänen (TM) schwankte je nach verwendeten Verfahren, betrug jedoch in den meisten Fällen acht, wobei sowohl N- wie auch C-terminal ca. 50-55 AS lange intrazelluläre Enden vorhergesagt wurden. Da diese zudem die längsten Nicht-TM-Bereiche des Proteins darstellen, erschienen sie als gute Kandidaten für das Vakzinierungsprotein.

Zur weiteren Überprüfung wurde zusätzlich eine gezielte Analyse der Proteinbereiche auf Antigenität durchgeführt (siehe Abbildung 4-10):



**Abbildung 4-10: Prognose der Antigenität des humanem MLC1-Proteins unter Verwendung von computergestützten Strukturanalyseverfahren**

Dargestellt sind die Ergebnisse von vier verschiedenen Verfahren zur Prognose von antigenen Abschnitten in Proteinen anhand von Sequenzanalysen. Gelbe Bereiche weisen auf Abschnitte hoher, grüne auf Abschnitte geringer Antigenität hin.

Zu den Quellen der Analyseprogramme siehe 3.2.7.

Hierbei zeigte sich ebenfalls, dass die ca. 50 Aminosäuren umfassenden Enden der Proteine ein hohes antigenes Potential besitzen. Dementsprechend wurde das Vakzinierungsprotein als 117 Aminosäuren langes Fusionsprodukt der 61 N-terminalen Aminosäuren und der 54 C-terminalen

Aminosäuren festgelegt, wobei ein kurzer Abschnitt der N-terminalen angrenzenden Transmembrandomäne sowie (technisch bedingt) zwei Serine als Spacer integriert wurde (siehe Abbildung 4-11).

<sup>01</sup> MTQEPFREEEL <sup>11</sup> AYDRMPTLER <sup>21</sup> GRQDPASYAP <sup>31</sup> DAKPSDLQLS <sup>41</sup> KRLPPCFSHK  
<sup>51</sup> TWVFSVLMGS <sup>61</sup> SSIQCVRFK <sup>71</sup> VSARLQASW <sup>81</sup> DTQNGPQERL <sup>91</sup> AGEVARSPK  
<sup>101</sup> EFDKEKAWRA <sup>111</sup> VVVQMAQ

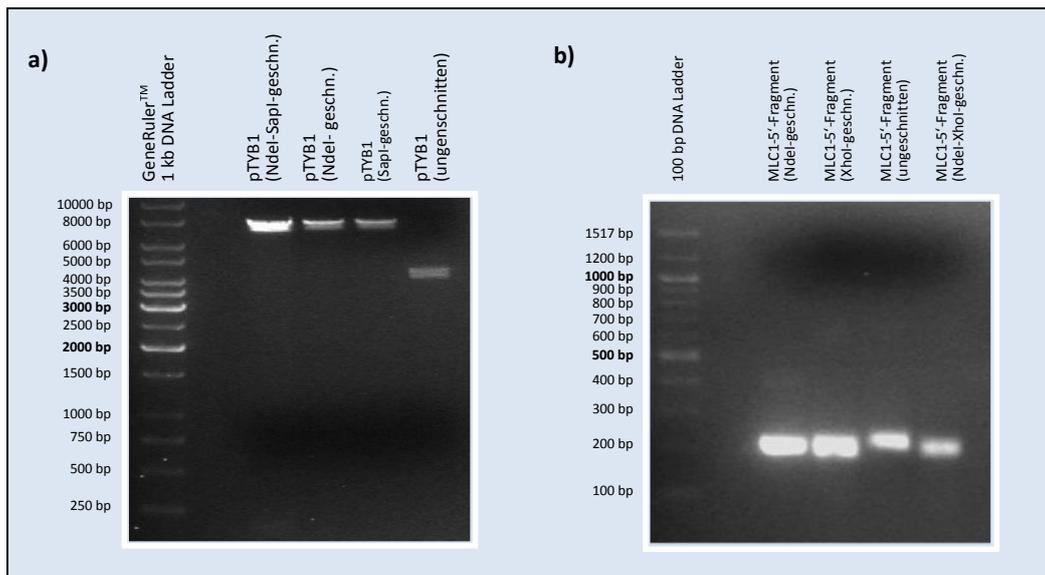
BLAU = ursprüngliche Nicht-Transmembran Domäne  
GRAU = ursprüngliche Transmembran-Domäne  
SS = Serin-Spacer

Abbildung 4-11: Sequenz des MLC1-Vakzinierungsproteins

#### 4.3.2. Klonierung des MLC1-Vakzinierungsvektors und Transformation von ER2566-Zellen

Als Klonierungs- und Expressionssystem zur Gewinnung des MLC1-Vakzinierungsproteins wurde das IMPACT™-CN System der Firma New England Biolabs gewählt, das durch das Konzept einer Intein-Kopplung des Zielproteins mit anschließender Chitin-Säulenchromatographie und DTT-induzierter (und somit proteasefreier) Abspaltung des Zielproteins eine hohe Ausbeute und Reinheit bei der Proteingewinnung verspricht.

Als Zielvektor diente das Plasmid pTYB1, dessen MCS die Klonierung des Zielproteins ohne unerwünschte zusätzliche Aminosäuren (nach Abspaltung des Intein-Tags) ermöglicht. Zur Vorbereitung der Klonierung wurde das pTYB1-Plasmid mit den Restriktionsendonukleasen NdeI und SapI geschnitten und das Ergebnis elektrophoretisch überprüft. Parallel hierzu wurden die ausgewählten 5'- und 3'-Fragmente der MLC1-cDNA aus einem cDNA-Sample des humanen Cerebellums mittels PCR amplifiziert und aufgereinigt, ebenfalls einem Doppelverdau mit NdeI/XhoI (5'-Fragment) bzw. XhoI/SapI (3'-Fragment) unterworfen und schließlich elektrophoretisch aufgetrennt. In Abbildung 4-12 ist das Resultat des erfolgreichen Schneidens des Vektors pTYB1 (Bild a) und von MLC1-PCR-Produkten (Bild b) exemplarisch dargestellt.



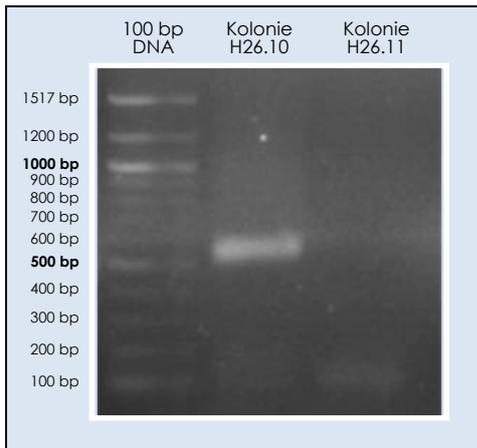
**Abbildung 4-12: Gelelektrophorese des erfolgreichen Restriktionsverdaus des pTYB1-Vektors (a) und des 5'- MLC1-Fragmentes (b)**

Dargestellt sind exemplarisch die Produkte des NdeI-/SapI-Verdaus des pTYB1-Plasmids (a) und des 5'-Fragmentes des NdeI/Xho-Verdaus des MLC1-Gens (b). Zur Kontrolle wurde ungeschnittenes Plasmid in a und ungeschnittenes MLC1-PCR-Produkt in b ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt. Nicht dargestellt ist der XhoI/SapI-Verdau des 3'-MLC1-Fragmentes.

Im nächsten Schritt wurden die geschnittenen Plasmide und die MLC1-Fragmente aus dem Gel herausgelöst, gereinigt und ligiert. Chemokompetente ER2566-Bakterien wurden mit dem Ligationsansatz transformiert und ausplattiert. Die Zahl der am Folgetag gezählten Kolonien zeigte die erfolgreiche Transformation an:

Transformationsansatz	Zahl der Kolonien
Transformation mit Ligationsansatz mit Ligase	~ 20 - 50
Transformation mit Ligationsansatz ohne Ligase (Negativkontrolle)	0
Transformation mit supercoiled pTYB1 (Positivkontrolle)	> 500

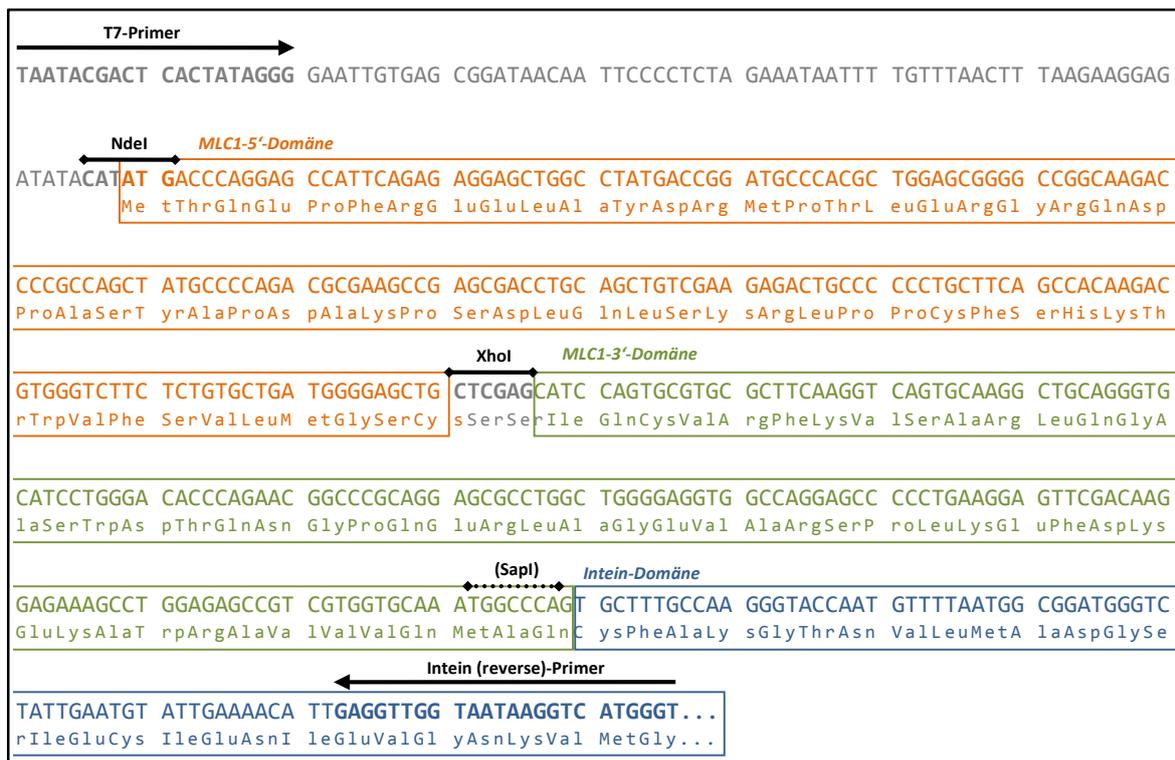
Einzelkolonien der Transformation mit dem Ligationsansatz wurden in LB-Medium hochgezogen und direkt aus der Bakteriensuspension mittels PCR auf erfolgreiche Insertion der beiden MLC1-Fragmente gescreent (siehe Abbildung 4-13).



**Abbildung 4-13: Screening-Gelelektrophorese der T7-Intein (reverse)-PCR der ER2566-Kolonien nach Transformation mit dem MLC1-5'D-3'D-ligierten pTYB1-Plasmid**

Die erwartete Fragmentgröße bei erfolgreicher Ligation betrug 526 bp. Dargestellt sind exemplarisch die Ergebnisse der Kolonie H26.10 mit offensichtlich erfolgreich ligiertem Vektor und der Kolonie H26.11 mit fehlender Ligation.

Zur Sicherstellung des erwarteten Klonierungsergebnisses wurden in der Folge die DNA-Sequenz einiger positiver Klone der Screening-Gelelektrophorese im Bereich der MCS bestimmt. Hierbei ließ sich bei mehreren Proben eine korrekten Einklonierung der 5'- und 3'-Domänen der MLC1-cDNA in die MCS des Vektors pTYB1 nachweisen (siehe Abbildung 4-14).



**Abbildung 4-14: Ergebnis der Sequenzierung des Plasmids des Klons H26.10**

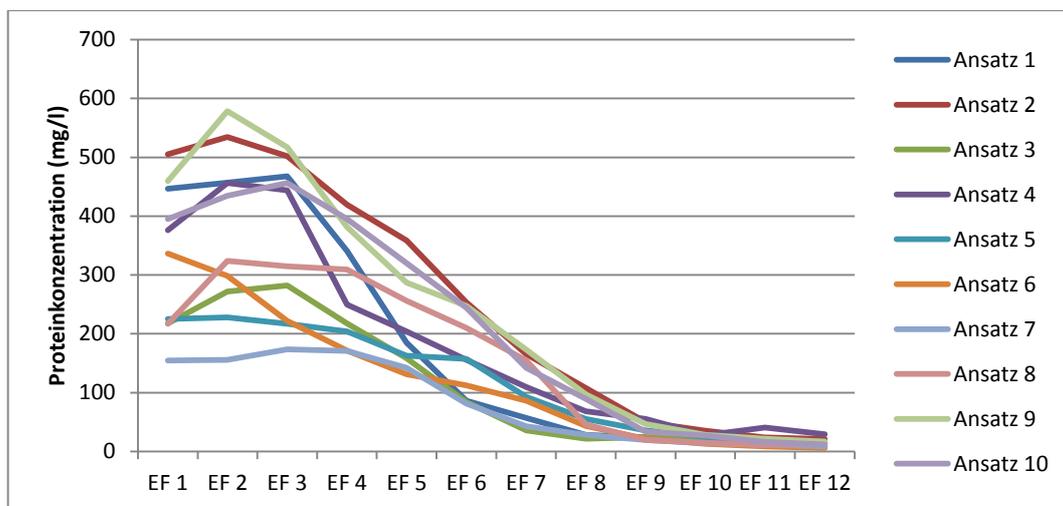
Eingezeichnet sind die Sequenzierungsprimer T7 und Intein (reverse), die Ursprungsdomänen der Sequenzen und die Erkennungssequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme NdeI und XhoI. Die Schnittstelle SapI ist nur angedeutet, da sie nach der Ligation der Fragmente verloren ging.

Für die folgenden Experimente wurde der Klon H26.10, für den ein korrektes Klonierungsergebnis nachgewiesen werden konnte, verwendet.

#### 4.3.3. Expression des MLC1-Vakzinierungsproteins, Aufreinigung und Nachweistests

Zur Gewinnung des MLC1-Vakzinierungsproteins wurden Zellen des Klons H26.10 in definierten Volumina LB-Mediums herangezüchtet und die Expression des MLC1-Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG induziert. Zur Optimierung der Proteinausbeute wurde die Expressionsinkubation bei unterschiedlichen Temperaturen (16°C, 22°C, 30°C) und für verschiedene Zeiträume (3 h, 6 h, 16 h) durchgeführt. Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert und die Zellen durch Detergenzienzugabe und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Aus den so gewonnenen Zellysaten wurden säulenchromatographisch das gebildete Fusionsprotein durch CBD-vermittelte Bindung an Chitin abgetrennt und anschließend das Vakzinierungsprotein durch DTT-induzierte Selbstspaltung der Intein-Domäne freigesetzt und eluiert (siehe Tabelle 4-4).

In den 18 aufgefangenen 1 ml-Elutionsfraktionen zeigte sich bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung bei 280 nm in allen untersuchten Fällen eine deutlich erhöhte Proteinkonzentration in den ersten 4-6 Aliquots, die zusammengenommen in etwa dem Volumen der verwendeten *chitin beads* in den Säulen (~4,5 ml) entsprachen (siehe Abbildung 4-15).



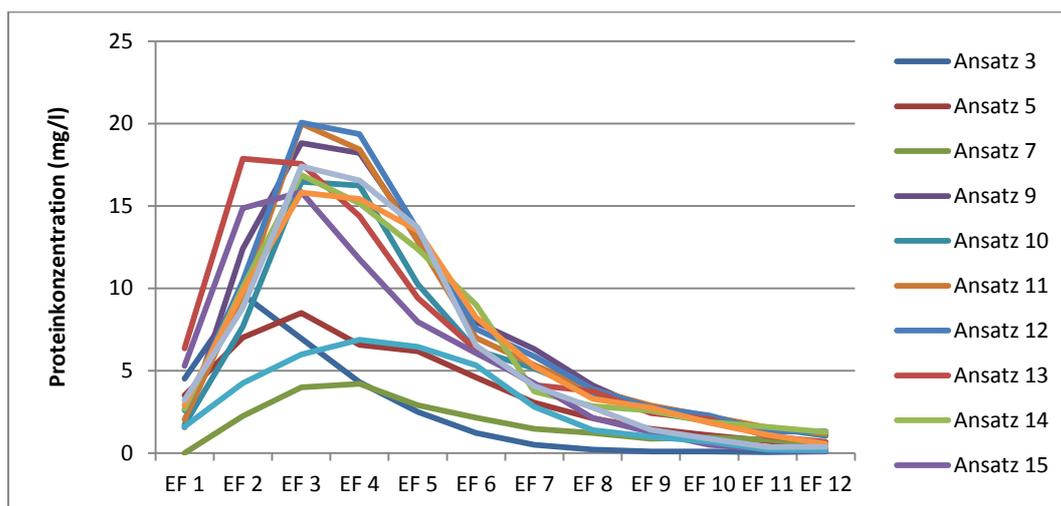
**Abbildung 4-15: Bestimmung der Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen über die OD<sub>280 nm</sub>-Methode**

Dargestellt ist der Verlauf der errechneten Proteinkonzentrationen anhand der OD<sub>280 nm</sub>-Werte in den ersten 12 Elutionsfraktionen (=EF) für die Ansätze 1-10.

Die errechneten Konzentrationswerte schwankten dabei zwischen 174 mg/l und 534 mg/l, wobei eine steigende Expressionsinkubationsdauer tendenziell zu höheren maximalen Messwerten führte (siehe Tabelle 4-4: Ansätze 1 vs. 3, 4 vs. 6, 8 vs. 7), während eine Temperaturerhöhung keinen (22°C→30°C: Ansatz 6 vs. 8) oder nur einen geringen Einfluss zeigte (16°C→22°C: Ansatz

3 vs. 6). Die Zugabe von IPTG führte entgegen der Erwartung nicht zu einem Anstieg der Proteinausbeute (Ansatz 1 vs. 2).

Da die erhobenen Daten nicht ohne Weiteres plausibel erschienen und die OD<sub>280 nm</sub>-Methode bekanntermaßen recht störanfällig gegenüber Medienverunreinigungen ist, wurden bei einer zweiten Ansatzreihe zusätzlich und ab Ansatz 11 alternativ eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt, die eine exaktere Messung ermöglichen sollte (siehe Abbildung 4-16).



**Abbildung 4-16: Bestimmung der Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen nach Bradford**

Dargestellt ist der Verlauf der bestimmten Proteinkonzentrationen nach Bradford in den ersten 12 Elutionsfraktionen (=EF) für die Ansätze 3, 5, 7 und 9-15.

Auch hier zeigten sich in den ersten sechs Elutionsfraktionen die jeweils höchsten Proteinkonzentrationen, wobei der Anstieg der Konzentrationen im Gegensatz zur OD<sub>280 nm</sub>-Bestimmung in der Regel erst in EF2 erfolgte. Insgesamt lagen die ermittelten Konzentrationen weit unter den Werten der OD<sub>280 nm</sub>-Bestimmung, jedoch zeigt der Vergleich der Ansätze, bei denen beide Bestimmungsmethoden angewendet wurden, dass eine Korrelation der Messverfahren besteht (Korrelation nach Pearson: N=5,  $\sigma=0,982$ ,  $p=0,03$ ).

Tabelle 4-4: Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Proteinbestimmungen unter verschiedenen Inkubations- und Aufreinigungbedingungen

Nr.	Expressionsinkubation				Spaltungsinkubation			Zellaufschluss		Bradford PKMax [ng/ µl]	SDS-PAGE ~13 kDa Bande in EF <sub>Max</sub>	
	Vol.	Temp.	Dauer	IPTG-Konz.	IPTG+/IPTG-	Induktor	Temp.	Dauer	Energie			OD280 PKMax [ng/ µl]
<i>Variation der Parameter der Expressionsinkubation</i>												
1	200 ml	16°C	16 h	0,4 mM	+	DTT	4°C	16 h	32 kJ	468	n.d.	-
2	"	"	"	"	-	"	"	"	"	534	n.d.	-
3	200 ml	16°C	6 h	"	+	"	"	"	"	282	9,6	n.d.
4	"	22°C	16 h	"	+	"	"	"	"	456	n.d.	-
5	"	"	3 h	"	+	"	"	"	"	228	8,4	n.d.
6	"	"	6 h	"	+	"	"	"	"	336	n.d.	-
7	"	30°C	3 h	"	+	"	"	"	"	174	4,2	n.d.
8	"	"	6 h	"	+	"	"	"	"	324	n.d.	-
9	"	16°C	16 h	0,3 mM	+	"	"	"	"	578	18,8	-
10	"	"	"	0,5 mM	+	"	"	"	"	556	16,4	-
11	800 ml	"	"	0,4 mM	+	"	"	"	"	n.d.	>20	(+)
12	"	"	"	"	-	"	"	"	"	n.d.	>20	-
<i>Variation der Parameter der Spaltungsinkubation</i>												
13	"	16°C	16 h	"	+	"	16°C	8 h	"	n.d.	17,8	-
14	"	"	"	"	+	"	22°C	8 h	"	n.d.	16,8	-
15	"	"	"	"	+	β-ME	4°C	16 h	"	n.d.	15,8	-
16	"	30°C	3 h	"	+	"	"	"	"	n.d.	6,9	n.d.
<i>Variation der Parameter des Zellaufschlusses</i>												
17	"	16°C	16 h	0,4 mM	+	DTT	4°C	16 h	18 kJ	n.d.	15,8	-
18	"	"	"	"	+	"	"	"	72 kJ	n.d.	17,4	-

β-ME = β-Mercaptoethanol; EF = Elutionsfraktion; n.d. = nicht durchgeführt; PK = Proteinkonzentration

Grün hinterlegt sind Standardbedingungen (Herstellerangaben bzw. errechnete optimale Zellaufschluss-Energie nach Feliu et al. 1998).

Rot hinterlegt sind von den Standardbedingungen abweichende Parameter.

Um einen qualitativen Nachweis und eine semiquantitative Bestimmung des Vakzinierungsproteins zu erreichen, wurde schließlich bei 14 Ansätzen<sup>28</sup> aus der Elutionsfraktion mit der höchsten Proteinkonzentration eine Azetonfällung mit anschließender SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit der Methode nach Neuhoff mit kolloidalem Coomassie Brilliant-Blau G-250 gefärbt.

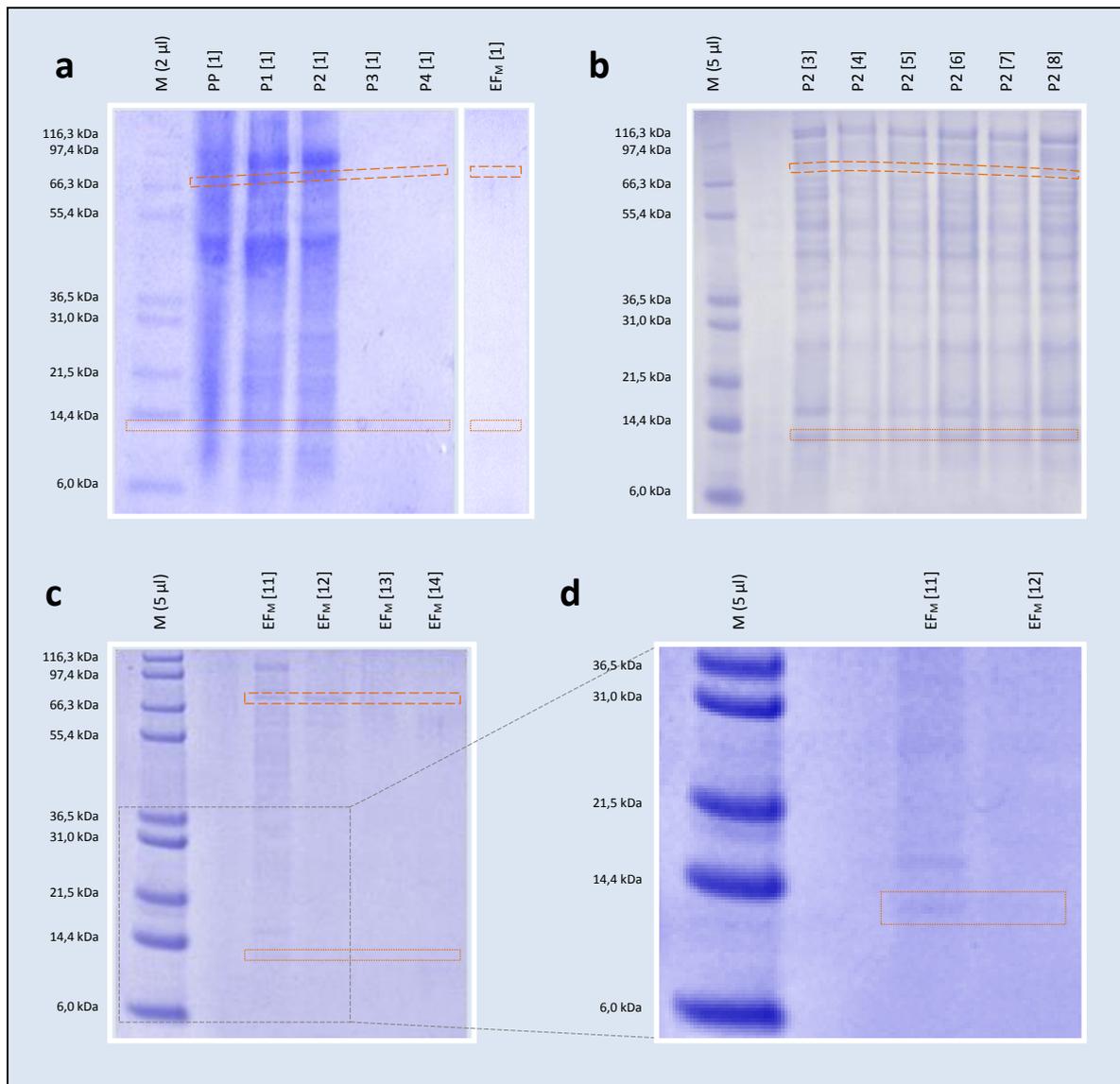
In den Proben 1-2 (Zellextrakte) zeigte sich in sämtlichen Ansätzen ein heterogenes Muster mit unscharf abgegrenzten Banden (siehe Abbildung 4-17a). Teilweise waren im erwarteten Bereich der Fusions- und Vakzinierungsproteine nur sehr schwache Bandenbildungen zu erkennen, die in ihrer Intensität jedoch weit hinter den übrigen Signalen zurücktraten. Ein Vergleich der Ansätze mit und ohne IPTG-Induktion (Ansatz 1 vs. 2, 11 vs. 12) zeigte entgegen der Erwartung ebenso wenig eine eindeutige Veränderung des Bandenmusters wie eine Modifizierung der Parameter der Bakterieninkubation, Spaltungsinkubation oder des Zellaufschlusses (Abbildung 4-17b). Insbesondere ergab sich keine Verstärkung einer Bande im Bereich des Fusionsproteins von 70,8 kDa.

Beim Waschen der Säule (Probe 3) und unmittelbar nach dem Auftragen von DTT/ $\beta$ -Mercaptoethanol war demgegenüber erwartungsgemäß in keinem Fall eine Bandenbildung im Säulendurchfluss zu entdecken.

Überraschenderweise ergab die SDS-Elektrophorese in den Elutionsfraktionen mit einer Ausnahme keine Bandenbildung. Lediglich im Falle der mit erhöhtem Inkubationsvolumen (800 ml) durchgeführten Ansätze 11 (mit IPTG) und 12 (ohne IPTG) zeigte sich ein schwaches Bandenmuster, bei dem die Signale bei ~13 kDa, ~16 kDa, ~70 kDa und ~105 kDa im Vergleich zu den Zellextrakten (Proben 1 und 2) leicht verstärkt erschienen (Abbildung 4-17c/d). Zudem zeigte sich, dass die ~13 kDa, ~16 kDa und ~105 kDa-Banden bei Ansatz 12 (ohne IPTG) schwächer ausfielen.

---

<sup>28</sup> Bei vier Ansätzen ergab die quantitative Proteinbestimmung im Vorfeld so niedrige Konzentrationswerte, dass eine SDS-Gelelektrophorese mit Coomassie-Färbung nicht erfolgversprechend erschien.



**Abbildung 4-17: Coomassie-Färbung der im SDS-Gel aufgetrennten Zwischenproben und der Elutionsfraktionen**

Die im Rahmen des Zellaufschlusses und der Chitinsäulenchromatographie der verschiedenen Inkubationsansätze entnommenen Proben sowie die aufkonzentrierte Elutionsfraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen wurden zusammen mit einem Proteinmarker (zur Größenabschätzung und semiquantitativen Mengenschätzung) im SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die Nachweisgrenze der Färbung lag methodenbedingt bei ca. 5-20 ng/Bande.

P1 - P4 = (Zwischen-)Proben 1 - 4 (→3.2.6.5), EF<sub>M</sub> = Elutionsfraktion mit maximaler Proteinkonzentration, M = Mark12™-Proteinmarker (5 µl-Quantitäten: 116,3 kDa - 400 ng / 97,4 kDa - 700 ng / 66,3 kDa - 400 ng / 55,4 kDa - 1,2 µg / 36,5 kDa - 800 ng / 31,0 kDa - 440 ng / 21,5 kDa - 640 ng / 14,4 kDa - 500 ng / 6,0 kDa - 760 ng / 3,2 kDa - 1,43 µg / 2,5 kDa - 780 ng). In eckigen Klammern ist die jeweilige Ansatznummer (siehe Tabelle 4-4) angegeben.

--- = erwarteter Bandenbereich des Fusionsproteins (70,8 kDa)

--- = erwarteter Bandenbereich des Vakzinierungsproteins (13,3 kDa)

**Abbildung 4-17 (Fortsetzung):**

**a) Pellet-Probe, Proben 1 bis 4 und Elutionsfraktion**

Exemplarisch dargestellt sind die Probenauftrennungen des Ansatzes 1. Sowohl in der Pellet-Probe (nach Ultraschall-Aufschluss und Zentrifugation) wie auch in den Proben 1 (grober Zellextrakt nach Ultraschall-Aufschluss) und 2 (klarer Zellextrakt nach Ultraschall-Aufschluss und Zentrifugation) sind zahlreiche unscharf abgegrenzte Banden zu erkennen. Banden im Größenbereich des Fusions- wie des Vakzinierungsproteins finden sich andeutungsweise in allen Zellextrakten, erwartungsgemäß jedoch nicht in den Proben 3 (Durchfluss der Chitinsäule nach Auftragung des klaren Zellextraktes) und 4 (Durchfluss der Chitinsäule unmittelbar nach Auftragung von DTT). Leider weist entgegen der Erwartung auch EF<sub>M</sub> keine Bande im Größenbereich der gesuchten Proteine auf.

**b) Klare Zellextrakte im Vergleich unterschiedlicher Inkubationsbedingungen**

Trotz unterschiedlicher Expressionsinkubationsbedingungen in den exemplarisch gewählten Ansätzen 3-8 lässt sich keine offensichtliche Veränderung des Bandenmusters der klaren Zellextrakte erkennen – weder in der globalen Intensität noch in der Binnenverteilung der Stärke der einzelnen Banden. Neben zahlreichen weiteren Banden lassen sich auch zwei Banden von ~13 kDa (≈Größe des Vakzinierungsproteins) und ~70 kDa (≈Größe des Fusionsproteins) in sehr schwacher Ausprägung identifizieren.

**c) und d) Elutionsfraktionen der Ansätze**

Lediglich im Falle der Ansätze 11/12, die aus einem vergrößerten Inkubationsvolumen von 1 l hervorgingen, konnten auch in der Elutionsfraktion die ~13 kDa- und ~70 kDa-Banden neben einer ~16 kDa-Bande und einigen weiteren Banden in äußerst schwacher Ausprägung festgestellt werden (vergrößert und kontrastverstärkt in d). Relativ zu den übrigen Banden in den Zellextrakten waren diese Banden verstärkt (vgl. b). Ohne IPTG-Induktion (12) fehlten zudem die ~13 kDa- und ~16 kDa-Banden (d). Allerdings war die ~70 kDa-Bande in beiden Fällen in ähnlicher Intensität vorhanden. Zudem zeigte sich in Ansatz 11 eine ~105 kDa-Bande, die in Ansatz 12 nur extrem schwach zu erkennen war.

Die Interpretation dieser Ergebnisse ist nicht einfach, da sie kein einheitliches Bild ergeben. Die 13 kDa-Bande in der Elutionsfraktion des Ansatzes 11 könnte als Signal des gesuchten Vakzinierungsprotein gedeutet werden, und die beobachtete IPTG-Abhängigkeit sowie die relative Verstärkung des Signals gegenüber den Zellextrakten, als Folge des Aufreinigungsprozesses interpretierbar, legen diese Ansicht nahe. Allerdings findet sich eine Bande gleicher Größe in zum Teil absolut deutlich höherer Signalstärke bereits in den Zellfraktionen aller Ansätze – ohne eine erkennbare Abhängigkeit von Inkubationsparametern. Gleichzeitig besteht im Vergleich der Ansätze 11 und 12 auch eine Differenz in der Stärke der Banden bei ~16 kDa und ~105 kDa – ohne dass die Herkunft dieser Signale eindeutig einzuordnen oder gar ihre IPTG-Abhängigkeit zu erklären wäre. Schließlich scheint die potentielle Bande des Fusionsproteins bei 70 kDa keine IPTG-Abhängigkeit zu besitzen – was bei Interpretation des 13 kDa-Bande als Signal des Vakzinierungsproteins nicht plausibel ist und somit eine Interpretation des Bandenmusters als Ergebnis unspezifischer Hintergrundsignale wahrscheinlicher erscheinen lässt.

In jedem Fall liegt die beobachtete Proteinausbeute des 13 kDa-Proteins in semiquantitativer Abschätzung im Falle des „besten“ Ansatzes 11 mit ca. 20 µg<sup>29</sup> Gesamtmenge der Elutionsfraktionen weit unterhalb der für die Gewinnung von Antiseren zur Immunisierung benötigten Antigenmengen. Aus diesem Grunde erschien eine Fortführung des Vorhabens der Gewinnung polyklonaler Anti-MLC1-Antikörper in dem verwendeten Expressionssystem leider nicht erfolgversprechend.

---

<sup>29</sup> Die sehr grobe Schätzung der Gesamtproteinmenge aus 18 Elutionsfraktionen ergibt sich aus:

- der semiquantitativen Abschätzung der Proteinmenge der Bande in der Höhe von 50 ng anhand der bekannten Proteinmengen der Markerbande und der bekannten Nachweisgrenze von ~5-20 ng/Bande
- der Berücksichtigung der aufgetragenen Teilmenge von 6,5 µl (von 40 µl) auf das Gel
- der zur Azetonfällung eingesetzten Menge von 0,3 ml von 1 ml Elutionsfraktion
- einer angenommenen Effizienz der Azetonfällung von 50% (pessimistisch)
- einer angenommenen Verzehnfachung der Aubeute durch Poolen der 18 EFs im Vergleich zu EF<sub>Max</sub> (optimistisch)

$$\sim 50 \text{ ng} \times 40 / 6,5 / 0,3 / 50\% \times 10 \approx 20 \text{ } \mu\text{g}$$

## 5. Diskussion

Die bisherigen Forschungsarbeiten zu MLC1 sind zu dem Ergebnis gekommen, dass es sich um ein primär neural exprimiertes und wahrscheinlich membranständiges Protein handelt, das möglicherweise als Ionenkanal dient und dessen *Loss-of-function*-Mutationen für einen Großteil der klinischen Fälle der MLC verantwortlich gemacht werden können. Seine Rolle in der Ätiologie endogener Psychosen und insbesondere der Periodischen Katatonie nach Leonhardt ist hingegen nach wie vor umstritten.

Ausgehend von diesem Kenntnisstand wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, anhand vergleichender *In Situ*-Hybridisierungen von Gehirnschnitten des Menschen und der Maus sowie MLC1-qRT-PCRs unterschiedlicher neuraler und nicht-neuraler humaner Gewebe weitere Kenntnisse über das regionale und zelluläre Verteilungsmuster der MLC1-Expression beim Menschen zu gewinnen, und durch Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen MLC1 neue Möglichkeiten zur weitergehenden Analyse seiner differentiellen Expression und funktionellen biologischen Bedeutung zu eröffnen.

### 5.1. Differentielle MLC1/Mlc1-Expression bei Mensch und Maus

#### *Neurale Expression von MLC1/Mlc1*

Zum Vergleich der regionalen und zellulären Expressionsmuster von MLC1/Mlc1 bei Mensch und Maus wurden Gewebeschnitte aus dem Hippocampus und dem Cerebellum einer *In Situ*-Hybridisierung mit Antisense-MLC1/Mlc1-cRNA-Sonden unterzogen. Zur Sicherstellung der Spezifität der Färbungen erfolgte parallel eine Hybridisierung mit Sense-MLC1/Mlc1-cRNA-Sonden als Negativkontrolle. Bei diesen Untersuchungen fand sich in den murinen Schnitten ein Mlc1-Expressionsmuster, das im Wesentlichen der bereits von Schmitt und Mitarbeitern (2003) festgestellten Verteilung entsprach, welche anhand von Doppelfärbungen eine ausgeprägte MLC1/Mlc1-Expression in den Bergmann-Gliazellen der Purkinjezellschicht des Kleinhirns sowie – in schwächerem Umfang – in verstreut liegenden und in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus gehäuft Astrozyten des Hippocampus nachweisen konnten. Keine erkennbare Färbung fand sich hingegen in Neuronen, Oligodendrozyten oder der Mikroglia. In den humanen Gewebeschnitten ergab sich im Falle des Kleinhirns ein der murinen Situation analoger Befund, wobei die Signalintensitäten etwas geringer waren. Im humanen Hippocampus ließen sich keine eindeutigen Signale detektieren, was allerdings in Anbetracht der auch bei der Maus geringeren hippocampalen Expression und des insgesamt niedrigeren Signalniveaus der humanen ISHs nicht als Beweis einer fehlenden MLC1-Expression im humanen Hippocampus gedeutet werden kann, sondern vermutlich eher auf einer schlechteren Qualität der humanen Gewebe aufgrund einer höheren Post-mortem-Verzögerung und eventuell zusätzlich einer geringeren Sensitivität der humanen MLC1-Antisense-Sonden beruht.

In einem zweiten experimentellen Ansatz zur Bestimmung der humanen Expression von MLC1 wurden von zwei Menschen (Mensch A und B) post-mortem Proben aus verschiedenen Hirnre-

gionen und beim Menschen B zusätzlich aus einigen nicht-neuralen Geweben zunächst RNA extrahiert und dann cDNA gewonnen. Mittels quantitativer qRT-PCR wurde die Genexpression von *MLC1* bestimmt und anhand der Expressionsniveaus von ausgewählten Housekeeping-Genen (*GAPDH*, *L13a*,  $\beta$ -Aktin sowie teilweise *ARP* und *Cyclophilin*) normalisiert. Als Ergebnis dieser Untersuchungen zeigte sich, dass in allen getesteten Hirnregionen eine deutliche *MLC1*-Expression festzustellen war, deren Maxima im Cerebellum und Frontalhirn und deren Minima im Putamen bzw. im nicht-neuralen Plexus chorioideus lagen. Die Gegenüberstellung der relativen Expressionsstärken bei den Menschen A und B in den Regionen, die bei beiden Menschen getestet werden konnten, erbrachte hierbei die gleiche Rangfolge (Cerebellum > Cortex frontalis > Hippocampus).<sup>30</sup> Die *MLC1*-Expression im frontalen Cortex (Mensch A) war deutlich höher als im okzipitalen und temporalen Cortex, was vor dem Hintergrund der ebenfalls frontal am stärksten ausgeprägten radiologischen Symptomatik bei der megalenzephalen Leukenzephalopathie ein interessanter Befund ist. Das anhand der qRT-PCRs festgestellte Expressionsmuster entspricht somit auch weitgehend den diesbezüglichen Ergebnissen aus dem Mausmodell (Schmitt et al. 2003).

Die im Rahmen dieser Arbeit mittels ISH und qRT-PCR gewonnenen Erkenntnisse zur *MLC1*-Expression im Gehirn auf transkriptionellem Niveau konnten in späteren Studien anderer Autoren auf Proteinebene bestätigt und zunehmend verfeinert werden. Immunhistochemische Untersuchungen an murinen (Teijido et al. 2004; Teijido et al. 2007) und humanen (Boor et al. 2005) Gewebeschnitten haben gezeigt, dass die astrozytäre Expression von *MLC1/Mlc1* in der Bergmann-Glia und in perivaskulären Astrozyten besonders ausgeprägt ist, wobei sich die intrazelluläre Verteilung auf die astrozytären Endfüßchen an Astrozyten-Astrozyten- und (selten) Astrozyten-Neuronen-Kontaktstellen konzentriert. Daneben lässt sich jedoch auch eine *MLC1*-Expression in Ependymzellen und – in geringerem Umfang – den Axonen, Präsynapsen und dendritischen Dornfortsätzen bestimmter Neurone (z.B. von kortikalen Pyramidenzellen) belegen (Teijido et al. 2004), wobei die Häufung von *MLC1* in intrazellulären Vesikeln eine Beteiligung an synaptischen Prozessen möglich erscheinen lässt (Teijido et al. 2007). Auch im peripheren Nervensystem gelang der Nachweis von *MLC1* in axonalen Fortsätzen und in der neuromuskuläre Präsynapse. In den peripheren Myelinscheiden fand sich hingegen ebenso wenig eine Expression wie in der zentralen Oligodendroglia und Mikroglia (Teijido et al. 2004). Hinsichtlich der regionalen Verbreitung von *MLC1* konnten Teijido und Mitarbeiter in einer extensiven Untersuchung des murinen Nervensystems während der Ontogenese mittels immunhistochemischer Färbungen und elektronenmikroskopischer Bildgebung zeigen, dass *MLC1* in sehr vielen Regionen des Gehirns neuronal und astrozytär exprimiert wird (Teijido et al. 2007). In guter Entsprechung zu den Ergebnissen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten qRT-PCRs und ISHs konnte auch hier eine starke *MLC1*-Expression u.a. im Cerebellum, (frontalen) Cortex, Thalamus und Hippocampus festgestellt werden.

---

<sup>30</sup> Dies kann als Indiz für die Reliabilität der gemessenen intrazerebralen Expressionslevel gewertet werden kann, wenngleich eine Stichprobengröße von zwei verständlicherweise keine signifikanten Ergebnisse erbringen kann.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die im Rahmen der qRT-PCRs und ISHs dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur neuronalen *MLC1*-Expression in der Gesamtschau mit den Ergebnissen anderer Autoren den Eindruck eines weitgehend ähnlichen Expressionsmusters bei Mensch und Maus unterstützen. *MLC1* zeigt zerebral eine ausgeprägt astrozytäre, in geringerem Maße auch neuronale Expression in weiten Bereichen des ZNS, wobei sowohl das regionale (paravaskulär, ependymal, subpial) wie auch das intrazelluläre Verteilungsmuster (Astrozyten-Kontaktstellen) für eine Beteiligung an Schrankenfunktionen (Blut-Hirn-Schranke, Blut-Liquor-Schranke) sprechen. Da Astrozyten eine wichtige regulierende Funktion auf die ionale und osmotische Homöostase im Gehirn ausüben und sich wichtige klinische Symptome der MLC (Vakuolenbildung, Epilepsie) als Folge eines diesbezüglichen Ungleichgewichtes interpretieren lassen, ist vor dem Hintergrund des Expressionsmusters eine Rolle des *MLC1*-Proteins als Ionenkanal/-transporter oder Regulator von Ionenkanälen/-transportern und/oder eine Beteiligung am interzellulären astrozytären Messaging gut vorstellbar.

#### *Nicht-neurale Expression von MLC1*

Neben der zerebralen Expression von *MLC1* beim Menschen wurde im Rahmen der qRT-PCR-Studie auch die Expression in einigen nicht-neuralen Geweben untersucht. Während in Herz, Leber, Nebenniere und Niere keine *MLC1*-Expression detektiert werden konnte, zeigten sich in Lunge und Milz schwache Signale, die allerdings im Vergleich zu denjenigen zerebraler Gewebe um den Faktor ~100 (Lunge) bis ~1000 (Milz) niedriger lagen. Wenngleich nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, dass es sich hierbei um technisch bedingte Artefakte (z.B. durch Verunreinigungen bei der Probenbiopsie) handelt, erscheint dieser Befund dennoch interessant. Bereits Nomura konnte eine niedrige *MLC1*-Expression in Lunge und Milz belegen<sup>31</sup> (Nomura et al. 1994), und auch die murinen Northern-Blot-Analysen von Steinke und Mitarbeitern zeigten für die Lunge ein fragliches schwaches Signal (Steinke et al. 2003). Demgegenüber konnten Meyer und Mitarbeiter in ihren Untersuchungen mittels Northern-Blot beim Menschen in keinem der getesteten nicht-neuralen Gewebe (Herz, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas) eine *MLC1*-Expression nachweisen (Meyer et al. 2001). In der EST-Tiger-Datenbank finden sich Hinweise auf (niedrige) *MLC1*-Expression in verschiedenen nicht-neuralen Geweben, nicht jedoch in Lunge und Milz (Johns Hopkins University). Demgegenüber verzeichnet die GEO-Datenbank des NCBI mehrere Microarray-Datensätze, die eine niedrige humane *MLC1*-Expression in Lunge und Milz belegen (NCBI); Datensets [GDS832](#), [GDS425](#)].

Die mit Abstand stärksten Hinweise auf eine nicht-neurale Expression von *MLC1* finden sich für das periphere Blut und das Knochenmark (Nomura et al. 1994). In der EST-Tiger-Datenbank überschreiten die gemessenen *MLC1*-Expressionsrate des peripheren Blutes deutlich diejenigen des peripheren Nervensystems, und die gemessenen Werte des Knochenmarks liegen sogar über denen des Gehirns (Johns Hopkins University). Auch in der GEO-Datenbank finden sich

---

<sup>31</sup> <http://www.kazusa.or.jp/huge/gfimage/northern/html/KIAA0027.html>

zahlreiche MLC1-Mikroarrays mit hohen Signalstärken für das periphere Blut und das Knochenmark (NCBI; [GDS832](#), [GDS425](#)), wobei einzelne Microarrays eine heterogene Expression in Leukozyten (mit beispielsweise höheren Expressionswerten für NK-Zellen) nahelegen ([GDS2735](#), [GDS751](#)). Mittels Anti-MLC1-Antikörpern konnte MLC1 in allen drei Leukozytenzelllinien (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) nachgewiesen werden (Boor et al. 2005; Duarri et al. 2008). Diese Befunde sind insofern interessant, als dass für Patienten mit dem klinischen Erscheinungsbild der MLC und nachgewiesenen homozygoten *Loss-of-Funktion*-Mutationen des MLC1-Gens zwar zahlreiche neurologische Auffälligkeiten beschrieben sind, nicht jedoch immunologische oder hämatologische Symptome. Dies könnte dahingehend interpretiert werden, dass der Ausfall von MLC1 in diesen Zellen über alternative zellulären Mechanismen kompensiert werden kann, dass der Verlust der von MLC1 getragene biologische Funktion nicht zu klinisch bemerkbaren Symptomen führt, oder dass diese Symptome im Rahmen der bisherigen klinischen Fallbeschreibungen der Aufmerksamkeit der Betrachter entgangen sind.

In jedem Fall erscheint eine nähere Untersuchung der MLC1-Expression auch in nicht-neuralen Geweben interessant, da die – wenn auch schwächer ausgeprägte – Expression von MLC1 in diesen Geweben/Zellen ein zusätzliches Licht auf seine funktionale Bedeutung *in vivo* werfen könnte.

## **5.2. Funktionelle Bedeutung von MLC1**

Aufgrund von Sequenz- und Strukturvergleichen spekulierten Meyer und Mitarbeiter, dass MLC1 zu einer Gruppe von Kationenkanälen gehören könnte, die in entfernter Verwandtschaft zum spannungsgesteuerten Kaliumkanal KCNA1 stehen (Meyer et al. 2001). Diese Hypothese erschien klinisch plausibel, da die Leu309Met-Mutation des MLC1-Genes eine Korrelation zum Auftreten der katatonen Schizophrenie in einer großen Stammbaumstudie aufwies, und auch KCNA1-Mutationen über Störungen des zellulären Ionengleichgewichtes zu verschiedenen zerebralen Symptomen (episodische Ataxien, Anfallsleiden, Myokymien u.a.) führen können. Zudem könnte eine Kanal- oder Transporterfunktion gut mit einigen Symptomen der MLC (Vakuolenbildung, Epilepsie) in Einklang gebracht werden, deren ursächliche Beziehung zu MLC1 zwischenzeitlich nachgewiesen worden war (Leegwater et al. 2001).

### *Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen MLC1*

Da zur Aufklärung der funktionellen Bedeutung wie auch zur näheren Untersuchung der differentiellen Proteinexpression von MLC1 immunhistochemische Verfahren unerlässlich sind, sollte als weiteres Ziel dieser Arbeit ein polyklonales Antiserum gegen humanes MLC1 gewonnen werden. Hierzu wurden als am besten geeignete immunogene Nicht-TM-Abschnitte das N-terminale Ende (61 AS) und das C-terminale Ende (54 AS) von MLC1 mittels computergestützter Analyseverfahren bestimmt, und ein 117 AS langes Vakzinierungsprotein entworfen. Durch RT-PCR wurden die entsprechenden Bereiche amplifiziert, in einen pTYB1-Vektor des Impact-CN®-Systems einkloniert und der Erfolg durch eine Bestimmung der Basensequenz nach Sanger

überprüft und bestätigt. Kompetente ER2566-Zellen wurden mit dem so gewonnenen Vakzinierungsvektor transformiert und unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen inkubiert. Nach Ultraschall-vermitteltem Aufschluss der Zellen wurde eine Affinitätschromatographie auf Chitin-Säulen durchgeführt, die das gebildete Fusionsprotein, welches neben der MLC1-Sequenz C-terminal ein Intein-Tag und eine Chitin-bindende Domäne enthielt, binden und so von den verbleibenden Zellbestandteilen abtrennen sollte. Schließlich sollte der 117 AS lange MLC1-Abschnitt des Proteins durch DTT-vermittelte Selbst-Spleißung freigesetzt, eluiert, und qualitativ und quantitativ mittels Bradford-Assay und SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen werden.

Leider konnte trotz vielfältiger Variation der Versuchsparameter kein eindeutiger Nachweis einer ausreichenden Expression des MLC1-Fusionsprotein in den ER2566-Zellen erbracht werden. Zwar zeigte das Bradford-Assay (und auch die OD<sub>280 nm</sub>-Messung) eine erhöhte Proteinkonzentration in den ersten vier bis sechs Elutionsfraktionen, was in Anbetracht eines Säulenvolumens von 4-6 ml plausibel erscheint, und die Gesamtproteinmenge in den Fraktionen lag mit bis zu ~560 ng/1 ml-Fraktion (Bradford-Assay) in einem durchaus nachweisbaren Bereich. Doch leider konnte weder eine eindeutige IPTG-induzierte noch von Inkubationsparametern abhängige Verstärkung einer Bande im Größenbereich des Fusion- oder Vakzinierungsproteins in den Elutionsfraktionen bzw. den während der Säulenchromatographie gewonnenen Zwischenproben entdeckt werden. Zudem lag die insgesamt aus der Säulenchromatographie gewonnene Proteinmenge auch bei Verwendung größerer Bakterien-Inkubationsvolumina weit unterhalb eines für die anschließend geplante Immunisierung notwendigen Niveaus.

Die Frage, warum unter Verwendung des gewählten Impact-CN-Expressionssystem zu keiner eindeutig erkennbaren Expression des MLC1-Vakzinierungsproteins kam, ist nicht einfach zu beantworten. Die erfolgreiche Sequenzierung des Vakzinierungsplasmids schließt einen Fehler der kodierenden Sequenzen aus. Primerdesign, Auswahl des Vektors (pTYP1) sowie die verwendeten experimentellen Parameter entsprachen den Empfehlungen des Herstellers. Die in Testreihen erzielten Ausbeuten lagen nach seinen Angaben bei verschiedenen Proteinen zwischen 800 µg/l und 20 mg/l Bakteriensuspension – die maximale Protein-Ausbeute im besten Inkubationsansatz betrug jedoch lediglich ca. 25 µg/l. Die Gründe für eine verminderte Expression können vielfältig sein: Eine ungünstige Codon-Frequenz, eine schlechte Löslichkeit, intrazelluläre Degradation der mRNA und proteolytische Abbauvorgänge sowie Hemmungen der Proteinbiosynthese durch die biologische Funktion des Proteins (intrazelluläres Messaging, Toxizität etc.) können zu geringen Expressionswerten beitragen. Die verwendete humane Codon-Sequenz des Vakzinierungsproteins war nicht für eine Expression in *E.coli* adaptiert; ihr *codon adaption index* (cai, Institut Pasteur; Sharp und Li 1987) war nicht optimal (0,382) und lag unterhalb des cai des Proteins mit der geringsten vom Hersteller angegebenen Expression CamK II<sup>32</sup> (cai: 0,443; human; 800 µg/l) und weit unterhalb des Wertes des Proteins mit der höchsten Expression MBP<sup>33</sup> (cai: 0,695, bakteriell; 20 mg/l). Hinzu kommt, dass das Vakzinie-

---

<sup>32</sup> Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II

<sup>33</sup> Maltose binding protein

rungsprotein deutlich kleiner war als die meisten Testproteine (Vakzinierungsprotein: 13 kDa, CamK IIa: 54 kDa, MBP: 43 kDa), so dass selbst bei gleicher molarer Expressionsstärke die Masse der gesamte Proteinausbeute ca. 3-4-fach niedriger liegen würde. Über die intrazelluläre Stabilität der mRNA und des Proteins selbst in *E.coli* kann nur spekuliert werden, zumindest die Löslichkeit sollte vermutlich kein größeres Problem dargestellt haben, da das Vakzinierungsprotein im Wesentlichen aus den hydrophilen Enden des MLC1-Proteins bestand und nur einen kurzen Abschnitt der ersten Transmembrandomäne enthielt.

Denkbar sind neben einer zu geringen Expression des Fusionproteins auch Probleme bei der Ultraschall-vermittelten Freisetzung der Proteine sowie bei der säulenchromatographischen Aufreinigung. Während zumindest der erfolgreiche Aufschluss der Zellen anhand des Nachweises ausgeprägter Proteinsignale des *crude cell extracts* in der SDS-Gelelektrophorese bewiesen werden konnte, ist die Beurteilung der erfolgreichen Bindung des Fusionsproteins an die Chitinsäulen und der Abtrennung des Vakzinierungsproteins schwieriger, da bereits der eindeutige Nachweis des Fusionsproteins nach Auftragung des Zellextraktes weder aus der ersten Waschkfraktion, noch aus den *chitin beads* möglich war. Eine unzureichende Abspaltung des Vakzinierungsproteins dagegen erscheint aufgrund der variierten Parameter der Spaltungsinzubation und der optimalen Klonierungssequenz unwahrscheinlich<sup>34</sup>.

Vor dem Hintergrund der beschriebenen experimentellen Probleme ist die nähere Betrachtung der fünf zwischenzeitlich publizierten MLC1-Antikörper hilfreich. Zwei von drei Autoren bedienten sich zu diesem Zweck synthetischer Polypeptide und verwendeten zwei kurze Abschnitte der murinen N-terminalen (2 ×15 AS; Teijido et al. 2004) bzw. der humanen N-terminalen (16 AS) und C-terminalen Sequenz (15 AS; Boor et al. 2005) zur Vakzinierung. Nur in einem Fall wurde das Antigen *in vivo* durch Expression in *E. coli* gewonnen, wobei das verwendete Verfahren drei wesentliche Unterschiede zu dem in dieser Arbeit verwendeten Ansatz besaß (Ambrosini et al. 2008):

1. Statt eines Fusionsproteins der N- und C-terminalen Bereiche wurde die gesamte humane MLC1-Sequenz verwendet.
2. Dem N-terminalen Ende wurde ein 6×HIS-Tag hinzugefügt.
3. Es wurde ein anderem Expressionssystem (QIAexpressionist™) mit abweichendem Klonierungsplasmid (pQE-30), *E.coli*-Stamm (M15 od. SG13009), und Aufreinigerungsverfahren (Ni-NTA Agarose) benutzt.

Wenngleich der Grund für das unterschiedliche Ergebnis der beiden experimentellen Ansätze nicht sicher festgestellt werden kann, können die erwähnten Punkte doch hilfreiche Hinweise liefern: Durch die erhöhte Proteinmasse des Gesamtproteins (1) dürfte die Massenausbeute bereits bei gleicher molarer Expressionsstärke ca. 3-4-fach höher gelegen haben. Zudem könnte das native Gesamtprotein möglicherweise eine größere intrazelluläre Stabilität besitzen als das

---

<sup>34</sup> Das C-terminale Glutamin lässt nach Herstellerangaben eine effiziente Thiol-vermittelte Abspaltung des Vakzinierungsproteines bei den verwendeten Inkubationsbedingungen erwarten.

(artifizielle) Fusionsprotein. Auch die N-terminale Hinzufügung des 6×HIS-Tags (2) kann die Expressionsstärke eines Proteins deutlich erhöhen (The QIAexpressionist 2003). Schließlich ist es möglich, dass die Verwendung des pQE-30/M15- oder pQE-30/SG13009-Systems (3) eine höhere Expressionsleistung ermöglicht als das pTYB1/ER2566-System, und dass über eine HIS-Tag-gebundene Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Agarose eine bessere Aufreinigungseffizienz erzielt wird als über die *chitin beads* mit Intein-vermittelter Selbst-Spleißung.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es leider nicht möglich war, mit dem gewählten experimentellen Ansatz eine ausreichende Menge an MLC1-Vakzinierungsprotein zu gewinnen. Die Gründe hierfür sind nicht endgültig geklärt, liegen aber vermutlich in erster Linie in einer zu geringen Expressionsrate des Vakzinierungsproteins in dem verwendeten *E.coli*-Stamm.

#### *Aktuelle Forschungsergebnisse zur funktionellen Bedeutung von MLC1*

Die Entwicklung gegen MLC1 gerichteter polyklonaler Antikörper ermöglichte es anderen Arbeitsgruppen, genauere Untersuchungen zur Lokalisation des Proteins (s.o.), seiner molekularen Struktur und intrazellulären Interaktionspartnern vorzunehmen. So konnte durch Verwendung zweier getrennter Antikörper gegen N- und C-terminale Abschnitte gezeigt werden, dass beide Enden des membranständigen Proteins im Cytosol liegen und MLC1 somit eine gerade Anzahl an Transmembrandomänen (vermutlich acht) besitzt (Boor et al. 2005). Western-Blot-Analysen von Proteinextrakten aus dem murinen Gehirn und ein *assembly-dependent trafficking assay* ergaben, dass MLC1 in vivo als Monomer, Dimer und evtl. (bei Überexpression) auch als Trimer vorliegen kann (Teijido et al. 2004). Aufbauend auf diesen Ergebnissen konnten Ambrosini und Mitarbeiter über einen fraktionierten Zellaufschluss mit anschließender Western-Blot-Analyse nachweisen, dass im Cytosol von Ratten-Astrozytenkulturen in erster Linie die monomere Form (ca. 36 kDa<sup>35</sup>) lokalisiert ist und sich dort teilweise unter Ausbildung von Disulfidbrücken zu Tetrameren zusammenlagert (Ambrosini et al. 2008). In der Fraktion membranassoziierter Proteine ließ sich neben dem monomeren MLC1 eine etwas leichtere Form von ca. 30 kDa identifizieren, deren Bedeutung (Konformationsisomer?) unklar ist. MLC1-Dimere (oder Heterodimere; 60-64 kDa) hingegen fanden sich ausschließlich in der Fraktion integraler Membranproteine. Ihre Verbindung ist DTT-stabil und somit vermutlich nicht durch Disulfidbrücken vermittelt. Es konnte kein Hinweis auf Glycosylierungen des Proteins gefunden werden (Maus: Boor et al. 2005; Ratte: Ambrosini et al. 2008).

Seit der Entdeckung von MLC1 wurde aufgrund von Sequenzhomologien (Meyer et al. 2001; Leegwater et al. 2001) und seiner schwerpunktmäßigen Expression an Gewebegrenzen über eine Funktion als Ionenkanal spekuliert (Teijido et al. 2004; Boor et al. 2005; Teijido et al. 2007). Allerdings konnte in Voltage-Clamp-Versuchen an *Xenopus*-Oozyten nach MLC1-Injektion keine spannungstriggerte oder cAMP-induzierte Änderung des Membranpotenzials bzw. der

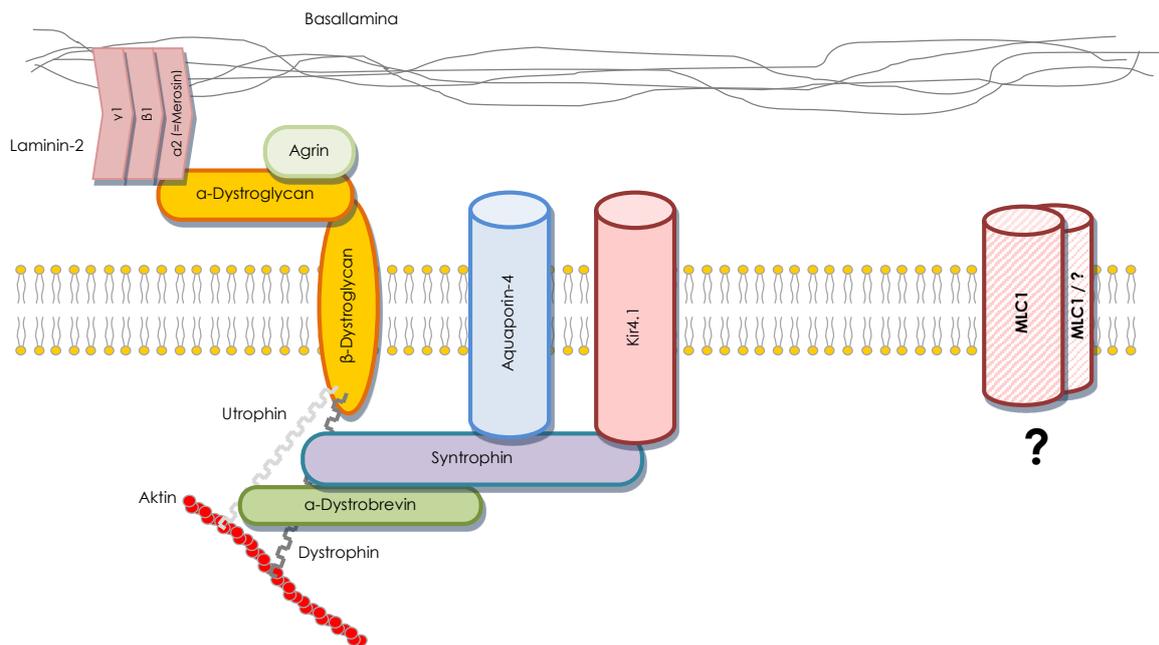
---

<sup>35</sup> Das Protein erscheint kleiner als erwartet (41 kDa) – vermutlich weil eine durch hydrophobe Abschnitte veränderte räumliche Struktur eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit bedingt.

membranösen Leitfähigkeit nachgewiesen werden (Teijido et al. 2004). Weitere Studien mit MLC1-transfizierten CHO-Zellen führten zu vergleichbaren Resultaten (Kaganovich et al. 2004). Ob MLC1 somit tatsächlich keine Funktion als Ionenkanal wahrnimmt, oder ob in den Expressionsmodellen lediglich die auslösenden Faktoren zur Öffnung des Kanals bzw. essentielle Kofaktoren für seine Funktion fehlten, bleibt jedoch offen.

Als weitere Hypothese zur funktionellen Bedeutung von MLC1 wurde in den vergangenen Jahren eine Interaktion mit dem membranständigen Dystrophin-assoziierten Glykoprotein-Komplex (DGC) postuliert (siehe Abbildung 5-1). Dieser kommt in verschiedenen Geweben in leicht unterschiedlicher Zusammensetzung vor und besitzt als Verbindungsstruktur des intrazellulären Cytoskeletts mit der extrazellulären Basallamina im Gehirn eine große Bedeutung für die zelluläre Entwicklung und Funktion (z.B. synaptische Plastizität, Ionen-Homöostase, Ausbildung und Funktion der Blut-Hirn-Schranke). Ausgangspunkt der Vermutung einer MLC1-DGC-Interaktion war die interessante Beobachtung, dass Kinder, die am MDC1A-Subtyp der kongenitalen Muskeldystrophie (CMD) leiden, neben der muskulären Symptomatik oft auch zerebrale Auffälligkeiten aufweisen, die sowohl makroskopisch (diffus abnormale und geschwollene weiße Substanz, anterior temporale Zysten: van der Knaap et al. 1997) wie mikroskopisch (Vakuolen in der Myelinscheide: Echenne et al. 1984) eine große Ähnlichkeit zur MLC besitzen (van der Knaap et al. 1995). MDC1A wird durch Mutationen im LAMA2-Gen verursacht, welches seinerseits für eine Untereinheit von Laminin-2 kodiert – einem Protein, das eine Brückenfunktion zwischen der extrazellulären Basallamina und dem DGC ausübt. Dies legt eine wichtige Rolle des DGC für die Pathogenese des MDC1A-Subtyps der CMD – und somit möglicherweise auch der MLC – nahe.

Zur Überprüfung dieser Hypothese führten Boor und Mitarbeiter Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen von MLC1 mit verschiedenen DGC- und DGC-assoziierten Proteinen an humanen gliotischen Gehirnschnitten durch (Boor et al. 2007). Hierbei konnten sie eine Co-Lokalisation von MLC1 insbesondere mit dem Transmembran-Protein  $\beta$ -Dystroglycan, in geringem Maße auch mit extrazellulärem Agrin und intrazellulärem Syntrophin nachweisen. Vergleichbare Untersuchungen von Ambrosini und Mitarbeitern bestätigten diese Ergebnisse weitgehend, wobei sie die Co-Lokalisation von MLC1 und  $\beta$ -Dystroglycan vornehmlich an den perivaskulären astrozytären Endfüßchen der paraventriculären weißen Substanz, von MLC1 und Syntrophin sowohl an den perivaskulären astrozytären Endfüßchen wie auch an Kontaktstellen zwischen Ependymzellen detektierten (Ambrosini et al. 2008). Zudem konnte in Ratten-Astrozytenkulturen eine punktuell konzentrierte Co-Lokalisation von MLC1 und  $\alpha$ -Dystroglycan an der Zellmembran von Zellkörper und Zellfortsätzen nachgewiesen werden.



**Abbildung 5-1: Hypothetischer Aufbau des Dystrophin-assoziierten Glykoprotein-Komplexes in humanen Astrozyten und seine mögliche Interaktion mit membranständigem MLC1**

Dargestellt sind einige der derzeit bekannten Bestandteile des Dystrophin-assoziierten Glykoprotein-Komplexes (DGC) bzw. seine assoziierten Proteine in humanen Astrozyten. Zentrales Element ist das membranständige  $\beta$ -Dystroglycan, das über das stark glycosylierte  $\alpha$ -Dystroglycan und Merosin (als Untereinheit von Laminin-2) mit der Basallamina verbunden ist. Intrazellulär üben Dystrophin und Utrophin eine Brückenfunktion zu Aktinfilamenten und damit zum Cytoskelett aus. An Dystrophin/Utrophin kann  $\alpha$ -Dystrobrevin binden, welches seinerseits Assoziationen zu Kanalproteinen wie dem Wasserkanal Aquaporin-4 oder dem Kaliumkanal Kir4.1 aufbauen kann. Mit welchen Bestandteilen des DGC MLC1 interagiert, ist Gegenstand mehrerer Untersuchungen (siehe Text).

Verändert nach Leiden University Medical Center (2007), Boor et al. (2007), Ambrosini et al. (2008), Lanciotti et al. (2010).

Zur Aufdeckung direkter Proteininteraktionen führten mehrere Autoren Co-Immuno-präzipitationen und Co-Fraktionierungen mit MLC1 in verschiedenen experimentellen Modellen durch. Boor und Mitarbeiter konnten dabei mittels paralleler MLC1- und Kir4.1-Präzipitationen in einem Lysat aus dem humanen Gehirn Hinweise auf den Kaliumkanal Kir4.1 als Bindungspartner finden (Boor et al. 2007). In weiteren Untersuchungen gelang Ambrosini über ein mehrstufiges Aufreinigungsprotokoll in einem Lysat aus dem Ratten-Gehirn die Co-Fraktionierung von MLC1 mit den Proteinen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Dystroglycan, Syntrophin und Caveolin-1 (Ambrosini et al. 2008). Schließlich konnten Lanciotti und Mitarbeiter in Pull-down-Assays eine Assoziation der endständigen intrazellulären MLC1-Domänen mit Dystrobrevin, Kir4.1, Syntrophin und Caveolin-1 in Ratten-Astrozyten nachweisen (nicht jedoch mit  $\beta$ -Dystroglycan; Lanciotti et al. 2010). Somit erscheint in der Gesamtschau der Ergebnisse eine Assoziation bzw. Interaktion von MLC1 mit Komponenten des DGC als sehr wahrscheinlich, wenngleich der exakte Bindungsmechanismus weiterhin unbekannt ist.

Die beobachtete Co-Präzipitation von MLC1 mit Caveolin-1 wies auf eine mögliche Lokalisation in den Caveolae hin, einer Untergruppe der *Lipid Rafts*, die als cholesterol- und glycosphingolipidreiche „Inseln“ in der Zellmembran eine wichtige Rolle für den Proteintransport (u.a. Endozytose) und die Ausbildung von Zellsignalkomplexen besitzen (Brown 2006b). Über eine Dichtegradientenzentrifugation, die selektiv Bestandteile der Lipid Rafts aufreinigt, konnten Ambrosini und Mitarbeiter in Ratten-Astrozyten das 60-64 kDa-MLC1-Dimer (nicht jedoch das Monomer) zusammen mit verschiedenen Komponenten des DGC ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Dystroglycan, Syntrophin) in den Caveolae nachweisen (Ambrosini et al. 2008). Anhand von Co-Immunfluoreszenzfärbungen mit organellspezifischen Markern zeigten sie, dass MLC1 im endoplasmatischen Retikulum, in Caveosomen, frühen Endosomen sowie (selten) in Lysosomen zu finden ist, nicht jedoch in Clathrin-Vesikeln oder im Trans-Golgi-Netzwerk. Diese intrazelluläre Ordnung war abhängig von der Funktion der Mikrotubuli und konnte durch Mikrotubuli-Disruptoren zerstört werden. Subzelluläre Fraktionierungen deuteten darauf hin, dass MLC1 in frühen Endosomen lediglich als Monomer (36 kDa) vorkommt, während es in den übrigen Kompartimenten sowohl als leichtes Mono- (30 kDa), wie auch als Dimer (60-64 kDa) anzutreffen ist. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass MLC1 möglicherweise über eine Caveolin-1-vermittelte Endozytose von der Zellmembran über Caveosomen zum Zwecke des Proteinrecyclings zum ER, oder zum proteolytischen Abbau zu Lysosomen transportiert wird. Diese Vermutung wurde weiterhin dadurch gestützt, dass Inhibitoren der Caveolin-vermittelten Endozytose zu einer Zunahme der zellmembranständigen Dimere führten, während stimulierende Faktoren eine Verstärkung monomeren MLC1 in paranukleären Kompartimenten bewirkten. Abschließend untersuchten die Autoren, inwieweit der Phosphorylierungsstatus von MLC1 für die Lokalisation des Proteins von Bedeutung ist. Es konnten zwei Phosphorylierungsstellen nachgewiesen werden (Serine S27 und S339), die von den Proteinkinasen A (nur S27) und C (S27 und S339) phosphoryliert werden. Stimulatoren der Proteinkinasen führten *in vivo* zu einer Zunahme der zellmembranständigen MLC1-Dimere und einer Abnahme von intrazellulärem monomeren MLC1. Da S27 von einem ER Rückhalte-Signal umgeben ist, liegt die Annahme nahe, dass ähnlich wie bei anderen Kanal- und Transportproteinen auch bei MLC1 die Phosphorylierung von S27 als Markierung des erfolgreichen Assemblies im ER dient und den Transport zur Zellmembran initiiert (Scott et al. 2003).

Vor dem Hintergrund der bekannten Bedeutung von MLC1 für die Pathogenese der MLC und evtl. auch affektiver Erkrankungen ist es von besonderem Interesse, Veränderungen des intrazellulären Proteintransportes bei bekannten Mutationsvarianten zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass in transfizierter *Xenopus* Oocyten oder HeLa-Zellen MLC-Mutationen zu einer Verringerung des zellulären und insbesondere des membranständigen MLC1-Proteins in einer Größenordnung von 5-95% führten (Teijido et al. 2004; Duarri et al. 2008)<sup>36</sup>. Durch Einfügung einer Glycosylierungssequenz und Untersuchung des Glycosylierungsstatus in verschiede-

---

<sup>36</sup> Interessanterweise zeigte die L309M-Mutation, deren Rolle in der Pathogenese der periodischen Katatonie stark umstritten ist, keine signifikante Reduktion der MLC1-Expression.

nen Mutationsvarianten konnten die Autoren belegen, dass bei der Mehrzahl der Mutationen ein Großteil der translatierten MLC1-Proteine nicht den Golgi-Apparat (und somit auch nicht die Plasmamembran) erreicht, sondern im ER zurückgehalten wird. Gleichzeitig fand sich eine teilweise starke Verringerung der Halbwertszeit der MLC1-Proteine, die sich durch Hemmung der Proteasomen bzw. Lysozyme partiell aufheben ließ und somit auf verstärkte Abbauvorgänge bei vielen Mutationen schließen lässt. Dass diese Störungen der Stabilität und des intrazellulären Transportes auch in Zelltypen auftreten, die *in vivo* MLC1 exprimieren, ließ sich anhand immunhistochemischer Färbungen von transfizierten Ratten-Astrozyten nachweisen: Während im Falle der Wildtyp-Sequenz der größte Teil der MLC1-Proteine membranständig war, zeigte sich im Falle der mutierten MLC1-Sequenzen eine deutlich ausgeprägtere (oft ausschließliche) intrazelluläre Verteilung. Zur Überprüfung der Relevanz dieser Befunde für die Diagnostik der MLC beim Menschen wurde eine quantitative Bestimmung von MLC1-Protein in Monozyten aus dem peripheren Blut von MLC1-Patienten und Kontrollpersonen vorgenommen. Auch hier zeigte sich im Falle der MLC-Patienten mit MLC1-Mutationen eine deutliche Verringerung der MLC1-Expression. Schließlich gelang den Autoren *in vitro* der Nachweis, dass die mutationsbedingte Reduktion von membranständigem MLC1 bei Mutationen mit gering reduzierter Expression teilweise reversibel sind, wenn die Inkubationstemperaturen abgesenkt und chemische Chaperone wie Glycerol zugesetzt werden, oder der proteasomale Abbauweg durch Zugabe von Proteasominhibitoren inhibiert wird. Insbesondere letzterer Ansatz mit dem bereits für die klinische Anwendung zugelassenen Wirkstoff Bortezomib könnte einen möglichen ersten Ansatzpunkt zur Entwicklung einer kausalen Therapie der MLC darstellen.

### 5.3. Ausblick

Zusammenfassend kann heute als bewiesen gelten, dass Mutationen des Gens *MLC1* für einen Großteil der klinischen Fälle der MLC verantwortlich sind, und dass der diesbezüglich wesentliche pathogenetische Mechanismus in einer Reduktion funktionaler zellmembranständiger MLC1-Proteine in Astrozyten und Neuronen besteht. Vermutlich führen die Mutationen entweder zu einer kompletten Unterdrückung der Expression (z.B. Deletionen), oder zur Expression nicht korrekt gefalteter Proteine, deren weiterer Transport bereits im ER unterdrückt wird und die stattdessen in Lysosomen und Proteasomen abgebaut werden. Funktionales MLC1 übt seine biologische Funktion als zellmembranständiges Dimer aus, wobei es mit Komponenten des DGC in Caveolae interagiert und in einem caveosomalen Recycling-Kreislauf eingebunden ist.

Wenngleich das Wissen um die Bedeutung und die Funktion von MLC1 in den vergangenen Jahren stark zugenommen hat, verbleiben dennoch eine Reihe wichtiger Fragen für die Zukunft:

- (1) Welche biologische Funktion übt MLC1 exakt aus? Dient es als Ionenkanal, oder ist es als Kofaktor in die Steuerung von Ionenkanälen involviert? Wie genau (Bindungspartner) erfolgt die Interaktion von MLC1 mit dem DGC?
- (2) Wie können die drei aktuell erkennbaren therapeutischen Ansatzpunkte zur Behandlung der MLC (Hemmung des proteasomalen/lysozymalen Abbaus, Hemmung der Caveolin-vermittelten Endozytose, Verstärkung des MLC1-Transportes zur Zellmembran durch Proteinkinasen) in therapeutische Verfahren umgesetzt werden?
- (3) Besteht tatsächlich ein Zusammenhang zwischen MLC1-Expression und affektiven Erkrankungen, insbesondere der katatonen Schizophrenie?
- (4) Besitzt MLC1 auch eine biologische Bedeutung in nicht-neuralen Geweben? Insbesondere die starke Expression von MLC1 in einigen hämatopoetischen Zellen ist bemerkenswert – zumal die bisher für Astrozyten und Neurone diskutierte Bedeutung nur schwer mit der Rolle mobiler Zellen in Einklang zu bringen ist.

Es wird die Aufgabe weitergehender Studien sein, Antworten auf diese Fragen zu finden.

---

## 6. Zusammenfassung

Das humane MLC1 (auch als KIAA0027 oder WKL1 benannt) ist ein 377 AS umfassendes Protein, welches vornehmlich in neuronalen Geweben exprimiert wird. Aufgrund von Strukturanalysen und Homologievergleichen wurde eine Funktion als Ionenkanal mit acht Transmembrandomänen postuliert. *Loss-of-function*-Mutationen des *MLC1*-Gens lassen sich mit dem Auftreten der *Megalenzephalie Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten* korrelieren. Ferner konnte anhand einer Stammbaumanalyse gezeigt werden, dass die C1121 A-Mutation in einer größeren Familie mit dem Auftreten der *Periodischen Katatonie nach Leonhardt* (PK) kosegregierte, wobei Folgeuntersuchungen zur Assoziation von *MLC1*-Mutationen und dem Auftreten der PK widersprüchliche Ergebnisse erbrachten.

Zur weiteren Aufklärung der biologischen Funktion von MLC1 war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, in zwei experimentellen Ansätzen nähere Kenntnisse zum transkriptionellen Expressionsmuster von *MLC1 in vivo* zu gewinnen, und anschließend durch Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen das humane MLC1 den Grundstein für weitergehende Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung von MLC1 zu legen.

Mittels *In Situ-Hybridisierung* humaner und muriner Gewebeschnitte aus Hippocampus und Cerebellum konnte gezeigt werden, dass die *MLC1/Mlc1*-Transkription in diesen Geweben vornehmlich in den Bergmann-Gliazellen der Purkinjzellschicht des Cerebellums sowie – in schwächerem Umfang – in verstreut liegenden und in der subgranulären Zone des Gyrus dentatus gehäuft Astrozyten des murinen Hippocampus nachweisbar war. Im zweiten Schritt der Analyse wurden humane post-mortem cDNA-Proben aus verschiedenen Gehirnregionen und zusätzlich einigen nicht-neuronalen Geweben von zwei Menschen gewonnen, mittels quantitativer Real-time-PCR die Genexpression von *MLC1* bestimmt und mithilfe des Expressionsniveaus von ausgewählten Housekeeping-Genen (*GAPDH*, *L13a*,  $\beta$ -*Aktin*, *ARP* und *Cyclophilin*) normalisiert. Es zeigte sich, dass in allen getesteten Hirnregionen eine deutliche *MLC1*-Expression festzustellen war, deren Maxima im Cerebellum und Frontalhirn und deren Minima im Putamen bzw. im nicht-neuralen Plexus chorioideus lagen. Zudem konnte eine nicht-neurale Expression auf sehr geringem Niveau für Lunge und Milz nachgewiesen werden.

Zur Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers gegen humanes MLC1 wurden mittels computergestützter Verfahren ein 117 AS langes Vakzinierungsprotein entworfen, welches immunogene Abschnitte des N-Terminus (61 AS) und C-Terminus (54 AS) enthielt. Die kodierende Sequenz wurde unter Verwendung des Impact-CN®-Expressionssystem in einen pTYB-Vektor kloniert, in ER2566-Zellen exprimiert, das Protein affinitätschromatographisch über Chitin-Säulen isoliert und aufgereinigt und mittels Bradford-Assay und SDS-Gelelektrophorese nachgewiesen.

Leider konnte trotz vielfältiger Variation der Versuchsparameter kein eindeutiger Nachweis einer ausreichenden Expression des MLC1-Proteins in den ER2566-Zellen erbracht werden, die für die anschließende Vakzinierung von Kaninchen zur Gewinnung des polyklonalen Antiserums erforderlich gewesen wäre. Die Gründe hierfür sind unklar, denkbar sind beispielsweise eine suboptimale Codon-Frequenz, eine schlechte Proteinlöslichkeit, intrazelluläre mRNA-

---

Degradation, proteolytische Abbauvorgänge oder eine Hemmung der Proteinbiosynthese durch die biologische Funktion des Proteins.

Zusammenfassend konnten die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse einen Beitrag zur Erweiterung des Wissens zur MLC1-Expression leisten. Dabei entsprachen die Befunde zur humanen MLC1-Expression weitgehend den diesbezüglichen Beobachtungen zur regionalen und zellulären Expressionsstärkenverteilung aus dem Mausmodell, welche eine funktionelle Bedeutung von MLC1 im Rahmen von neuronalen Schrankenstrukturen nahelegten (vgl. Schmitt et al. 2003). Mittels der zwischenzeitlich von anderen Arbeitsgruppen (über andere experimentelle Verfahren) erzeugten Antikörper gegen MLC1 konnte gezeigt werden, dass funktionelles MLC1 vermutlich als zellmembranständiges Dimer vorliegt und seine biologische Funktion u.a. durch Interaktion mit dem DGC (=Dystrophin-assoziierten Glykoprotein-Komplex) in den Caveolae ausübt. Es bleibt eine Aufgabe für die Zukunft, die genauen molekularen Mechanismen dieser Prozesse und ihre mögliche therapeutische Beeinflussbarkeit zur Behandlung der MLC zu erforschen. Auch die Frage der potenziellen extraneuralen *MLC1*-Expression, für die in dieser Arbeit Hinweise gefunden wurden, mag ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige Forschungsarbeiten sein.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungsverzeichnis

aP	alkalische Phosphatase
AR	Amplifikationsrate
AS	Aminosäure(n)
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
bp	Basenpaare
CBD	Chitin binding domain
cDNA	complementary DNA (durch reverse Transkription aus mRNA gewonnen)
CDS	coding sequence
CHO	Chinese Hamster Ovary
CMD	congenital muscular dystrophy
DEPC	Diethylidicarbonat
DGC	dystrophin-associated glycoprotein complex
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ddNTP	Didesoxy-Nukleotide (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP)
dNTP	Desoxy-Nukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FP	Fusionsprotein
g	Erdbeschleunigung: 9,81 m/s <sup>2</sup>
gDNA	genomische DNA
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde(n)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
ISH	<i>In Situ</i> -Hybridisierung
kb	Kilobasen(-paare)
kDa	Kilo-Dalton
MCS	Multiple cloning site
MDE	Manisch-depressive Erkrankung
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MIM	Mendelian Inheritance in Man
min	Minute(n)
MLC	Megalenzephalie Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

PK	Periodische Katatonie
qRT-PCR	quantitative Real-time-PCR
PFA	Paraformaldehyd
RFU	relative fluorescence unit
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde(n)
SD	standard deviation = Standardabweichung
SDS	sodium dodecylsulfate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNP	single nucleotide polymorphism
SSC	saline sodium citrate (buffer)
sWGA	succinyl-wheat germ agglutinin
TCR	transcriptional control region
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	Über Nacht
UTR	untranslated region
V	Volt
VP	Vakzinierungsprotein
W	Watt
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentralnervensystem

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

### Einleitung

Abbildung 1-1: Aufbau des humanen <i>MLC1</i> -Genlokus.....	12
--	----

### Fragestellung, Ziele und experimentelle Strategie

Abbildung 2-1: Übersicht über den experimentellen Ablauf für Zielstellung I.....	16
Abbildung 2-2: Übersicht über den experimentellen Ablauf für Zielstellung II und III .....	17

### Material und Methoden

Abbildung 3-1: Idealtypischer Fluoreszenzverlauf einer qPCR mit SYBR-Green I.....	40
Abbildung 3-2: Idealtypische Darstellung der Fluoreszenzkurven einer dezimalen Verdünnungsreihe .....	41
Abbildung 3-3: Beispielhafte Berechnung von $F_A$ aus der Steigung $S$ der Ausgleichsgeraden der logarithmierten $C_T$ -Werte der Verdünnungsreihe .....	42
Abbildung 3-4: Übersicht über die genetischen Grundlagen der IPTG-induzierten Expression des Fusionsproteines im Impact-CN-System .....	53

### Ergebnisse

Abbildung 4-1: Vergleich des Verteilungsmuster von <i>Mlc1</i> - und <i>MLC1</i> -mRNA in murinen und humanen Kleinhirnschnitten mittels <i>In Situ</i> -Hybridisierung. ....	61
Abbildung 4-2: Darstellung der Verteilungsmuster von <i>Mlc1</i> -mRNA in murinen Hippocampus-Gewebeschnitten mittels <i>In Situ</i> -Hybridisierung.....	63
Abbildung 4-3: Exemplarischer Schmelzkurvenverlauf der Verdünnungsreihe von <i>MLC1</i> .....	64
Abbildung 4-4: Exemplarischer Verlauf einer Verdünnungsreihe (Etablierungsphase <i>ARP</i> ).....	65
Abbildung 4-5: Normalisierte Quantitäten der Housekeeping-Gene <i>GAPDH</i> , $\beta$ - <i>Aktin</i> und <i>L13a</i> in verschiedenen Gehirnregionen des Menschen A .....	67
Abbildung 4-6: Normalisierte Quantitäten der Housekeeping-Gene <i>GAPDH</i> , $\beta$ - <i>Aktin</i> , <i>L13a</i> , <i>ARP</i> und <i>Cyclophilin</i> in verschiedenen Gehirnregionen und nicht-neuralen Geweben des Menschen B .....	67
Abbildung 4-7: Normalisierte Quantitäten von <i>MLC1</i> -mRNA in verschiedenen Gehirnregionen des Menschen A .....	68
Abbildung 4-8: Normalisierte Quantitäten von <i>MLC1</i> -mRNA in verschiedenen Gehirnregionen und nicht-neuralen Geweben des Menschen B .....	69
Abbildung 4-9: Prognose der Domänenstruktur des humanen <i>MLC1</i> -Proteins unter Verwendung von computergestützten Strukturanalyseverfahren.....	70
Abbildung 4-10: Prognose der Antigenität des humanem <i>MLC1</i> -Proteins unter Verwendung von computergestützten Strukturanalyseverfahren.....	71
Abbildung 4-11: Sequenz des <i>MLC1</i> -Vakzinierungsproteins .....	72

---

Abbildung 4-12:	Gelelektrophorese des erfolgreichen Restriktionsverdaus des pTYB1-Vektors (a) und des 5'-MLC1-Fragmentes (b) .....	73
Abbildung 4-13:	Screening-Gelelektrophorese der T7-Intein (reverse)-PCR der ER2566-Kolonien nach Transformation mit dem MLC1-5'D-3'D-ligierten pTYB1-Plasmid .....	74
Abbildung 4-14:	Ergebnis der Sequenzierung des Plasmids des Klons H26.10 .....	74
Abbildung 4-15:	Bestimmung der Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen über die OD <sub>280 nm</sub> -Methode.....	75
Abbildung 4-16:	Bestimmung der Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen nach Bradford .....	76
Abbildung 4-17:	Commassie-Färbung der im SDS-Gel aufgetrennten Zwischenproben und der Elutionsfraktionen .....	79
 <b>Diskussion</b>		
Abbildung 5-1:	Hypothetischer Aufbau des Dystrophin-assoziierten Glykoprotein-Komplexes in humanen Astrozyten und seine mögliche Interaktion mit membranständigem MLC1 .....	90

### 7.3. Tabellenverzeichnis

#### Einleitung

Tabelle 1-1:	Erst- und Zweitrangsymptome der Schizophrenie nach K. Schneider.....	2
Tabelle 1-2:	Positiv- und Negativsymptome der Schizophrenie nach N. Andreasen.....	2
Tabelle 1-3:	Vergleichende Darstellung aktueller Klassifikationssysteme der Schizophrenie .....	4
Tabelle 1-4:	Klinische Befunde der megalenzephalen Leukenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC) .....	9

#### Material und Methoden

Tabelle 3-1:	Schritte der <i>In Situ</i> -Hybridisierung.....	36
Tabelle 3-2:	Untersuchte Gewebe der Menschen 1 und 2 mithilfe der <i>MLC1</i> -qRT-PCR.....	43
Tabelle 3-3:	Untersuchte Gene der qRT-PCRs, verwendete Primer und primerspezifische PCR-Parameter .....	44
Tabelle 3-4:	Primer und Primerspezifische Parameter zur <i>MLC1</i> -cDNA-PCR .....	49
Tabellen 3-5:	Restriktionsenzymatischer Verdau des pTYB1-Plasmids und der <i>MLC1</i> -Fragmente zur Vorbereitung der Ligation des Vakzinierungsvektors .....	50
Tabelle 3-6:	PCR zum Nachweis der erfolgreichen <i>MLC1</i> -5'-3'-Klonierung in den pTYB-Vektor.....	52
Tabelle 3-7:	Getestete IPTG-Konzentrationen und Inkubationstemperaturen und -zeiten zur Expression des Fusionsproteins .....	54
Tabelle 3-8:	Coomassie-Färbung.....	58

#### Ergebnisse

Tabelle 4-1:	Effizienzen und Korrelationskoeffizienten der durchgeführten qRT-PCRs.....	65
Tabelle 4-2:	Geometrische Mittelwerte der primären Quantitäten der Housekeeping-Gene aller getesteten Gewebe .....	66
Tabelle 4-3:	M-Werte als Indikatoren der Stabilität der Gene <i>GAPDH</i> , <i>L13a</i> , $\beta$ - <i>Aktin</i> , <i>ARP</i> und <i>Cyclophilin</i> .....	66
Tabelle 4-4:	Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Proteinbestimmungen unter verschiedenen Inkubations- und Aufreinigungbedingungen .....	77

## 7.4. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Almgren, Malin; Nyengaard, Jens R.; Persson, Bengt; Lavebratt, Catharina (2008): **Carbamazepine protects against neuronal hyperplasia and abnormal gene expression in the megencephaly mouse.** In: *Neurobiology of disease*, Jg. 32, H. 3, S. 364–376. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2008.07.025>.
- Ambrosini, Elena; Serafini, Barbara; Lanciotti, Angela; Tosini, Fabio; Scialpi, Flavia; Psaila, Rossana et al. (2008): **Biochemical characterization of MLC1 protein in astrocytes and its association with the dystrophin-glycoprotein complex.** In: *Molecular and cellular neurosciences*, Jg. 37, H. 3, S. 480–493. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2007.11.003>.
- Andreasen, N. C. (1987): **The diagnosis of schizophrenia.** In: *Schizophrenia bulletin*, Jg. 13, H. 1, S. 9–22.
- Anita Riecher-Rössler (2002): **Östrogene und schizophrene Psychosen.** In: Kuhl, Herbert; Braendle, Wilhelm; Breckwoldt, Meinert (Hg.): *Sexualhormone und Psyche. Grundlagen, Symptomatik, Erkrankungen, Therapie.* Thieme, Stuttgart, S. 38–47.
- Banki, Mahmoud Reza; Wood, David W. (2005): **Inteins and affinity resin substitutes for protein purification and scale up.** In: *Microbial cell factories*, Jg. 4, S. 32. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2859-4-32>.
- Bateson, G.; Jackson, D. D.; Haley, J.; Weakland, J. (1956): **Toward a theory of schizophrenia.** In: *Behavioral Science*, Jg. 1956, H. 1, S. 251–264.
- Beckmann, Helmut; Leonhard, Karl (Hg.) (2003): **Aufteilung der endogenen Psychosen und ihre differenzierte Ätiologie.** 54 Tabellen. 8. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Ben-Zeev, Bruria; Levy-Nissenbaum, Etgar; Lahat, Hadas; Anikster, Yair; Shinar, Yael; Brand, Nathan et al. (2002): **Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts; a founder effect in Israeli patients and a higher than expected carrier rate among Libyan Jews.** In: *Human genetics*, Jg. 111, H. 2, S. 214–218. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-002-0770-y>.
- Bettecken, T.; Rubie, C.; Lichtner, P.; Siekiera, M.; Meitinger, T.; Stöber, G. (2002): **Reduced amplification efficiency of KIAA0027/MLC1 alleles: implications for the molecular diagnosis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts.** In: *Molecular and cellular probes*, Jg. 16, H. 5, S. 379–384.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1979): **A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.** In: *Nucleic acids research*, Jg. 7, H. 6, S. 1513–1523.
- Blattner, R.; Moers, A. von; Leegwater, P. A. J.; Hanefeld, F. A.; van der Knaap, M. S.; Köhler, W. (2003): **Clinical and genetic heterogeneity in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (MLC).** In: *Neuropediatrics*, Jg. 34, H. 4, S. 215–218. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-42210>.
- Bleuler, Eugen (1911): **Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien.** Leipzig – Wien: Deuticke.
- Boor, Ilja; Nagtegaal, Machiel; Kamphorst, Wouter; van der Valk, Paul; Pronk, Jan C.; van Horssen, Jack et al. (2007): **MLC1 is associated with the dystrophin-glycoprotein complex at astrocytic endfeet.** In: *Acta neuropathologica*, Jg. 114, H. 4, S. 403–410. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/s00401-007-0247-0>.
- Boor, Ilja P.; Groot, Koen de; Mejaski-Bosnjak, Vlatka; Brenner, Christiana; van der Knaap, Marjo S.; Scheper, Gert C.; Pronk, Jan C. (2006): **Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: an update and extended mutation analysis of MLC1.** In: *Human mutation*, Jg. 27, H. 6, S. 505–512. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/humu.20332>.
- Boor, P. K. Ilja; Groot, Koen de; Waisfisz, Quinten; Kamphorst, Wouter; Oudejans, Cees B. M.; Powers, James M. et al. (2005): **MLC1: a novel protein in distal astroglial processes.** In: *Journal of neuropathology and experimental neurology*, Jg. 64, H. 5, S. 412–419.
- Bradford, M. M. (1976): **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** In: *Analytical biochemistry*, Jg. 72, S. 248–254.
- Brown, Alan S. (2006): **Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia.** In: *Schizophrenia bulletin*, Jg. 32, H. 2, S. 200–202. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1093/schbul/sbj052>.

- Brown, Deborah A. (2006): **Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals.** In: Physiology (Bethesda, Md.), Jg. 21, S. 430–439. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1152/physiol.00032.2006>.
- Brown, G. W.; Birley, J. L.; Wing, J. K. (1972): **Influence of family life on the course of schizophrenic disorders: a replication.** In: The British journal of psychiatry : the journal of mental science, Jg. 121, H. 562, S. 241–258.
- Bugiani, M.; Moroni, I.; Bizzi, A.; Nardocci, N.; Bettecken, T.; Gärtner, J.; Uziel, G. (2003): **Consciousness disturbances in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts.** In: Neuropediatrics, Jg. 34, H. 4, S. 211–214. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/s-2003-42209>.
- Bustin, S. A. (2000): **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** In: Journal of molecular endocrinology, Jg. 25, H. 2, S. 169–193.
- Corcoran, Cheryl; Walker, Elaine; Huot, Rebecca; Mittal, Vijay; Tessner, Kevin; Kestler, Lisa; Malaspina, Dolores (2003): **The stress cascade and schizophrenia: etiology and onset.** In: Schizophrenia bulletin, Jg. 29, H. 4, S. 671–692.
- Devaney, J. M.; Donarum, E. A.; Brown, K. M.; Meyer, J.; Stöber, G.; Lesch, K. P. et al. (2002): **No missense mutation of WKL1 in a subgroup of probands with schizophrenia.** In: Molecular psychiatry, Jg. 7, H. 4, S. 419–423. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001022>.
- Dong-Dong, Lu (2005): **Up-regulation expression of MLC1 in human liver cancer tissue and enhanced SMMC7721 cell tumorigenesis in vivo and vitro.** In: Hepato-gastroenterology, Jg. 52, H. 64, S. 1186–1190.
- Duari, Anna; Teijido, Oscar; López-Hernández, Tania; Scheper, Gert C.; Barriere, Herve; Boor, Ilja et al. (2008): **Molecular pathogenesis of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: mutations in MLC1 cause folding defects.** In: Human molecular genetics, Jg. 17, H. 23, S. 3728–3739. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn269>.
- Ebert, Dieter (2008): **Psychiatrie systematisch:** UNI-MED Verlag, Bremen.
- Echenne, B.; Pages, M.; Marty-Double, C. (1984): **Congenital muscular dystrophy with cerebral white matter spongiosis.** In: Brain & development, Jg. 6, H. 5, S. 491–495.
- Emini, E. A.; Hughes, J. V.; Perlow, D. S.; Boger, J. (1985): **Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide.** In: Journal of virology, Jg. 55, H. 3, S. 836–839.
- Ewald, H.; Lundorf, M. D. (2002): **The missense mutation in the WKL1 gene not found in patients with bipolar affective disorder.** In: Molecular psychiatry, Jg. 7, H. 4, S. 340–341. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4001002>.
- Fallin, M. Daniele; Lasseter, Virginia K.; Avramopoulos, Dimitrios; Nicodemus, Kristin K.; Wolyniec, Paula S.; McGrath, John A. et al. (2005): **Bipolar I disorder and schizophrenia: a 440-single-nucleotide polymorphism screen of 64 candidate genes among Ashkenazi Jewish case-parent trios.** In: American journal of human genetics, Jg. 77, H. 6, S. 918–936. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1086/497703>.
- Feliu, J. X.; Cubarsi, R.; Villaverde, A. (1998): **Optimized release of recombinant proteins by ultrasonication of E. coli cells.** In: Biotechnology and bioengineering, Jg. 58, H. 5, S. 536–540.
- Freud, Sigmund (1894): **Die Abwehrneuropsychosen.** In: Neurol Zbl, Jg. 1894, H. XIII, S. 362–364, 402–409.
- Fromm-Reichmann, Frieda (1948): **Notes on the development of treatment of schizophrenics by psychoanalytic psychotherapy.** In: Psychiatry, Jg. 11, H. 3, S. 263–273.
- Gibson, U. E.; Heid, C. A.; Williams, P. M. (1996): **A novel method for real time quantitative RT-PCR.** In: Genome research, Jg. 6, H. 10, S. 995–1001.
- Gorospe, J. R.; Singhal, B. S.; Kainu, T.; Wu, F.; Stephan, D.; Trent, J. et al. (2004): **Indian Agarwal megalencephalic leukodystrophy with cysts is caused by a common MLC1 mutation.** In: Neurology, Jg. 62, H. 6, S. 878–882.
- Gorospe, J. Rafael; Maletkovic, Jelena (2006): **Alexander disease and megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: leukodystrophies arising from astrocyte dysfunction.** In: Mental retardation and developmental disabilities research reviews, Jg. 12, H. 2, S. 113–122. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/mrdd.20101>.

- Goutières, F.; Bouloche, J.; Bourgeois, M.; Aicardi, J. (1996): **Leukoencephalopathy, megalencephaly, and mild clinical course. A recently individualized familial leukodystrophy. Report on five new cases.** In: Journal of child neurology, Jg. 11, H. 6, S. 439–444.
- Griesinger, Wilhelm (1861): **Die Pathologie und Therapie der psychischen Krankheiten für Ärzte und Studierende.** 2., umgearb. und sehr verm. Aufl. Stuttgart: Krabbe.
- Heinrichs, R. Walter (2003): **Historical origins of schizophrenia: two early madmen and their illness.** In: Journal of the history of the behavioral sciences, Jg. 39, H. 4, S. 349–363. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/jhbs.10152>.
- Herbart, Johann Friedrich (1816): **Lehrbuch der Psychologie.** Königsberg, Leipzig: [s.n.].
- Hinterhuber, Hartmann (2005): **Theorien zur Ätiologie in den verschiedenen historischen Schizophreniekonzepten.** In: Fortschr Neurol Psychiat, Jg. 2005, H. 73, S. 3–8.
- Hooley, Jill M. (2007): **Expressed emotion and relapse of psychopathology.** In: Annual review of clinical psychology, Jg. 3, S. 329–352. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.clinpsy.2.022305.095236>.
- Institut Pasteur: **Mobyle@pasteur.** Online verfügbar unter <http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?form=cai>.
- Itoh, Nobuo; Maeda, Masayuki; Naito, Yutaka; Narita, Yugo; Kuzuhara, Shigeki (2006): **An adult case of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts with S93 L mutation in MLC1 gene: a case report and diffusion MRI.** In: European neurology, Jg. 56, H. 4, S. 243–245. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1159/000096672>.
- Jerbi Omezzine, S.; Ben Ameer, H.; Bousoffara, R.; Ayedi, A.; Hamza, H. A.; Sfar, M. T.: **[Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: report of 4 new cases].** In: Journal de radiologie, Jg. 89, H. 7-8 Pt 1, S. 891–894.
- Tiger: Tissue-specific Gene Expression and Regulation (MLC1).** Johns Hopkins University. Online verfügbar unter [http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/db\\_gene/MLC1-index.html](http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger/db_gene/MLC1-index.html).
- Juneja, Monica; Sharma, Suvasini (2005): **Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts.** In: Indian journal of pediatrics, Jg. 72, H. 2, S. 179–180.
- Kaganovich, M.; Peretz, A.; Ritsner, M.; Bening Abu-Shach, U.; Attali, B.; Navon, R. (2004): **Is the WKL1 gene associated with schizophrenia?** In: American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics, Jg. 125 B, H. 1, S. 31–37. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.b.20115>.
- Karplus PA, Schulz G. E. (1985): **Prediction of Chain Flexibility in Proteins - A tool for the Selection of Peptide Antigens.** In: Naturwissenschaften, H. 72, S. 212–213.
- Kiryama, Takao; Tanizawa, Emi; Hirano, Makito; Shinkai, Takayuki; Asai, Hirohide; Furiya, Yoshiko; Ueno, Satoshi (2007): **SPECT revealed cortical dysfunction in a patient who had genetically definite megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts.** In: Clinical neurology and neurosurgery, Jg. 109, H. 6, S. 526–530. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2007.03.012>.
- Kiryama, Takao; Tanizawa, Emi; Hirano, Makito; Shinkai, Takayuki; Asai, Hirohide; Furiya, Yoshiko; Ueno, Satoshi (2007): **SPECT revealed cortical dysfunction in a patient who had genetically definite megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts.** In: Clinical neurology and neurosurgery, Jg. 109, H. 6, S. 526–530. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.clineuro.2007.03.012>.
- Kirov, George; O'Donovan, Michael C.; Owen, Michael J. (2005): **Finding schizophrenia genes.** In: The Journal of clinical investigation, Jg. 115, H. 6, S. 1440–1448. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1172/JCI24759>.
- Knapp, Martin; Mangalore, Roshni; Simon, Judit (2004): **The global costs of schizophrenia.** In: Schizophrenia bulletin, Jg. 30, H. 2, S. 279–293.
- Koskenvuo, M.; Langinvainio, H.; Kaprio, J.; Lönnqvist, J.; Tienari, P. (1984): **Psychiatric hospitalization in twins.** In: Acta geneticae medicae et gemellologiae, Jg. 33, H. 2, S. 321–332.

- Koussa, S.; Roukoz, H.; Rizk, T.; Mégarbané, A. (2005): **[Megalencephalic leucoencephalopathy with subcortical cysts: a study of a Lebanese family and a review of the literature]**. In: *Revue neurologique*, Jg. 161, H. 2, S. 183–191.
- Kraepelin, Emil (1883): **Compendium der Psychiatrie**. Zum Gebrauche für Studierende und Aerzte. Leipzig: Abel (Abel's medicinische Lehrbücher).
- Kraepelin, Emil (1893): **Psychiatrie**. 4. Aufl. Leipzig: Abel (Meixner).
- Kuhl, Herbert; Braendle, Wilhelm; Breckwoldt, Meinert (Hg.) (2002): **Sexualhormone und Psyche**. Grundlagen, Symptomatik, Erkrankungen, Therapie: Thieme, Stuttgart.
- Kyziridis, Theocharis Chr. (2005): **Notes on the History of Schizophrenia**. In: *German Journal of Psychiatry*, S. 42–47.
- Laemmli, U. K. (1970): **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. In: *Nature*, Jg. 227, H. 5259, S. 680–685.
- Lanciotti, Angela; Brignone, Maria Stefania; Camerini, Serena; Serafini, Barbara; Macchia, Gianfranco; Raggi, Carla et al. (2010): **MLC1 trafficking and membrane expression in astrocytes: role of caveolin-1 and phosphorylation**. In: *Neurobiology of disease*, Jg. 37, H. 3, S. 581–595. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2009.11.008>.
- Lang, Undine E.; Puls, Imke; Muller, Daniel J.; Strutz-Seebohm, Nathalie; Gallinat, Jurgen (2007): **Molecular mechanisms of schizophrenia**. In: *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, Jg. 20, H. 6, S. 687–702. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1159/000110430>.
- Larsen, Jens Erik Pontoppidan; Lund, Ole; Nielsen, Morten (2006): **Improved method for predicting linear B-cell epitopes**. In: *Immunome research*, Jg. 2, S. 2. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1186/1745-7580-2-2>.
- Leegwater, P. A.; Yuan, B. Q.; van der Steen, J.; Mulders, J.; Könst, A. A.; Boor, P. K. et al. (2001): **Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leucoencephalopathy with subcortical cysts**. In: *American journal of human genetics*, Jg. 68, H. 4, S. 831–838. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1086/319519>.
- Leegwater, P. A. J.; Boor, P. K. I.; Yuan, B. Q.; van der Steen, J.; Visser, A.; Könst, A. A. M. et al. (2002): **Identification of novel mutations in MLC1 responsible for megalencephalic leucoencephalopathy with subcortical cysts**. In: *Human genetics*, Jg. 110, H. 3, S. 279–283. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-002-0682-x>.
- Leiden University Medical Center (2007): **The Dystrophin-associated Glycoprotein Complex (DGC)**. Online verfügbar unter <http://www.dmd.nl/DGC.html>, zuletzt aktualisiert am 2007.
- Leonhard, K. (1986): **Aufteilung Der Endogenen Psychosen Und Ihre Differenzierte Aetiologie**: John Wiley and Sons Ltd.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method**. In: *Methods (San Diego, Calif.)*, Jg. 25, H. 4, S. 402–408. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lottspeich, Friedrich; Zorbas, Haralabos (1998): **Bioanalytik**. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. (Spektrum Lehrbuch).
- Mane, Viraj P.; Heuer, Melissa A.; Hillyer, Philippa; Navarro, Maria B.; Rabin, Ronald L. (2008): **Systematic method for determining an ideal housekeeping gene for real-time PCR analysis**. In: *Journal of biomolecular techniques : JBT*, Jg. 19, H. 5, S. 342–347.
- Manolio, Teri A.; Collins, Francis S.; Cox, Nancy J.; Goldstein, David B.; Hindorff, Lucia A.; Hunter, David J. et al. (2009): **Finding the missing heritability of complex diseases**. In: *Nature*, Jg. 461, H. 7265, S. 747–753. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/nature08494>.
- McQuillin, Andrew; Kalsi, Gursharan; Moorey, Helen; Lamb, Graham; Mayet, Soraya; Queded, Digby et al. (2002): **A novel polymorphism in exon 11 of the WKL1 gene, shows no association with schizophrenia**. In: *European*

- journal of human genetics : EJHG, Jg. 10, H. 8, S. 491–494. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200837>.
- Mejaski-Bosnjak, V.; Besenski, N. (1997): **Megalencephalic leukoencephalopathy: a further case of a new neurodegenerative white matter disease.** In: Developmental medicine and child neurology, Jg. 39, H. 8, S. 561–563.
- Mejaski-Bosnjak, V.; Besenski, N.; Brockmann, K.; Pouwels, P. J.; Frahm, J.; Hanefeld, F. A. (1997): **Cystic leukoencephalopathy in a megalencephalic child: clinical and magnetic resonance imaging/magnetic resonance spectroscopy findings.** In: Pediatric neurology, Jg. 16, H. 4, S. 347–350.
- Meuer, Stefan; Wittwer, Carl; Nakagawara, Kan-ichi (2001): **Rapid cycle real-time PCR.** Methods and applications; with 209 tables. Berlin: Springer.
- Meyer, J.; Huberth, A.; Ortega, G.; Syagailo, Y. V.; Jatzke, S.; Mössner, R. et al. (2001): **A missense mutation in a novel gene encoding a putative cation channel is associated with catatonic schizophrenia in a large pedigree.** In: Molecular psychiatry, Jg. 6, H. 3, S. 302–306. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/sj.mp.4000869>.
- Meyer, Jobst; Johannssen, Kirsten; Freitag, Christine M.; Schraut, Kerstin; Teuber, Isabel; Hahner, Astrid et al. (2005): **Rare variants of the gene encoding the potassium chloride co-transporter 3 are associated with bipolar disorder.** In: The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP), Jg. 8, H. 4, S. 495–504. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1017/S1461145705005821>.
- Miles, Lili; Degrauw, Ton J.; Dinopoulos, Argirios; Cecil, Kim M.; van der Knaap, Marjo S.; Bove, Kevin Emil (2008): **Megalencephalic Leukoencephalopathy with Subcortical Cysts (MLC): a third confirmed case with literature review.** In: Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society, S. 1. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.2350/08-06-0481.1>.
- Mishra, Dhruva Kumar; Chen, Zujian; Wu, Yanyuan; Sarkissyan, Marianna; Koeffler, H. Phillip; Vadgama, Jaydutt V. (2010): **Global methylation pattern of genes in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells.** In: Molecular cancer therapeutics, Jg. 9, H. 1, S. 33–45. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-0486>.
- Montagna, Giorgia; Tejjido, Oscar; Eymard-Pierre, Eleonore; Muraki, Koutarou; Cohen, Bruce; Loizzo, Annalivia et al. (2006): **Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: functional studies of novel variants in MLC1.** In: Human mutation, Jg. 27, H. 3, S. 292. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/humu.9407>.
- Morita, Hideyuki; Imamura, Atsushi; Matsuo, Naoki; Tatebayashi, Koji; Omoya, Kentaro; Takahashi, Yukitoshi; Tsujino, Seiichi (2006): **MR imaging and 1 H-MR spectroscopy of a case of van der Knaap disease.** In: Brain & development, Jg. 28, H. 7, S. 466–469. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2005.12.006>.
- Gene Expression Omnibus.** NCBI. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>.
- Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W. (1988): **Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.** In: Electrophoresis, Jg. 9, H. 6, S. 255–262. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/elps.1150090603>.
- Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D.; Ehrhardt, W. (1988): **Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.** In: Electrophoresis, Jg. 9, H. 6, S. 255–262. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/elps.1150090603>.
- Neumann, Heinrich (1859): **Lehrbuch der Psychiatrie.** Erlangen.
- Noetzel, Michael J. (2004): **Diagnosing "undiagnosed" leukodystrophies: The role of molecular genetics.** In: Neurology, Jg. 62, H. 6, S. 847–848.

- Nomura, N.; Miyajima, N.; Sazuka, T.; Tanaka, A.; Kawarabayasi, Y.; Sato, S. et al. (1994): **Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1.** In: DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes, Jg. 1, H. 1, S. 27–35.
- Parker JM, Guo D, Hodges RS (1986): **New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites.** In: Biochemistry, Jg. 23.
- Pascual-Castroviejo, I.; van der Knaap, M. S.; Pronk, J. C.; García-Segura, J. M.; Gutiérrez-Molina, M.; Pascual-Pascual, S. I.: **Vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy: 24 year follow-up of two siblings.** In: Neurología (Barcelona, Spain), Jg. 20, H. 1, S. 33–40.
- Patrono, C.; Di Giacinto, G.; Eymard-Pierre, E.; Santorelli, F. M.; Rodríguez, D.; Stefano, N. de et al. (2003): **Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts.** In: Neurology, Jg. 61, H. 4, S. 534–537.
- Peccoud, J.; Jacob, C. (1996): **Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction.** In: Biophysical journal, Jg. 71, H. 1, S. 101–108. Online verfügbar unter [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79205-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79205-6).
- Riel-Romero, Rosario Maria S.; Smith, Charles D.; Pettigrew, Anjana L. (2005): **Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in two siblings owing to two novel mutations: case reports and review of the literature.** In: Journal of child neurology, Jg. 20, H. 3, S. 230–234.
- Riley, Brien; Kendler, Kenneth S. (2006): **Molecular genetic studies of schizophrenia.** In: European journal of human genetics : EJHG, Jg. 14, H. 6, S. 669–680. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201571>.
- Roberts, Richard J.; Belfort, Marlene; Bestor, Timothy; Bhagwat, Ashok S.; Bickle, Thomas A.; Bitinaite, Jurate et al. (2003): **A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes.** In: Nucleic acids research, Jg. 31, H. 7, S. 1805–1812.
- Rubie, Claudia; Lichtner, Peter; Gärtner, Jutta; Siekiera, Markus; Uziel, Graziella; Kohlmann, Bernd et al. (2003): **Sequence diversity of KIAA0027/MLC1: are megalencephalic leukoencephalopathy and schizophrenia allelic disorders?** In: Human mutation, Jg. 21, H. 1, S. 45–52. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/humu.10145>.
- Saijo, Harumi; Nakayama, Harumi; Ezoe, Takanori; Araki, Katsuhito; Sone, Sui; Hamaguchi, Hiroshi et al. (2003): **A case of megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts (van der Knaap disease): molecular genetic study.** In: Brain & development, Jg. 25, H. 5, S. 362–366.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 74, H. 12, S. 5463–5467.
- Schiffmann, Raphael; van der Knaap, Marjo S. (2004): **The latest on leukodystrophies.** In: Current opinion in neurology, Jg. 17, H. 2, S. 187–192.
- Schmidt-Kastner, Rainald; van Os, Jim; W M Steinbusch, Harry; Schmitz, Christoph (2006): **Gene regulation by hypoxia and the neurodevelopmental origin of schizophrenia.** In: Schizophrenia research, Jg. 84, H. 2-3, S. 253–271. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.schres.2006.02.022>.
- Schmitt, Angelika; Gofferje, Viktor; Weber, Melanie; Meyer, Jobst; Mössner, Rainald; Lesch, Klaus-Peter (2003): **The brain-specific protein MLC1 implicated in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts is expressed in glial cells in the murine brain.** In: Glia, Jg. 44, H. 3, S. 283–295. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/glia.10304>.
- Schneider, Kurt (2007): **Klinische Psychopathologie.** 15. Aufl. Stuttgart: G. Thieme.
- Scott, Derek B.; Blanpied, Thomas A.; Ehlers, Michael D. (2003): **Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors.** In: Neuropharmacology, Jg. 45, H. 6, S. 755–767.
- Selch, Sandra; Strobel, Alexander; Haderlein, Julia; Meyer, Jobst; Jacob, Christian P.; Schmitt, Angelika et al. (2007): **MLC1 polymorphisms are specifically associated with periodic catatonia, a subgroup of chronic**

- schizophrenia.** In: Biological psychiatry, Jg. 61, H. 10, S. 1211–1214. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.08.030>.
- Semple, David M.; McIntosh, Andrew M.; Lawrie, Stephen M. (2005): **Cannabis as a risk factor for psychosis: systematic review.** In: Journal of psychopharmacology (Oxford, England), Jg. 19, H. 2, S. 187–194.
- Sharp, P. M.; Li, W. H. (1987): **The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications.** In: Nucleic acids research, Jg. 15, H. 3, S. 1281–1295.
- Shukla, Pallavi; Balakrishnan, Prahlad; Agarwal, Neerja; Ghosh, Manju; Kabra, Madhulika; Sharma, Raju et al. (2008): **Prenatal diagnosis of megalencephalic leukodystrophy.** In: Prenatal diagnosis, Jg. 28, H. 4, S. 357–359. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/pd.1931>.
- Simpson, D. A.; Feeney, S.; Boyle, C.; Stitt, A. W. (2000): **Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR.** In: Molecular vision, Jg. 6, S. 178–183.
- Singhal, B. S. (2005): **Leukodystrophies: Indian scenario.** In: Indian journal of pediatrics, Jg. 72, H. 4, S. 315–318.
- Singhal, B. S.; Gursahani, R. D.; Udani, V. P.; Biniwale, A. A. (1996): **Megalencephalic leukodystrophy in an Asian Indian ethnic group.** In: Pediatric neurology, Jg. 14, H. 4, S. 291–296.
- Singhal, Bhim S.; Gorospe, J. Rafael; Naidu, Sakkubai (2003): **Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts.** In: Journal of child neurology, Jg. 18, H. 9, S. 646–652.
- Steinke, V.; Meyer, J.; Sygailo, Y. V.; Ortega, G.; Hameister, H.; Mössner, R. et al. (2003): **The genomic organization of the murine Mlc1 (Wkl1, KIAA0027) gene.** In: Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996), Jg. 110, H. 4, S. 333–343. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-002-0788-2>.
- Stöber, G.; Franzek, E.; Lesch, K. P.; Beckmann, H. (1995): **Periodic catatonia: a schizophrenic subtype with major gene effect and anticipation.** In: European archives of psychiatry and clinical neuroscience, Jg. 245, H. 3, S. 135–141.
- Stöber, G.; Saar, K.; Rüschenclorf, F.; Meyer, J.; Nürnberg, G.; Jatzke, S. et al. (2000): **Splitting schizophrenia: periodic catatonia-susceptibility locus on chromosome 15 q15.** In: American journal of human genetics, Jg. 67, H. 5, S. 1201–1207. Online verfügbar unter [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9297\(07\)62950-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9297(07)62950-4).
- Teijido, Oscar; Casaroli-Marano, Ricardo; Kharkovets, Tatjana; Aguado, Fernando; Zorzano, Antonio; Palacín, Manuel et al. (2007): **Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems.** In: Neurobiology of disease, Jg. 26, H. 3, S. 532–545. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2007.01.016>.
- Teijido, Oscar; Martínez, Albert; Pusch, Michael; Zorzano, Antonio; Soriano, Eduardo; Del Río, Jose Antonio et al. (2004): **Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts.** In: Human molecular genetics, Jg. 13, H. 21, S. 2581–2594. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddh291>.
- Thalmeier, Andreas; Dickmann, Martin; Giegling, Ina; Schneider, Barbara; M Hartmann, Annette; Maurer, Konrad et al. (2008): **Gene expression profiling of post-mortem orbitofrontal cortex in violent suicide victims.** In: The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP), Jg. 11, H. 2, S. 217–228. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1017/S1461145707007894>.
- The QIAexpressionist.** A handbook for high-level expression and purification of 6 xHis-tagged proteins. Fifth edition (June 2003): Qiagen.
- Tichopad, Ales; Dilger, Michael; Schwarz, Gerhard; Pfaffl, Michael W. (2003): **Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up.** In: Nucleic acids research, Jg. 31, H. 20, S. e122.
- Topcu, M.; Saatci, I.; Topcuoglu, M. A.; Kose, G.; Kunak, B. (1998): **Megalencephaly and leukodystrophy with mild clinical course: a report on 12 new cases.** In: Brain & development, Jg. 20, H. 3, S. 142–153.
- Topçu, M.; Gartioux, C.; Ribierre, F.; Yalçinkaya, C.; Tokus, E.; Oztekin, N. et al. (2000): **Vacuolizing megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, mapped to chromosome 22 qtel.** In: American journal of human genetics, Jg. 66, H. 2, S. 733–739. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1086/302758>.

- Tsujino, Seiichi; Kanazawa, Naomi; Yoneyama, Hitoshi; Shimono, Masayuki; Kawakami, Akihiro; Hatanaka, Yuuki et al. (2003): **A common mutation and a novel mutation in Japanese patients with van der Knaap disease.** In: Journal of human genetics, Jg. 48, H. 12, S. 605–608. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/s10038-003-0085-4>.
- Valk, Jakob (2004): **Indian Agarwal megalencephalic leukodystrophy with cysts is caused by a common MLC1 mutation.** In: Neurology, Jg. 63, H. 11, S. 2197; author reply 2197.
- van der Knaap, M. S.; Barth, P. G.; Stroink, H.; van Nieuwenhuizen, O.; Arts, W. F.; Hoogenraad, F.; Valk, J. (1995): **Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children.** In: Annals of neurology, Jg. 37, H. 3, S. 324–334. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410370308>.
- van der Knaap, M. S.; Barth, P. G.; Vrensen, G. F.; Valk, J. (1996): **Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course.** In: Acta neuropathologica, Jg. 92, H. 2, S. 206–212.
- van der Knaap, M. S.; Smit, L. M.; Barth, P. G.; Catsman-Berrevoets, C. E.; Brouwer, O. F.; Begeer, J. H. et al. (1997): **Magnetic resonance imaging in classification of congenital muscular dystrophies with brain abnormalities.** In: Annals of neurology, Jg. 42, H. 1, S. 50–59. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1002/ana.410420110>.
- van der Knaap MS; Scheper GC. (2008): **Megalencephalic Leukoencephalopathy with Subcortical Cysts.** Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=mlc#mlc.REF.topu.1998.142>, zuletzt aktualisiert am July 29, 2008.
- van Os, Jim (2004): **Does the urban environment cause psychosis?** In: The British journal of psychiatry : the journal of mental science, Jg. 184, S. 287–288.
- Vandesompele, Jo; Preter, Katleen de; Pattyn, Filip; Poppe, Bruce; van Roy, Nadine; Paepe, Anne de; Speleman, Frank (2002): **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** In: Genome biology, Jg. 3, H. 7, S. RESEARCH0034.
- Verma, Ranjana; Mukerji, Mitali; Grover, Deepak; B-Rao, Chandrika; Das, Swapan Kumar; Kubendran, Shobana et al. (2005): **MLC1 gene is associated with schizophrenia and bipolar disorder in Southern India.** In: Biological psychiatry, Jg. 58, H. 1, S. 16–22. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.03.027>.
- Vogelstein, B.; Gillespie, D. (1979): **Preparative and analytical purification of DNA from agarose.** In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 76, H. 2, S. 615–619.
- Walker, Elaine; Mittal, Vijay; Tessner, Kevin (2008): **Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia.** In: Annual review of clinical psychology, Jg. 4, S. 189–216. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.clinpsy.4.022007.141248>.
- Wernicke, Carl (1894/1900): **Grundriss der Psychiatrie in klinischen Vorlesungen.** Leipzig: G. Thieme.
- [Real time quantitative PCR.](#) Wikipedia.
- Zubin, J.; Spring, B. (1977): **Vulnerability--a new view of schizophrenia.** In: Journal of abnormal psychology, Jg. 86, H. 2, S. 103–126.

---

## Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung zahlreicher helfender Hände und Köpfe. Neben vielen anderen kleinen und großen Unterstützern möchte ich mich im Einzelnen ganz herzlich bedanken bei:

- **PD Dr. Angelika Schmitt** für die Betreuung der Arbeit, unzählige Ratschläge und technische Hilfestellungen, vor allem aber für Ihre große Geduld und das unerschöpfliche Verständnis für „flexible“ Zeitpläne... ;-)
  - **Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch** für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und die Möglichkeit, unter sehr guten Bedingungen in seiner Arbeitsgruppe arbeiten zu können.
  - **Dr. Lise Gutknecht, Dr. Claudia Kriegebaum, Gabriela Ortega** und **Theresia Töpner** für Hilfestellungen und zahlreiche Ratschläge bei unzähligen Situationen des Laboralltags.
  - **Prof. Dr. Wolfgang Roggendorf** für die Überlassung verschiedener Gewebeproben
  - meiner Frau **Burcin Kreuzfeldt** für Geduld und Verständnis für viele Arbeiten am Abend und Wochenenden und meinen Kindern **Canay** und **Sinan** für die Kraft, die Ihr durch Eure Fröhlichkeit und Neugier auf die Welt versprüht,
  - und nicht zuletzt **meinen Eltern** dafür, dass sie mir die Möglichkeit zum Studium gegeben haben, und mir bis heute wo immer möglich mit Rat und Tat zur Seite stehen.
-