

**Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und
Psychotherapie**

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

**Funktionalität eines Dinukleotid-Polymorphismus in der
Promoterregion der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase
(NOS1)**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sebastian Mathias Lang

aus Karlsruhe

Würzburg, August 2015

Referent: Professor Dr. med. Andreas Reif

Koreferent/Koreferentin: Professor Dr. med. Marcel Romanos

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10.03.2016

Der Promovend ist Arzt

Für meine Familie

„Man will nicht nur verstanden werden, wenn man schreibt, sondern ebenso gewiß auch *nicht* verstanden werden.“

Friedrich Nietzsche, Die fröhliche Wissenschaft – Fünftes Buch

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Zusammenfassung/Abstract

1. Einleitung

1.1. Stickstoffmonoxid	1
1.2. Stickstoffmonoxidsynthasen	2
1.3. Die neuronale Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS/NOS-I)	4
1.4. Das humane <i>NOS1</i> -Gen	7
1.5. Der Promoter des <i>NOS1</i> -Exons 1f	9
1.6. Genomische und nichtgenomische Effekte von Östrogen	10
1.7. Genomische Effekte des cAMP response element-binding (CREB)	11
1.8. Das Brodmann-Areal 46 des humanen Cortex	12
1.9. Zielsetzung der Arbeit	13

2. Material und Methoden

2.1. Laborausstattung	15
2.2. Verbrauchsmaterialien	16
2.3. Chemikalien	17
2.4. Enzyme	18
2.5. Kits	19
2.6. Puffer und Medien	19
2.7. Primer und Vektoren	20
2.8. <i>Escherichia coli</i> -Stämme	21
2.9. Zelllinien	21
2.10. Das Patienten-Sample der Stanley Foundation brain collection	21
2.11. Software	22
2.12. Mikrobiologische Methoden	22
2.12.1. Kultivieren von <i>E. coli</i> -Bakterien	22
2.12.2. Dauerkulturen von <i>E. coli</i> -Bakterien	22
2.12.3. Transformation Hitzeschock-kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	23

2.13. Molekularbiologische Methoden	23
2.13.1. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Bakterien	23
2.13.1.1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA	23
2.13.1.2. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	24
2.13.2. Ethanolfällung von DANN	25
2.13.3. Agarose-Gel-Elektrophorese	25
2.13.4. DNA-Extraktion aus Hirngewebe	26
2.13.5. Konzentrationsbestimmung von DNA	26
2.13.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.13.6.1. Amplifikations-PCR	27
2.13.6.2. Sondensynthese	27
2.13.6.3. Genotypisierungs-PCR	28
2.13.6.4. Sequenzierungs-PCR	29
2.13.6.4.1. PCR-Produktaufreinigung	29
2.13.6.4.2. Sequenzierungs-PCR und DNA-Sequenzierung	30
2.13.7. Restriktionsenzymverdau	31
2.13.8. Dephosphorylierung	32
2.13.9. DNA-Extraktion aus Agarosegelen	32
2.13.10. Ligation	33
2.13.11. Kolonie-Screening	33
2.13.12. Hybridisierung	34
2.14. Biochemische Methoden	34
2.14.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	34
2.14.2. Luciferase-Assay	34
2.14.3. Luciferase-Messung	36
2.14.4. DNA-Microarray	37
2.15. Zellkultur-Methoden	38
2.15.1. Kultivierung und Bebrütung von Zellen/ Zelllinien	38
2.15.1.1. Passagieren von Zelllinien	39
2.15.1.2. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	39
2.15.2. Transfektion von Zellen	40
2.15.2.1. Transfektion mit Lipofectamine® 2000	40
2.15.2.2. Transfektion mit Effectene® Transfection Reagent	40
2.15.3. Stimulation von Zellkulturen	41

2.15.3.1. Stimulation mit Östrogen	41
2.15.3.2. Stimulation mit Forskolin	41
2.16. Berechnung der Promoteraktivität	41
2.17. Statistische Analyse	43

3. Ergebnisse

3.1. Erstellung der DNA-Konstrukte	44
3.1.1. Ergebnisse der Amplifikations-PCR	44
3.1.2. Restriktionsenzym-Verdau	46
3.1.3. Gelextraktion	48
3.1.4. Kolonie-Screening	49
3.1.5. Orientationsverdau	50
3.1.6. Mini- und Maxipräparationen von Plasmid-DNA	52
3.1.7. Sequenzierung der DNA-Konstrukte	53
3.2. Längenabhängige Unterschiede in der Aktivität des <i>NOS1</i> Ex1f-VNTR-Promoter-Luciferase Assay	55
3.3. Untersuchung der Promoteraktivität unter Stimulation durch Forskolin	57
3.4. Untersuchung der Promoteraktivität unter Stimulation durch β -Östradiol	58
3.5. Längenabhängiger Einfluss des <i>NOS1</i> Ex1f-VNTR auf das neuronale Transkriptom	58

4. Diskussion

4.1. Klonierung des <i>NOS1</i> Ex1f-VNTR	61
4.2. Modulation der Promoteraktivität im Luciferase-Assay durch Längenunterschiede des <i>NOS1</i> Ex1f-VNTR	62
4.3. Kein Einfluss von 17β -Östradiol und Forskolin auf die Promoteraktivität der <i>NOS1</i> Ex1f-VNTR-Varianten	62
4.4. Molekulare Mechanismen der Beeinflussung der Promoteraktivität durch die Anwesenheit des <i>NOS1</i> Ex1f-VNTR	63
4.5. Einfluss des <i>NOS1</i> Ex1f-VNTR auf das humane Transkriptom des BA46	65
4.6. Bedeutung des <i>NOS1</i> Ex1f-VNTR im Rahmen psychischer Erkrankungen	66
4.6.1. <i>NOS1</i> Ex1f-VNTR und neurodegenerative Erkrankungen	67
4.6.2. <i>NOS1</i> Ex1f-VNTR und schizophrene Erkrankungen	69

4.6.3. <i>NOS1</i> Ex1f-VNTR und affektive Erkrankungen	70
4.6.4. <i>NOS1</i> Ex1f-VNTR und Persönlichkeit, Impulsivität und Aggressivität	72
4.7. Ausblick	75
5. Literaturverzeichnis	77
6. Anhang	93
Danksagung	

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung des NO-Radikals
- Abbildung 2: Schema eines NOS-Dimers
- Abbildung 3: Schema membranständiger NOS-I-Komplexe
- Abbildung 4: Schema zum *NOS1*-Gen und der variablen Region der alternativen ersten Exons
- Abbildung 5: Verteilung der *NOS1* Ex1f-VNTR-Allelhäufigkeit
- Abbildung 6: Die Brodmann-Areale der linken Großhirnrinden-Konvexität
- Abbildung 7: Die an der Luciferase-Reaktion beteiligten Moleküle
- Abbildung 8: Schematische Darstellung der Micro-Array-Methode
- Abbildung 9: Schematische Darstellung der *NOS1_1f* Inserts
- Abbildung 10: Gelelektrophoretische Auftrennung der untersuchten *NOS1_Ex1f*-Inserts
- Abbildung 11: Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten
- Abbildung 12: Schema der Restriktionsenzym-Schnittstellen für die Enzyme *HaeIII* und *MscI* am Beispiel des Inserts *NOS1_Ex1f_31*
- Abbildung 13: Gelelektrophoretische Auftrennung der durch Verdau mit *HaeIII* erhaltenen Genfragmente am Beispiel der PCR-Produkte *NOS1_Ex1f_31* und *NOS1_Ex1f_25*
- Abbildung 14: Elektrophoretische Auftrennung des Inserts *NOS1_Ex1f_20* gegen den linearisierten Vektor pGL3-Basic
- Abbildung 15: Kolonie-Screening der mit pGL3- *NOS1_Ex1f_20* transformierten Bakterienkolonien
- Abbildung 16: Schema der verschiedenen möglichen Orientierungen des Inserts
- Abbildung 17: Gelelektrophoretische Auftrennung der durch den Verdau des pGL3- *NOS1_Ex1f_20mod* mit *Sac I* erhaltenen DNA-Fragmente
- Abbildung 18: Elektrophoretische Auftrennung der durch Mini- bzw. Maxipräparation gewonnenen Plasmide gegen den nativen pGL3-Basisvektor
- Abbildung 19: Längenabhängige Unterschiede in der Promoterreporter-Aktivität gemessen im Luciferase-Assay

Abbildung 20: Graphische Darstellung des Einflusses von Forskolin auf die Promoteraktivität unterschiedlicher *NOS1_Ex1f*-Promoterkonstrukte.

Abbildung 21: Graphische Darstellung des Einflusses von β -Östradiol auf die Promoteraktivität unterschiedlicher *NOS1_Ex1f*-Promoterkonstrukte.

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Unterschiedliche Nomenklaturen der alternativen *NOS1* Exons1f
- Tabelle 2: Verwendete Restriktionsenzyme
- Tabelle 3: Verwendete PCR-Oligonukleotid-Primer
- Tabelle 4: Programm der Amplifikations-PCR
- Tabelle 5: Programm der Radioaktiv-PCR
- Tabelle 6: Programm der Genotypisierungs-PCR
- Tabelle 7: Thermocycler-Programm zur PCR-Produktaufreinigung
- Tabelle 8: Programm der Sequenzierungs-PCR
- Tabelle 9: Durch den *NOS1* Ex1f-VNTR signifikant dysregulierte Gene im Transkriptom des BA46

Abkürzungsverzeichnis

aADHS	adultes Aufmerksamkeitsdefizit- /Hyperaktivitätssyndrom
AP-1	activation protein-1
ApoE	Apolipoprotein E
AP1S1	adaptor-related protein complex 1, ϕ 1 subunit
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Brodmann-Areal
BHLHB2	basic helix-loop-helix domain containing, class B,2
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BSA	bovine serum albumin
CACNB2	calcium channel, voltage-dependent, β 2 subunit
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAPON	C-terminal PDZ domain ligand of neurolan NOS
CBP	CREB-binding protein
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CHI3L1	chitinase 3-like 1
CLPTM1	cleft lip and platelate-associated transmembrane protein 1
CO	carbon oxide
CRE	cAMP response elements
CREB	cAMP responsive element-binding
CREM	cAMP response modulators
DAT	Dopamintransporter
dd	demineralisiert/destilliert
ddNTP	Didesoxyribonucleosid-Triphosphat
DexRas	Dexamethasone-induced Rat sarkoma-related protein
DLPFC	dorsolateraler präfrontaler Cortex
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribinucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosid-Triphosphat
DTX3	deltex 3 homologue
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDRF	endothelium derived relaxing factor
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid-Na ₂ -salt
ER	estrogen response
Ex	Exon
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	fetal calf serum
FMN	Flavin-Mononukleotid
GHITM	growth hormone-inducible transmembrane protein
GPX3	glutathione peroxidase 3
GRIN1	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HDGFRP3	hepatoma-derived growth factor, related protein 3
HSP	Heat-Shock-Protein
5-HT	5-Hydroxytryptamin
5-HTT	5-Hydroxytryptamintransporter
5-HTTLPR	5-Hydroxytryptamintransporter-linked polymorphic region
ICER	Inducible cAMP early repressor
kb	kilobasen

LB	Luria Bertani Broth
L-NAME	N(G)-nitro.L-Arginin
MAP	mitogen-activated protein
MAP1LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3 β
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEF2C	MADS box transcription enhancer factor 2, polipeptide C
MEM	Modified Eagle's Medium
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NEFL	neurofilament, light polypeptide 68 kDa
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NEO-PI-R	Neuroticism-Extroversion-Openness Personality Inventory – Revised
NET	Noradrenalintransporter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	nitrite oxide
NOS	nitrite oxide synthase
Oct-2	Octamer transcription factor 2
OD	optical density
p.a.	pro analysis
PCR	polymerase chain reaction
PLB	passive lysis buffer
PSD	postsynaptic density protein/ Disc large
RGS4	regulator of G-protein signaling 4
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
sGC	soluble Guanylatcyclase
SAP	shrimp alkalische Phosphatase
SDS	sodiumdodecylsulphate
SERT	Sertralintransporter
SF-1	steroidogenic factor-1
SMRI	Stanley Medical Research Institute
SMRIDB	Stanley Medical Research Institute online database
SNCA	α -synuclein
SNX3	sorting nexin 3
SOC	soil organic carbon
SOD2	superoxide dismutase 2
SP1	specificity protein 1
SRD5A1	steroid-5- α -reductase, α polipeptide 1
TESS	Transcription Element Search System
TIF2	transcription intermediary factor 2
TPD52	tumor protein D52
TRIS	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
TUBB	β 5-Tubulin
TUBB4	β 4-Tubulin
UV	Ultraviolett
VNTR	variable number of tandem repeats
v/v	Volumen/ Volumenverhältnis
v/w	Volumen/ Gewichtsverhältnis
WARS	Tryptophanyl-tRNA Synthetase
x	mal
XIST	X (inactive)-specific transcript

z.B. zum Beispiel
ZO-1 zonula occludens

Für Abkürzungen von physikalischen und chemischen Einheiten werden die IUPAC Empfehlungen verwendet.

Zusammenfassung

NOS1, das für die neuronale Stickstoffmonoxidsynthase (NOS-I) kodierende Gen, konnte bislang durch eine stetig wachsende Zahl an Untersuchungen mit verschiedenen Pathomechanismen bedeutsamer neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Der Dinukleotid-Polymorphismus im Promoterregion von *NOS1*, für welchen in der Population verschieden lange Allelen existieren, war bislang bezüglich der durch ihn vermittelten Wirkungen kaum untersucht. Um die Relevanz und Funktionalität des Promoterpolymorphismus *NOS1* Ex1f-VNTR zu erforschen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Reporter-Gen-Assay durchgeführt, der den Einfluss verschieden langer Allele auf transkriptionaler Ebene verdeutlichen sollte. Hierfür wurden *NOS1* Exon 1f-Promoterregionen mit unterschiedlich langen VNTRs in einen Luciferase-Genvektor kloniert und der Einfluss der verschiedenen Allellängen auf die Aktivität des Reportergens ermittelt. Hierbei zeigte sich der Einfluss der Allele dergestalt, dass das Vorhandensein kurzer Allele des *NOS1* Ex1f-VNTR in verminderter Aktivität des Reportergens resultierte. Durchgeführte Stimmulationsversuche mit Östrogen und Forskolin ergaben hingegen keine signifikante Änderung der Transkriptionsaktivität. Im DNA-Microarray konnten mit kurzen Allelen des *NOS1* Ex1f-VNTR assoziierte Alterationen im Transkriptom des humanen Brodmann-Areals 46 nachgewiesen werden, was Wechselwirkungen zwischen dem Vorhandensein kurzer Allele des *NOS1* Ex1f-VNTR und der Gentranskription psychiatrisch relevanter Gene demonstriert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der *NOS1* Ex1f-VNTR Einfluss auf transkriptionaler Ebene ausübt und mit psychiatrischen Krankheiten assoziiert ist, was ihn weiterhin zu einem wichtigen Forschungsobjekt macht und in die Gruppe klinisch bedeutsamer Polymorphismen einreicht.

Abstract

NOS1, the coding gene for the neuronal nitric oxide synthase (NOS-I), has been linked to various pathomechanisms of neurologic and psychiatric disorders by a steadily growing body of work. The dinucleotide polymorphism contained in the *NOS1* promoter gene, existing in a variety of allelic lengths, has so far been rarely investigated in terms of influence. To determine transcriptional functionality and relevance of different lengths of the promoter polymorphism *NOS1* Ex1f-VNTR, a reporter gene assay has been carried out in the herein presented study. By cloning *NOS1* Ex1f-VNTR promoter regions containing different lengths of the VNTR in a Luciferase-gene vector, the influence of different promoter alleles on reporter gene activity has been demonstrated. A reduced reporter gene activity has been shown in the presence of short alleles of the *NOS1* Ex1f-VNTR. Accomplished trials of stimulating activity via estrogen and forskoline treatment resulted in no further changes of reporter gene activity. In DNA-Microarray studies an association of short *NOS1* Ex1f-VNTR alleles and transcriptome alterations in human Brodmann area 46 has been detected, indicating a correlation of short *NOS1* Ex1f-VNTR alleles and transcription of genes involved in psychiatric disorders. These results demonstrating the functionality of the *NOS1* Ex1f-VNTR confirm its clinical relevance and the importance of its further investigation.

1. Einleitung

1.1. Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein membrangängiges Gas mit radikalischen Eigenschaften (Abb. 1). Größere Bedeutung erhielt das Molekül durch die Entdeckungen der Arbeitsgruppe um *Murad*, die belegen konnten, dass die Relaxation glatter Muskelzellen im Gefäßsystem der Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) durch NO folgt [1]. Dieses bis dato noch unbekannte Prinzip der Signaltransduktion wurde daraufhin zum Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen, durch welche die Arbeitsgruppen *Moncada* und *Ignarro* NO als das zuvor von *Furchgott* [2] postulierte *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) erkannten [3-5]. Dies brachte Verständnis der pharmakologischen Prozesse der schon lange zuvor zur Behandlung des akuten Coronarsyndroms eingesetzten Stickstoffverbindungen, wie z.B. Nitroglycerin.

Somit war NO, noch vor Kohlenmonoxid (CO), der erste bekannte gasförmige Transmitter und wurde von der Zeitschrift *Science* zum Molekül des Jahres 1992 gekürt [6]. Für die Erforschung der Rolle des NO als Signalmolekül im kardio-vaskulären System erhielten *R. Furchgott*, *L. Ignarro* und *F. Murad* (unter Vernachlässigung von *S. Moncada* [7]) 1998 den Nobelpreis in Medizin und Physiologie.

Seit der Entdeckung der NO-vermittelten Mechanismen im Herz-Kreislaufsystem, wurden vielfältige weitere Wirkmechanismen und Funktionen des NO erforscht und beschrieben. Je nach Entstehungsort und -weise kann es als parakrines Hormon, Neurotransmitter, cytoprotektives wie auch cytotoxisches Molekül agieren. Es beeinflusst die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, moduliert Signalkaskaden, die mRNA-Stabilität, sowie mRNA-Translation und kann primäre Gen-Produkte verändern [6, 8-12].

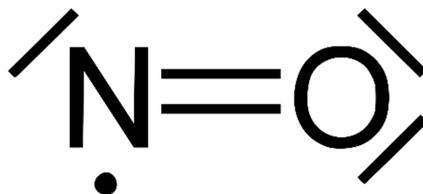


Abb. 1: Schematische Darstellung des NO-Radikals.

1.2. Stickstoffmonoxidsynthasen

Aufgrund seiner Reaktionsfreudigkeit als wasserlösliches Gasradikal kann NO nicht vesikulär gespeichert werden, weshalb seine Freisetzung unter physiologischen Bedingungen direkt über die enzymatische NO-Synthese durch gewebsspezifische Synthasen (*nitric oxide synthase*, NOS; EC 1.14.13.39) reguliert wird. Es kann aber auch nichtenzymatisch unter pathophysiologischen Umständen, z.B. am ischämischen Herzen oder bei Harnwegsinfekten entstehen [13, 14].

Bekannt sind drei NO-produzierende isoenzymatische Formen, von distinkten Genen kodiert und zunächst benannt nach den Geweben, aus denen sie zuerst isoliert wurden, die neuronale NOS (nNOS/NOS-I; kodiert vom *NOS1* Gen) [15], die induzierbare oder „immunologische“ NOS (iNOS/NOS-II; kodiert vom *NOS2* Gen) [16] und die endotheliale NOS (eNOS/NOS-III; kodiert vom *NOS3* Gen) [17], welche allesamt L-Arginin als Stickstoffdonor verwenden. Die erstmals im Kleinhirn des Schweines entdeckte Zn²⁺-haltige NOS-I [18-20] und die NOS-III, die vor allem im Gefäßendothel lokalisiert ist [21, 22], sind sich strukturell sehr ähnlich und werden in relativ konstanten Konzentrationen exprimiert. Deshalb werden NOS-I und NOS-III als konstitutive NOS-Formen bezeichnet. Anders die NOS-II, die erst durch Induktion auftritt, z.B. bei der Immunabwehr [23]. Sie kann prinzipiell in allen Zelltypen exprimiert werden, wurde jedoch zunächst in Makrophagen beschrieben [24, 25]. Auch die Quantität des produzierten NO unterscheidet sich zwischen den konstitutiven NOS-Isoformen und der induzierbaren NOS. Während von der NOS-I und NOS-III produziertes NO, welches der Signaltransduktion dient, unter physiologischen Konditionen zwischen 0.2 und 2.0 nM liegt, kann die von der NOS-II produzierte antimikrobielle NO-Konzentration 2.0 bis 20 nM, in Einzelfällen auch bis zu 200 nM erreichen [26, 27]. Die Halbwertszeit eines NOS-I-Proteins wird durch die Ca²⁺-abhängige Protease Calpain reguliert [28].

Auch wenn sie sich funktionell unterscheiden, so ist allen Dreien gemein, dass sie als eng gebundene Cofaktoren (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) und Fe²⁺-Protoporphyrin IX (Häm) benötigen und die Reaktion von L-Arginin, Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) und Sauerstoff zu freiem NO, Citrullin und NADP⁺ H⁺ katalysieren [29-31]).

Durch die drei existierenden Redox-Formen des NO (NO⁺/Nitrosonium, NO-/Stickoxid und NO⁻/Nitroxylanion) werden mittels Kreuzreaktion mit O₂, CO₂ und

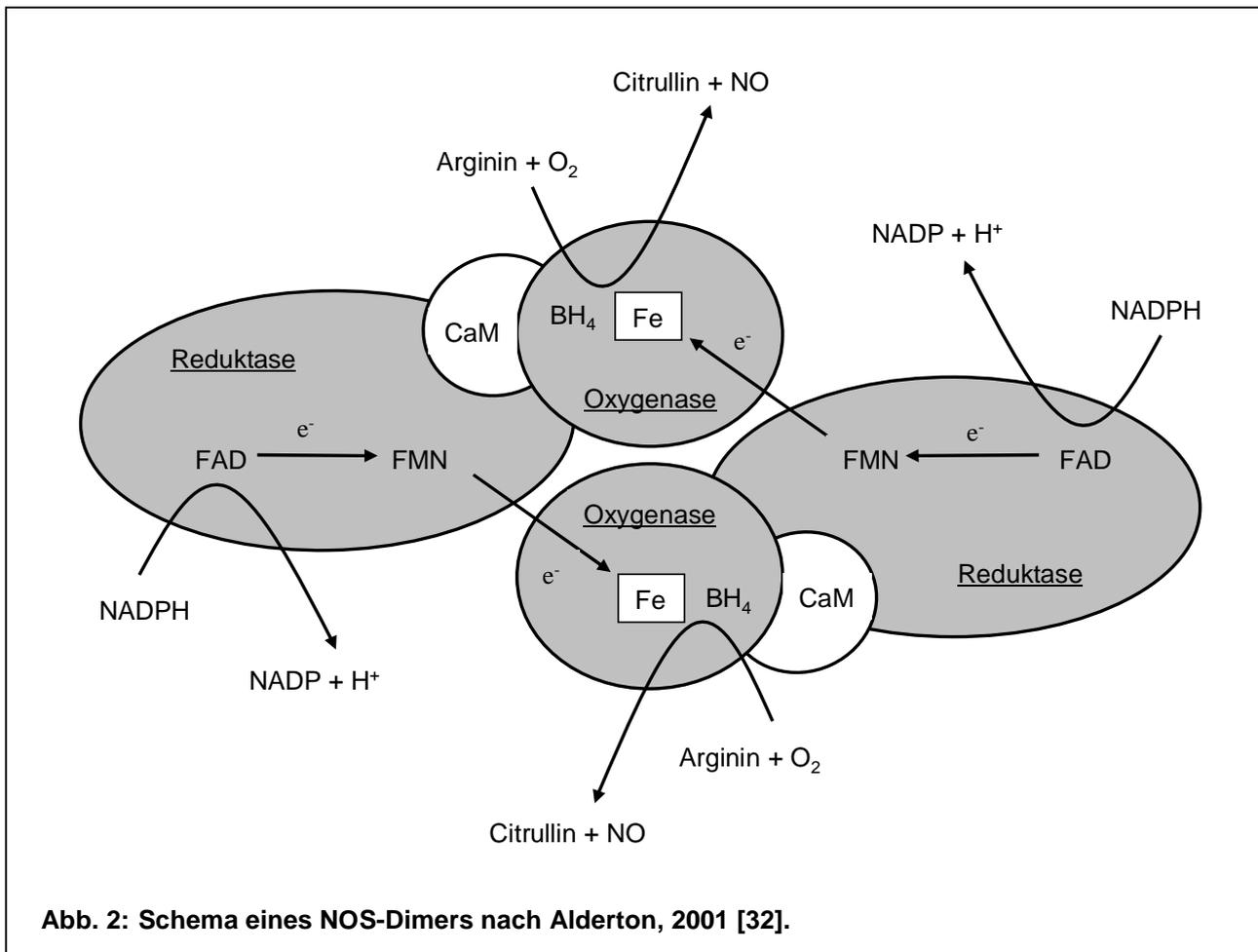
Einleitung

H₂O₂ dem scheinbar alleinigen effektiven NOS-Produkt NO weitere mögliche reaktive Produkte, *reactive nitrogen species* (RNS) zur Seite gestellt, wie z.B. Peroxynitrit (ONOO- bzw. dessen protonierte Spezies ONOOH) oder verschiedene Nitrosothiole [32, 33]. In moderaten Konzentrationen erhalten diese RNS das Redox-Gleichgewicht aufrecht, werden jedoch wenn exzessiv produziert zum Vermittler der NO-Zytotoxizität, somit des Alterungsprozesses und assoziierter Neurodegeneration [34-36].

Strukturell bestehen die NOS aus einer N-terminalen Oxygenase-Domäne, welche Bindungsstellen für Häm, BH₄ und L-Arginin beinhaltet und einer über eine Calmodulin (CaM)-Bindungsstelle verbundene C-terminale Reduktase-Domäne, in welcher FAD, FMN und NADPH gebunden werden [37-41]. Die C-terminale Reduktasedomäne aller NOS weist eine Strukturhomologie zur NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase auf, welche unter anderem für die Biotransformation von Pharmaka essentiell ist [42, 43]. Dennoch stellt diese Homologie ein Ergebnis konvergenter Evolutionsprozesse dar, da die sekundärstrukturelle Bauweise der NOS sich völlig von der Struktur der Cytochrom-P450-Reduktase unterscheidet. Für die verschiedenen NOS-Isoformen darf jedoch ein gemeinsames „Ur“-Gen angenommen werden, welches sich in der ähnlichen genomischen Struktur der NOS-Isoenzyme niederschlägt [32].

Katalytisch wirksam sein können die NOS nur in homodimerisierter Form [44], wozu das Dimer mit zwei Calmodulin-Monomeren ein Tetramer bildet (Abb. 2) [30, 32]. Alle drei NOS-Formen werden durch das Ca²⁺-bindende Calmodulin aktiviert [15, 45], die beiden konstitutiven Formen, NOS-I und NOS-III, benötigen jedoch Ca²⁺ in deutlich höherer Konzentration als die NOS-II [46-48]. Die Aufgabe der dimerischen Organisation der Reduktasedomäne besteht darin, Reduktionsäquivalente für das Häm in der Oxygenase-Domäne des jeweils anderen Dimerpartners zu liefern und so den für die Katalyse notwendigen Elektronenfluss zu gewährleisten [32, 44].

Einleitung



1.3. Die neuronale Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS/NOS-I)

Wenngleich es der Name suggeriert, wird die „neuronale“ Isoform der NOS nicht nur im Nervensystem exprimiert, so findet man sie zum Beispiel auch in Muskelzellen oder Hodengewebe [49-51].

Die im Nervensystem vorherrschende Form der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (NOS-I α) ist als Monomer ein 161 kDa schweres, 1434 Aminosäuren langes Protein bekannt, das im Unterschied zu den beiden anderen Isoformen zusätzlich zu den zuvor genannten Bindestellen eine N-terminale *postsynaptic density protein* (PSD)/Discs-large/zonulla occludens (ZO)-1-homologe-Domäne (PDZ-Domäne) aufweist [37, 52, 53]. Diese bindet Proteinliganden mit gleichartigen Domänen [54], in diesem Fall an die des PSD-95, welches seinerseits an den zytosolischen Teil des membranständigen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors bindet [55] und somit die NO-Synthese an den Ca²⁺-Einstrom *via* Ionenkanal des NMDA-Rezeptors koppelt (Abb. 3) [56].

Einleitung

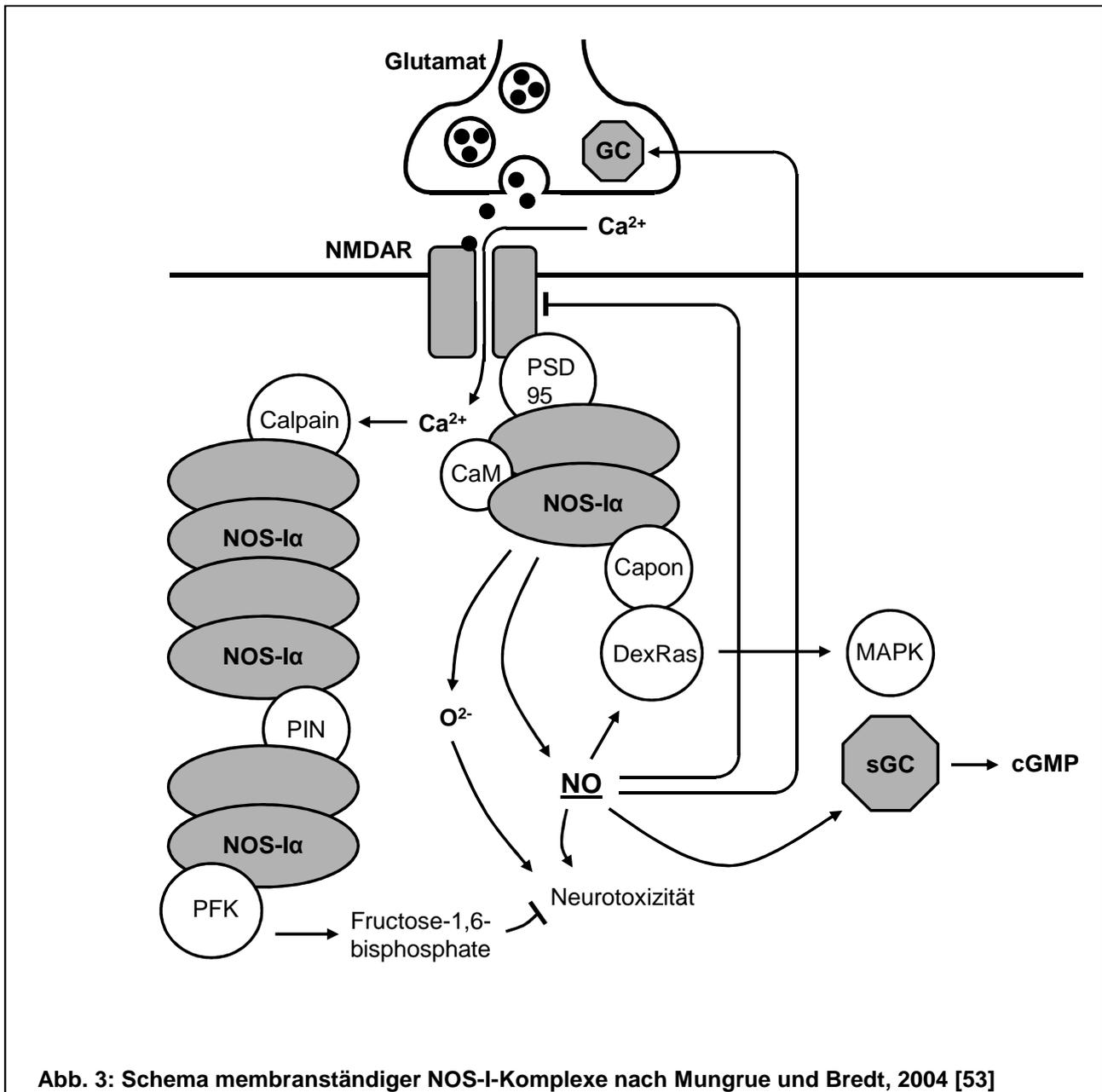


Abb. 3: Schema membranständiger NOS-I-Komplexe nach Mungrue und Bredt, 2004 [53]

Durch die Verbindung mit dem NMDA-Rezeptor, einem Subtyp des Glutamat-Rezeptors, fungiert NO durch Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase (sGC) und dem dadurch bedingten Anstieg zellulären zyklischen Guanosinmonophosphates (cGMP) als *second messenger* des wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitters, aber auch als Vermittler glutamaterger Neurotoxizität [57-60].

Weiterhin ist der membranständige NOS-I-Komplex über das mit PSD-95 um die PDZ-Bindestelle konkurrierende CAPON (auch NOS1 adaptor protein) mit dem *Dexamethasone-induced Rat sarkoma-related protein 1* (DexRas1, auch RASD 1) verbunden [61], welches eine MAP-Kinase-Kaskade anstößt und die nukleäre

Einleitung

Transkription moduliert [53]. Auch eine Kopplung der NOS-I an Synapsin wird über die CAPON-Bindung erreicht [62].

Die sGC, welche mittels NO-Bindung an ihre Hämgruppe und die daraus resultierende Konformationsänderung des katalytischen Zentrums dazu angeregt wird, Guanosin triphosphat (GTP) zum cyclischen Guanosinmonophosphat (cGMP) zu hydrolysieren, ist aber nicht die einzige Zielstruktur von NO. Ergänzend zur seit 1955 bekannten Phosphorylierung wurde jüngst die S-Nitrosylierung, durch NO-Bindung an Thiol-Seitenketten von Cysteinresten, als bedeutender Mechanismus zur dynamischen Steuerung von Proteinen erkannt [63]. Das Fehlen endogener S-Nitrosylierung in NOS-I-knock-out Mäusen [64] legte nahe, dass der NOS-I als Kontrollmolekül eines ganzen Spektrums intrazellulärer Signalkaskaden ebenso große Bedeutung zukommt wie als Aktivator der sGC/*second messenger* des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors [65].

So werden auch zahlreiche, direkt an der neuronalen Transmission beteiligte Proteine der S-Nitrosylierung unterworfen. Hervorzuheben sind die an der Pathogenese neuropsychiatrischer Erkrankungen beteiligte Enzyme, welche den Haushalt von Monoaminen kontrollieren, zum Beispiel der Serotonintransporter (SERT, 5-Hydroxytryptamintransporter, 5-HTT) oder der Dopamintransporter (DAT) [66]. Auch die Tryptophanhydroxylase [67], der Noradrenalintransporter (NET) [68] und im Sinne eines negativen Feedbacks sogar der NMDA-Rezeptor selbst [64, 69, 70] werden S-nitrosyliert. Wenngleich widersprüchliche Daten vorliegen, häufen sich die Hinweise darauf, dass die S-Nitrosylierung die Funktion von Monoamintransportern hemmt, wodurch NO zusätzliche Bedeutung als endogenem Inhibitor der Monoamin-Wiederaufnahme zukommt [71]. Selbst der NO-Rezeptor sGC unterliegt der S-Nitrosylierung, was ihn für NO desensibilisiert und möglicherweise zur pharmakologisch problematischen Nitrat-Toleranz beiträgt [72].

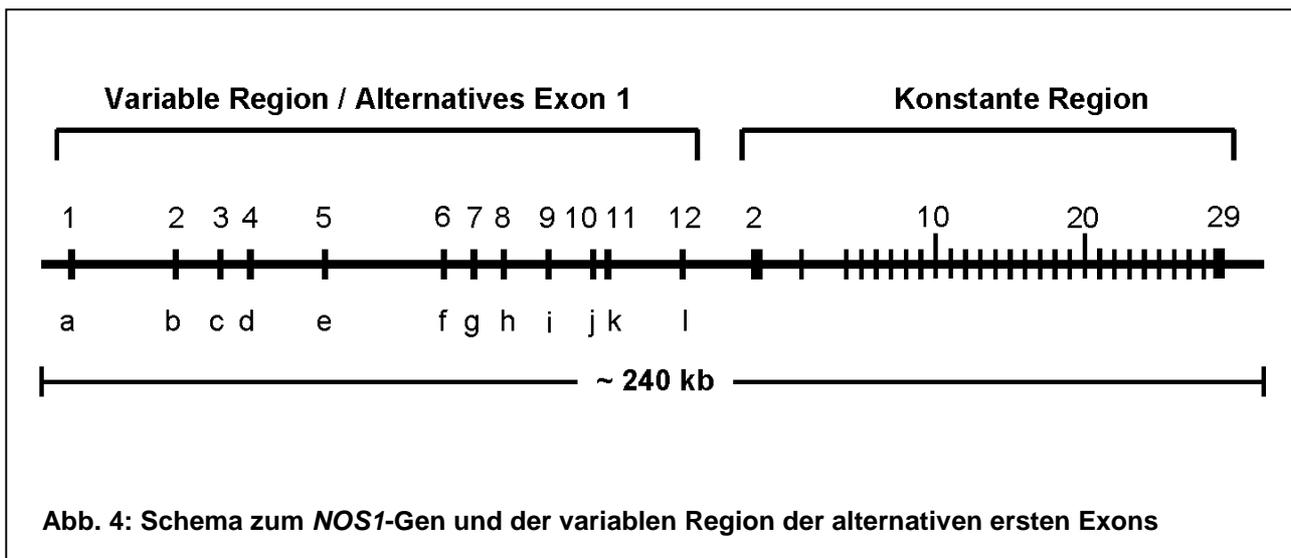
Zwar wird die NOS-I nur von rund 1% der Neurone exprimiert, welche auch nur in bestimmten Arealen (Cortex, Hypothalamus, Hirnstamm, Cerebellum, Striatum und Hippocampus [73-78]) angesiedelt sind, jedoch bilden diese so weitläufige Verzweigungen aus, dass nahezu jedes Neuron eine nitrinerge Projektion empfängt [19, 42]. Durch die Fähigkeit, frei durch Zellmembranen zu diffundieren und sich ca. 200 µm im Umfeld auszubreiten, um benachbarte Neurone in parakriner Weise zu beeinflussen, können lokale Zellverbände darüber hinaus auch auf nicht-synaptischem Wege koordiniert werden [79].

Einleitung

Die höchste Aktivität der NOS-I findet sich zudem in Hirnregionen von besonderer Bedeutung für die Genese psychiatrischer Erkrankungen, wie dem Cortex, dem limbischen System, dem Striatum und dem Hirnstamm [80-82].

1.4. Das humane NOS1-Gen

Das für die NOS-I kodierende Gen liegt auf dem Chromosom 12, Locus 24.22 – 24.31 (Genbanknr. L02881/U11422) und wird als *NOS1* bezeichnet [52, 83]. Das *NOS1*-Gen, bestehend aus 29 Exons und 28 Introns, erstreckt sich über ca. 240 kbp und ist eines der menschlichen Gene mit der komplexesten Regulation bezüglich Benutzung des ersten Exons und alternativen Splicens (Abb. 4) [37, 52]. Nur das Glucocorticoid-Rezeptor-Gen weist eine ähnliche Komplexität auf [84]. Allein für das Exon 1 bestehen mindestens 12 alternative Exons (Exon 1a-1l), als „variable“ Region bezeichnet, deren Transkription zu mRNA-Varianten führt, die unterschiedliche Translationsaktivitäten zur Folge haben und gewebsspezifisch exprimiert werden [85-87].



Zusätzlich zu NOS- α , der sozusagen vollständigen NOS-I, bei welcher die Exons 1a bis 1l an Exon 2 gespleisst werden, existieren weitere Splice-Varianten, die durch Deletion bestimmter Bereiche kürzere Proteinketten ergeben. Zu nennen sind NOS- β (80% der NOS- α -Enzymaktivität) und NOS- γ , auch TnNOS genannt (Testis-spezifische Form; 3% der NOS- α -Aktivität), die sich durch Fehlen der membrankoppelnden PDZ-Domäne auszeichnen und vermutlich cytosolische Varianten darstellen [88]. Außerdem findet sich eine im Skelettmuskel lokalisierte Form NOS- μ [37], welche mittels ihres PDZ-Motives an den sarkolemmalen

Einleitung

Dystrophinkomplex gekoppelt ist und evtl. bei diversen Muskeldystrophien eine Rolle spielt [89].

Verwirrenderweise sind unterschiedliche Nomenklaturen für die alternativen Exons im Umlauf (Tab. 1). Die anfänglich entdeckten alternativen ersten Exons wurden als 5'1 und 5'2 benannt [90], im Verlauf um ein Exon 5'3 erweitert. Um der Entdeckung weiterer alternativer Exons Rechnung zu tragen, erfolgte die Einführung einer alphabetischen Nomenklatur [85], welche aber in Teilen nicht mit der Nomenklatur nach Förstermann [87] übereinstimmt, da diese z.B. das Exon, welches von Wang und Saur [86] als Exon 1c bezeichnet wurde, 1d nennen. Für die Exons 1f bis 1h stimmt die Namensgebung jedoch überein und des Weiteren wird in der vorliegenden Arbeit die Nomenklatur nach Wang verwendet.

Tab. 1. Unterschiedliche Nomenklaturen der alternativen NOS1 Exons1f.

Numerisch	5'3			5'2			5'1					
Wang, Saur	a	b	-	c	e	f	g	h	i	-	AS	j
Förstermann	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L

Elf unterschiedliche Promotoren kontrollieren die Expression dieser alternativen ersten Exons. Nur die hochkonservierten Exons 1g und 1f finden sich auch im murinen Genom, was ein hohes evolutionäres Alter dieser Exons vermuten lässt. Dort sind diese zwei Exons jedoch verschmolzen und werden von nur einem Promoter angetrieben, wohingegen sie im humanen Genom durch getrennte Promotoren gesteuert werden [90, 91]. Einige der Exon1-Alternativen werden selektiv in wenigen Geweben exprimiert, andere sind in zahlreichen Zellarten zu finden. Auch können verschiedene erste Exons parallel in einer einzigen Zelle exprimiert werden. So zum Beispiel im Skelettmuskel, in welchem man fast ausschließlich Exon 1a und das nahezu ubiquitäre 1c vorfindet oder in Neuronen, die sowohl Exon 1c als auch 1f/g bilden [86]. Exon 1c findet sich im Cortex und im Hippocampus. Unklar ist allerdings, ob sich dort auch Exon 1f finden lässt, da die Befunde hierzu widersprüchlich sind [92]. Es wird angenommen, dass diese alternativen Exons zahlreiche Wechselwirkungen hervorbringen, so findet sich im Falle einer „Herunter“-Regulation des Exons 1c, wie bei der infantilen

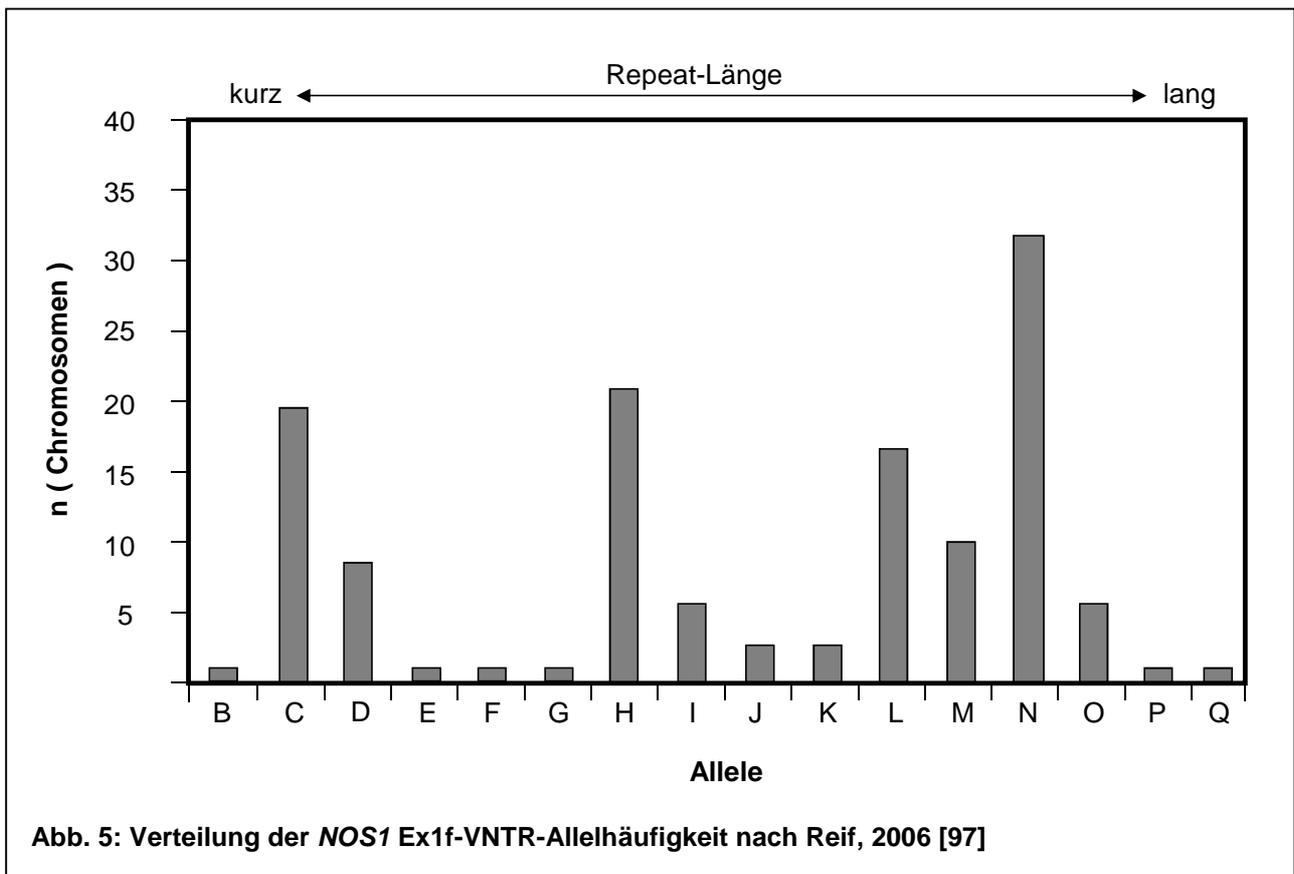
Einleitung

hypertrophischen Pylorusstenose, eine vermutlich kompensatorische „Hoch“-Regulation des Exons 1f [93].

Die Start und -Endpunkte für die Translation liegen in den Exons 2 und 29, was dazu führt, dass die alternativen ersten Exons nicht in Protein translatiert, sondern aus der mRNA herausgespleisst werden. Ihre Funktion liegt also in der Regulation einer gewebs- oder stimulusspezifischen Translationsaktivität [85, 94-96].

1.5. Der Promoter des *NOS1*-Exons 1f

In dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk auf der Promotereinheit des Exons 1f, in welcher 33 Basenpaare (bp) *upstream* der TATA-Box ein hochpolymorpher ((TG)_mTA(TG)_n)-Repeat existiert, der als *NOS1* Ex1f-VNTR (*variable number of tandem repeats*) bezeichnet wird. Die Dinukleotidwiederholungslänge schwankt zwischen 19 und 34 Repeats, mit einer nicht-gleichmäßigen Verteilung und einer Häufung der Allele mit 20/21, 25 und 29/30/31 Repeats (Abb. 5) [97-99].



Hall et al., 1994 [52] beschrieben bereits einen ähnlichen CA-Dinukleotid-Repeat in der 3'-UTR des Exon 29 von *NOS1* und äußerten die Vermutung, die mRNA

Einleitung

Prozessierung könne durch die Länge des Repeats beeinflusst werden. Bis dato wurde jedoch für diesen Dinukleotid-Repeat, welcher in der Länge seiner Allele ebenfalls ungleich verteilt ist, keine Funktionalität demonstriert. Laut einer Studie von Rife und Mitarbeitern findet sich, bezogen auf das 5'-Ende des *NOS1 Ex1f*, die TATA-Box zwischen den Basenpaaren 1600 bis 1609, die *core promoter function* zwischen den bp 1626 bis 1674, und ein die Transkription negativ regulierendes Element zwischen den bp 1196 bis 1428 bzw. 1469 [91]. Rife veröffentlichte weiterhin Daten über eine *Activation Protein-1* (AP-1)-Bindestelle an Position 1586 und *Yinghui et al., 2007* beschrieben darüber hinaus eine Bindestelle für das *Specificity Protein-1* (SP-1) an Position 1454. Beide Transkriptionsfaktoren, AP-1 und SP-1, sind in die Vermittlung indirekter genomischer Östrogenwirkung involviert [100-102].

Eine Analyse der Sequenz mittels *Transcription Element Search System* (TESS) ergab 3 Sp1/ER östrogenresponsive Bindungstellen zwischen bp 1420 und 1470, sowie eine *cAMP Response Element* (CRE)-Bindungsstelle an Position 1693, beide allerdings als unvollständige palindromische Sequenz, was die Affinität der Transkriptionsfaktoren für die Bindungsstellen mindern könnte. Die numerische Angabe der Basenpaare berücksichtigt nicht die variable Länge des VNTRs.

1.6. Genomische und nichtgenomische Effekte von Östrogen

Die Klasse der lipophilen Steroidhormone, welcher die Östrogene mit ihrem potentesten Vertreter 17 β -Estrogen, sowie weitere Sexualhormone (Gestagene, Androgene), Mineralocorticoide und Glucocorticoide angehören, stellt eine wichtige Gruppe humaner Effektorhormone dar. Östrogene vermitteln ihre Wirkung nach transmembranöser Diffusion durch Bindung an zytoplasmatische Östrogen-Rezeptoren (ER), hauptsächlich ER α und ER β [103-105], die als liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren agieren [106]. Die ER, welche in inaktiver Form an Chaperone-Proteine, wie das *Heat-Shock-Protein 90* (HSP90) gebunden sind [107-109], dissoziieren nach Östrogenbindung und der dadurch bewirkten Konformationsänderung vom HSP90 und bilden Homo- sowie Heterodimere aus [110, 111]. Dieser aktivierte Hormon-Rezeptor-Komplex transloziert in den Zellkern, wo er in der Promoterregion der Zielgene durch Bindung an *estrogen response elements* (ERE) seine Wirkung als Transkriptionsfaktor entfaltet [112]. In der Folge

Einleitung

wird die Transkription der betreffenden Gene gesteigert oder supprimiert, was letztendlich in veränderter Proteinexpression resultiert [105, 106].

Außer den EREs gibt es aber noch weitere DNA-Bindestellen, die über die Interaktion des ER mit anderen Transkriptionsfaktoren indirekte genomische Östrogenwirkung vermitteln können, was als *transcriptional cross-talk* bezeichnet wird [113] und bei rund einem Drittel der östrogenregulierten humanen Gene zum tragen kommt [114]. Hierbei sind die Bindungsstellen für *Activation Protein-1* (AP-1) und *Specificity Protein-1* (SP-1) von besonderem Interesse [102, 115], die ohne direkte DNA-Bindung des ERs östrogenabhängige Genexpressionsänderung nach sich ziehen. Die Interaktion mit dem ER aktiviert die *Mitogen-activated Protein Kinase* (MAPK), welche wiederum die Proteine c-Fos und c-Jun phosphoryliert, was diese befähigt, die AP-1-Bindungsstelle zu besetzen [116]. Im Falle der SP-1-Bindungsstelle führt ein Komplex aus dimerisiertem ER und dem SP-1 zur Transaktivierung der Genexpression [117].

Ergänzend zur genomischen Östrogenwirkung, die mit einer Latenz von mehreren Stunden die Proteinsynthese beeinflusst, wurden nichtgenomische Östrogeneffekte demonstriert, die sich innerhalb von Minuten entfalten und auf eine Erhöhung intrazellulärer *second messenger* zurückgeführt werden [118]. Hierfür wurde unter anderem die Beteiligung membranständiger ERs gezeigt [119, 120], welche in Endothelzellen die östrogenabhängige Aktivierung der NOS-III vermitteln [121-123]. Darüber hinaus kann auch die intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} [124, 125] und des *zyklischen Adenosinmonophosphates* (cAMP) [126, 127] im Rahmen nichtgenomischer Östrogenwirkung innerhalb von Minuten erhöht werden.

1.7. Genomische Effekte des cAMP response element-binding (CREB)

Der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor *cAMP response element-binding* (CREB), welcher zur Familie der *Basic Leucine Zipper* (bZip) Transkriptionsfaktoren gehört [128], spielt als Endpunkt der Signaltransduktionskaskade des *zyklischen Adenosinmonophosphates* (cAMP) eine wichtige Rolle in zahlreichen physiologischen Prozessen, wie dem Zellüberleben [128], der Glukosehomöostase [129], der neuronalen Entwicklung und Plastizität [130], sowie der Formierung des Langzeit-Gedächtnisses [131, 132].

Für die Aktivierung von CREB ist die Phosphorylierung am Serinrest 133 in der *Kinase-induzierbaren Domäne* (KID) Voraussetzung [133, 134].

Einleitung

Diese Phosphorylierung kann durch eine Reihe verschiedener Kinasen geschehen, z.B. mittels der Proteinkinase A und C (PKA, PKC), der Calmodulin-Kinasen I, II und IV (CaMK) oder der Glykogensynthasekinase-3, wodurch die CREB-Aktivität erhöht aber auch erniedrigt werden kann [135, 136]. Über die mögliche Phosphorylierung durch verschiedenste Kinasen kann CREB somit zur Endstrecke vieler Signalkaskaden werden [137, 138]. So kann zum Beispiel die Aktivierung des D1-Dopamin-Rezeptors, der über seine Transmembrandomäne mit der Adenylatzyklase (AC) verbunden ist, zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP führen, welches wiederum die PKA zur Translokation in den Zellkern und zur Aktivierung von CREB veranlasst [139, 140]. In Folge dessen bindet CREB in homodimerisierter Form an spezifische DNA-Bindestellen, den *cAMP Response Elements* (CRE) [128, 141] und aktiviert im Zusammenspiel mit dem *CREB Binding Protein* (CBP) den RNA-polymerase II-Komplex [142].

Neben Aktivatoren der Transkription gibt es auch suprimierend wirkende Mitglieder der CREB-Familie, die *cAMP Response Modulatoren* (CREM) und den *Inducible cAMP early Repressor* (ICER), die ebenfalls an CRE binden und somit die CRE-abhängige Transkription blockieren [143, 144].

Für molekularbiologische Studien hat sich die Aktivierung des CREB-Signalweges mittels Forskolin, eines direkten Aktivators der Adenylatcyclasen, bewährt, da es bereits in geringen Konzentrationen zu einem deutlichen Anstieg des cAMP-Spiegels führt [145].

1.8. Das Brodmann-Areal 46 des humanen Cortex

Die Einteilung der Großhirnrinde in einzelne Areale geht auf den Anatomen Korbinian Brodmann zurück, der, basierend auf Befunden zur neuronalen Zytoarchitektur, Organisationsverbände der Neurone zusammenzufassen versuchte (Korbinian Brodmann, *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde. In ihren Principien dargestellt auf Grund des Zellenbaues*, Leipzig: Barth, 1909). Dieser heute noch gebräuchlichen Ordnung zufolge lässt sich der humane Cortex in 52 Bereiche einteilen, wovon einigen im Verlauf auch physiologische Aufgaben zugeordnet werden konnten (Abb. 6).

Das im Frontallappen lokalisierte BA46 entspricht in seinen Abmessungen ungefähr dem dorsolateralen prefrontalen Cortex (DLPFC), welcher mit der Fähigkeit Aufmerksamkeit aufrecht zu erhalten, der Funktion des Arbeitsgedächtnisses und

Einleitung

dem Bewusstsein im Allgemeinen in Verbindung gebracht wird [148]. Insbesondere geht eine Beeinträchtigung dieser kognitiven Domänen bei schizophrenen Patienten mit einer Störung frontaler kortikaler Funktionen im DLPFC einher [149, 150], welche sich auch auf zellulärer und molekularer Ebene nachweisen lassen [151]. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits in neurophysiologischen Untersuchungen schizophrener Patienten Beeinträchtigungen präfrontaler kortikaler Funktion feststellen und eine Assoziation mit dem *NOS1* Ex1f-VNTR herstellen [97].

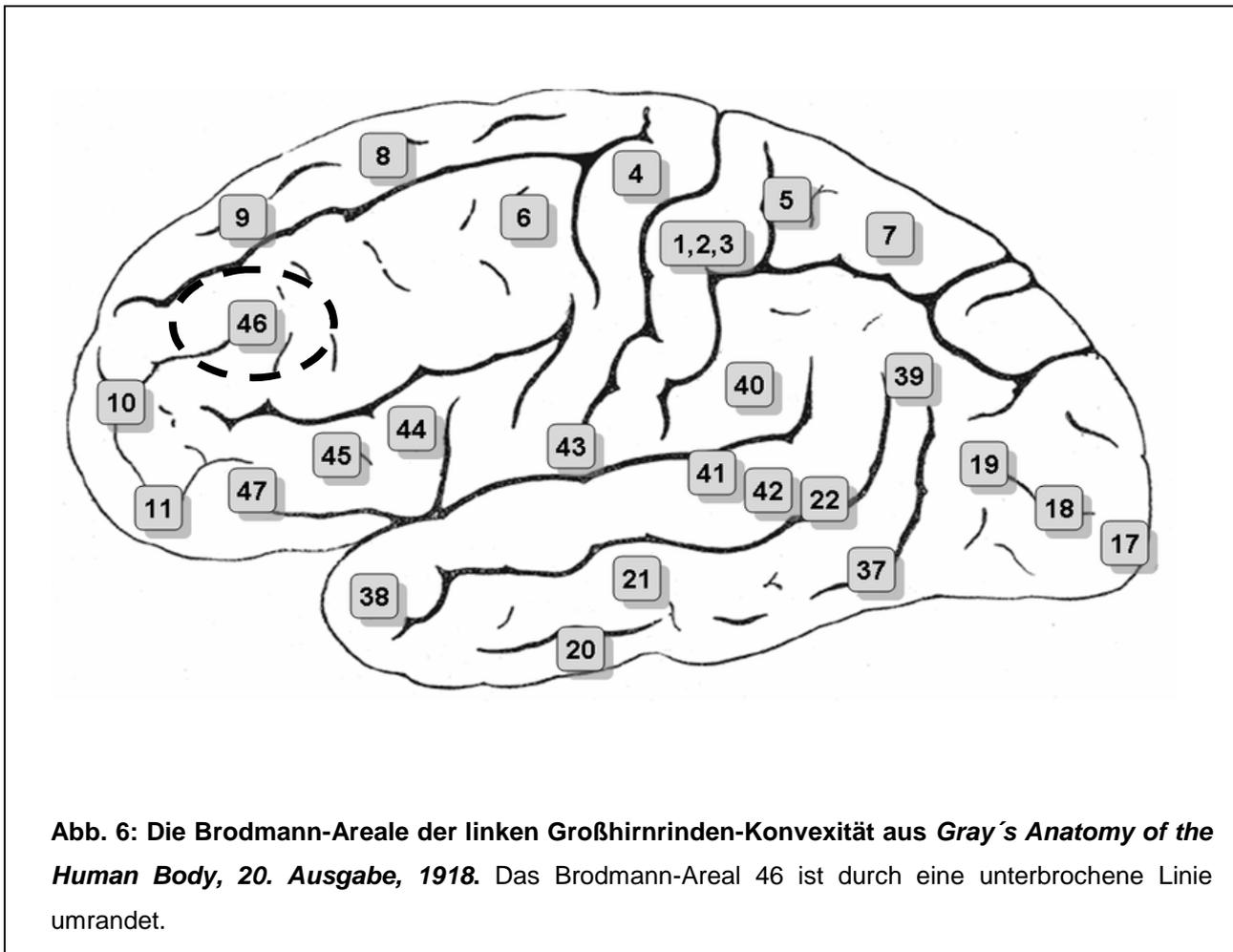


Abb. 6: Die Brodmann-Areale der linken Großhirnrinden-Konvexität aus *Gray's Anatomy of the Human Body*, 20. Ausgabe, 1918. Das Brodmann-Areal 46 ist durch eine unterbrochene Linie umrandet.

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkung des *NOS1* Ex1f-VNTRs auf die Genexpression zu ermitteln. Dazu wurden im Sinne einer Extremgruppenanalyse den Dinukleotid-Repeat enthaltende Promotoren mit kurzen (20 Repeats), intermediären (25 Repeats) und langen (31 Repeats) *NOS1* Ex1f-VNTR ausgewählt und mittels eines Reporter-gen-Assays auf ihre Funktionalität untersucht. Dazu

Einleitung

wurden den Promoter enthaltende Genabschnitte in den Luciferase-Vektor pGL3 kloniert. Diesen Plasmiden wurden drei analoge Konstrukte zur Seite gestellt, die sich lediglich in ihren 5'-Enden unterschieden, innerhalb derer die oben genannten östrogenresponsiven Bindungsstellen lokalisiert sind. Durch den Vergleich der beiden zu je einer Repeat-Länge korrespondierenden Konstrukte sollte es möglich gemacht werden, mittels Östrogeninduktion den Einfluss dieser Bindestellen auf die Transkription zu ermitteln. Darüber sollte durch Forskolinstimulation der Einfluss des im Promoter lokalisierten CRE untersucht werden. Zusätzlich wurde noch ein siebtes Konstrukt erstellt, welches den invertierten Promoter enthält, um etwaige unspezifische Aktivität des Genabschnitts auszuschliessen.

Des Weiteren wurden vom *Stanley Medical Research Institute* erhaltene Patientenproben aus zerebellären Gewebeproben genotypisiert. Um die Auswirkungen des *NOS1* Ex1f-VNTR auf das humane Transkriptom des BA46 nachzuweisen, wurden die zuvor durch die Genotypisierung identifizierten Patientensamples in Gruppen bezüglich der Länge des VNTR eingeteilt (nach Genotyp homozygot kurz/kurz (s/s), heterozygot kurz/lang (s/l) und lang/lang (l/l)) und die Mikroarraydaten nach diesen Merkmalen stratifiziert.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Geräte

- ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City
- AT21 Feinwaage, Mettler; Giessen
- Biofuge fresco, Univapo 150H, Uniequip
- Biometra Uni Thermoblock, Biotron; Göttingen
- B&W Video Camera, Exwave HAD, Sony
- CEQ 8000 DNA-Sequencer, Beckmann-Coulter, Krefeld
- Consort Electrophoresis Power Supply E844; Peqlab, Erlangen
- Consort Electrophoresis Power Supply E835; Peqlab, Erlangen
- DMIL Lichtmikroskop, Leica
- E-Centrifuge, Laborbedarf Hartenstein; Würzburg
- Elphor-Powerpack P24 Powersupply, Biometra
- 3850 ELV Autoclav, Tuttnauer Systec; Wittenberg
- Fireboy Eco, Integra Biosciences
- Fluo-Link UV-Tisch, MWG-Biotech
- Gelair Gruppo-Flow, Opera
- 40-1214 Gelelectrophorese-Laufkammer; Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
- Gene Power Supply GPS 200/400; Pharmacia, Freiburg
- GFL 1083-Wasserbad; GLF, Burgwedel
- HERA cell 150, Thermo Scientific
- HAM2 Autoclave, Wolf
- HL52 Feinwaage, Mettler; Giessen
- ID 02 Lichtmikroskop, Zeiss
- KAMAG RCT Thermomagnetrührer, IKA Labortechnik, Staufen I. Br.
- Kämme für Agarosegele; Peqlab, Erlangen
- KL2 Schüttler, Johanna Otto GmbH
- LB 122 Dekontaminationsmonitor, Berthold; Bad Wildbad
- Micro 20, Hettlich Zentrifugen; Tuttlingen
- Microlumat Plus LB 96V, Berthold; Bad Wildbad
- Mini Centrifuge C-1200; Labnet International, Inc, Woodbridge, NJ, USA
- Mini Centrifuge C-1202; Labnet International, Inc, Woodbridge, NJ, USA

Material und Methoden

- Mini Oven MK II, Hybaid, MWG-Biotech
- Molecular Imager ChemiDoc XRS System; Bio-Rad, München
- Nanodrop, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
- NC2L –60°C, Unicryo, Uniequip
- NU AIR, Biological Safety Cabinets; Sarstedt
- Pico Fuge, Stratagene
- Pipetboy, Accujet Pro
- Pipetten; Eppendorf, Hamburg
- PM 300 Waage; Mettler, Gießen
- RC5C, Sorvall Instruments, DU PONT; Bad Homburg
- Rotanta 56 RS, Hettich Zentrifugen; Tuttlingen
- T-1 Thermoblock; Biometra, Göttingen
- T-Gradient Thermoblock; Biometra, Göttingen
- TH15 Schüttler, Labortechnik Johanna Otto GmbH
- TissueLyser; Qiagen, Hilden
- Toledo Waage; Mettler, Gießen
- UNO II Thermoblock; Biometra, Göttingen
- UV-Lampe, Konrad Benda Laborgeräte & Ultraviolettstrahler; Wiesloch
- UV-Tisch 2035; Herolab, Deutschland
- UV Transluminator; UVP, Upland, CA, USA
- UV/VIS Spektralphotometer, AnalytikJena, Jena
- Video Graphic Printer UP-895CE; Sony, Tokio
- Vortex; Scientific Industries Inc., USA
- Vortex Genie 2 Vortexer, Bender & Hobein AG; Zürich

2.2. Verbrauchsmaterialien

- DNTPs, GIBCO BRL, Keutz
- Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega, Mannheim
- Effectene® Transfection Reagent, Qiagen, Hilden
- Einmal-Küvetten, Brand
- ExpressHyb™ Hybridization Solution, Clontech, Mountain View, USA
- Fotolaborchemikalien, Kodak, Paris
- Frischhaltefolie, Dow, Midland

Material und Methoden

- Gel Blotting-Filterpapier Whatman, Middlesex
- Glaskapillaren, World Precision Instruments, Florida
- Glasflammer, Gasi, Schütt, Göttingen
- Glaswaren, Schott, Wertheim
- Kryoröhrchen, Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
- Lipofectamine® 2000, Invitrogen, Karlsruhe
- Parafilm „M“®, Pechiney Plastic Packiging, Menasha
- Prestained Protein Marker (PPL) Fermentas Life Science, St. Leon-Roth
- Puderfreie Latex-Handschuhe Kimberly-Clark, Mainz
- 1,5 ml Reaktionsgefäße, Eppendorf, Hamburg
- 2 ml Reaktionsgefäße, Eppendorf, Hamburg
- RNeasy® Mini Kit, Qiagen, Hilden
- Röhren, Sarstedt, Nürnberg
- SSL-Marker 100 bp Ladder, Generuler, Fermentas Life Science, St. Leon-Roth
- Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System, Promega, Mannheim

2.3. Chemikalien

- 17β-Östradiol, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Agarose; Biozym, Rockland, USA
- Ammoniumchlorid (NH₄Cl), AppliChem, Darmstadt
- Betain, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- 100 bp DNA-Marker, Peqlab, Erlangen
- Bromphenolblau; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- *Bovine Serum Albumine* (BSA), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Ethyldiamintetraacetat (EDTA), AppliChem, Darmstadt
- Ethanol; AppliChem, Darmstadt
- Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Forskolin, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Glycerol, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Isopropanol, Merck, Darmstadt
- Kaliumchlorid (KCl), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Material und Methoden

- Kaliumhydrogencarbonat (KHCO₃), AppliChem, Darmstadt
- Magnesiumchlorid (MgCl₂), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Natriumacetat; Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- SDS (Sodiumdodecylsulphat), AppliChem, Darmstadt
- Tris-HCl, AppliChem, Darmstadt
- Wasser (LiChlorosolv® Wasser für die Chromatographie, Merck, Darmstadt)
- Xylencyanol FF, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Alle anderen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Gibco BRL (Eggenstein), AppliChem (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) in höchstem Reinheitsgrad (*pro analysis*, p.a.) bezogen.

2.4. Enzyme

- Exo (-) Klenow-DNA-Polymerase, Fermentas, St. Leon Rot
- Proteinase K, Fermentas, St. Leon Rot
- Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas, St. Leon Rot
- Taq-Polymerase, Fermentas, St. Leon Rot

Tab. 2: Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	zu erkennende Sequenz	Hersteller
Hae III (R0108S)	5'...GG▼CC...3' 3'...CC▲GG...5'	New England Biolabs
Msc I (R054S)	5'...TGG▼CCA...3' 3'...ACC▲GGT...5'	New England Biolabs
Sac I (R0156S)	5'...GAGCT▼C...3' 3'...C▲TCGAG...5'	New England Biolabs
Sma I ((R0141S)	5'...CCC▼GGG...3' 3'...GGG▲CCC...5'	New England Biolabs
Sca I (R0122S)	5'...AGT▼ACT...3' 3'...TCA▲TGA...5'	New England Biolabs
BamH I ((R0136S)	5'...G▼GATCC...3'	New England Biolabs

Material und Methoden

Not I (R0189S)	3'...CCTAG▲G...5' 5'...GC▼GGCCGC...3' 3'...CGCCGG▲CG...5'	New England Biolabs
Cla I (R0197S)	5'...AT▼CGAT...3' 3'...TAGC▲TA...5'	New England Biolabs

2.5. Kits

- ABI Prism Big Dye™ Terminator Reaction Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA
- Dual Luciferase Assay-Kit, Promega, Madison, USA
- LigaFast™ Rapid DNA Ligation System; Promega, Madison, USA
- MasterPure™ Complete DNA Kit, Epicentre Biotechnologies, Madison
- Plasmid Maxi-Kit, Qiagen, Hilden
- Plasmid-Mini-Kit, Qiagen, Hilden
- Prime It® II Random Primer Labeling-Kit, Stratagene, La Jolla, USA
- Qiaex II Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden

2.6. Puffer und Medien

- *Dulbecco's Modified Eagle's* Medium (DMEM), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Einfriermedium:
 - 8 ml Medium mit 10% FCS-Anteil und Pen-Strep-Zusatz
 - 1 ml FCS
 - 1 ml DMSO
- LB(Luria Bertani Broth)-Medium:
 - 10 g Bacto™-Tryptone
 - 5 g Bacto™ Yeast-Extract
 - 10 g NaCl
 - ad 1000 ml H₂O bidest.
 - ph 7,4

Material und Methoden

- 1x TAE-Puffer:
 - 40 mM Tris/Essigsäure
 - 1 mM EDTA
- Probenpuffer :
 - 0,25% Bromphenolblau
 - 0,25% Xylencyanol
 - 40% Saccharose
- Gold-Star® Puffer, AnaSpec, Fremont, USA

2.7. Primer und Vektoren

- pGL3-Basic Vector, Promega, Madison, USA
- phRG-TK Vector, Promega, Madison, USA
- DNA-Konstrukte

Aus Blutspender-Kontroll-Stichproben isolierter DNA wurden die homozygoten Träger der häufigsten Allele ausgewählt, so der 20-Repeat-Genotyp, der 25-Repeat-Genotyp und der 31-Repeat-Genotyp und deren 1f Promoterregion als Insert in einen Reporter-gen-Vektor pGL3 (Promega) kloniert.

Zu diesen drei Alleltypen wurde jeweils zwei Konstrukte erstellt, welche sich in ihrer Länge geringfügig bezüglich ihres Anfangs unterschieden. Es war möglich, durch einen zusätzlichen Restriktionsenzymverdau ein Fragment unterschiedlicher Länge zu erhalten, welches auf nur 38 bp Längenunterschied drei östrogenresponsive Elemente und ein CRE beherbergt, um somit östrogen- und CREB-induzierte Veränderung der Promoteraktivität nachzuweisen.

Zuletzt wurde noch ein siebtes Konstrukt hinzugefügt, welches das antisense-Konstrukt des 20-Repeat-Genotypen darstellt, um eventuelle unspezifische intrinsische Aktivität zu entdecken und aus den Messungen zu eliminieren.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotid-Primer

Primer-Name	Sequenz
hnNOSpromEx1f-F	5'-GGC TGC TTT TCT CCG TCT GTC-3'
hnNOSpromEx1f-R	5'-CCC GCT AGG AGG AAA ATG AGG-3'
hnNOSpromEx1f-Fmod	5'-CCC TGC GTG GCC ACT ACA TTC A-3'
pGL-3LigConr.Rev	5'-CCG GGCCTT TCT TTATGT TTT TG-3'
RVprimer3 pGL3	5'-CTA GCA AAA TAG GCT GTC CC-3'
GLprimer2 pGL3	5'-CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA-3'
NOS-Fw	5'- GGC TCC CAG AAA TTG TCA TTG T-3'
NOS-Re	5'- CTG GGC TCC AAA GCA TAC ATC-3'

2.8. *Escherichia coli*-Stämme

- XL-10 Gold, Stratagene, La Jolla, USA
- OneShot TOP10, Invitrogen, Carlsbad, USA

2.9. Zelllinie

- HeLa-Zellen humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, die ersten Zellen, aus denen eine permanente Zelllinie etabliert wurde.

2.10. Das Patienten-Sample der Stanley Foundation brain collection

Das *Stanley Medical Research Institute* (SMRI) begann 1994 damit, eine seither stetig wachsende Sammlung von Gehirngewebe psychiatrisch erkrankter Patienten anzulegen, die derzeit Gewebe von über 300 Individuen umfasst. Die Sammlung beinhaltet vorrangig Gewebe schizophrener oder bipolarer Patienten, da die Erforschung dieser beiden Erkrankungen der Zielsetzung der *Stanley Foundation* entspricht, enthält aber auch Proben von depressiv erkrankten Patienten und gesunden Kontrollen. Die den Gewebeproben zugeordnete Datenbank setzt sich aus Informationen über Demographie, Familienanamnese, Ausbildung, Ersterkrankungsalter, gesamter Hospitationsdauer, psychiatrische und somatische Diagnosen, Todesursache, Medikation zum Todeszeitpunkt, Gehirngewicht, sowie Zeitintervall zwischen Todeszeitpunkt und Einfrieren des Gehirngewebes zusammen. Weiterhin werden Einschätzungen zur Lebenszeit-Fluphenazin-Äquivalenzdosis, Geburts- und Entwicklungskomplikationen, globalen Schwere der Erkrankung, Ausmaß von Substanz-, Alkohol- und Nikotinabusus vorgenommen [146].

Mit RNA-Proben der inkludierten Individuen wurde eine auf Microarray-Untersuchungen basierende genomische Datenbank, die *Stanley Medical Research Institute online genomics database* (SMRIDB), angelegt und 2006 vorgestellt [147]. Gewebeproben aus der Sammlung und auch damit generierte Daten werden Forschungsgruppen weltweit zur Verfügung gestellt, um in der Zusammenarbeit die Kenntnisse über die Genese dieser schweren psychiatrischen Störungen zu vermehren.

Unsere Arbeitsgruppe erhielt von der *Stanley Foundation* Hirngewebsproben aus dem Cerebellum von 105 Individuen, für die bereits Microarray-Daten aus dem Brodmann-Areal 46 (BA46) vorlagen, um diese bezüglich des *NOS1 Ex1f-VNTRs* zu genotypisieren und dessen Einfluss auf das humane Transkriptom des BA46 zu untersuchen.

2.11. Software

- GeneTools, Syngene, Frederick, USA

2.12. Mikrobiologische Methoden

2.12.1. Kultivieren von *E. coli*-Bakterien

Die Kultivierung eines mit einem sterilen Zahnstocher oder Pipettenspitze isolierten Bakterienklons erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37°C in mit Antibiotikum versehenen LB-Medium auf einem Schüttler bis eine *optical density* (OD) von ca. 0,5 erreicht wurde.

2.12.2. Dauerkulturen von *E. coli*-Bakterien

Für längerfristige Aufbewahrung von transformierten Bakterienkulturen wurden aus den entsprechenden, frisch angewachsenen Kulturen Glycerolstocks hergestellt. Hierfür wurde die Bakterienkulturlösung mit einer autoklavierten 98% (v/v) Glycerol-Lösung 1:1 gemischt und auf -80°C gefroren. Die jeweiligen Glycerolstocks konnten nach Bedarf mit einem sterilen Zahnstocker angeimpft und in LB-Medium gezüchtet werden.

2.12.3. Transformation Hitzeschock-kompetenter E. coli-Bakterien

Die Plasmide wurden per Hitzeschock-Verfahren in chemisch kompetente E. coli Bakterien transformiert. Hierzu wurde ein 50 µl-Aliquot chemisch kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 10 µl des gewünschten Plasmides versehen. Die 30-minütige Inkubation des Gemisches erfolgte auf Eis, wonach die Bakterien-cDNA-Lösung einem 30 sec langen Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt wurde. Erneut wurde der Ansatz 10 min lang auf Eis inkubiert und anschließend 250 µl raumtemperiertes SOC-Medium (Invitrogen) zugegeben. Die erhaltene Lösung wurde für 1 h bei 37°C auf einem Drehrad gedreht. Nach der Inkubation wurde die angezüchtete Bakterienkultur 1 min lang bei 13000 rpm (Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415C) zentrifugiert und der Überstand auf eine mit entsprechendem Antibiotikum versehene LB-Agar-Platte ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach ca. 8 h konnten die durch das Antibiotikum selektierten Bakterien-Kulturen zur Isolierung von Plasmid-DNA oder Anfertigung von Glycerolstocks angeimpft werden.

2.13. Molekularbiologische Methoden

2.13.1. Plasmidisolierung aus E. coli-Bakterien

2.13.1.1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA wurden bakterielle Übernacht-Kulturen angesetzt. Hierzu wurden die Bakterien aus den bei -80°C aufbewahrten gewünschten Glycerolstocks angeimpft und in 5 ml autoklaviertem LB-Medium mit Anitibiotikumzusatz bei 37°C über Nacht in 15 ml Falcon-Röhrchen auf einem Schüttler mit 225 rpm inkubiert.

Die angewachsene Bakterienkultur wurde in 2 ml Eppendorf-Reagenzgefäßen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Aus dem verbliebenen Sediment wurde mit Hilfe des Plasmid-Mini-Kits (Qiagen) die Plasmid-DNA gewonnen.

Zunächst wurde das Sediment in 250 µl des 50 mM Glucose/ 25 mM Tris/ 10 mM EDTA enthaltendem P1-Puffers resuspendiert und mechanisch homogenisiert. Als nächstes wurden die Bakterien durch Zugabe von 250 µl des 0,2 M NaOH/ 1% SDS-Lösung P2 lysiert und nach Zugabe von 350 µl der 3 M Kaliumazetat-Lösung (pH 5,3) N3 10 min lang bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin auf die zuvor vorbereiteten Säulen überführt und erneut bei maximaler Geschwindigkeit 1 min lang zentrifugiert. Und der Durchfluß verworfen.

Material und Methoden

Die Säule wurde zur Fällung mit 500 µl der PB-Lösung equilibriert, erneut 1 min lang zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Daraufhin wurde die Säule zweifach mit 750 µl der Ethanol-haltigen PE-Waschlösung versetzt und zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung des Ethanols wurde die Säule ohne Zugabe der Waschlösung wiederholt. Die Säule wurde auf ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reagenzgefäß überführt und von dieser die Plasmid-DNA mit 50 µl der EB-Elutionslösung und durch 2 min langes Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit eluiert. Die mit Hilfe des Kits gewonnene Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.13.1.2. Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation von Plasmid-DNA in größeren Mengen wurden bakterielle Übernacht-Kulturen angesetzt. Hierzu wurden die Bakterien aus den bei -80°C aufbewahrten gewünschten Glycerolstocks angeimpft und in 400 ml LB-Medium mit Anitibiotikumzusatz bei 37°C über Nacht in einen 500 ml bis 1 l großem Erlenmeier Kolben geschüttelt.

Nach überführen von je 200 ml in 500 ml Zentrifugengefäße wurden die Kulturen bei $6000 \times g$ und 4°C 15 min lang zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Zur Extraktion der Plasmid-DNA wurde das Plasmid Maxi-Kit (Qiagen) verwendet.

Das Bakterienpellet wurde in 10 ml der 50 mM Tris-HCl/10 mM EDTA P1-Lösung resuspendiert und mechanisch homogenisiert. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 10 ml der 200 mM NaOH/ 1% SDS P2-Lösung lysiert, welches gut vermengt und bei RT 5 min lang mit den Bakterienzellen inkubiert wurde. Präzipitation genomischer DNA wurde erreicht, indem 10 ml gekühlter 3 M Kaliumacetat-haltiger P3-neutralisierungspuffer zugegeben, gut vermischt und 20 min auf Eis inkubiert wurde. Nach Zentrifugation bei $20000 \times g$ bei 4°C für 30 min wurde der Plasmid-DNA-enthaltende Überstand durch eine zuvor mit 10 ml QBT-Equilibrierungspuffer (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% Isopropanol, 0.15% Triton) gewaschene Qiagen-tip 500 Säule gefiltert. Nachfolgend wurde die Säule mit 2 x 30 ml der 1 M NaCl/50 mM MOPS/15% Isopropanol QC-Lösung gewaschen und die DNA mit der 15 ml 1,25 M NaCl (50 mM Tris-Cl/ 15% Isopropanol QF-Lösung eluiert. Dem Eluat wurde 10,5 ml Isopropanol zugegeben, um die DNA zu präzipitieren, und bei $15\ 000 \times g$ und 4°C 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt, das erhaltene DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und nochmals bei $15\ 000 \times g$

für 10 min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstands wurde das DNA-Pellet 5 min lang luftgetrocknet und in 500 ml Tris/EDTA-haltigem TE-Puffer gelöst.

Nach Konzentrationsbestimmung wurde die erhaltene Plasmid-DNA bei -20°C aufbewahrt.

2.13.2. Ethanolfällung von DNA

Die Fällung mit Ethanol diente der Aufkonzentrierung von DNA sowie der Entfernung von Verunreinigungen, wie Salzresten. In ersten Schritt wurde die zu Fällende DNA-Probe mit 1/50 Volumen 5 M NaCl-Lösung oder 1/10 Volumen NaAcetat pH 5,2, sowie mit 2,5 Volumen 100% eiskaltem Ethanol versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei -80°C oder 20 min bei -20°C wurde die DNA 10 min lang bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das dabei entstandene Sediment wurde mit einer 70% Ethanol-Lösung gewaschen und erneut 10 min lang zentrifugiert. Das Sediment wurde in einer Vakuumzentrifuge kurz getrocknet und in einer entsprechenden Menge bidestiliertem Wasser gelöst.

2.13.3. Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Analyse oder Präparation von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten wurden diese in Agarosegelen im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Methode beruht auf der Tatsache, dass die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA antiproportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare ist (Meyers 1976). Nach Zugabe von Ethidiumbromid, welches zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert, können DNA-Fragmente unter UV-Licht aufgrund der Abgabe von Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden.

Die verwendete Agarosekonzentration der Gele richtet sich nach der Größe der zu trennbaren Fragmente und variiert zwischen 0,8-1,5% (w/v). Eine entsprechende Agarosemenge wurde in 1x TAE-Puffer bis zur Homogenität aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf $50-60^{\circ}\text{C}$ in eine Gelkammer mit Gelkamm gegossen. DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und zur Elektrophorese in die geformten Geltaschen pipettiert. Als Standard zum Größenvergleich wurde ein X kb-Marker eingesetzt. Die angelegte Spannung während der Elektrophorese betrug 80-120 V. Die Gele wurden in Ethidiumbromidlösung ($2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ in 1x TAE) für ca. 10 min inkubiert und im UV-Durchlicht bei 312 nm fotografiert.

2.13.4. DNA-Extraktion aus Hirngewebe

Die Gesamt-DNA aus gefrorenem Hirngewebe wurde nach einer Methode von *Miller* [152], mit Hilfe des MasterPure™ Complete DNA Kits (Epicentre Biotechnologies, Madison) gewonnen. Je 50-100 mg bei -80°C gefrorener Gewebeprobe wurde gemäß dem Herstellerprotokoll mit 900 μl T&C-Lyselösung und 3 μl einer 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ -konzentrierten Proteinase K-Lösung versehen und anschließend mit dem TissueLyser (Qiagen) 40 s lang bei 20 Hz homogenisiert. Es folgte ein 15-minütiger Verdau bei 65°C auf dem Schüttler (KL2 Schüttler), wonach die Proben auf Eis überführt wurden. Nachdem die Proben mit je 3 μl RNAse A (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) versehen wurden folgte eine 30 min lange Inkubation bei 37°C . Daraufhin das Homogenat mit 450 μl MPC-Lösung präzipitiert, 10 s lang gevortext und 10 min lang bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Isopropanol p.a. versehen, wonach erneut 10 min lang bei maximaler Geschwindigkeit auf 4°C zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde vorsichtig entnommen und verworfen. Als nächstes wurde das Sediment zunächst mit 500 μl 100% Ethanol unter 5 min langem Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit auf 4°C gewaschen. Dieser Waschschrift wurde anschließend mit 500 μl 75% Ethanol wiederholt. Der Überstand wurde verworfen und das ca. 30 min lang bei Raumtemperatur getrocknete Sediment in 100-200 μl bidestillierten Wasser gelöst.

2.13.5. Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA wurde photometrisch in wässriger Lösung durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte zwischen 260 und 280 nm. Aus den erhaltenen Absorptionswerten wurde die Konzentration der Nukleinsäure berechnet und ihre Reinheit geschätzt. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Bei einem Quotienten $E_{260/280}$ von 1,8-2,0 beträgt die Reinheit der DNA 70-95%. Der Konzentrationsberechnung der doppelsträngigen DNA wurde der folgende Koeffizient zugrunde gelegt:

$$1 \text{ OD} = 50 \mu\text{g}/\text{ml}$$

2.13.6. **Polymerasekettenreaktion (PCR)**

2.13.6.1. **Amplifikations-PCR**

Zur Amplifikation der in vorhergegangenen *Screenings* identifizierten Patienten-DNA wurde eine zuvor optimierte PCR durchgeführt. Um der verlustreichen Gel-Extraktion aus einer 25 µl PCR-Probe entgegenzuwirken, wurde der Mastermix gleich für acht Proben à 25 µl angesetzt. Das PCR-Produkt wurde überprüft, indem man es auf einem 1% Agarose-Gel elektrophoretisch auftrennte. Der einzelne PCR-Ansatz enthielt:

1 µl	DNA (1 µg)
1,15 µl	Forward-Primer <i>hnNOSpromEx1f-F</i> bzw. <i>hnNOSpromEx1f-Fmod</i> (25 pmol)
1,15 µl	Reverse-Primer <i>hnNOSpromEx1f-R</i> (25 pmol)
1 µl	dNTP
5 µl	Betain
1,5 µl	MgCl ₂ (1mmol/µl)
2,5 µl	GoldStar-Puffer
1 µl	Taq-DNA-Polymerase
ad 25 µl	H ₂ O

Tab. 4: Programm der Amplifikations-PCR

Zyklen	PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
1 x	Prädenaturierung	95°C	5 min
38 x	Denaturierung	95°C	30 s
	Annealing	66°C	40 s
	Elongation	72°C	1 min 25 s
1 x	Inkubation	72°C	8 min
		4°C	∞

2.13.6.2. **Sondensynthese**

Um das in den ausplattierten Bakterienkulturen enthaltene Plasmid mit dem gewünschten Insert identifizieren zu können, wurde ein radioaktiv gelabeltes Oligonukleotid mittels PCR erzeugt und die Bakterienkulturen damit beimpft. Hierfür

Material und Methoden

wurde das Prime It® II-Gen-Labeling Kit verwendet. Der einzelne PCR-Ansatz mit 25 µl Endvolumen enthielt:

12,5 ng denaturierte DNA-Vorlage (*NOS1_Ex1f*-Insert)
5 µl Labeling 5x Puffer
1 µl dNTP-Mix
1 µl nukleasefreie BSA-Lösung
2,5 µl [α^{32} -P] dNTP
0,5 µl Exo (-) Klenow-DNA-Polymerase (5 U/µl)
2 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0
ad 25 µl H₂O

Tab. 5: Programm der Radioaktiv-PCR

Zyklen	PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
1 x	Inkubation	40°C	8 min

Der Reaktionsansatz bestehend aus DNA-Template, Wasser und der Primer wurde 5 min lang im Wasserbad gekocht und kurz herunterzentrifugiert. Nach Zugabe des *Labeling*-Puffers, der radioaktiv gelabelten Nukleotide, sowie der Exo (-) Klenow-DNA-Polymerase wurde der Ansatz vorsichtig mit einer Pipette gemischt und 10 min lang bei 40°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl der Stop Mix™-Lösung gestoppt.

2.13.6.3. Genotypisierungs-PCR

Zur Längenbestimmung des *NOS1 Ex1f*-VNTRs wurde eine Genotypisierungs-PCR durchgeführt und die Länge des Polymorphismus aus der Länge des PCR-Produktes errechnet. Diese Methode wurde freundlicherweise von Frau Dr. rer. nat. S. Herterich, Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie, Würzburg, durchgeführt. Der Längenbestimmung liegt folgender PCR-Ansatz zu Grunde:

200 µM dNTP
2 pmol Forward-Primer *NOS-Fw*
2 pmol Reverse-Primer *NOS-Re*
3 µl DNA

Material und Methoden

0,4 U Taq-Polymerase
ad 25 µl H₂O

Tab. 6: Programm der Genotypisierungs-PCR

Zyklen	PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
1 x	Prädenaturierung	96°C	2 min
33 x	Denaturierung	96°C	20 s
	Annealing	58°C	20 s
	Elongation	72°C	20 s
1 x	Inkubation	72°C	5 min
		4°C	∞

Die nachfolgende elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte wurde mit dem CEQ8000-DNA-Sequenzierer durchgeführt.

2.13.6.4. Sequenzierungs-PCR

2.13.6.4.1. PCR-Produktaufreinigung

Vor der Sequenzierung war es nötig, die im Amplifikat verbliebenen Desoxyribonucleotide sowie überschüssige einzelsträngige Oligonucleotide zu entfernen, da diese sonst das Sequenzierungsergebnis verfälschen könnten. Nach der PCR folgte daher eine enzymatische Aufreinigung der Amplifikate.

Hierfür wurde jeweils folgender Ansatz verwendet:

5 µl PCR-Produkt (1 µg)
1 µl Exonuclease I (1 U/µl)
1 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (20 U/µl)

Tab. 7: Thermocycler-Programm zur PCR-Produktaufreinigung

Zyklen	Thermocycler-Schritt	Temperatur	Dauer
1 x	Enzymaktivierung	37°C	30 min
	Verdau	80°C	15 min
	Inkubation	4°C	∞

2.13.6.4.2. **Sequenzierungs-PCR und DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierungen wurden nach der Desoxynukleotid-Kettenabbruch-Methode nach Sanger [153] durchgeführt. Hierfür wurden zunächst die zu sequenzierenden Genabschnitte mittels PCR amplifiziert und für Vorwärts- und Rückwärtsprimer je ein Reaktionsansatz erstellt:

- 2 µl aufgereinigtes PCR-Produkt (1µg)
- 2 µl Primer (5 pmol/µl) GLprimer2 pGL3 oder RVprimer3 pGL3
- 0,5 µl Big Dye™ Premix
- 1,8 µl 5x ABI-Sequenzierungspuffer
- 3,7 µl H₂O

Im Reaktionsansatz der Sequenzierungs-PCR befindet sich nur ein Primer (*forward* oder *reverse*), da die Sequenzanalyse im automatischen Sequenzierer das Vorliegen von Einzelsträngen erfordert. Das PCR-Programm bestand aus 25 Zyklen folgenden Ablaufs:

Tab. 8: Programm der Sequenzierungs-PCR

Zyklen	PCR-Schritt	Temperatur	Dauer
25 x	Denaturierung	96°C	10 s
	Annealing	55°C	5 s
	Elongation	60°C	4 min

Das Produkt der Sequenzierungs-PCR wurde anschließend über Sephadex G50 Säulen aufgereinigt, welche zum Aufquellen mit 300 µl H₂O aufgefüllt wurden und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Als nächstes wurden die Säulen 5 min lang bei 2300 rpm zentrifugiert, erneut mit 150 µl H₂O versehen und wieder zentrifugiert. Auf die gebrauchsfertigen Säulen wurden 10 µl des Sequenzierungs-PCR-Produktes pipettiert und erneut 5 min lang bei 2300 rpm zentrifugiert. Das aufgereinigte, in den Säulen vorliegende Produkt wurde 15 min lang bei 45°C in einer Vakuumzentrifuge getrocknet, dann in 20 µl Formamid aufgenommen und im Sequenzierer aufgetrennt und analysiert. Zur Ermittlung der genauen Sequenz wurde die Sequenzierungssoftware 3100 Avant Data Collection Software verwendet.

2.13.7. Restriktionsenzymverdau

Um das Insert gewünschter Länge zu erhalten, wurde das gesamte Amplifikations-PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym HaeIII bei 37°C verdaut und das Restriktionsenzym nach 1 h durch 20minütige Inkubation auf 65°C inaktiviert. Um das alternative Insert zu erhalten, wurde ein „Doppel“-Verdau mit dem Restriktionsenzym MscI und HaeIII durchgeführt. Bei beiden Ansätzen entstanden am 5´- sowie am 3´-Ende sogenannte „*blunt-ends*“. Der Verdau-Ansatz enthielt:

0,5 µl	HaeIII
2,2 µl	Puffer #2
12 µl	PCR-Produkt (1µg)
ad 15 µl	H ₂ O
bzw.	
0,5 µl	HaeIII
0,5 µl	MscI
2,2 µl	Puffer #2
10 µl	PCR-Produkt (1µg)
ad 15 µl	H ₂ O

Das gesamte Verdau-Produkt wurde auf einem 1% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Bande erwarteter Größe nachfolgend aus dem Gel extrahiert.

Das Plasmid pGL3 wurde einem Verdau bei 25°C mit dem Restriktionsenzym SmaI unterzogen, welches nur eine Schnittstelle auf dem Plasmid innerhalb der dafür vorgesehenen „*Multiple-Cloning-Site*“ vorwies. Darauf wurde das Plasmid mittels *Shrimp* alkalische Phosphatase (SAP, Fermentas) dephosphoryliert, um einer „Selbst-Ligation“ vorzubeugen. Auch hierbei entstanden am 5´- sowie am 3´-Ende „*blunt-ends*“ analog zu denen des Inserts.

0,25 µl	SmaI
2,5 µl	Puffer #4
1 µl	pGL3 Basic-Vektor (1µg)
ad 25 µl	H ₂ O

Material und Methoden

Um zu einem späteren Zeitpunkt, nach erfolgreicher Ligation und Kolonie-Screening, die Orientierung des Inserts im Plasmid zu testen, wurden die „positiven“ Kolonien hochgezüchtet, ihre DNA mittels Mini-Präparation extrahiert und die dadurch erhaltene Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *SacI* verdaut.

0,25 µl	<i>SacI</i>
2 µl	Puffer #1
2 µl	Plasmid-DNA (1µg)
ad 20 µl	H ₂ O

Das Verdau-Produkt wurde auf einem 1% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, um die erhaltenen Fragmente auf ihre Größe zu untersuchen. Dieses Enzym eignete sich für diesen Zweck besonders, da es sowohl auf dem ursprünglichen Leervektor-Plasmid, sowie auf dem DNA-Insert jeweils nur eine Schnittstelle angreifen würde. Dadurch erhielte man zwei Fragmente, die je nach Orientierung des Inserts unterschiedlich lang wären. Dieser Schritt war wichtig, da es beim „*blunt-end*“-Klonieren möglich wäre, dass sich das Insert entgegen seiner gewünschten Orientierung in das Plasmid einbauen würde. Theoretisch wäre es sogar denkbar, dass mehrere Inserts seriell ins Plasmid eingebaut worden wären, welche man in diesem Verdau durch den Erhalt dreier oder mehrer Fragmente entlarven könnte.

2.13.8. Dephosphorylierung

Das Plasmid pGL3 wurde, nachdem man seinen DNA-Ring mittels Restriktionsenzymverdau geöffnet hatte, mit SAP dephosphoryliert, um die Ligation der entstehenden Enden „mit sich selbst“ weniger wahrscheinlich zu machen. Dieser Vorgang wurde 30 min bei 37°C belassen und dann das SAP durch 20-minütige Inkubation auf 65°C inaktiviert. Die benötigte SAP-Menge wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{pmol SAP} = (\mu\text{g DNA} : \text{kb DNA}) \times 3,04$$

2.13.9. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Gele wurden auf den UV-Tisch aufgelegt und die gewünschte Bande mit einem Skalpell exzidiert und gewogen. Die Extraktion der DNA wurde entsprechend dem

Protokoll des Quiaex II® *Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Hierzu wurde 100 mg des Agarose-Gels in 300 µl QX1-Puffer durch 30 s langes Vortexen resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde der Suspension je nach Menge der auf Gel aufgetragenen DNA ein entsprechendes Volumen der QIAEX II-Lösung, welche die Wasserstoffbrücken schwächt, hinzugefügt, woraufhin eine 10-minütige Inkubation auf 50°C mit Vortexschritten alle 2 min erfolgte. Um den basischen pH-Wert der Suspension zu erhalten, wurde bei einer Farbänderung der Lösung von gelb zu rot 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung dazugegeben und die Inkubation um weitere 5 min verlängert. Es folgte ein 30 s langer Zentrifugierschritt, wonach der Überstand vorsichtig entnommen und verworfen werden konnte. Das erhaltene Pellet wurde in 500 µl QX1-Puffer resuspendiert und durch 30 s langes Zentrifugieren gewaschen. Der Waschschritt wurde mit 500 µl alkoholhaltigen PE-Puffer wiederholt. Das Ergebnis wurde zur vollständigen Eliminierung von Salzresten in einer Vakuum-Schleuder zentrifugiert, nach 30 min in 20 µl eines 10 mM Tris/HCl-Puffers gelöst, gegen eine Probe des nicht extrahierten Verdauprodukts elektrophoretisch aufgetragen und die Konzentration bestimmt.

2.13.10. **Ligation**

Die Ligation des Insert mit dem Plasmid wurde entsprechend dem Protokoll des LigaFast™ Rapid DNA Ligation-Kits (Promega) unter Verwendung der T4 DNA-Ligase bei 30°C für 3 h durchgeführt. Die Menge des benötigten Inserts wurde mit folgender Formel berechnet:

$$1\text{ng des Inserts} = \frac{\text{ng des Vektors} \times \text{kb Größe des Inserts}}{\text{kb Größe des Vektors}} \times \frac{\text{molecular ratio Insert}}{\text{Vektor}}$$

Die Ligation wurde durch Erwärmung des Ansatzes für 10 min bei 70°C beendet.

2.13.11. **Kolonie-Screening**

Die Bakterienkolonien der zuvor beimpften Agarplatte wurden per Abklatschverfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die Membran wurde für 2 min auf der Platte belassen, dann jeweils 4 min zuerst in einem denaturierendem 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl- dann einem neutralisierendem 1 M Tris/HCl/1,5 M NaCl-Bad mit einem pH von 7,5 getaucht, um die DNA auf der Membran zu fixieren und die Zellreste zu eliminieren.

Um die das gewünschte Plasmid tragenden Bakterienkolonien auf einer Agar-Platte identifizieren zu können wurde ein Kolonie-Screening durchgeführt, für welches eine radioaktive Sonde benötigt wurde, d.h. ein dem Insert entsprechendes radioaktiv markiertes DNA-Fragment, welches mit dem Prime It[®] II Random Primer Labeling-Kit (Stratagene) erstellt wurde.

2.13.12. **Hybridisierung**

5 ml ExpressHyb[™] wurde in geeigneten, sicher verschliessbaren Gefäßen auf 65°C vorgewärmt, die Membranen hinzugegeben und für 30 min bei 64°C prähybridisiert. Danach wurde das ExpressHyb[™] durch frische, vorgewärmte 5 ml ersetzt, 13 µl der radioaktiven Sonde zugegeben und die Hybridisierung 1 h 30 min bei 64°C belassen. Nachfolgend wurden die Membranen entsprechend dem Protokoll mit einer Natriumzitat und SDS-haltigen Lösung gewaschen und über Nacht bei –80°C auf einen Film gelegt. Die so identifizierten Kolonien wurden von der ursprünglichen Platte gepickt, hochgezüchtet, im DNA-Mini-Präparationsverfahren extrahiert und mit oben genanntem Verdau auf die Orientierung ihres Inserts geprüft. Die gewünschten Klone wurden daraufhin sequenziert um ihre DNA-Sequenz zu überprüfen.

2.14. **Biochemische Methoden**

2.14.1. **Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Proteinbestimmungen erfolgten nach der von Bradford [154] etablierten Methode. 5–400 µl der auf ihren Proteingehalt zu untersuchenden Probe wurden mit bidestilliertem Wasser auf 800 µl aufgefüllt, so dass die Proteinkonzentration im Testansatz 12 µg/ml nicht überschritt. Nach Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz wurde die Extinktion der Probe im UV/VIS-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Als Blindwert dienten 200 µl Bradford-Reagenz mit 800 µl Wasser auf 1 ml Küvettenvolumen aufgefüllt. Eine Eichkurve wurde mit BSA erstellt.

2.14.2. **Luciferase-Assay**

Reporter-Gene werden zu Forschungszwecken benutzt, um bestimmte Qualitäten und Effekte anderer Gene zeigen zu können. Sie kommen unter anderem bei Studien über Rezeptoraktivität, intrazellulärem *messaging* und mRNA-Prozessierung zum Einsatz. Sie müssen möglichst einfach nachweisbare Produkte erzeugen, die für den Organismus oder die Zellen, in denen sie gebildet werden, nicht toxisch sind.

Material und Methoden

Die Produkte der Reporter Gene, Reporterproteine, geben ihre Aktivität meist durch Farbreaktionen (Galactosidase-Gen für Milchzucker-Abbau) oder über die Emission fluoreszierenden (Grün Fluoreszierendes Protein/GFP) oder lumineszierenden Lichts an. Biolumineszenz-Assays dominieren inzwischen die Quantifizierung von Promoteraktivitäten und haben Fluoreszenz-Assays fast vollständig verdrängt. Letztere sind aber nach wie vor sehr gefragt, wenn es darum geht Proteine in der Zelle zu lokalisieren. Der gängigste Biolumineszenz-Reporter, die *Firefly*-Luciferase aus dem amerikanischen Glühwürmchen *Photinus pyralis*, basiert auf der durch die Luciferase katalysierten Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin unter ATP-Verbrauch in deren Verlauf gelbes, lumineszierendes Licht entsteht (Abb. 7) [155].

Die von zahlreichen Firmen vertriebenen Luciferase-Plasmide, die neben dem für das Luciferase-Protein kodierende Gen meist noch ein β -Lactamase-Gen und eine *multiple cloning site*, in welche das gewünschte Insert kloniert wird, in ihrem Vektor-Grundgerüst enthalten, besitzen aber keinen eigenen Promoter, können also nicht eigenständig zur Expression des Proteins führen. Sie sind daher ideal dafür geeignet, um fremde Promotoren vor das Luciferase-Gen zu schalten, die dann die Transkription des Luciferase-Gens antreiben. In Zellen zur Expression gebracht und nachfolgend zum Leuchten angeregt, kann aus der Leuchtkraft auf die Aktivität des inserierten Promoters geschlossen werden.

Um bei Reporter Gen-Experimenten unspezifische Reaktionen oder schwankende Transfektionseffizienz auszugleichen, wird zusätzlich zum eigentlichen Reporter Gen-Vektor als interne Kontrolle ein Co-Reporter transfiziert, welcher aber einen eigenen stabil zur Transkription führenden Promoter enthält. Des Weiteren wird beim Aufbau solcher allein für diesen Zweck geschaffenen Co-Vektoren eine andere Form des Luciferase-Enzyms verwendet, so zum Beispiel die Luciferase der Weichkoralle (Seefeder) *Renilla reniformis*, welche Coelenterazin zu Coelenteramid verstoffwechselt und statt gelbem blaues Licht emittiert (Abb. 7).

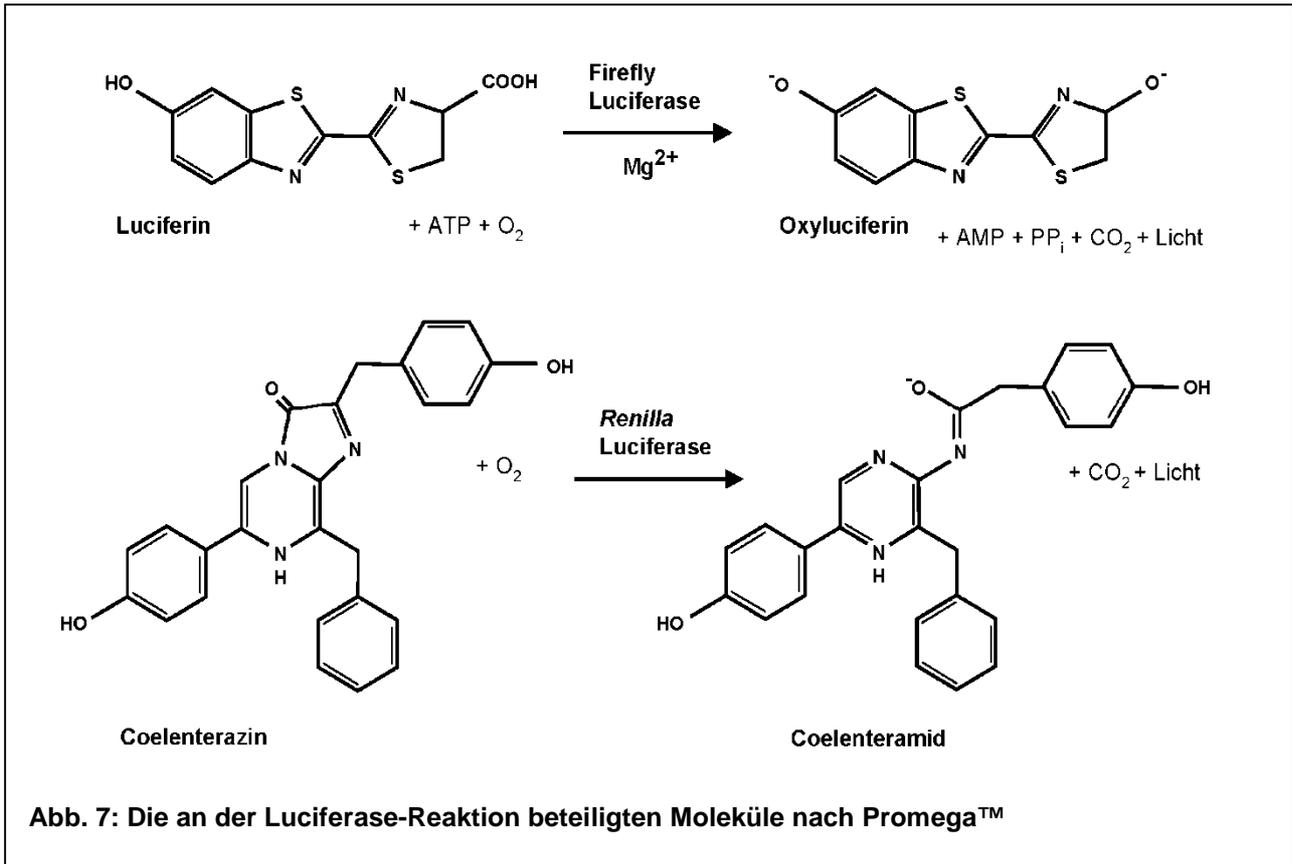


Abb. 7: Die an der Luciferase-Reaktion beteiligten Moleküle nach Promega™

Die quantitative Messung dieser beiden Leuchtquellen wird bewerkstelligt, indem einem Lysat von Zellen, in welchen zuvor die beiden Vektoren zur Expression gebracht wurden, nacheinander die Substrate der beiden Enzyme zugegeben werden. Zunächst wird die *Firefly*-Luciferase durch *Luciferase Assay Reagent II* (LAR II) angeregt und ihre Aktivität in relative light units (RLU) gemessen. Dann wird die Lichtemission, mittels Stop & Glo®, eines die Reaktion beendenden Reagenzes, „gequencht“, die *Renilla*-Luciferase auch durch selbiges zum Leuchten gebracht und ebenfalls gemessen.

2.14.3. Luciferase-Messung

Die auf einer 24-well Platte gezüchteten Zellen wurden nach Erreichen einer 80% Konfluenz transfiziert. Danach wurden die Zellen im Falle der Induktionsversuche mit 10 µM Forskolin oder 10 nM 17β-Östradiol behandelt und für weitere 12 h inkubiert. Danach wurden sowohl die behandelten als auch die unbehandelten Zellen, welche als Kontrolle mitgeführt wurden, dem Protokoll entsprechend mit 100 µl *Passive Lysis Buffer* (PLB) geerntet.

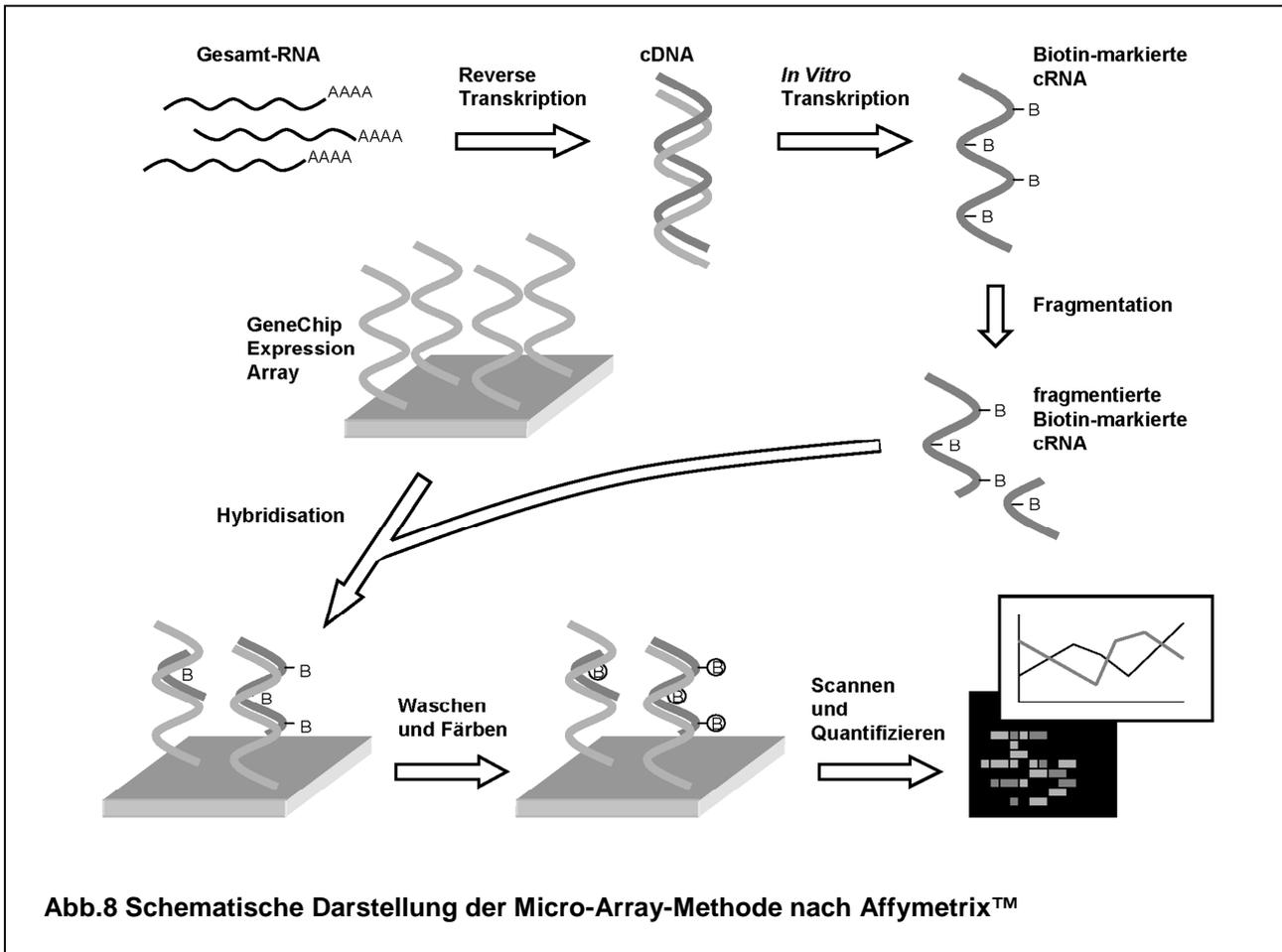
Jeweils 20 µl des Lysats wurde auf eine 96-well Platte pipettiert und sowohl *Firefly*- als auch *Renilla*-Luciferase-Messungen mit dem *Dual-Luciferase Assay-Kit* (Promega) auf einem Microlumat durchgeführt.

Hierbei wurde von einem automatischen Pipettier- und Messkopf die entsprechende Position über der 96-well Platte angefahren und 10 µl LAR II injiziert. Nach einem *delay* von 1,6 s wurde eine 10 s dauernde Messung der *Firefly*-Luciferase durchgeführt und die während dieses Zeitabschnitts registrierten *relative light units* (RLUs) vom Gerät integriert. Nach unmittelbar nachfolgender Zugabe von 10 µl Stop & Glo®, wurde eine zweite Messung mit denselben Zeiteinstellungen vorgenommen, welche die Aktivität der *Renilla*-Luciferase ermittelte.

2.14.4. DNA-Microarray

Da der DNA-Microarray nicht von unserer Arbeitsgruppe, sondern im Rahmen der Datenbankerstellung für die Stanley Foundation durchgeführt wurde [147], soll hier nur eine schematische Darstellung der Microarray-Methode erfolgen.

Die DNA-Microarray-Methode ist ein zu Forschungs- und Diagnostikzwecken entwickeltes Instrument, welches erlaubt, eine große Anzahl an Einzeluntersuchungen zur Genomanalyse oder differentiellen Genexpression vorzunehmen. Im Falle der hier verwendeten Microarrays der Firma Affymetrix™ handelt es sich um sogenannte Genchips, an deren oberflächlicher Mikrostruktur in mehreren Hunderttausend Quadranten verschiedenste Oligonukleotide von bis zu 25 Nukleotiden Länge fixiert wurden, die auf dem Chip in millionenfacher Kopie vorliegen. Der Untersuchung wird die RNA des zu untersuchenden Organismus oder Individuums zu Grunde gelegt, deren Vorhandensein oder Menge bestimmt werden soll. Die aus dem Organismus extrahierte und isolierte RNA wird zunächst mittels reverser Transkription in cDNA oder cRNA umgeschrieben, diese wiederum mit Biotin markiert und schließlich zu Oligonukleotiden fragmentiert. Der Genchip wird mit diesen fragmentierten Oligonukleotiden hybridisiert, worauf sie an die fixierten komplementären Oligonukleotide auf der Oberfläche des Chips binden. Nach Wasch- und Färbeschritten, welche die nicht-hybridisierten Fragmente entfernen und die gebundenen Oligonukleotide „sichtbar“ machen, kann der Microarray-Chip in entsprechenden Analysegeräten ausgelesen und die Daten ausgewertet werden (Abb. 8) [156].



2.15. Zellkultur-Methoden

2.15.1. Kultivierung und Bebrütung von Zellen/ Zelllinien

HeLa-Zellen benötigten DMEM- Medium, welches vor Gebrauch mit 10% FCS (50 ml auf 450 ml Medium) und 100 IU/ ml Penicillin und 100 mg/ ml Streptomycin (1% PEST) versehen wurde.

Die kultivierten Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einem 5% CO₂-Anteil in leicht verschlossenen Kulturgefäßen aufbewahrt.

Gewöhnlich wurde der Medienwechsel alle 2 bis 3 Tage durchgeführt. Hierzu wurde das Kulturmedium bei 37°C erwärmt und das verbrauchte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette aus dem Kulturgefäß abgesogen und durch eine entsprechende Menge des frischen Mediums, je nach Größe des Kulturgefäßes, ersetzt worden ist.

2.15.1.1. **Passagieren von Zelllinien**

Das Subkultivieren, das sog. Splitten der Zellen erfolgte erst, wenn diese ein konfluentes Monolayer gebildet hatten. (2-3x wöchentlich, nach Erreichen der Konfluenz) Dafür wurde das Medium abgesogen, die Kultur einmalig mit PBS gewaschen und als nächsten durch Einwirkung von Trypsin-EDTA abgelöst. Für ein 1: 3-Splitten verwendete man immer je 3 ml Trypsin auf eine T₇₅- Kulturflasche. Endothelzellen wurden zusätzlich nach der PBS-Spülung mit einer kleinen Menge Trypsin gewaschen. Nach Ablösung der Zellen wurde die Enzymwirkung durch Zugabe vom 6 ml Kulturmedium gestoppt, die Zellsuspension mit einer Pipette aufgenommen und auf 3 neue Kulturschalen aufgeteilt. Um eine möglichst gleichmäßige Zahl an Zellen zu erreichen, wurde die Zellsuspension tropfenweise nacheinander in die Vertiefungen verteilt und die Kulturschalen mit frischem Medium auf den entsprechenden Stand aufgefüllt.

2.15.1.2. **Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren von Zellproben wurden die Zellen, wie in der Beschreibung des Passagierens geschrieben, vom Boden der Zellkulturgefäßes abgelöst, mit reichlich Medium in ein 15 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min lang bei 900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesogen und das verbliebene Sediment mit dem Einfriermedium aufgenommen. Hierzu wurden die Zellen aus einer T₇₅-Kulturflasche in 2 ml Einfriermedium aufgenommen und als nächstes je 1 ml auf ein zuvor auf Eis gekühltes Kryoröhrchen (Nunc) portioniert. Für das Einfrieren wurde das bisher verwendete Kulturmedium mit 2% FCS-Anteil und mit 10% DMSO versetzt. Die Zellen wurden erst bei -80°C eingefroren und als nächstes für die Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die eingefrorenen Kryoröhrchen wiederholt mit einer geringen Menge an erwärmtem Medium gefüllt und das aufgetaute Einfriermedium mit den kryokonservierten Zellen in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt. Die auf diese Art und Weise aufgetaute Zellsuspension wurde als nächstes 5 min lang bei 900 rpm zentrifugiert, der Überstand abgesogen, das Zellpellet in frischem Kulturmedium gelöst und in eine T₂₅ Kulturflasche überführt.

2.15.2. **Transfektion von Zellen**

Als Transfektion bezeichnet man das Einführen eines Fremd-DNA-Moleküls in eine Eukaryoten-Zelle. Bei der transienten Transfektion ist die Lebensdauer der aufgenommenen DNA auf einige Tage beschränkt. Danach wird die Fremd-DNA in der Zelle vollständig abgebaut.

Für die Transfektionen der HeLa-Zellen wurden verschiedene Reagenzien getestet und etabliert, da die Transfektionsrate zur Durchführung des Luciferase-Assay möglichst hoch und stabil sein musste. Um die Transfektionsmethoden zu optimieren wurden verschiedene Ansätze angewandt. Die Transfektionseffizienz wurde durch Transfektionen des Co-Vektors phRG-TK überprüft, welcher statt *Firefly*-Luciferase in seinem Plasmid *Renilla*-Luciferase besitzt. Als Kontrolle verwendete man untransfizierte Zellen.

2.15.2.1. **Transfektion mit Lipofectamine® 2000**

Lipofectamine® 2000 ist ein Lipidreagenz, das durch eine Komplexbildung mit der Nukleinsäure diese durch die Zellmembran in die Zelle überführt. Für die Transfektion einer Kulturplatte mit 6 Vertiefungen wurden ca. 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt und zwei Reaktionslösungen angesetzt. Die eine enthielt das Reagenz Lipofectamine® 2000 in 240 µl serumfreiem Medium und wurde 5 min bei RT inkubiert. Für die andere Lösung wurden 10 µl der Plasmid-DNA in 240 µl serumfreiem Medium zugegeben und durch vorsichtiges Auf- und Ab-Pipettieren vermischt. Schließlich wurde die Lösung tröpfchenweise mit dem Transfektionsreagenz in das Reaktionsgefäß mit der DNA-Lösung überführt und 30 min lang bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit der die Zellen mit 1 ml serumfreiem Medium, wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert. Das Medium wurde nach 4-6 Stunden durch frisches serumhaltiges Medium ersetzt.

2.15.2.2. **Transfektion mit Effectene® Transfection Reagent**

Das Effectene®-Transfektionsreagenz wurde in Verbindung mit einem Enhancer und einem DNA-Kondensierungspuffer (EC-Puffer) verwendet. Im ersten Schritt der Bildung des Effectene®-DNA-Komplexes ist die DNA durch die Interaktion mit dem Enhancer in einem definierten Puffersystem kondensiert. Das Effectene®-Reagenz wird der kondensierten DNA zugegeben. In Konsequenz dazu wird der Effectene-

DNA-Komplex gebildet, wonach dieser als nächstes mit Medium gemischt und direkt auf die Zellkultur gegeben wird.

Eingesetzt wurde ca. 2 µg Plasmid-DNA in 10 µl Volumen, die in 140 µl EC-Puffer gelöst worden sind. Das Gemisch wurde als nächstes mit 16 µl Enhancer versehen, gut gemischt und 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden der Lösung 20 µl des Effectene®-Reagenzes beigefügt, erneut gut gemischt, zentrifugiert und 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit 1,6 ml frischem Medium versehen. Nach der Inkubationszeit wurde dem Transfektionsansatz 0,6 ml Medium beigemischt und auf die Zellen gegeben.

2.15.3. Stimulation von Zellkulturen

Die Stimulation der auf 24-well Kulturplatten ausgesäten Zellen mit Substanzen erfolgte 24 h nach der Transfektion. Hierzu wurde das Transfektionsmedium durch frisches Kulturmedium ersetzt und jeweils 1 µl der zuvor angesetzten Stammlösung auf 1 ml Zellkulturmedium verwendet. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen entsprechend für Luciferase-Assays geerntet.

2.15.3.1. Stimulation mit Östrogen

Zur Stimulation der Zellen wurde eine 10 µM β-Östradiol/Ethanol-Stammlösung verwendet. Die lichtempfindliche β-Östradiol-Lösung wurde bei -20°C in einem schwarzen Reaktionsgefäß aufbewahrt. Die Endkonzentration, mit der transfizierte Zellen behandelt wurden, betrug 10 nM. Die Stimulationsdauer wurde auf 12 h festgelegt.

2.15.3.2. Stimulation mit Forskolin

Es wurde eine 10 mM Forskolin/Ethanol-Stammlösung angesetzt und bei -20°C aufbewahrt. Die Zellen wurden mit einer Endkonzentration von 10 µM Forskolin für 12 h behandelt.

2.16. Berechnung der Promoteraktivität

Die Rohdaten der gemessenen *Relative Light Units* sind alleine noch wenig aussagekräftig, da sie von einigen Faktoren wie der Transfektionseffizienz, der Anzahl und dem Wachstum der zu transfizierenden Zellen abhängig sind. Deshalb

Material und Methoden

wurden bei der Evaluierung der Promoteraktivität verschiedene Berechnungsschritte durchgeführt, die eine Normalisierung der Ergebnisse im Bezug auf die mittels Bradford-Assay gemessene Proteinmenge des Transfektionsansatzes und auf die Transfektionseffizienz beinhalten.

Die Transfektionseffizienz ($T_{\text{Eff_Konstrukt}}$) der jeweiligen Proben wurde aus dem Verhältnis der RLU des mit den Konstrukten cotransfizierten Kontrollvektors phRG-TK ($RLU_{\text{Ren_Konstrukt}}$) zu $RLU_{\text{Ren_pGL3}}$ gebildet. Ebenso wurde das Proteinverhältnis der jeweiligen Proben ($C_{\text{Konstrukt}} / C_{\text{pGL3}}$) aus dem Verhältnis der Proteinkonzentration des Transfektionsansatzes des betreffenden Konstruktes ($C_{\text{Konstrukt}}$) zur Proteinkonzentration des Transfektionsansatzes des Leervektors (C_{pGL3}) berechnet. Weiterhin wurden jeweils die RLU der Konstrukte ($RLU_{\text{Luc_Konstrukt}}$) auf die Transfektionseffizienz ($T_{\text{Eff_Konstrukt}}$) normalisiert. Im nächsten Schritt wurde der dadurch erhaltene Wert wiederum auf das zuvor errechnete Proteinverhältnis ($C_{\text{Konstrukt}} / C_{\text{pGL3}}$) normalisiert.

Die Transaktivierung erhielt man indem der normalisierte RLU-Wert des jeweiligen Konstruktes durch den gleichermaßen normalisierten RLU-Wert des Leervektors geteilt wurde.

$$\text{Transaktivierung} = \frac{RLU_{\text{Luc_Konstrukt}}}{(RLU_{\text{Ren_Konstrukt}} / RLU_{\text{Ren_pGL3}})} \bigg/ \frac{C_{\text{Konstrukt}}}{C_{\text{pGL3}}} \bigg/ RLU_{\text{Luc_pGL3}}$$

Im Falle der Stimulationsversuche wurde im Prinzip gleich verfahren, nur wurden hierbei die Transfektionseffizienz und das Proteinverhältnis der behandelten Konstrukte im Vergleich zu den unbehandelten Konstrukten gleicher *NOS1* Ex1f-VNTR-Inserts berechnet.

$$\text{Transaktivierung} = \frac{RLU_{\text{Luc_Konstrukt_beh}}}{(RLU_{\text{Ren_Konstrukt_beh}} / RLU_{\text{Ren_Konstrukt_unbeh}})} \bigg/ \frac{C_{\text{Konstrukt_beh}}}{C_{\text{Konstrukt_unbeh}}} \bigg/ RLU_{\text{Luc_Konstrukt_unbeh}}$$

Die Transfektionen wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt, die Transaktivierungen der einzelnen Transfektionsansätze/Konstrukte errechnet und aus den Transaktivierungen Mittelwerte gebildet. Die Versuche wurden zwei Mal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

2.17. Statistische Analyse

Statistische Unterschiede der verschiedenen Versuchsansätze im Luciferase-assay wurden mittels des zweiseitigen „Student’s T-Tests“ (Microsoft Excel™) berechnet. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Mittelwertabweichung angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,01$ * angenommen, $p < 0,001$ ** wurde als hochsignifikant gewertet. Bei der Microarray-Auswertungen wurde die Genexpression der jeweiligen Gene entsprechend der Delta-Delta- C_t -Methode (C_t = Cycle of threshold) relativ quantifiziert. Dabei entspricht der C_t -Wert dem Zeitpunkt bzw. dem Zyklus der Reaktion, in dem sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich von der Hintergrundstrahlung abhebt und ist abhängig von der Ausgangsmenge der Matrizen-DNA. Je niedriger der C_t -Wert ist, desto mehr Kopien des Zielgens sind in der Probe enthalten. Die Expression eines Zielgens wurde auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Referenzgens (housekeeping gene; Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)) bezogen. Dies wurde für Individuen mit homozygot kurzen oder langen sowie heterozygoten Allelen des *NOS1* Ex1f-VNTR durchgeführt und diese Genotypen durch die Werte 0/1/2 (lang-lang/kurz-lang/kurz-kurz) klassifiziert. Aus den Delta- C_t -Werten dieser Gruppen wurde anschließend ein jeweiliger Delta-Delta- C_t -Wert gebildet. Um den Expressionsunterschied zwischen den Gruppen zu ermitteln, wurde dieser Wert anschließend in die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$, wie folgt, eingesetzt:

$$\begin{aligned}\Delta C_t &= C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ Referenzgen} \\ \Delta\Delta C_t &= \Delta C_t x - \Delta C_t y \\ \text{Ratio (Expression x relativ zu y)} &= 2^{-\Delta\Delta C_t}\end{aligned}$$

Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (standard deviation = SD) angegeben. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden hinsichtlich ihrer Signifikanz mit dem „One-way Analysis of Variance“ (ANOVA)- und einem nachfolgenden Bonferroni-Test korrigiert. Änderungen der Genexpression um 10% wurden als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Erstellung der DNA-Konstrukte

Um die Auswirkung des *NOS1* Ex1f-VNTR auf die Expression zu ermitteln, wurden im Sinne einer Extremgruppenanalyse Promotoren mit kurzen (20 bp = Ex1f_20), intermediären (25 bp = Ex1f_25) und langen (31 bp; Ex1f_31) Repeats ausgewählt und in den Luciferase-Vektor pGL3 kloniert. Benannt wurden die Plasmidkonstrukte nach der Anzahl der beinhalteten Dinukleotid-Repeats. Diesen Plasmiden wurden drei analoge Konstrukte (Ex1f_20mod, Ex1f_25mod, Ex1f_31mod) zur Seite gestellt, die sich lediglich in ihren modifizierten 5'-Enden unterschieden, wo sie um 38 bp kürzer sind als die Konstrukte (Ex1f_20, Ex1f_25, Ex1f_31), welche innerhalb dieses 38 bp langen zusätzlichen Genabschnittes die eingangs genannten östrogenresponsiven Bindungsstellen enthalten. Diese Plasmide mit den kürzeren Inserts wurden ebenfalls den Repeat-Längen entsprechend benannt und mit dem Namenszusatz „mod“ versehen, welcher auf das modifizierte 5'-Ende hinweist (schematische Darstellung der Inserts siehe Abb. 9 und elektrophoretische Auftrennung siehe Abb. 10). Durch den Vergleich der korrespondierenden Konstruktpaare, die jeweils in der Repeat-Länge übereinstimmen und sich nur im Vorhandensein von Östrogenrezeptorbindestellen unterscheiden, sollte es möglich gemacht werden, den Einfluss dieser Bindestellen auf die Transkription zu ermitteln. Alle Konstrukte enthielten darüber hinaus CRE im Promoterbereich.

Zusätzlich wurde noch ein siebtes Konstrukt erstellt, welches eines der Inserts (Ex1f_20mod_INV) in gegenläufiger Orientierung enthält, um etwaige auftretende unspezifische Effekte zu detektieren. Dieses ergänzende Plasmid erhielt den Namenszusatz „INV“, welcher das invertierte Insert kennzeichnet.

Ergebnisse

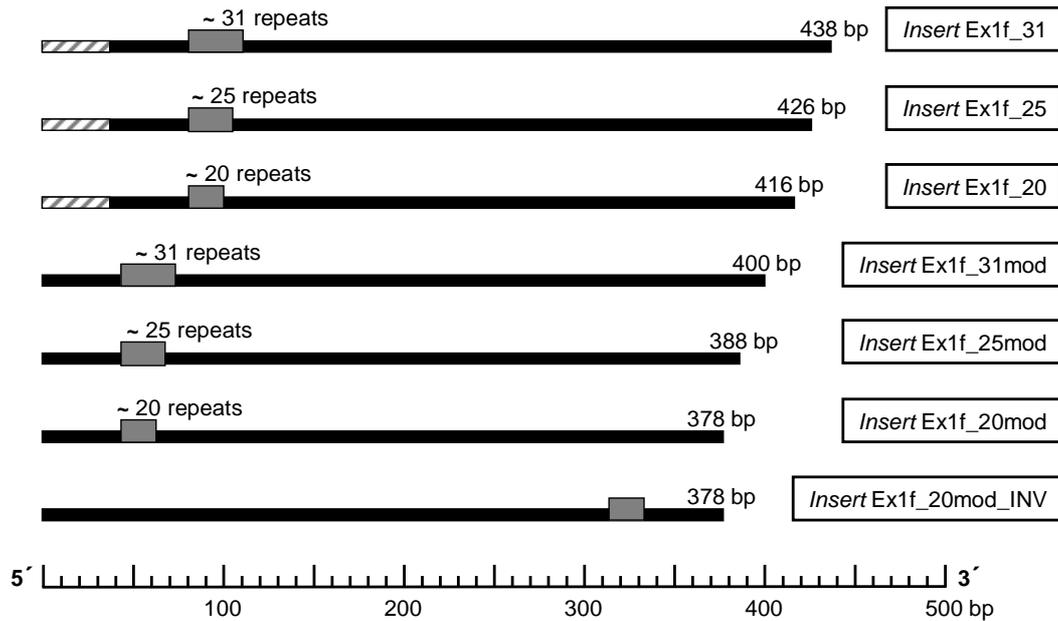


Abb. 9: Schematische Darstellung der *NOS1_Ex1f* Inserts. Die jeweiligen Inserts wurden nacheinander in den Vektor pGL3-Basic kloniert, um mittels Luciferase-Assay den Einfluss der unterschiedlichen Repeat-Längen auf die Expression zu untersuchen.

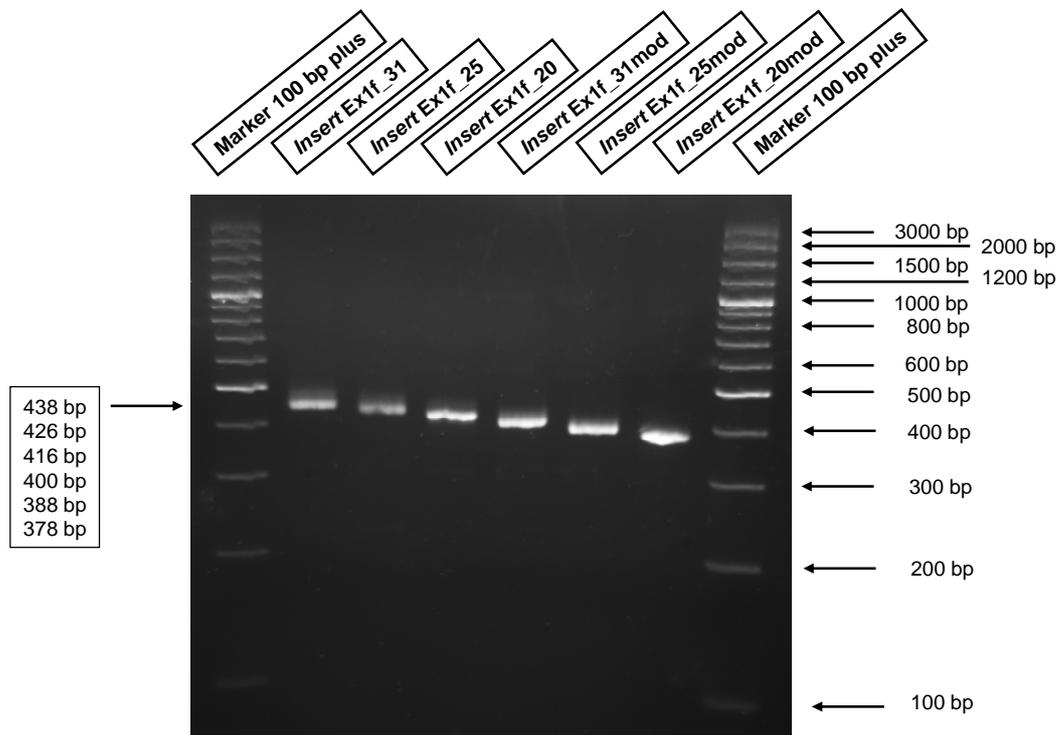


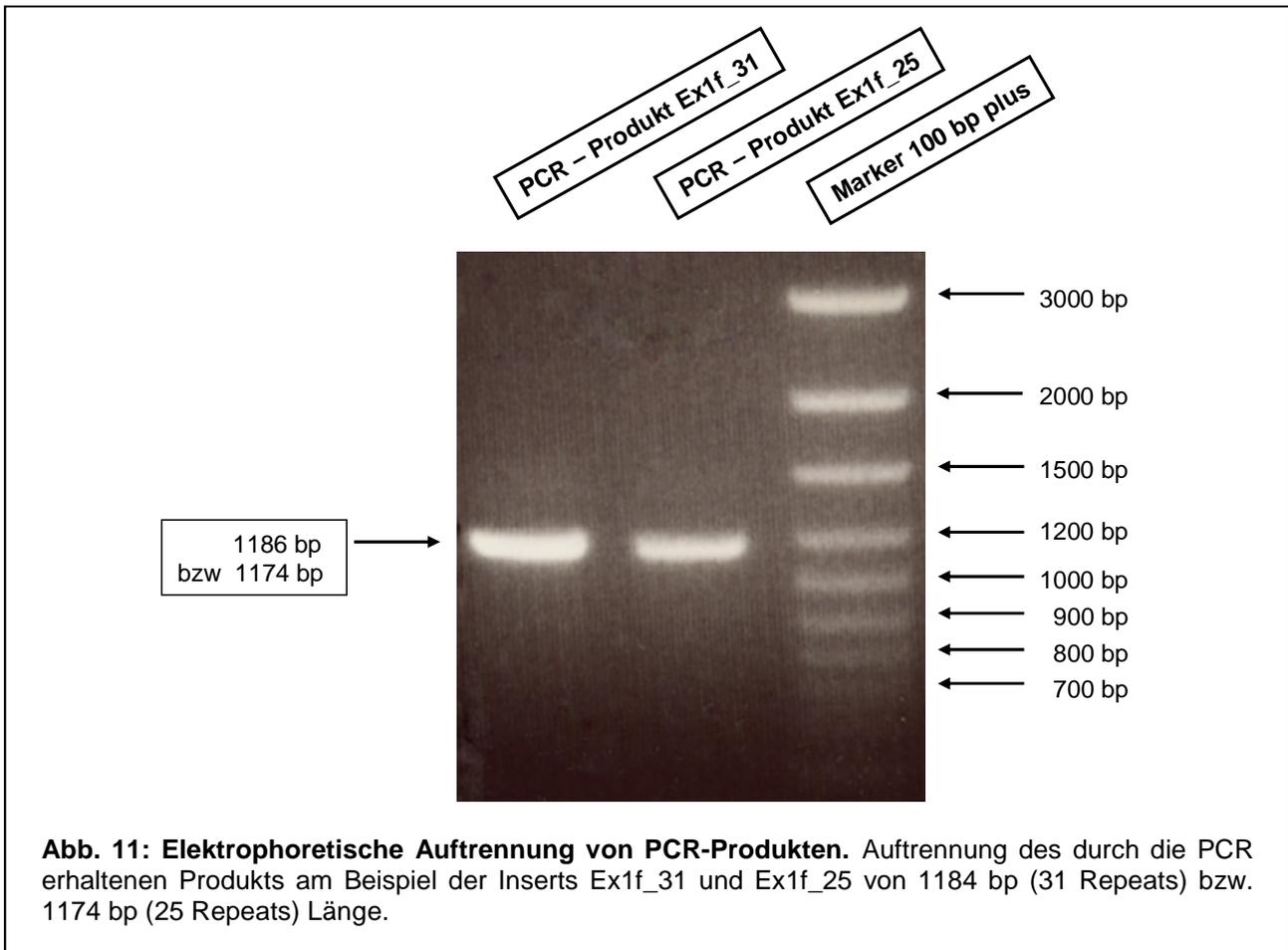
Abb. 10: Gelelektrophoretische Auftrennung der untersuchten *NOS1_Ex1f* Inserts. Die Inserts Ex1f_31, Ex1f_25, Ex1f_20 unterscheiden sich untereinander nur durch die Längenunterschiede des enthaltenen VNTRs. Die Konstrukte F unterscheiden sich von den Konstrukten Fmod durch eine am 5'-Ende enthaltene Sequenz, innerhalb derer ein die Transkription beeinflussendes Element vermutet wird.

Ergebnisse

3.1.1. Ergebnisse der Amplifikations-PCR

Zunächst wurde mit dem Programm *GeneTools* eine Übersicht über den bereits sequenzierten Abschnitt des Genoms erstellt, um mögliche PCR-Primer und Restriktionsenzym-Schnittstellen zu planen.

Bei der Amplifikation des den 31 Repeat-langen VNTR tragenden Genabschnitts mittels des „Vorwärts“-Primers „hnNOSpromEx1f-F“ wurde ein DNA-Fragment mit einer Länge von 1186 bp erhalten (Abb. 11); bei gleichartiger PCR mit dem „Vorwärts“-Primer „Fmod“ ein 969 bp langes Produkt. Dieser alternative „Vorwärts“-Primer „hnNOSpromEx1f-Fmod“ war notwendig, um eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *MscI* zu schaffen, welche benötigt wurde, um das im Endeffekt um 38 bp kürzere 5'-Ende der „Fmod“-Konstrukte zu erzeugen. Der „Rückwärts“-Primer „hnNOSpromEx1f-R“ war in beiden Fällen derselbe. Etwaige „parasitäre“ Banden durch unvermeidliche geringfügige Unspezifität der PCR-Primer wurden durch vorrangende Optimierung des PCR-Ansatzes sowie der Annealing-Temperatur weitestgehend eliminiert.

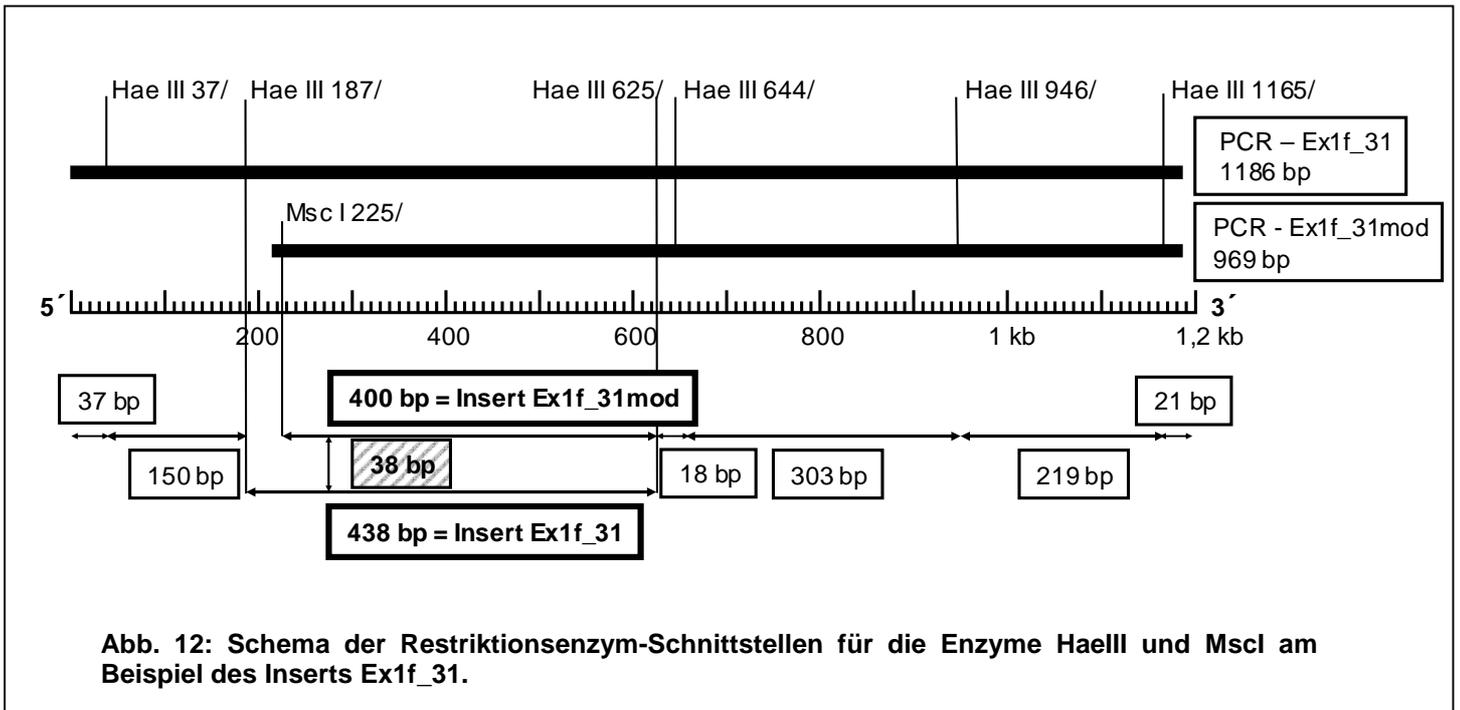


Ergebnisse

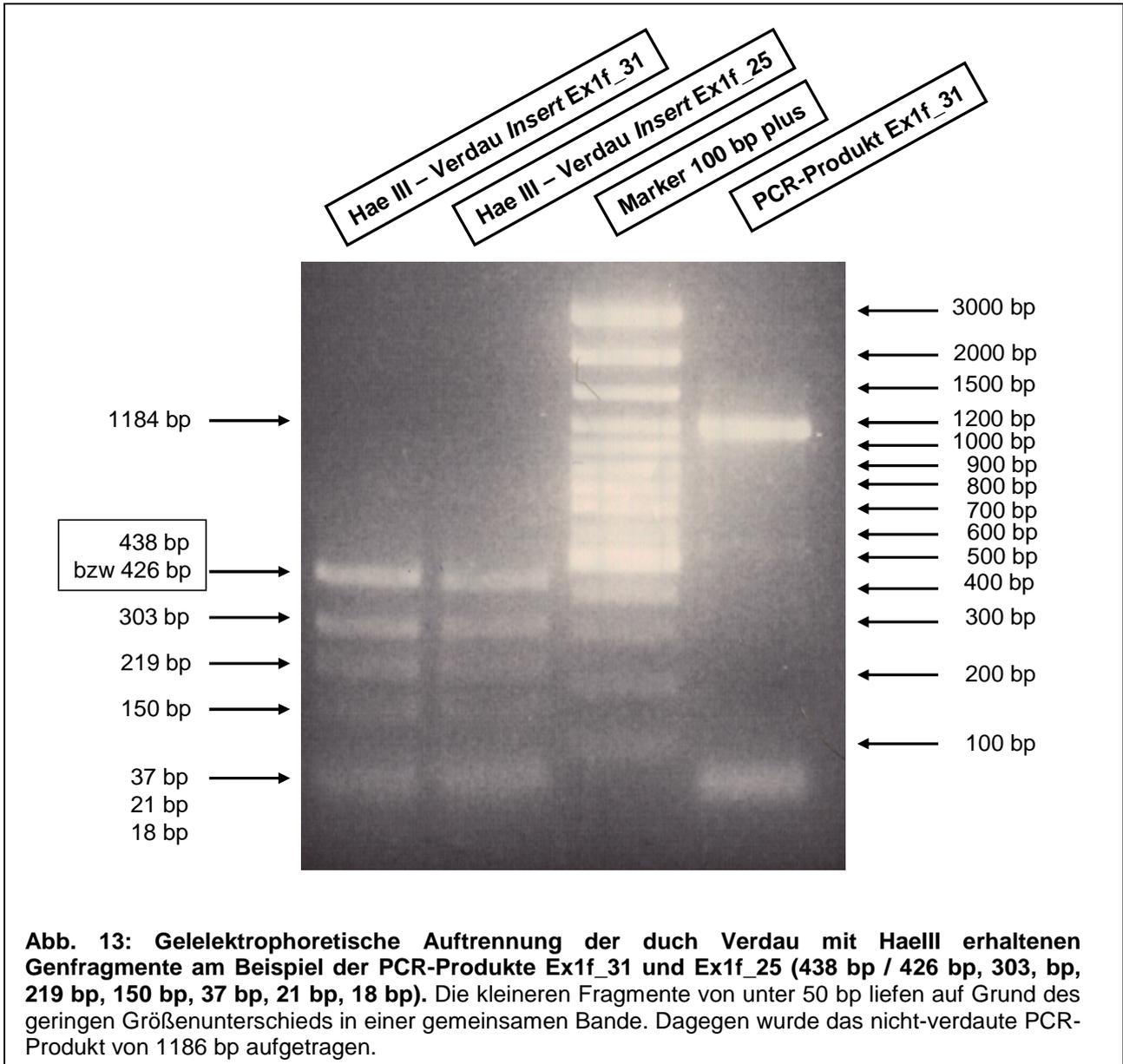
3.1.2. Restriktionsenzym-Verdau

Durch Verdau des PCR-Produkts (am Beispiel des zukünftigen Inserts Ex1f_31) mittels des Restriktionsenzym *Hae*III erhielt man 7 Genfragmente unterschiedlicher Größe (436 bp, 303 bp, 219 bp, 150 bp, 37 bp, 21 bp, 18 bp), da das PCR-Produkt 6 Schnittstellen für dieses Enzym aufweist (schematische Darstellung siehe Abb. 12 und elektrophoretische Auftrennung siehe Abb. 13).

Um das dazu korrespondierende Insert Ex1f_31mod zu erzeugen, wurde ein Doppel-Verdau mit den Enzymen *Hae*III und *Msc*I durchgeführt. Der Unterschied in der Anzahl und Größenverteilung der Genfragmente bei Doppel-Verdau (400 bp, 303 bp, 219 bp, 21 bp, 18 bp) fiel erwartungsgemäß aus. Die Fragmente mit den gewünschten Größen von 436 bp bzw. 400 bp wurden nachfolgend aus dem Gel extrahiert.



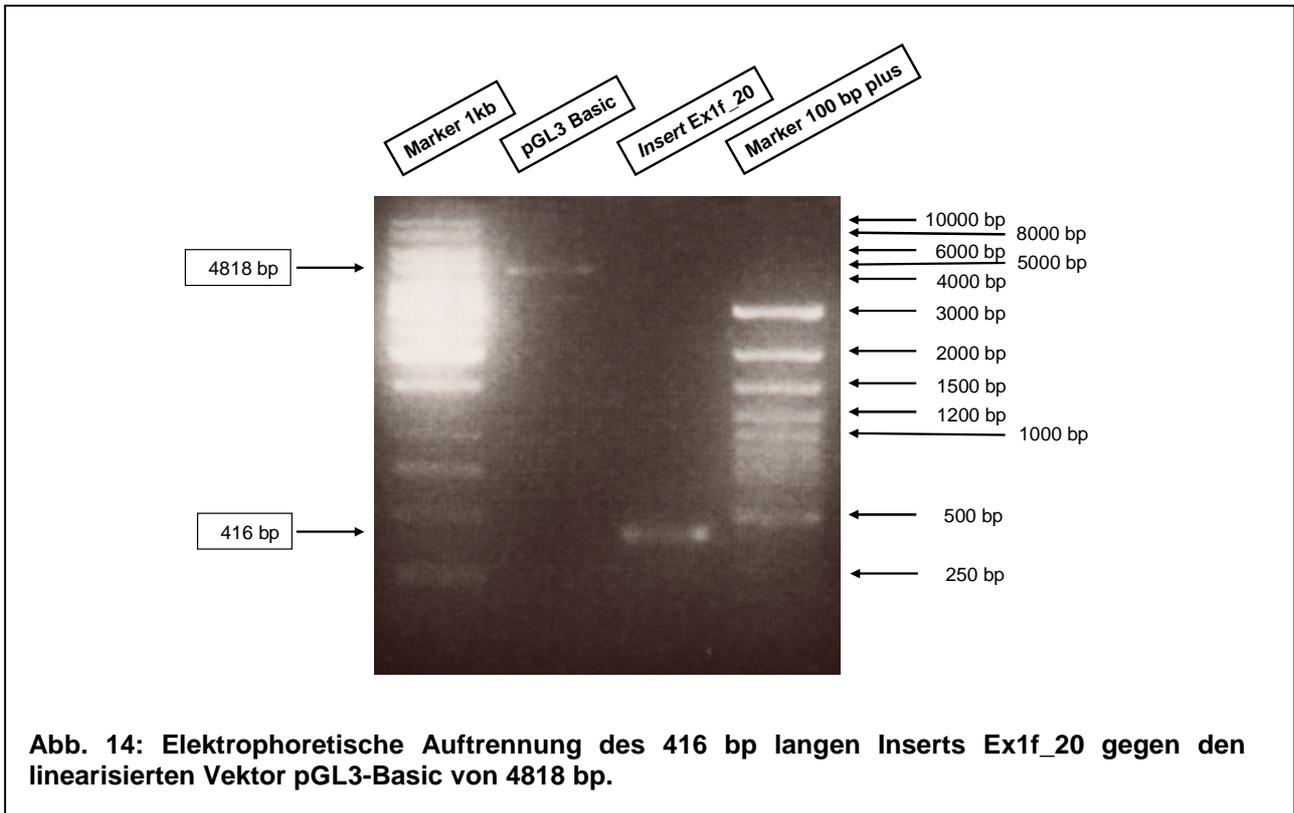
Ergebnisse



3.1.3. Gelextraktion

Nach Gelextraktion wurde sowohl das dadurch erhaltene Insert (Abb. 10), als auch der durch Verdau mittels SmaI linearisierte Vektor pGL3-Basic von 4818 bp Länge aufgetragen (Abb. 14). Nachfolgend wurden diese beiden Genabschnitte der Ligation zugeführt.

Ergebnisse



3.1.4. Kolonie-Screening

Das durch Ligation erhaltene DNA-Konstrukt pGL3-NOS1_Ex1f^{xx} wurde in Bakterien transformiert und diese auf LB-Agarplatten angezüchtet. Das Überleben auf den Ampicillin-haltigen Agarplatten war nur den Bakterien möglich, die zuvor das transformierte Plasmid aufgenommen hatten, welches zusätzlich zum Luciferase-Gen einen für β -Lactamase kodierenden Bereich enthielt. Jedoch musste das Plasmid nicht notwendigerweise auch das gewünschte Insert NOS1_Ex1f enthalten, wahrscheinlicher war sogar der Wiederverschluss des nativen pGL3-Vektors durch die Ligation. Es war somit unmöglich bzw. relativ unwahrscheinlich, durch „blindes“ Picken einer Bakterienkolonie von den reichlich bewachsenen LB-Agarplatten, den gewünschten Bakterienklon zu erhalten. Deshalb wurde ein Kolonie-Screening durchgeführt, bei welchem die Kolonien per Abklatsch-Verfahren auf eine Membran übertragen, die in den Bakterien enthaltene DNA auf der Membran fixiert und mit einer radioaktiven Sonde beimpft wurden, um die das Insert tragenden Bakterien zu identifizieren. Diese Sonde bestand aus einem zum Insert NOS1_Ex1f komplementären Genfragment, welches zuvor mit radioaktivem Phosphor gelabelt wurde. Diese Gen-Sonde kann in die Bakterien eindringen und sich an die Inserts in den transformierten Plasmiden legen. Diese radioaktiven Membranen wurden auf

Ergebnisse

Film inkubiert und die geschwärzten Stellen den entsprechenden Kolonien zugeordnet (Abb. 15).

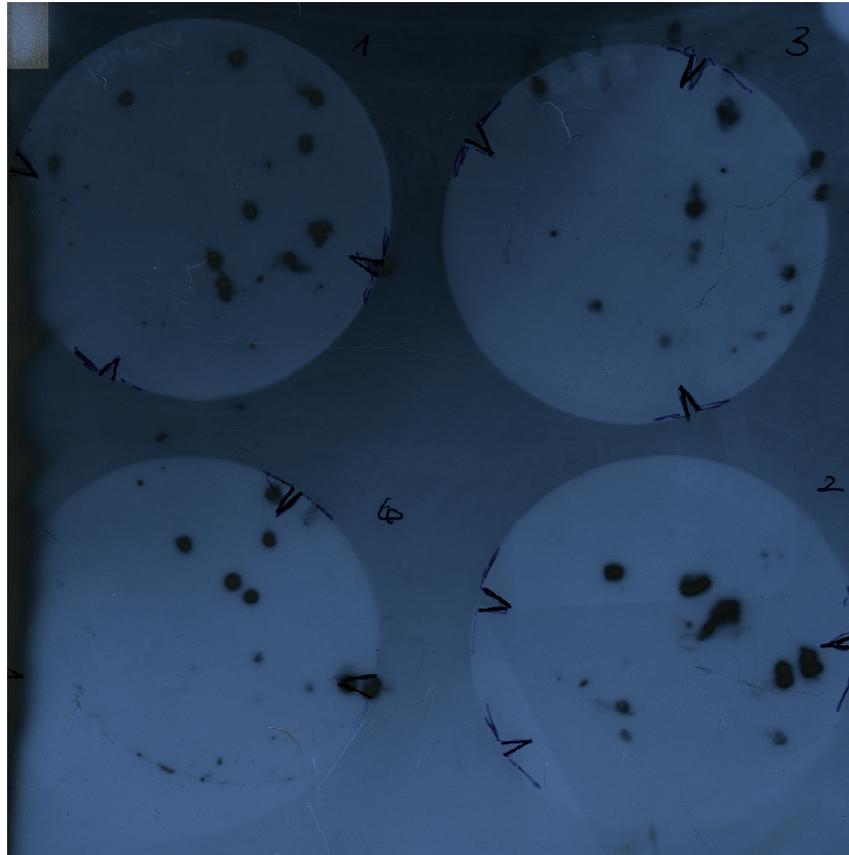


Abb. 15: Kolonie-Screening der mit pGL3-NOS1_Ex1f_20 transformierten Bakterienkolonien. Die geschwärzten Filmstellen entsprechen den Kolonien, die das gewünschte Plasmid aufgenommen hatten, innerhalb welcher die radioaktive Sonde an das Insert NOS1_Ex1f binden konnte.

3.1.5. Orientationsverdau

Durch die Anwendung der *Blunt-end*-Klonierung war es ebenso wahrscheinlich, dass das Insert NOS1_Ex1f in gegenläufiger Richtung in das Plasmid eingebaut wurde (Abb. 16). Um die Orientierung des Inserts zu überprüfen, wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym SacI durchgeführt. Dieses Enzym eignet sich für diesen Zweck besonders, da es sowohl auf dem ursprünglichen Plasmid, sowie auf dem DNA-Insert jeweils nur eine Schnittstelle angreift. Dadurch erhält man zwei Fragmente, die je nach Orientierung des Inserts unterschiedlich lang sind (Abb. 17). Theoretisch wäre es sogar denkbar, dass mehrere Inserts seriell ins Plasmid eingebaut wurden, welche man in diesem Verdau durch den Erhalt mehrerer Fragmente hätte identifizieren können.

Ergebnisse

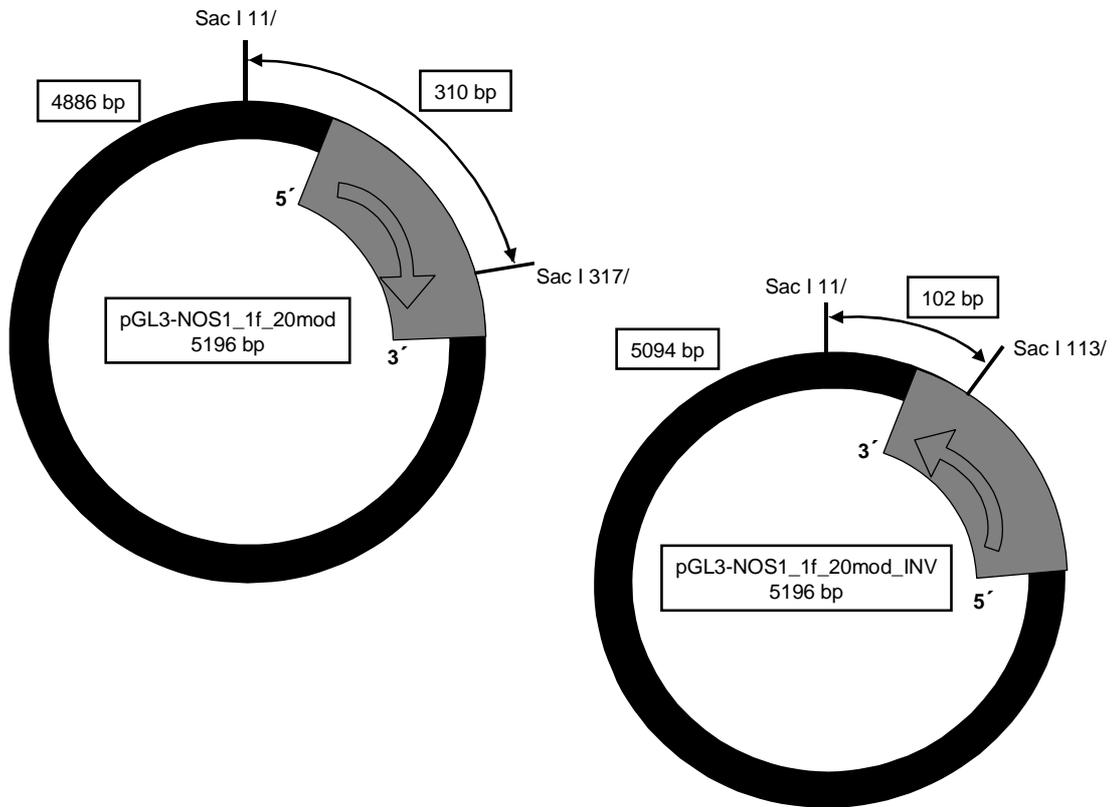
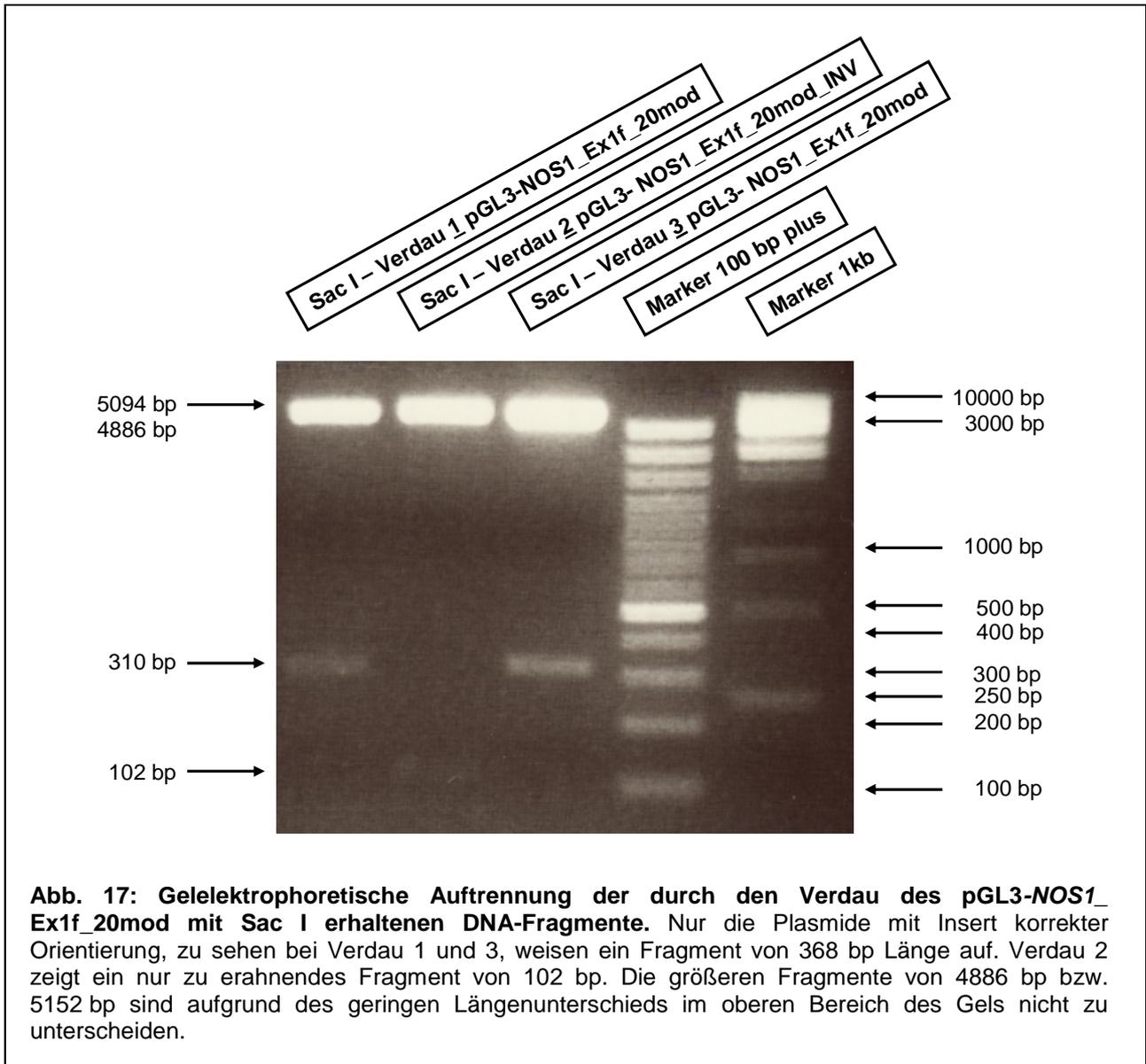


Abb. 16: Schema der verschiedenen möglichen Orientierungen des Inserts. Bei Verdau des Insert-tragenden Vektors pGL3-NOS1_Ex1f_20mod durch das Enzym SacI sind zwei Ergebnisse denkbar: bei korrekter Orientierung des Inserts erhält man zwei Fragmente von 4886 bp und 310 bp, bei Antisense-Orientierung (pGL3-NOS1_Ex1f_20mod_INV) weisen diese Fragmente eine Länge von 5094 bp und 102 bp auf.

Ergebnisse



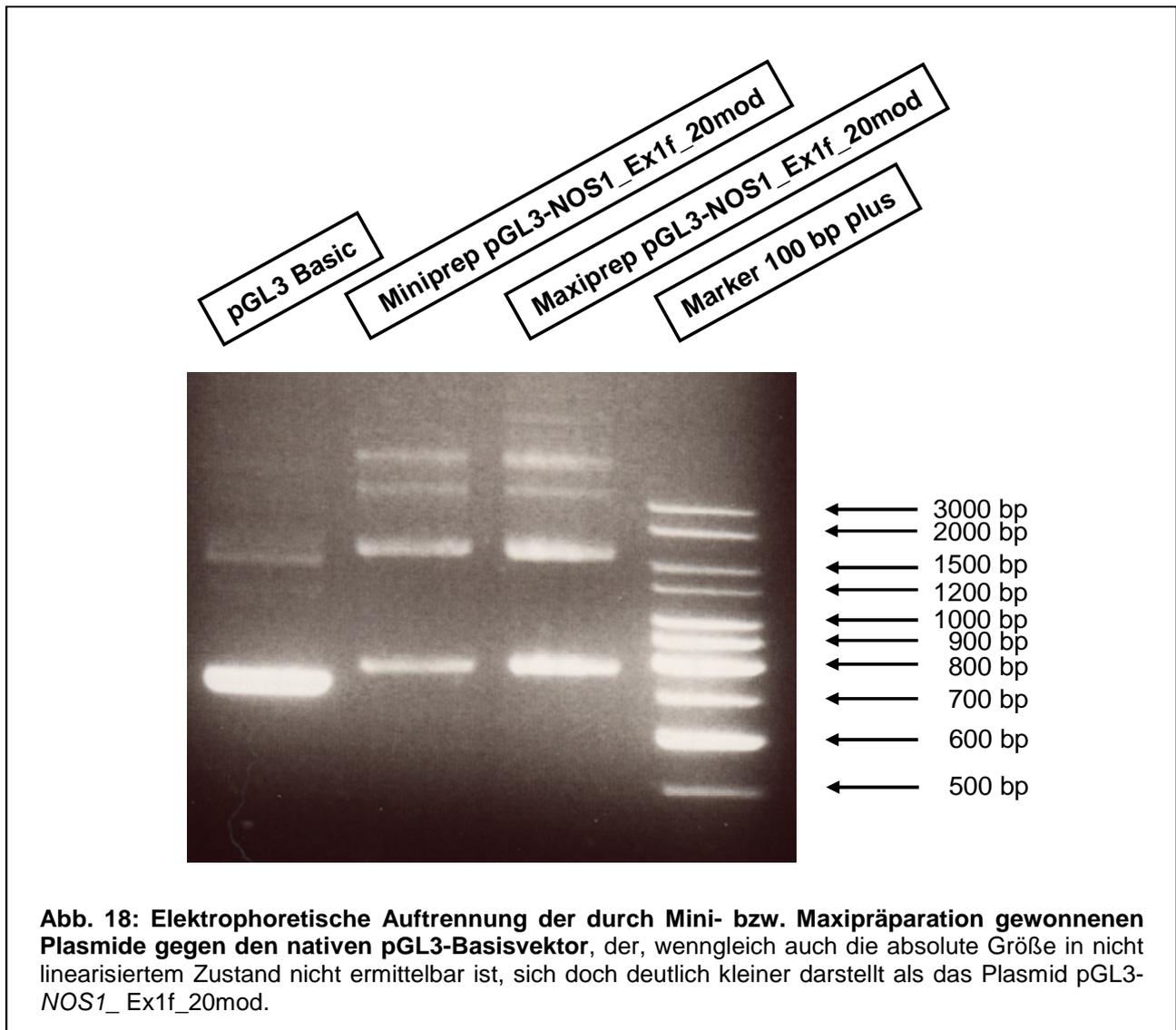
3.1.6. Mini- und Maxipräparationen von Plasmid-DNA

Nach Identifikation der gewünschten Klone wurden diese zur Vermehrung in Kultur gebracht. Zunächst wurden Mini-Präparationen von Plasmid-DNA durchgeführt, und danach Großkulturen angesetzt, um Maxi-Präparationen durchzuführen. Die daraus erhaltenen Plasmide pGL3-NOS1_Ex1f wurden vergleichend auf Agarose-Gelen aufgetragen (Abb. 18).

Da die Plasmide nicht linearisiert vorlagen, ist die vom Marker angegebene Größe wenig aussagekräftig. Vielmehr liegen die ringförmigen Plasmide in mehreren „Verdrillungsstufen“ vor (z.B. *coiled*, *hyper-coiled* etc.), die in ihrem Masse/Größe-Verhältnis nicht den linearisierten Genfragmenten entsprechen und sich somit im Gel

Ergebnisse

mit höher Geschwindigkeit fortbewegen. Im Vergleich zum Insert tragenden Plasmid sieht man dennoch die geringere Größe des nativen Vektors pGL3-Basic.



3.1.7. Sequenzierung der DNA-Konstrukte

Um die erstellten Konstrukte auf ihre Sequenz zu überprüfen, wurden DNA-Sequenzierungen durchgeführt. Zunächst wurde eine PCR durchgeführt, um einen das Insert beinhaltenden Genabschnitt zu erzeugen und nachfolgend unter Verwendung eines Kapillar-Sequenzierers die Basenabfolge des amplifizierten Abschnitts zu ermitteln. Allerdings beinhaltet der Vorgang Sequenzierung eine geringe Fehlerquote der zu sequenzierenden Basenabfolge gegenüber, so dass auch nach mehrmaligen Analysen nie eine vollständig deckungsgleiche Sequenz erhalten wurde.

Ergebnisse

Auch bezüglich des VNTRs ergaben sich Unterschiede, selbst wenn die sequenzierten Konstrukte aus dem ursprünglich selben genetischen Material erstellt wurden. Es ist nicht nachzuvollziehen, ob sich die aufgetretenen *Mismatch*-Fehler in der Analyse darstellen oder durch einen der zahlreichen Konstruktionsschritte verursacht wurden.

Bei einigen Sequenzierungsvorgängen brach der Sequenzierer die Analyse ab, so dass teilweise mehrere Anläufe benötigt wurden. Die Sequenz *NOS1_Ex1f_31* wurde insgesamt drei Mal erfolgreich analysiert, wobei sich jedes Mal eine Repeat-Länge von 30 Repeats ergab. Die alternative Sequenz *NOS1_Ex1f_31mod*, die ursprünglich ebenso wie die Sequenz *NOS1_Ex1f_31* aus der DNA des CC-Genotyps stammt, zeigte bei vier erfolgreich durchgeführten Analysen je zwei Mal 31 Repeats und zwei Mal 32 Repeats, obwohl hier für alle vier Sequenz-Analysen das selbe PCR-Produkt verwendet wurde. Es ist also anzunehmen, dass der Sequenzierungsvorgang besonders im Bereich der monotonen Dinukleotid-Wiederholungen anfällig für Fehler ist („stottern“ der Polymerase), zumal die Anzahl der unterschiedlichen Basenpaare zwischen den *NOS1_Ex1f*-Konstrukten und den *NOS1_Ex1f_mod* Konstrukten bei jeder Analyse korrekt mit 38 bp angegeben wurde. Ein Mittelwert für die sieben Messungen bezüglich des CC-Genotyps wurde gebildet und das Vorhandensein von 31 Repeats angenommen. Die Sequenzen *NOS1_Ex1f_25* und *NOS1_Ex1f_25mod* wurden je zwei Mal analysiert und zeigten bei allen Sequenzierungsvorgängen ohne Abweichungen 25 Repeats. Für die Sequenz *NOS1_Ex1f_20* ergaben sich bei fünf Analysevorgängen zwei Mal 21 Repeats, zwei Mal 19 Repeats und bei einer Sequenzierung 20 Repeats. In der zweimaligen Analyse der Sequenz *NOS1_Ex1f_20mod* fanden sich 21 Repeats und bei zweimaliger Analyse der Sequenz *NOS1_Ex1f_20mod_INV* 20 Repeats. Hierfür wurden ebenfalls Mittelwerte der Repeat-Längen gebildet und in der Folge für diese drei Konstrukte von einer Repeat-Länge von 20 bp ausgegangen.

Die unterschiedliche Länge der aus der Analyse erhaltenen Sequenzen ist dadurch zu erklären, dass die Sequenzierungsreaktion an den 5'- oder 3'-Primern ansetzt und nach ungefähr 500 bp abbricht. Wenn in der Gensequenz ein „n“ statt der üblichen Basen auftaucht, bedeutet dies, dass im Sequenzierungsvorgang die entsprechende Base nicht erkannt werden konnte (Darstellung der Sequenzen siehe 6. Anhang).

3.2. Längenabhängige Unterschiede in der Aktivität des *NOS1* Ex1f-VNTR-Promoter-Luciferase Assay

Die Extremgruppenanalyse der kurzen (20 Repeats), intermediären (25 Repeats) und langen (31 Repeats) Allele des *NOS1* Ex1f-VNTR, welche in den Luciferase-Reporter-Vektor pGL3-Basic kloniert wurden, ergab, dass die Expression des Reporter-Gens in signifikanter Weise von der Länge des VNTR beeinflusst wird (Abb. 19). Das Insert Ex1f_31 mit den meisten Repeats des *NOS1* Ex1f-VNTR hatte die höchste Gen-Expression des Luciferase-Reportergens zur Folge ($5,79 \pm 0,56$ -fache Aktivität im Vergleich zum nativen Plasmid pGL3-Basic, welches mit 1 gleich gesetzt wurde). Intermediäre und in noch stärkerem Maße kürzere Allele resultierten in reduzierter Expression des Reporter-Gens.

So zeigte sich beim Ex1f_25-Promoterkonstrukt mit 25 Repeats eine mehr als doppelte Luciferase-Aktivität ($2,78 \pm 0,63$). Das mit 20 Repeats kürzeste der drei Konstrukte, Ex1f_20, wies nur eine Aktivität von fast 1 auf ($0,97 \pm 0,25$). Bei den „mod“-Konstrukten, welche die östrogenrezeptortragende Sequenz entbehren, wurde ebenfalls eine höhere Aktivität der Luciferase gemessen. Sie betrug bei Ex1f_31mod das $4,03 \pm 0,57$ -fache, bei Ex1f_25mod das $4,85 \pm 0,3$ -fache und bei Ex1f_20mod das $3,52 \pm 0,58$ -fache der Kontrolle. Die Aktivität des Promoterkonstruktes Ex1f_20mod_INV -war gleich der Kontrollaktivität von pGL3-basic ($1,01 \pm 0,37$).

Die Aktivität des Promoterkonstruktes Ex1f_25 war im Verhältnis zu Ex1f_31 fast um die Hälfte ($0,48 \pm 0,11$ -fache, $p=0,000005$), die des Konstruktes Ex1f_20 im Verhältnis zu Ex1f_31 um über 80 % ($0,17 \pm 0,04$ -fache, $p=0,000000003$) erniedrigt. Zwischen den Konstrukten Ex1f_25 und Ex1f_20 ergab sich eine Minderung der Aktivität auf ein Drittel ($0,35 \pm 0,09$ -fach, $p=0,00007$).

Ergebnisse

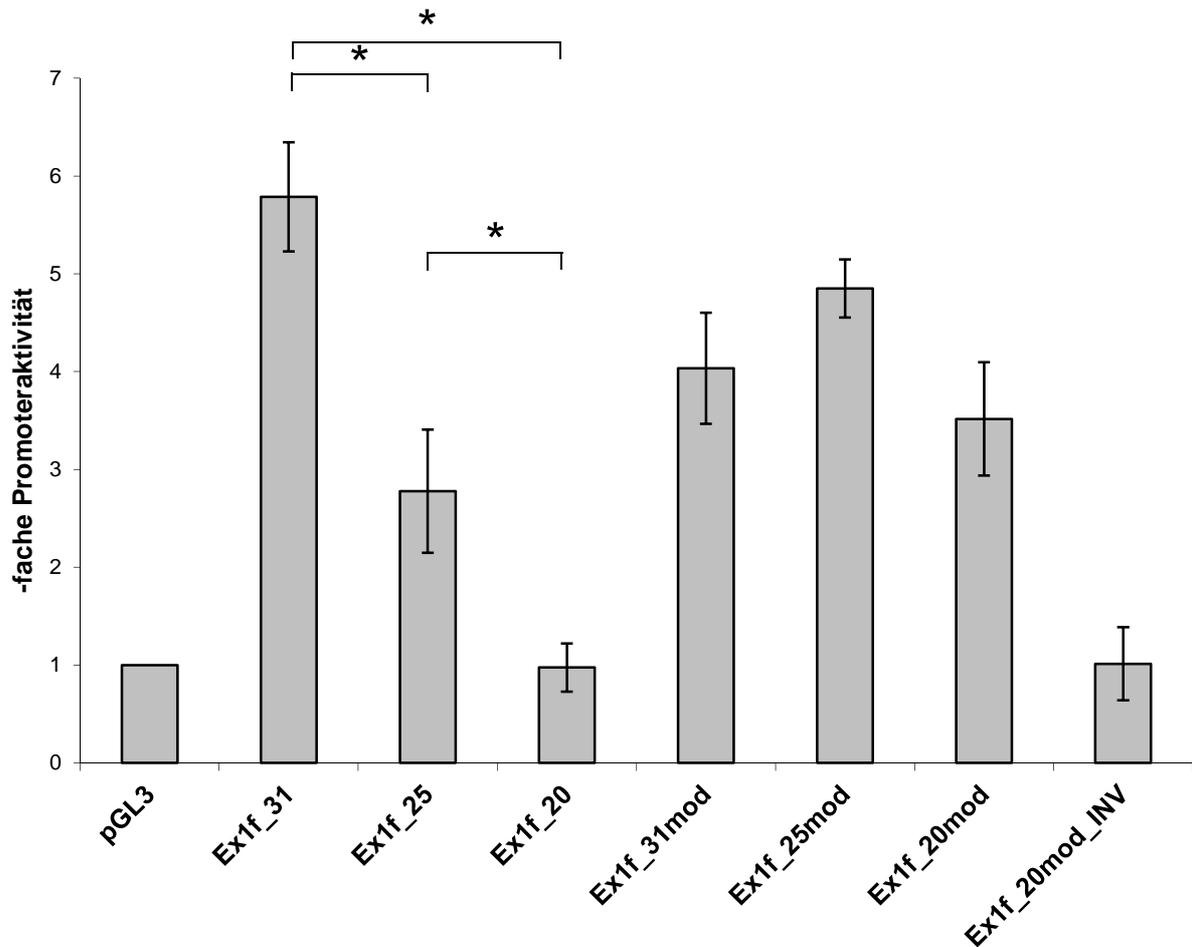


Abb. 19: Polymorphismuslängenabhängige Unterschiede in der Promoterreporter-Aktivität gemessen im Luciferase-Assay. Als Kontrolle wurde die Basisaktivität des pGL3-basic-Reportergens angenommen und gleich 1 gesetzt. Verglichen mit dieser Aktivität konnte eine starke Promoteraktivität in Konstrukten mit langen (Ex1f_31) Allelen nachgewiesen werden, welche mit abnehmender Länge des VNTR (Ex1f_25, Ex1f_20) im Promoterabschnitt schwächer wurden. Diese Effekte waren jedoch in Konstrukten nicht messbar, bei welchen im 5'-Ende drei Östrogen-Bindestellen eliminiert wurden (Ex1f_31mod, Ex1f_25mod, Ex1f_20mod). Ein Konstrukt mit invertiertem Insert (Ex1f_20mod_INV) hatte dieselbe Aktivität wie der native Basisvektor (*, $p < 0,001$).

Ergebnisse

3.3. Untersuchung der Promoteraktivität unter Stimulation durch Forskolin

Nach 12-stündiger Forskolin-Behandlung von HeLa-Zellen, welche mit den Promoterkonstrukten transfiziert wurden, konnte keine signifikante Änderung der Aktivität gemessen werden (Abb. 20).

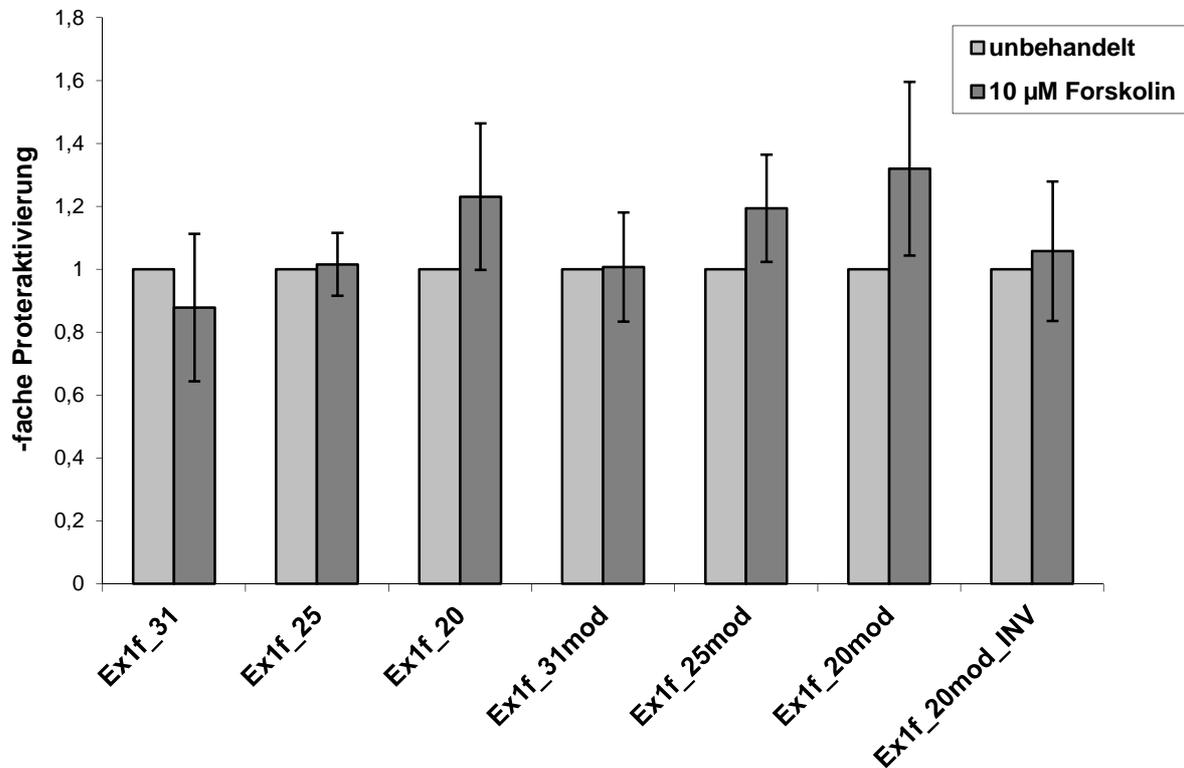
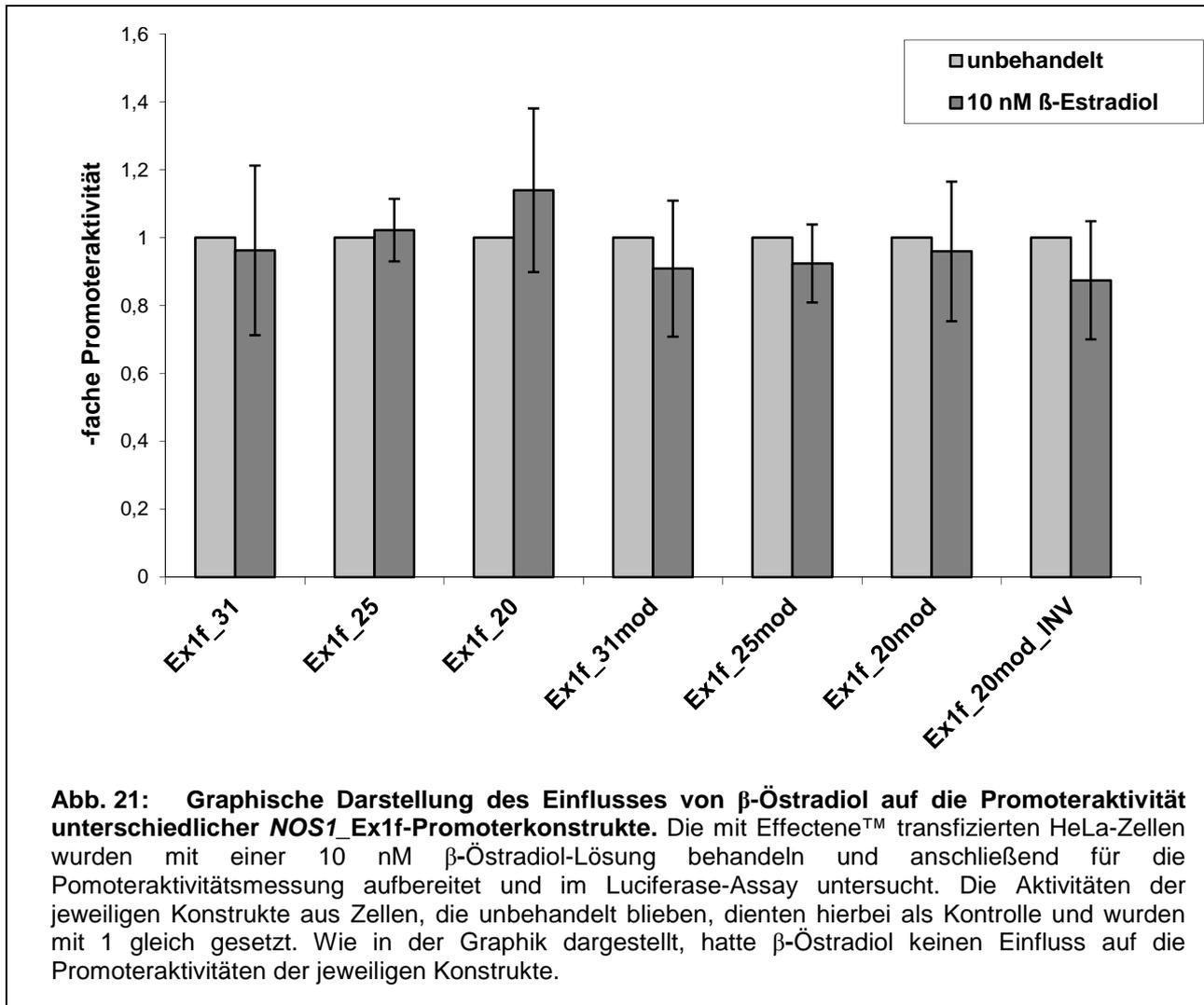


Abb. 20 Graphische Darstellung des Einflusses von Forskolin auf die Promoteraktivität unterschiedlicher *NOS1_Ex1f*-Promoterkonstrukte. Die aus mit Effectene™ transfizierten HeLa-Zellen gewonnenen Zelllysate wurden im Luciferase-Assay auf Promoteraktivitäten untersucht. Die Aktivitäten der jeweiligen Konstrukte aus Zellen, die unbehandelt blieben, dienten hierbei als Kontrolle und wurden mit 1 gleich gesetzt. Forskolin hatte den Daten zufolge keinen Einfluss auf die Promoteraktivitäten aller Konstrukte.

Ergebnisse

3.4. Untersuchung der Promoteraktivität unter Stimulation durch β -Östradiol

Die 12-stündige β -Östradiol-Behandlung bewirkte bei keinem der transfizierten Promoterkonstrukte signifikante Aktivitätsunterschiede (Abb. 21).



3.5. Längenabhängiger Einfluss des *NOS1* Ex1f-VNTR auf das neuronale Transkriptom

Zur Überprüfung, ob der *NOS1* Ex1f-VNTR die Regulation anderer Gene beeinflusst, wurde die Auswirkung der Länge auf die globale Genexpression anhand postmortalen Hirngewebes aus dem Brodmann-Areal 46 von 105 verschiedenen Individuen untersucht. Die DNA-Microarray Daten, welche eine Gesamtzahl von 19.500 Genen enthielten, wurden unter Anwesenheit von homozygot kurzen oder langen sowie heterozygoten Promoterallelen des *NOS1* Ex1f-VNTR stratifiziert, welche durch die Zahlenwerte "0/1/2" (lang-lang/kurz-lang/kurz-kurz) klassifiziert wurden. Eine Erhöhung des Zahlenwertes um "1" ergibt demnach die Steigerung der

Ergebnisse

jeweiligen Gen-Expression um den in Tabelle 9 angegebenen Faktor. Nach Korrektur für multiples Testen mittels ANOVA und nachfolgendem Bonferroni-Test wurden 25 Gene identifiziert, deren Expression signifikant und um mehr als 10% verändert war. Die veränderten Gene sind als x-fache Änderung der Expression pro Zahlenwert "1" in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Durch den *NOS1* Ex1f-VNTR signifikant dysregulierte Gene im Transkriptom des BA46

Gen Symbol	Vollständiger Name des Gens	-fache Expressionsänderung	Signifikanz (<i>p</i>)
AP1S1	Adaptor-related protein complex 1, σ subunit	1,1083	1,42 x 10 ⁻⁵
BHLHB2	Basic helix-loop-helix domain containing, class B,2	1,1348	6,27 x 10 ⁻⁶
CACNB2	Calcium channel, voltage-dependent, β 2 subunit	1,107	5,59 x 10 ⁻⁶
CHI3L1	Chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	1,1016	3,00 x 10 ⁻⁷
CLPTM1	Cleft lip and palate-associated transmembrane protein 1	1,1082	2,27 x 10 ⁻⁵
DTX3	Deltex 3 homologue (Drosophila)	1,1068	1,67 x 10 ⁻⁷
GHITM	Growth hormone-inducible transmembrane Protein	1,1308	1,62 x 10 ⁻⁵
GPX3b	Glutathione peroxidase 3 (plasma)	1,1214	2,01 x 10 ⁻⁵
GRIN1 b,c	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1	1,1248	3,07 x 10 ⁻¹⁰
HDGFRP3	Hepatoma-derived growth factor, related protein	1,1308	5,79 x 10 ⁻⁸
KKIAA0182	KIAA0182 protein (genetic suppressor element 1)	1,1226	5,32 x 10 ⁻⁶
MAP1LC3B	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 β	1,1008	2,30 x 10 ⁻⁵
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8 (alias JNK)	1,1010	2,56 x 10 ⁻⁶
MEF2C	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (myocyte enhancer factor 2C)	1,1066	1,90 x 10 ⁻⁶

Ergebnisse

NEFL b,c	Neurofilament, light polipeptide 68 kDa	1,1272	1,91 x 10 ⁻⁵
RGS4 c	Regulator of G-protein signaling 4	1,1148	1,06 x 10 ⁻⁵
SNCA b,c	Synuclein, α (non-A4 component of amyloid precursor)	1,1271	4,83 x 10 ⁻⁶
SNX3	Sorting nexin 3	1,1129	5,29 x 10 ⁻⁷
SOD2 b,c	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	1,1148	3,05 x 10 ⁻⁶
SRD5A1	Steroid-5- α -reductase, α polipeptide 1 (3-oxo-5 α -steroid δ 4-dehydrogenase α 1)	1,1126	5,17 x 10 ⁻⁶
TPD 52	Tumor protein D52	1,1046	4,60 x 10 ⁻⁶
TUBB c	β 5-tubulin	1,1072	3,57 x 10 ⁻⁸
TUBB4	β 4-tubulin	1,1197	1,36 x 10 ⁻⁸
WARS	Tryptophanyl-tRNA synthetase	1,1216	1,73 x 10 ⁻⁷
XIST	X (inactive)-specific transcript	-1,21854	6,17 x 10 ⁻⁶

4. Diskussion

4.1. Klonierung des *NOS1* Ex1f-VNTR

Die vorliegende Arbeit entstand basierend auf vorausgegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe [97], die eine multiple Allelie für den *NOS1* Ex1f-VNTR mit einer nicht-gleichmäßigen Häufung kurzer, intermediärer und langer Allele zeigen konnten. Es fand sich darüber hinaus eine Assoziation zwischen homozygotem Vorhandensein kurzer Allele und der Reduktion in der präfrontalen kortikalen Funktion als auch der klinischen Symptomatik schizophrener Patienten, was starke Hinweise auf eine funktionelle Relevanz des *NOS1* Ex1f-VNTR lieferte. Um den Einfluss der verschiedenen Repeat-Längen auf die Transkriptionsaktivität zu demonstrieren, wurde ein Luciferase-Reportergen-Assay im Sinne einer Extremgruppenanalyse durchgeführt und die drei am häufigsten vorkommenden Allele des Polymorphismus verglichen.

Bei der Erstellung der in dieser Arbeit verwendeten Reportergen-Konstrukte und der Durchführung des Luciferase-Assays orientierten wir uns an Studien von Rife und Mitarbeitern [91]. Allerdings ging man bei diesen Untersuchungen von nur 2 alternativen Versionen des *NOS1* Exon1 aus, die als 5´1 und 5´2 bezeichnet wurden und mittlerweile ihre Entsprechungen in neuerer Nomenklatur fanden, in welcher 5´1 als Exon1g und 5´2 als Exon1f benannt werden [85]. Von der Arbeitsgruppe um Rife wurden Genkonstrukte unterschiedlicher Länge angefertigt, um die in der Transkription aktiven Promotorsequenzen zu identifizieren. Das in dem dort verwendeten Konstrukt *pNOS1(1470/1842)-L* eingefügte Insert entspricht in seinen Abmessungen annähernd den von uns klonierten mod-Inserts der Nukleotide 1464 bis 1861. Wir entschieden uns für dieses Insert, da Rife zeigen konnte, dass hiermit eine starke Reportergenaktivierung verbunden ist. Ein weiteres vorgestelltes Konstrukt *pNOS1(1613/1842)-L* zeigte bei Deletion des VNTR-tragenden Promoterabschnittes eine noch größere Transkriptionsaktivität, was bereits deutliche Hinweise auf einen transkriptionsmodulierenden Einfluß des *NOS1* EX1f-VNTR gab. Ferner vermutete Rife ein die Transkription negativ beeinflussendes Element zwischen den Nukleotiden 1195 und 1428 bzw. 1469. Die genannten Nukleotide 1428 und 1469 wurden jedoch ohne weitere Erläuterung beide als Endpunkt des Suppressionselementes bezeichnet, so dass weiterhin Unklarheit über dessen exakte Position bestand. Aus diesem Grund entschieden wir uns dazu, ein sich im 5´-Ende unterscheidendes Insert zu klonieren, welches die Nukleotide 1424 bis 1861

umspannt und somit den oben genannten strittigen Bereich des vermuteten Suppressionselementes beherbergt.

4.2. Modulation der Promoteraktivität im Luciferase-Assay durch Längenunterschiede des *NOS1* Ex1f-VNTR

Im durchgeführten Luciferase-Reporter-Gen-Assay zeigten sich in Abhängigkeit von der Länge des *NOS1* Ex1f-VNTR Unterschiede in der Promoteraktivität, die sich auf die Expression des Reportergens auswirkten. In reproduzierbaren Ergebnissen brachten die Konstrukte mit höherer Anzahl von Dinukleotid-Repeats größere Leuchtkraft im Luciferase-Assay hervor, während Konstrukte mit intermediären oder gar kurzen Repeat-Längen eine deutlich reduzierte Aktivität aufwiesen.

In einer parallelen, jedoch später veröffentlichten Arbeit von Rife [99] wurden drei *NOS1* Ex1f-VNTR-Promoterkonstrukte vergleichbarer Repeat-Längen untersucht und auch hier zeigte sich in Übereinstimmung zu den von uns durchgeführten Versuchen bei Konstrukten mit einer größeren Anzahl von Repeats eine erhöhte Promoteraktivität.

In den von uns durchgeführten Versuchen zeigte sich jedoch der längenabhängige Effekt des *NOS1* Ex1f-VNTR nur bei den Konstrukten, die im 5'-Ende um die ERE-enthaltenden 38 bp länger waren. Wenngleich diese in unserem experimentellen Setting nicht auf Östrogen-Behandlung reagierten, tragen sie doch zur Funktionalität des Promoters bei, indem sie den Einfluss des *NOS1* Ex1f-VNTR manifestierten. In Abwesenheit dieser 38 bp des 5'Endes zeigte sich die Transaktivierung des Reportergens unabhängig von der Allellänge des *NOS1* Ex1f-VNTR gleichsam nivelliert. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass andere bislang nicht identifizierte Bindestellen für Transkriptionsfaktoren auf diesem besagten Genabschnitt liegen oder dass die Abwesenheit dieser Basenpaare die Affinität von modulierenden Transkriptionsfaktoren für den *NOS1* Ex1f-Promoter beeinflusst.

4.3. Kein Einfluss von 17 β -Östradiol und Forskolin auf die Promoteraktivität der *NOS1* Ex1f-VNTR-Varianten

Im Falle der Forskolin-Stimulation zeigte sich bei einigen Konstrukten (Ex1f_20, Ex1f_25mod und Ex1f_20mod) zwar eine leichte Steigerung der Promoteraktivität, erreichte jedoch keine Signifikanz.

Untersuchungen zufolge, die einen Einfluss des Östrogens auf die Expression des NOS-I-Proteins demonstrierten, soll die Expression von der Konzentration des 17β -Östradiols abhängig sein. Konzentrationen von bis zu 10^{-7} mol/L sollen hierbei stimulierend, Konzentrationen darüber, hingegen supprimierend wirken [157].

In der vorliegenden Arbeit war jedoch kein signifikanter Einfluss der 17β -Östradiol-Behandlung nachweisbar. Dies ist vermutlich auf niedrige ER α -Konzentrationen der verwendeten HeLa-Zellen zurückzuführen. Alternativ könnten zusätzliche Promoteraktivitätsstudien mit hochexprimierenden Zelllinien wie z.B. MCF-7 (Mamma-Ca) aufschlussreich sein. Begleitet von Negativ-Kontrollen, wie COS-7-Zellen, welche keine endogenen Rezeptoren exprimieren, wäre eine Aussage zur Östrogeninduzierbarkeit möglich.

4.4. Molekulare Mechanismen der Beeinflussung der Promoteraktivität durch die Anwesenheit des NOS1 Ex1f-VNTR

Die *in vitro* nachgewiesene Repeat-längenabhängige Promoteraktivität kann jedoch nicht ohne weiteres mit erhöhter Transkriptionsaktivität des Exon1f in Gegenwart höherzahliger Dinukleotid-Repeats und somit höherer NOS-I-Aktivität gleichgesetzt werden. Denn obgleich es Befunde gibt, die dieses nahelegen, wie zum Beispiel eine Erhöhung des NO-Gehaltes in der Ausatemluft bei Patienten mit Cystischer Fibrose, die Träger langer Allele des NOS1 Ex1f-VNTR waren [158], stehen diesen Daten eine Untersuchung von Silberberg auf RNA-Ebene entgegen, bei welcher keine Assoziation der Repeat-Länge mit der Expression der Gesamt-NOS-I in post-mortalen zerebralen Gewebeproben gefunden wurde [159]. Studien hierzu, die diese Ergebnisse reproduzieren oder den Effekt des NOS1 Ex1f-VNTR auf Proteinebene ermitteln, stehen noch aus.

Als Erklärung für die Diskrepanz zwischen den Daten der RNA-Expression und denen der Reporter-Gen-Assays könnte die eingangs erwähnte kompensatorische Regulation verschiedener NOS1-Exons angesehen werden. So wurde von Saur am Beispiel der infantilen Pylorusstenose gezeigt, dass eine Herunterregulation des NOS1 Exon 1c von einer vermutlich kompensatorischen Hochregulation des NOS1 Exons 1f begleitet wurde [93]. Dies lässt den Schluss zu, dass diese Kompensationsvorgänge auch in gegenläufiger Form zum Tragen kommen könnten. Jedoch fehlen bislang Studien, die eben diesen Kompensationsmechanismus an anderen Gewebsarten als denen der glatten Muskelzellen des Magenausgangs, wie

Diskussion

bei Saur, demonstrieren und auch solche Untersuchungen, welche die kompensatorischen Regulationsvorgänge in gegenläufiger Form aufzeigen, ob z.B. eine Hochregulation des Exon 1f auch in einer Herunterregulation des Exon 1c resultiert.

Wenn auch Silberberg, keinen Einfluss des *NOS1* Ex1f-VNTR auf die RNA-Expression der gesamten *NOS1* finden konnte [159], so stehen dem die Ergebnisse der unabhängigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe und derer von Rife [99] gegenüber, die einen Einfluss des *NOS1* Ex1f-VNTR zumindest auf die Expression des Luciferase-Reportergens zeigten. Der Effekt des *NOS1* Ex1f-VNTR auf die Transkriptionsvorgänge könnte durch verändertes Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren im Bereich des Dinukleotid-Repeats erklärt werden. Zur molekularen Wirkungsweise von Dinukleotid-Repeats lassen sich verschiedene Mechanismen erörtern. So wurde beispielsweise gezeigt, dass TG-Repeats in anderen Bereichen des Genoms Z-DNA formen können, die eine linksgängige Variante der üblichen rechtsgängigen B-DNA-Helix darstellt und deren Anwesenheit sowohl 5'- als auch 3'-Transkriptionsfaktoren beeinflusst, und somit die Transkriptionsaktivität erhöhen, meist aber erniedrigen kann [160-164]. Als in der Nähe des TG-Repeats bindende Transkriptionsfaktoren konnten beim *NOS1* Ex1f-VNTR der *Octamer transcription factor 2* (Oct-2) und der *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) identifiziert werden [52, 165-167]. Besonders im Falle des NF- κ B gibt es Hinweise, dass dieser einen signifikanten Einfluss auf die Transkriptionsaktivität des *NOS1* Ex1f-Promoters ausübt [168], so dass eine Veränderung der Promoteraktivität durch eine Alteration der DNA-Konformation durchaus denkbar scheint. Des Weiteren gibt es Befunde, denen zufolge die Einzelstränge bei Repeat-DNA schneller reassoziieren, d. h. die zur Transkription zur Verfügung stehende Zeit verkürzt sich [257], was aber naturgemäß nicht zu einer Erhöhung der Transkriptionsaktivität führen würde.

Zusammenfassend lässt sich zwar sagen, dass es einen Einfluss von VNTRs auf die DNA-Transkription gibt, aber welcher Art dieser Einfluss ist, ob er nun regelhaft aktivierend oder supprimierend sei, oder im Falle verschiedener Gene auch verschieden ausfällt, bedarf weiterer Abklärung.

4.5. Einfluss des *NOS1 Ex1f-VNTR* auf das humane Transkriptom des BA46

Die DNA, welche aus den uns von der *Stanley Foundation Brain Collection* überlassenen cerebellären Gewebeproben gewonnen und nachfolgend genotypisiert wurde, konnte daraufhin bezüglich der Allellänge des *NOS1 Ex1f-VNTR* den Merkmalsgruppen homozygot für kurze (s/s) oder lange (l/l) Allele bzw. heterozygot für kurzes und langes Allel (s/l) zugeordnet werden.

Korrespondierend zu den cerebellären Gewebeproben wurden von der *Stanley Foundation* aus den kortikalen BA46 derselben Individuen DNA-Microarrays durchgeführt und die Ergebnisse in einer Datenbank (SMRIDB) angelegt. Die von uns identifizierten Allelträger wurden der *Stanley Foundation* übermittelt und die Datenbank nach den Merkmalsgruppen bezüglich der Allellänge ausgewertet, wodurch es möglich war, den Einfluss unterschiedlicher *NOS1 Ex1f-VNTR*-Allele auf die Genexpression sämtlicher im BA46 transkribierten Gene aufzuzeigen.

Hierbei konnte ein signifikanter Einfluss kurzer Allele des *NOS1 Ex1f-VNTR* auf die Transkription einer Reihe von Genen demonstriert werden, die in Tabelle 9 aufgelistet sind. Einige dieser dysregulierten Gene stehen im direkten Zusammenhang mit der Funktion von NO und kodieren für Enzyme, welche an der Inaktivierung des radikalischen Sauerstoffs beteiligt sind, wie die Superoxid-Dismutase 2, die Glutathion-Peroxidase 3, sowie die MAPK8. Die MAPK8, auch c-Jun (N)-terminal Kinase (JNK) oder Stress-aktivierte Protein Kinase (SAPK) genannt, wird besonders durch zelluläre Stressstimuli wie Hitzeschock, ionisierende Strahlung, UV-Strahlen, DNA-schädigende Agenzien, DNA- und Proteinsyntheseinhibitoren, Entzug von Wachstumsfaktoren, sowie oxidativen Stress aktiviert [169], und durch NO zusätzlich in der Funktion gehemmt [170].

Eine weitere Gruppe dysregulierter Gene kodiert für Bestandteile des Zytoskeletts, darunter befinden sich β 4- und β 5-Tubulin, *Microtubule-associated protein 1 light-chain 3 β* (*MAP1LC3B*) und *Neurofilament light polypeptide* (*NEFL*).

Von besonderer Bedeutung unter den dysregulierten Genen sind jene, deren Assoziation mit psychiatrischen Erkrankungen bereits bekannt ist, wie z.B. α -Synuclein, welches eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen einnimmt [171]. Durch Nitrosylierung von α -Synuclein wird die Bildung reaktiver Stickstoffoxidspezies, sowie Protease-resistenter α -Synuclein-Aggregate erhöht, deren Zelltoxizität das Fortschreiten neurodegenerativer Erkrankungen beschleunigen [172]. Im Hinblick auf impulsives Verhalten konnte α -Synuclein in

Verbindung mit Alkoholismus gebracht werden. Einer Studie zufolge ist α -Synuclein mRNA bei Suchtpatienten, speziell bei Alkoholikern während der Entzugsphase erhöht und in signifikanter Weise mit dem *Craving*-Verhalten assoziiert [173].

Auch für Schizophrenie als prädisponierend angenommene Gene sind betroffen, wie das *Chitinase 3-like 1 (CHI3L1)*-Gen [174] und das Gen des *Regulator of G Protein Signaling 4 (RGS4)* [175], welches die synaptische Plastizität sowie den NMDA-Signalweg beeinflusst [176] und somit besonders im BA46 die These der hypoglutamatergen Störung untermauert. Ebenfalls im Zusammenhang mit der Störung der glutamatergen Funktion steht das zuvor genannte NEFL, welches die Expression des NMDA-Rezeptors an der Zelloberfläche erhöht, was zur NMDA-Rezeptor-vermittelten Toxizität führen kann [177]. Am schwersten wiegt jedoch die Dysregulation des *GRIN1*-Gens, das ebenfalls mit Schizophrenie assoziiert ist [178] und für die GluN1 Untereinheit des NMDA-Rezeptors, des direkten Aktivators der NOS-I, kodiert.

Gerade durch die Dysregulation dieser Gene, die für Proteine kodieren, welche an der glutamatergen Neurotransmission beteiligt sind, werden die früheren Befunde unserer Arbeitsgruppe unterstrichen, die zeigen, dass die Anwesenheit kurzer Allele des *NOS1 Ex1f-VNTR* die kognitiven Störungen und den Schweregrad der Schizophrenie negativ beeinflusst [97]. Die nachgewiesenen Transkriptionserhöhungen der betroffenen Gene könnten im Rahmen kompensatorischer Vorgänge zum Ausgleich einer NOS-I-Unterfunktion, bedingt durch kurze *NOS1 Ex1f-VNTR*-Allele, verstanden werden.

4.6. Die Bedeutung des *NOS1 Ex1f-VNTR* im Rahmen psychischer Erkrankungen

Folgt man der Entwicklung der Studienergebnisse, welche die Zusammenhänge zwischen dem NO-Metabolismus und der Genese psychischer Störungen zu ermitteln suchen, findet man eine wachsende Anzahl von Hinweisen und Veröffentlichungen, die einen substantiellen Einfluss des NO und seiner radikalischen *reactive nitrogen species* (RNS) auf die Pathomechanismen eines breiten Spektrums von psychiatrischen Erkrankungen nahelegen [12]. Wie bereits eingangs geschildert, entstehen durch Kreuzreaktionen des NO mit O_2 , CO_2 und H_2O_2 weitere radikalische Redox-Formen, die bei erhöhter Produktion derselben zum Vermittler glutamaterger Neurotoxizität werden [32, 34-36]. Mögliche Mechanismen

dieser toxischen Eigenschaften der *RNS* beinhalten Lipidperoxidation, Nitrosylierung einiger Moleküle, Inaktivierung von Na^+ -Kanälen, Blockierung mitochondrialer Atmung und Interaktion mit Metallen mit Redox-Potential wie z.B. Cu^{2+} und Fe^{2+} [180, 181].

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Reporter-Gen-Assays weisen auf eine Regulierung der NOS-I-Funktionalität via Expressionsveränderungen des *NOS1* Exon1f durch den *NOS1* Ex1f-VNTR hin. Diese Effekte könnten durch veränderte intrazelluläre Prozessierung der *NOS1* Ex1f-mRNA oder beeinträchtigte Stabilität derselben verursacht sein [52].

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen darüber hinaus einen Einfluss auf das Transkriptom, was bedeutet, dass die Transkription anderer für die Pathogenese psychiatrischer Störungen bedeutsamer Gene durch die Anwesenheit verschieden langer Allele des *NOS1* Ex1f-VNTR signifikant beeinflusst wird [98].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass, sollte dem *NOS1* Ex1f-VNTR, wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, eine Funktionalität bezüglich der Aktivität der NOS-I zukommen, der *NOS1* Ex1f-VNTR ebenfalls auf die Entstehung, den Verlauf oder den Schweregrad psychischer Störungen einwirkt.

4.6.1. *NOS1* Ex1f-VNTR und neurodegenerative Erkrankungen

Ein Zitat aus dem Review „*Nitric Oxide and Neuronal Death*“ von *Brown* [181], welches die Befundlage zum Thema NO und neurodegenerative Prozesse treffend zusammenfasst, lautet: „NO induces neuronal death; NO inhibits neuronal death; and NO does nothing to neuronal death.“ Als Erklärung für diese widersprüchlichen Befunde kann man die in unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Zuständen jeweils differierende NO-Konzentration und Herkunft für das verschiedenartige Wirken verantwortlich machen.

So scheint NO in niedriger Konzentration neuroprotektiv zu wirken, indem es radikalische Eigenschaften anderer Moleküle inaktiviert und in hoher Konzentration, durch nitroxidativen Stress Toxizität und Neurodegeneration zu vermitteln [182-184]. Neurodegenerative Prozesse wiederum sind ein essentieller Bestandteil bei allen vorkommenden Formen dementieller Erkrankungen. Morbus Alzheimer, die im Senium am häufigsten vorkommende Form der Demenz, ist eine multifaktoriell bedingte Krankheit, welche durch genetische Prädisposition und Umweltfaktoren verursacht wird. Als ein genetischer Risikofaktor für das Auftreten der Alzheimer-

Diskussion

Demenz konnte bislang das $\epsilon 4$ Allel des *Apolipoprotein E (ApoE)*-Gens identifiziert werden [185]. Andere Kandidatengene stehen mit der durch oxidativen Stress verursachten Neurotoxizität in Verbindung, die eine Schlüsselrolle in der Genese der Alzheimer-Erkrankung spielt [181]. Hervorzuheben ist, dass in betroffenen Gehirnen β -Amyloid zur Bildung von Superoxid-Radikalen führen kann, welche mit NO zu dem reaktiven Peroxynitrit (ONOO^-) reagieren. Die von diesem Agens verursachte Lipid-Peroxidation und DNA-Schäden führen letztendlich zum Zelltod, womit das NO als ein Risikofaktor bei neurodegenerativen Erkrankungen auch in direkter Verbindung mit der Alzheimer-Pathogenese steht [186, 187].

Dem gegenüber ist aber auch eine Beteiligung am neurodegenerativen Prozess durch beeinträchtigte NOS-I-Funktion denkbar. In dem Maße, in welchem eine Verringerung der NO-Produktion erfolgt, kann das NO bei zu geringer Konzentration seinen neuroprotektiven Aufgaben nicht mehr nachkommen, was wiederum in stärkerer Neurodegeneration resultiert. Diese Beeinträchtigung der physiologischen, neuroprotektiven NO-Produktion könnte, wie unsere Ergebnisse suggerieren, durch das Vorliegen kurzer Allele des *NOS1 Ex1f-VNTR* begünstigt werden.

Diese Hypothese deckt sich mit Befunden, denen zufolge kurze Allele signifikant häufiger bei Alzheimer-Patienten vorliegen, was in noch stärkerem Maße für die Homozygotie kurzer Allele gilt [189]. Interessanterweise konnte dieser Effekt in Übereinstimmung mit epidemiologischen Daten, wonach die Prävalenz der Alzheimer-Erkrankung in der weiblichen Bevölkerung höher ist [190], nur bei weiblichen Probanden festgestellt werden [188], was mit den postulierten Östrogen-responsiven Bindestellen im *NOS1 Ex1f-Promoter* zusammenhängen könnte. Obwohl wir keine Östrogeninduktion der Expression des Reportergens in HeLa-Zellen nachweisen konnten, schließt dies Östrogeneffekte nicht aus, da in unserem experimentellen Aufbau diese Untersuchungen nur anhand einer Zelllinie durchgeführt wurden, und HeLa-Zellen wohlgerne epitheliale Tumorzellen zervikalen Ursprungs sind. Es wäre von erheblicher Wichtigkeit, weitere Untersuchungen an einer Zelllinie neuronalen Ursprungs fortzuführen, um eine bessere Aufklärung der Promoteraktivität, der in dieser Arbeit vorgestellten Konstrukte, in Hinsicht auf Östrogeneffekte zu erhalten. Die geschilderten geschlechtsspezifischen Effekte treten jedoch in den Hintergrund, wenn zusätzlich zum kurzen Allel des *NOS1 Ex1f-VNTR* auch noch das *ApoE $\epsilon 4$* -Allel vorliegt. Hier scheint eine synergistische

Interaktion der beiden Gene das Risiko an Alzheimer zu erkranken, um das 10-fache zu erhöhen [188].

Auch für eine weitere bedeutende neurodegenerative Erkrankung, den Morbus Parkinson, liegen Hinweise vor, dass der *NOS1* Ex1f-VNTR in Abhängigkeit von der Allellänge die Pathogenese der Erkrankung beeinflusst. In welcher Weise allerdings der *NOS1* Ex1f-VNTR auf die Erkrankung einwirkt ist noch nicht abschließend geklärt, da der Großteil der Publikationen eine Erhöhung der NOS-I-Aktivität mit der bei Parkinson stattfindenden Neurodegeneration in Verbindung bringt, die beiden bislang einzigen Studien zum Thema *NOS1* Ex1f-VNTR und Morbus Parkinson aber kurze Allele, welche mutmaßlich mit verringerter *NOS1* Ex1f-Transkription und somit erniedrigter NOS-I-Aktivität einhergehen, mit der Erkrankung vergesellschaftet sehen [99, 191]. Als Erklärungsversuch gibt *Rife* an, dass kurze Allele des *NOS1* Ex1f-VNTR in bestimmten Zelltypen oder in Gegenwart von speziellen Transkriptionsfaktoren eine Hochregulierung der *NOS1*-Expression zur Folge haben könnten.

4.6.2. ***NOS1* Ex1f-VNTR und schizophrene Erkrankungen**

Die Schizophrenie, ein klassisches psychiatrisches Krankheitsbild, stellt eine heterogene Gruppe von psychischen Störungen dar, die eine Vielzahl unterschiedlicher klinischer Symptome und Verläufe zeigt. Für die Erkrankung charakteristisch ist ein akutes psychotisches Syndrom mit formalen und inhaltlichen Denkstörungen, Halluzinationen, Ich-Störungen und nicht zuletzt chronische kognitive Defizite, die mit einer ausgeprägten Minderung der Leistungsfähigkeit einhergehen. Für die Genese der Erkrankung wurden einige Umweltfaktoren, wie z.B. Aufwachsen in urbaner Umgebung, Zugehörigkeit zu gesellschaftlichen Minderheiten, Cannabisabusus und Entwicklungsstörungen [192], im Zusammenspiel mit einer hohen erblichen Komponente in Form einer Reihe von Kandidatengenen nachgewiesen [178, 193]. Von erheblicher Bedeutung für die klinische Behandlung ist das Auftreten zahlreicher Deregulationen in nahezu sämtlichen Neurotransmittersystemen, welche sich auch in der Vielzahl der beteiligten Kandidatengene niederschlägt, die für Elemente dieser Transmittersysteme kodieren. Im Tiermodell ist die Gabe von *Phencyclidin* (PCP), einem Antagonisten am NMDA-Rezeptor, zum Auslösen experimenteller schizophrenieähnlicher Zustände etabliert [194]. Dieser Effekt lässt sich wiederum durch die Gabe von NOS-I-Inhibitoren wie

N(G)-nitro.L-Arginin (L-NAME) oder *Methylenblau* aufheben [195-199]. Eine Beteiligung der NOS-I bei der Entstehung der Schizophrenie kann also angenommen werden, wenn auch in scheinbar widersprüchlicher Weise sowohl erhöhte als auch erniedrigte NO-Spiegel mit der Erkrankung in Verbindung gebracht werden [200]. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass begleitend zu dem für verschiedene kortikale Bahnen gegenläufig veränderten Dopamin-Metabolismus, welcher als charakteristisch für die Schizophrenie gilt, die NO-Synthese in analoger Weise lokale Unterschiede aufweist.

Eine direkte Assoziation des *NOS1 Ex1f-VNTR* mit dem Auftreten der Schizophrenie konnte zwar nicht gezeigt werden, jedoch scheint das homozygote Vorliegen kurzer *NOS1 Ex1f-VNTR*-Allele die Schwere der Erkrankung, wie sie in der *Positive and Negative Syndrom Scale* (PANSS), kognitiven Defiziten in der neuropsychologischen Testung und beeinträchtigter präfrontaler kortikaler Funktion in neurophysiologischen Untersuchungen abgebildet werden konnte, negativ zu beeinflussen [97]. Dies deckt sich mit Befunden zur Hypofrontalitäts-Hypothese der Schizophrenie, welche besagt, dass insbesondere Defizite in frontalen kortikalen Bahnen für die kognitiven Defizite bei der Schizophrenie verantwortlich sind [201]. Darüber hinaus konnte eine Reduktion der Aktivität sämtlicher kalziumabhängiger konstitutiver NOS-I-Isoformen im präfrontalen Kortex schizophrener Patienten gezeigt werden, welche die Hypofrontalität verstärken könnte [202].

Sollten, wie durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nahegelegt, kurze *NOS1 Ex1f-VNTR*-Allele die NOS-I-Funktion beeinträchtigen, wäre es denkbar, dass hierdurch die NOS-I als *second messenger*-Enzym des NMDA-Rezeptors, die auf molekularer Ebene vermutete glutamaterge Dysfunktion vermitteln könnte, welche mutmaßlich den kognitiven Defiziten zugrunde liegt [203, 204].

4.6.3. ***NOS1 Ex1f-VNTR* und affektive Erkrankungen**

Unter den affektiven Störungen, die den größten Anteil der psychiatrischen Erkrankungen ausmachen, ist die Depression von herausragender Bedeutung, da sie laut World Health Organisation (WHO) im Jahre 2020 die zweithäufigste Ursache für gesundheitliche Beeinträchtigung sein wird [205]. Klinisch zeigt sich die depressive Störung nicht nur als Herabgestimmtheit, sondern als Komplex zahlreicher somatischer, kognitiver und motivationaler Symptome. Die Ätiologie der Depression ist ebenso vielgestaltig, da sie im Zusammenhang mit belastenden

Diskussion

Lebensereignissen aber auch ohne identifizierbaren Auslöser auftreten kann. Gemein ist den Manifestationen der depressiven Störung jedoch, wie bei anderen Erkrankungen auch, die Interaktion von Umweltfaktoren mit einer gewissen Vulnerabilität, oder auch einer genetisch belegbaren Prädisposition [206-208]. Im Rahmen der Untersuchung der Umwelteinflüsse ist die Reaktion des Organismus auf das Auftreten von Stress seit langem Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen. Ein möglicher Mechanismus der Entstehung der durch chronischen milden Stress ausgelösten Depression, scheint die mit erhöhten NO-Spiegeln und gesteigerter NOS-I-Aktivität einhergehende Beeinträchtigung der adulten Neurogenese im Hippocampus zu sein [209, 210].

Der Hippocampus, welcher bekanntermaßen eine zentrale Rolle bei der Entstehung von affektiven Erkrankungen spielt [211], ist durch Stress und Depression einer atrophischen Entwicklung, betreffend Volumen- und Neuronenverlust unterworfen [212]. Der hippocampale Gyrus dentatus (DG) stellt zusammen mit dem Bulbus olfactorius bzw. der Subventrikulären Zone (SVZ) die Regionen des adulten Gehirnes dar, in welchen noch Neurogenese und neuronale Migration stattfindet [213-216]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das durch die in diesen Regionen lokalisierte NOS-I [217-220] produzierte NO einen negativen Einfluss auf die adulte Neurogenese im DG und SVZ ausübt [221-223]. Im Umkehrschluss konnte ebenfalls gezeigt werden, dass NOS-I-Inhibition wiederum die Proliferation von Verläuferzellen im DG erhöht und antidepressive Effekte hervorbringt [224-226]. Diese Befunde decken sich mit Studienergebnissen, die besagen, dass bei an Depression erkrankten Patienten erhöhte Plasma-Nitrat-Spiegel nachgewiesen werden konnten, die auf erhöhte NO-Produktion hindeuten [227]. Interessanterweise scheinen Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI), aber auch trizyklische Antidepressiva, die NOS-I-Aktivität zu verringern [228-230] und die adulte hippocampale Neurogenese durch antidepressive Behandlung erhöht zu werden [231, 232].

Eine Beteiligung von Polymorphismen des *NOS1*-Gens an der Pathogenese der Depression konnte bislang jedoch weder für einzelne SNPs [233, 234] noch für den *NOS1* Ex1f-VNTR [182] nachgewiesen werden.

4.6.4. **NOS1 Ex1f-VNTR und Persönlichkeit, Impulsivität und Aggressivität**

Genetische Heritabilität liegt nicht nur den schwerwiegenden psychiatrischen Krankheitsbildern zu Grunde, sondern stellt auch die Rahmenbedingung einzelner Persönlichkeitszüge, Fähigkeiten und Verhaltensweisen dar, wie sie sich durch Gen-Umwelt-Interaktion letztendlich phänotypisch äußern [235-237]. Es konnte unter anderem bereits für den Serotonin-Transporter (SERT), auch 5-Hydroxytryptamin-Transporter (5HTT) genannt, ein funktioneller Polymorphismus im Promoterregion (5HTTLPR) gefunden werden, dessen kurzes Allel mit dem Persönlichkeitsmerkmal Neurotizismus assoziiert ist [238].

Seit langem sind auch Einflüsse der NOS-I auf Verhaltensebene bekannt, wie sie sich zunächst im Tiermodell nachweisen lassen. So zeigen männliche NOS1-knockout-Mäuse unangemessen aggressives und sexuelles Verhalten im Vergleich zum Wild-Typ [239]. In Abwesenheit von Testosteron scheint das aggressive Verhalten nicht aufzutreten, wie Versuche mit kastrierten NOS1-knockout-Männchen ergaben. Testosterongabe stellt das aggressive Verhalten bei NOS1-knockout-Männchen wieder her [240].

Besondere Aufmerksamkeit verdient bei der Aufklärung des Einflusses der NOS-I auf aggressives Verhalten die Interaktion zwischen serotonerger und nitrinerger Transmittersystem. Auch Mäuse mit einer funktionellen Läsion des 5-Hydroxytryptamin(5HT)1B-Rezeptors oder des Calmodulins, welches für die Homodimerisierung der NOS-I benötigt wird, zeigen aggressives Verhalten [242, 243], ebenso wie Mäuse mit pharmakologischer Serotonindepletion sich aggressiv und hypersexuell verhalten [241-244]. Ergänzend hierzu gibt es Befunde, dass bei NOS1-knockout-Mäusen zwar der 5-HT-Gehalt in bestimmten Hirnregionen (zerebraler Cortex, Hypothalamus, Hippocampus, Mesencephalon und Cerebellum) erhöht ist, nicht jedoch dessen Metabolit 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA), was für verringerten 5-HT-Umsatz spricht. Behandlung mit dem Serotoninvorläufer 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) unterband das aggressive Verhalten in NOS1-knockout-Mäusen, ebenso wie Behandlung mit 5-HT1A- und 5-HT1B-Rezeptoragonisten, wobei hiervon bei *Knockouts* signifikant höhere Dosen benötigt wurden als bei Wild-Typen [245]. Für diese komplexe Interaktion des serotonergen und nitrinerger Systems wurden auch direkte Effekte der Protein-Interaktion zwischen SERT/5HTT und NOS-I erörtert. Die Co-Expression von NOS-I und SERT ergab eine Reduktion

der an der Zelloberfläche lokalisierten SERT und daraus folgender Reduktion der 5-HT-Wiederaufnahme. Hier fanden sich vermehrt im Zytosol befindliche SERT, was auf eine Störung des intrazellulären SERT-Transports schließen lässt, der möglicherweise durch Konkurrenz von NOS-I mit Transport- oder Bindeproteinen verursacht wird. Diese Effekte wiederum waren abwesend, wenn NOS-I mit SERT transfiziert wurden, welche im PDZ-Motiv, der Interaktionsstelle zwischen NOS-I und SERT, verändert waren. Auch konnte gezeigt werden, dass SERT-vermittelte 5-HT-Aufnahme NOS-I Aktivität induziert und somit NOS-I an einer negativen Feedback-Schleife zur längerfristigen Regulation der Serotonin-Wiederaufnahme beteiligt ist. Bei NOS1-knockout-Mäusen hingegen konnte eine Erhöhung der SERT-Aktivität und somit der zerebralen 5-HT-Wiederaufnahme beobachtet werden, die eine Verringerung des zur Verfügung stehenden Serotonins zur Folge hat [246, 247]. Dies stellt einen Mechanismus dar, wie durch den s/s-Genotyp des *NOS1* EX1f-VNTR verursachte verminderte NO-Produktion zum Absinken der serotonergen Neurotransmission und somit zu aggressiven und impulsiven Phänomenen beitragen kann.

Dass der s/s-Genotyp des *NOS1* Ex1f-VNTR Einfluss auf Verhaltensebene im Sinne erhöhter Impulsivität ausübt, welcher hier als unüberlegtes Handeln einschliesslich aggressivem, emotionalem und hyperaktivem Verhalten aufgefasst wird, konnte in Studien unserer Arbeitsgruppe belegt werden. So wurde ein signifikant höheres Vorliegen homozygoter kurzer Allele bei emotional-dramatischen Cluster B-Persönlichkeitsstörungen, insbesondere der histrionischen Persönlichkeitsstörung, sowie adultem Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom (aADHS) gefunden. Weibliche Träger kurzer *NOS1* EX1f-VNTR-Allele wiesen darüber hinaus geringere Ausprägungen des Persönlichkeitsmerkmals „Gewissenhaftigkeit“ auf, wie es durch den Fragebogen *Neuroticism-Extroversion-Openness Personality Inventory – Revised* (NEO-PI-R) als Grad der Organisation, Ausdauer, Kontrolle und Motivation für zielgerichtetes Verhalten erfasst wird. Weiterhin konnten in dieser Studie die Befunde der Beeinträchtigung präfrontaler kortikaler Funktion durch die Anwesenheit des s/s-Genotypen des *NOS1* Ex1f-VNTR bei Schizophrenen an gesunden Probanden repliziert werden [98].

Analog zu Befunden, welchen zufolge das aggressive und hypersexuelle Verhalten von NOS1-knockout-Mäusen nur unter widrigen Lebensumständen zu Tage tritt [248], konnte gezeigt werden, dass auch beim Menschen ungünstige Umweltfaktoren

Diskussion

im Zusammenspiel mit dem s/s-Genotypen des *NOS1* Ex1f-VNTR das Auftreten dysfunktionaler Impulsivität fördern [249].

Weitere Belege für eine Funktionalität des *NOS1* Ex1f-VNTR, lieferten Befunde, denen zufolge aADHS-Patienten mit s/s-Allelen höhere Impulsivitätswerte, verglichen zu Trägern langer oder heterozygoter Allele, im sogenannten *Delay Discounting* aufwiesen. Jedoch ergaben die begleitenden, in dieser Frage bislang ersten funktionellen Magnetresonanztomographie-Untersuchungen, dass homozygote Träger kurzer *NOS1* Ex1f-VNTR-Allele, aADHS-Patienten ebenso wie gesunde Kontrollen, höhere ventrale striatale Aktivität aufwiesen als Träger homozygoter langer Allele (l/l-Genotyp) oder auch heterozygoter Allele (s/l-Genotyp) [250]. Dieses Ergebnis ist schwerlich mit der bisherigen Befundlage für ADHS-Patienten in Einklang zu bringen, da überwiegend bei ADHS eine Hypoaktivität des ventralen Striatums demonstriert wurde [251], wohingegen Impulsivität bei gesunden Probanden mit erhöhter ventraler striataler Aktivität einhergeht [252].

Wie komplex allerdings die regulierenden Einwirkungen auf den *NOS1* Ex1f-VNTR sind, zeigen Untersuchungen zur gegenseitigen Einflussnahme verschiedener in den Neurotransmitterhaushalt eingebundener Enzyme anhand der Interaktion zwischen der Monoaminoxidase (MAO), einer weiteren impulsivitätsbezogenen Größe und Spiegelbild zentralnervöser Serotonin-Aktivität [253] und der NOS-I. Hier war die Beteiligung des s/s-Genotypen des *NOS1* Ex1f-VNTR am Auftreten impulsiven Verhaltens nur in Gegenwart von thrombozytärer MAO mittlerer Aktivität nachweisbar [254]. Da gemeinhin besonders hohe oder niedrige MAO-Aktivität als Marker impulsivem Verhalten gilt [253], im Falle des s/s-Genotypen des *NOS1* Ex1f-VNTR Impulsivität nur bei moderater MAO-Aktivität auftritt, muss davon ausgegangen werden, dass der *NOS1* Ex1f-VNTR eine der MAO untergeordnete Rolle spielt. Ebenfalls zeigt eine Studie, die den Effekt des *NOS1* Ex1f-VNTR bei straffälligen, psychiatrisch erkrankten jungen Männern untersucht, dass hier ein heterozygoter Vorliegen kurzer und langer Allele (s/l-Genotyp) des *NOS1* Ex1f-VNTR höhere Werte bezüglich impulsiven Verhaltens hervorbringt [255]. Diese Befunde wiederum legen nahe, dass nicht einfach eine reine Assoziation kurzer Allele mit dem Auftreten und der Ausprägung des Merkmals Impulsivität angenommen werden darf, sondern dass bislang unbekannte Mechanismen notwendig sind, um den Einfluss des *NOS1* Ex1f-VNTR zu manifestieren.

4.7. Ausblick

Die vielversprechenden Hinweise auf eine Funktionalität des *NOS1* Ex1f-VNTRs und seine mögliche Relevanz in zahlreichen pathophysiologischen Szenarien lassen weitere Forschungsbestrebungen wünschenswert erscheinen.

Durch oben aufgeführte Studien wird eine Interaktion zwischen kurzen *NOS1* Ex1f-VNTR-Allelen und weiblichem Geschlecht bei der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung nahegelegt, so dass sich weitere Untersuchungen anbieten. Die Wechselwirkungen zwischen den kurzen Allelen und Östrogenbehandlung sind durch die durchgeführten Versuche nicht ausreichend abgeklärt, weshalb es von erheblicher Wichtigkeit wäre, Untersuchungen an einer Zelllinie neuronalen Ursprungs fortzuführen, um eine bessere Aufklärung der Promoteraktivität der in dieser Arbeit vorgestellten Konstrukte in Hinsicht auf Östrogeneffekte zu erhalten. Hierfür würde unter anderem die Phäochromozytom-Zelllinie PC12 in Frage kommen, welche ebenfalls den endogenen Östrogenrezeptor ER α exprimiert. Empfehlenswert wäre es, in parallelen Experimenten Zelllinien zu verwenden, die den endogenen ER nicht aufweisen, wie z.B. Cos-7-Zellen (ATCC CRL1651). Um den genomischen und nichtgenomischen Östrogeneffekten nachzugehen, könnten die ER-defizienten Zellen fakultativ mit dem ER transfiziert werden. Es wäre darüber hinaus naheliegend, die Zellen mit 17 β -Östrogen-Antagonisten, wie z.B. Tamoxifen oder Fulvestrant zu behandeln und auch Stimulationsversuche mit unterschiedlichen Konzentrationen von 17 β -Östrogen durchzuführen.

Im Falle der CRE-Bindungsstellen, wären Behandlungen mit supprimierend wirkenden CRE-Agonisten, wie dem *cAMP Response Modulator* (CREM) und den *Inducible cAMP early Repressor* (ICER) möglich, um den Einfluss der CRE im *NOS1* Exon 1f Promoter aufzudecken.

Sollten durch die *Stanley Foundation* weitere Microarrays in anderen, bei der Hypofrontalität schizophrener Patienten bedeutsamer BA, z.B. den BA 6, 8, 9 und 32 [256] durchgeführt worden sein, könnte auch das Transkriptom dieser Hirnareale durch die Anwesenheit des *NOS1* Ex1f-VNTR verändert sein.

Klinisch wären weitere mit erhöhter Impulsivität einhergehende Krankheitsbilder, wie die Borderline-Störung, aber auch Substanzabhängigkeit von großem Interesse. Bei diesen Patienten könnten Genotypisierungen bezüglich der Allellängen des *NOS1* Ex1f-VNTR durchgeführt und diese in Relation zu impulsivitätsbezogenen Verhaltensmustern, wie Anzahl der Suizidversuche, selbstverletzendem Verhalten,

Diskussion

Promiskuität oder auch Anzahl der Rückfälle gesetzt werden. Hierbei könnten durch Randomisierung und Vergleiche zu Kontrollgruppen ebenfalls geschlechtsspezifische Unterschiede näher erörtert werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F: **Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:3203-3207.
2. Furchgott RF, Zawadzki JV: **The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.** *Nature* 1980, **288**:373-376.
3. Ignarro LJ, Lippton H, Edwards JC, Baricos WH, Hyman AL, Kadowitz PJ, Gruetter CA: **Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates.** *J Pharmacol Exp Ther* 1981, **218**:739-749.
4. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G: **Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**:9265-9269.
5. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S: **Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.** *Nature* 1987, **327**:524-526.
6. Culotta E, Koshland DE: **NO news is good news.** *Science* 1992, **258**:1862-1865.
7. de Berrazueta JR: **[The Nobel Prize for nitric oxide. The unjust exclusion of Dr. Salvador Moncada].** *Rev Esp Cardiol* 1999, **52**:221-226.
8. Bredt DS, Snyder SH: **Nitric oxide: a physiologic messenger molecule.** *Annu Rev Biochem* 1994, **63**:175-195.
9. Bogdan C: **Nitric oxide and the immune response.** *Nat Immunol* 2001, **2**:907-916.
10. Hemish J, Nakaya N, Mittal V, Enikolopov G: **Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression.** *J Biol Chem* 2003, **278**:42321-42329.
11. Abbott LC, Nahm SS: **Neuronal nitric oxide synthase expression in cerebellar mutant mice.** *Cerebellum* 2004, **3**:141-151.
12. Akyol O, Zoroglu SS, Armutcu F, Sahin S, Gurel A: **Nitric oxide as a physiopathological factor in neuropsychiatric disorders.** *In Vivo* 2004, **18**:377-390.
13. Damy T, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, Marotte F, Samuel JL, Heymes C: **Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart.** *Lancet* 2004, **363**:1365-1367.
14. Gladwin MT, Kim-Shapiro DB: **The functional nitrite reductase activity of the heme-globins.** *Blood* 2008, **112**:2636-2647.
15. Bredt DS, Snyder SH: **Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**:682-685.
16. Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF: **Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:7773-7777.
17. Förstermann U, Schmidt HH, Pollock JS, Sheng H, Mitchell JA, Warner TD, Nakane M, Murad F: **Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types.** *Biochem Pharmacol* 1991, **42**:1849-1857.

18. Mayer B, John M, Böhme E: **Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin.** *FEBS Lett* 1990, **277**:215-219.
19. Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM, Snyder SH: **Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase.** *Neuron* 1991, **7**:615-624.
20. Schmidt HH, Murad F: **Purification and characterization of a human NO synthase.** *Biochem Biophys Res Commun* 1991, **181**:1372-1377.
21. Hecker M, Mülsch A, Bassenge E, Förstermann U, Busse R: **Subcellular localization and characterization of nitric oxide synthase(s) in endothelial cells: physiological implications.** *Biochem J* 1994, **299 (Pt 1)**:247-252.
22. Förstermann U, Dun N: **Immunohistochemical localization of nitric oxide synthases.** *Methods Enzymol* 1996, **268**:510-515.
23. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ: **Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**:9730-9734.
24. Mitchell JA, Kohlhaas KL, Matsumoto T, Pollock JS, Förstermann U, Warner TD, Schmidt HH, Murad F: **Induction of NADPH-dependent diaphorase and nitric oxide synthase activity in aortic smooth muscle and cultured macrophages.** *Mol Pharmacol* 1992, **41**:1163-1168.
25. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF: **Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:5243-5248.
26. Hall CN, Garthwaite J: **What is the real physiological NO concentration in vivo?** *Nitric Oxide* 2009, **21**:92-103.
27. Herulf M, Svenungsson B, Lagergren A, Ljung T, Morcos E, Wiklund NP, Lundberg JO, Weitzberg E: **Increased nitric oxide in infective gastroenteritis.** *J Infect Dis* 1999, **180**:542-545.
28. Hajimohammadreza I, Raser KJ, Nath R, Nadimpalli R, Scott M, Wang KK: **Neuronal nitric oxide synthase and calmodulin-dependent protein kinase IIalpha undergo neurotoxin-induced proteolysis.** *J Neurochem* 1997, **69**:1006-1013.
29. Knowles RG, Moncada S: **Nitric oxide synthases in mammals.** *Biochem J* 1994, **298 (Pt 2)**:249-258.
30. Marletta MA: **Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis.** *Cell* 1994, **78**:927-930.
31. Nathan C, Xie QW: **Regulation of biosynthesis of nitric oxide.** *J Biol Chem* 1994, **269**:13725-13728.
32. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG: **Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.** *Biochem J* 2001, **357**:593-615.
33. Porasuphatana S, Tsai P, Rosen GM: **The generation of free radicals by nitric oxide synthase.** *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2003, **134**:281-289.
34. Dröge W: **Free radicals in the physiological control of cell function.** *Physiol Rev* 2002, **82**:47-95.
35. Radi R, Cassina A, Hodara R: **Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria.** *Biol Chem* 2002, **383**:401-409.

36. Stewart VC, Heales SJ: **Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration.** *Free Radic Biol Med* 2003, **34**:287-303.
37. Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Förstermann U, Murad F: **Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle.** *FEBS Lett* 1993, **316**:175-180.
38. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H: **Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions.** *Hypertension* 1994, **23**:1121-1131.
39. Richards MK, Marletta MA: **Characterization of neuronal nitric oxide synthase and a C415H mutant, purified from a baculovirus overexpression system.** *Biochemistry* 1994, **33**:14723-14732.
40. McMillan K, Masters BS: **Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415.** *Biochemistry* 1995, **34**:3686-3693.
41. Ghosh DK, Stuehr DJ: **Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction.** *Biochemistry* 1995, **34**:801-807.
42. Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH: **Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase.** *Nature* 1991, **351**:714-718.
43. Daff S, Noble MA, Craig DH, Rivers SL, Chapman SK, Munro AW, Fujiwara S, Rozhkova E, Sagami I, Shimizu T: **Control of electron transfer in neuronal NO synthase.** *Biochem Soc Trans* 2001, **29**:147-152.
44. Stuehr DJ: **Mammalian nitric oxide synthases.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1411**:217-230.
45. Hayashi Y, Nishio M, Naito Y, Yokokura H, Nimura Y, Hidaka H, Watanabe Y: **Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases.** *J Biol Chem* 1999, **274**:20597-20602.
46. Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Förstermann U, Murad F: **Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases.** *Cell Calcium* 1992, **13**:427-434.
47. Nathan C, Xie QW: **Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls.** *Cell* 1994, **78**:915-918.
48. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM: **Neurobiology of nitric oxide.** *Crit Rev Neurobiol* 1996, **10**:291-316.
49. Brenman JE, Xia H, Chao DS, Black SM, Bredt DS: **Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts.** *Dev Neurosci* 1997, **19**:224-231.
50. Wang Y, Goligorsky MS, Lin M, Wilcox JN, Marsden PA: **A novel, testis-specific mRNA transcript encoding an NH₂-terminal truncated nitric-oxide synthase.** *J Biol Chem* 1997, **272**:11392-11401.
51. Silvagno F, Xia H, Bredt DS: **Neuronal nitric-oxide synthase-mu, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle.** *J Biol Chem* 1996, **271**:11204-11208.
52. Hall AV, Antoniou H, Wang Y, Cheung AH, Arbus AM, Olson SL, Lu WC, Kau CL, Marsden PA: **Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1).** *J Biol Chem* 1994, **269**:33082-33090.
53. Mungrue IN, Bredt DS: **nNOS at a glance: implications for brain and brawn.** *J Cell Sci* 2004, **117**:2627-2629.

54. Jemth P, Gianni S: **PDZ domains: folding and binding.** *Biochemistry* 2007, **46**:8701-8708.
55. Christopherson KS, Hillier BJ, Lim WA, Bredt DS: **PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain.** *J Biol Chem* 1999, **274**:27467-27473.
56. Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M: **Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein.** *Science* 1999, **284**:1845-1848.
57. Bredt DS, Snyder SH: **Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**:9030-9033.
58. Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S: **NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices.** *Eur J Pharmacol* 1989, **172**:413-416.
59. Ayata C, Ayata G, Hara H, Matthews RT, Beal MF, Ferrante RJ, Endres M, Kim A, Christie RH, Waeber C, et al: **Mechanisms of reduced striatal NMDA excitotoxicity in type I nitric oxide synthase knock-out mice.** *J Neurosci* 1997, **17**:6908-6917.
60. Rameau GA, Chiu LY, Ziff EB: **Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor.** *J Biol Chem* 2004, **279**:14307-14314.
61. Fang M, Jaffrey SR, Sawa A, Ye K, Luo X, Snyder SH: **Dexras1: a G protein specifically coupled to neuronal nitric oxide synthase via CAPON.** *Neuron* 2000, **28**:183-193.
62. Jaffrey SR, Benfenati F, Snowman AM, Czernik AJ, Snyder SH: **Neuronal nitric-oxide synthase localization mediated by a ternary complex with synapsin and CAPON.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**:3199-3204.
63. Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, Marshall HE, Stamler JS: **Protein S-nitrosylation: purview and parameters.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005, **6**:150-166.
64. Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH: **Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide.** *Nat Cell Biol* 2001, **3**:193-197.
65. Lane P, Hao G, Gross SS: **S-nitrosylation is emerging as a specific and fundamental posttranslational protein modification: head-to-head comparison with O-phosphorylation.** *Sci STKE* 2001, **2001**:re1.
66. Kiss JP, Hennings EC, Zsilla G, Vizi ES: **A possible role of nitric oxide in the regulation of dopamine transporter function in the striatum.** *Neurochem Int* 1999, **34**:345-350.
67. Kuhn DM, Arthur RE: **Inactivation of brain tryptophan hydroxylase by nitric oxide.** *J Neurochem* 1996, **67**:1072-1077.
68. Kaye DM, Gruskin S, Smith AI, Esler MD: **Nitric oxide mediated modulation of norepinephrine transport: identification of a potential target for S-nitrosylation.** *Br J Pharmacol* 2000, **130**:1060-1064.
69. Choi YB, Tenneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HS, Lipton SA: **Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation.** *Nat Neurosci* 2000, **3**:15-21.
70. Lipton SA, Choi YB, Takahashi H, Zhang D, Li W, Godzik A, Bankston LA: **Cysteine regulation of protein function--as exemplified by NMDA-receptor modulation.** *Trends Neurosci* 2002, **25**:474-480.

71. Kilic F, Murphy DL, Rudnick G: **A human serotonin transporter mutation causes constitutive activation of transport activity.** *Mol Pharmacol* 2003, **64**:440-446.
72. Sayed N, Baskaran P, Ma X, van den Akker F, Beuve A: **Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:12312-12317.
73. Cork RJ, Perrone ML, Bridges D, Wandell J, Scheiner CA, Mize RR: **A web-accessible digital atlas of the distribution of nitric oxide synthase in the mouse brain.** *Prog Brain Res* 1998, **118**:37-50.
74. Förstermann U, Gorsky LD, Pollock JS, Schmidt HH, Heller M, Murad F: **Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s) in rat brain.** *Biochem Biophys Res Commun* 1990, **168**:727-732.
75. Burazin TC, Gundlach AL: **Localization of NO synthase in rat brain by [3H]L-NG-nitro-arginine autoradiography.** *Neuroreport* 1995, **6**:1842-1844.
76. Hara H, Waeber C, Huang PL, Fujii M, Fishman MC, Moskowitz MA: **Brain distribution of nitric oxide synthase in neuronal or endothelial nitric oxide synthase mutant mice using [3H]L-NG-nitro-arginine autoradiography.** *Neuroscience* 1996, **75**:881-890.
77. Kidd EJ, Michel AD, Humphrey PP: **Autoradiographic distribution of [3H]L-NG-nitro-arginine binding in rat brain.** *Neuropharmacology* 1995, **34**:63-73.
78. Vincent SR, Kimura H: **Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain.** *Neuroscience* 1992, **46**:755-784.
79. Kiss JP, Vizi ES: **Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission.** *Trends Neurosci* 2001, **24**:211-215.
80. Blum-Degen D, Heinemann T, Lan J, Pedersen V, Leblhuber F, Paulus W, Riederer P, Gerlach M: **Characterization and regional distribution of nitric oxide synthase in the human brain during normal ageing.** *Brain Res* 1999, **834**:128-135.
81. Downen M, Zhao ML, Lee P, Weidenheim KM, Dickson DW, Lee SC: **Neuronal nitric oxide synthase expression in developing and adult human CNS.** *J Neuropathol Exp Neurol* 1999, **58**:12-21.
82. Egberongbe YI, Gentleman SM, Falkai P, Bogerts B, Polak JM, Roberts GW: **The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain.** *Neuroscience* 1994, **59**:561-578.
83. Boissel JP, Schwarz PM, Förstermann U: **Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation.** *Nitric Oxide* 1998, **2**:337-349.
84. Zhang T, Haws P, Wu Q: **Multiple variable first exons: a mechanism for cell- and tissue-specific gene regulation.** *Genome Res* 2004, **14**:79-89.
85. Wang Y, Newton DC, Marsden PA: **Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance.** *Crit Rev Neurobiol* 1999, **13**:21-43.
86. Saur D, Seidler B, Paehge H, Schusdziarra V, Allescher HD: **Complex regulation of human neuronal nitric-oxide synthase exon 1c gene transcription. Essential role of Sp and ZNF family members of transcription factors.** *J Biol Chem* 2002, **277**:25798-25814.
87. Boissel JP, Zelenka M, Gödtel-Armbrust U, Feuerstein TJ, Förstermann U: **Transcription of different exons 1 of the human neuronal nitric oxide synthase gene is dynamically regulated in a cell- and stimulus-specific manner.** *Biol Chem* 2003, **384**:351-362.

88. Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH: **Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localizations in the brain.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:3396-3401.
89. Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Brecht DS: **Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy.** *Cell* 1995, **82**:743-752.
90. Xie J, Roddy P, Rife TK, Murad F, Young AP: **Two closely linked but separable promoters for human neuronal nitric oxide synthase gene transcription.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995, **92**:1242-1246.
91. Rife TK, Xie J, Redman C, Young AP: **The 5'2 promoter of the neuronal nitric oxide synthase dual promoter complex mediates inducibility by nerve growth factor.** *Brain Res Mol Brain Res* 2000, **75**:225-236.
92. Bros M, Boissel JP, Gödtel-Armbrust U, Förstermann U: **Transcription of human neuronal nitric oxide synthase mRNAs derived from different first exons is partly controlled by exon 1-specific promoter sequences.** *Genomics* 2006, **87**:463-473.
93. Saur D, Vanderwinden JM, Seidler B, Schmid RM, De Laet MH, Allescher HD: **Single-nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:1662-1667.
94. Ayoubi TA, Van De Ven WJ: **Regulation of gene expression by alternative promoters.** *FASEB J* 1996, **10**:453-460.
95. Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H: **Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III).** *FASEB J* 1998, **12**:773-790.
96. Newton DC, Bevan SC, Choi S, Robb GB, Millar A, Wang Y, Marsden PA: **Translational regulation of human neuronal nitric-oxide synthase by an alternatively spliced 5'-untranslated region leader exon.** *J Biol Chem* 2003, **278**:636-644.
97. Reif A, Herterich S, Strobel A, Ehli AC, Saur D, Jacob CP, Wienker T, Töpner T, Fritzen S, Walter U, et al: **A neuronal nitric oxide synthase (NOS-I) haplotype associated with schizophrenia modifies prefrontal cortex function.** *Mol Psychiatry* 2006, **11**:286-300.
98. Reif A, Jacob CP, Rujescu D, Herterich S, Lang S, Gutknecht L, Baehne CG, Strobel A, Freitag CM, Giegling I, et al: **Influence of functional variant of neuronal nitric oxide synthase on impulsive behaviors in humans.** *Arch Gen Psychiatry* 2009, **66**:41-50.
99. Rife T, Rasoul B, Pullen N, Mitchell D, Grathwol K, Kurth J: **The effect of a promoter polymorphism on the transcription of nitric oxide synthase 1 and its relevance to Parkinson's disease.** *J Neurosci Res* 2009, **87**:2319-2325.
100. Krishnan V, Wang X, Safe S: **Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells.** *J Biol Chem* 1994, **269**:15912-15917.
101. Porter W, Saville B, Hoivik D, Safe S: **Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor.** *Mol Endocrinol* 1997, **11**:1569-1580.
102. Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS: **Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites.** *Science* 1997, **277**:1508-1510.

103. Enmark E, Gustafsson JA: **Oestrogen receptors - an overview.** *J Intern Med* 1999, **246**:133-138.
104. Kushner PJ, Agard D, Feng WJ, Lopez G, Schiau A, Uht R, Webb P, Greene G: **Oestrogen receptor function at classical and alternative response elements.** *Novartis Found Symp* 2000, **230**:20-26; discussion 27-40.
105. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM: **The nuclear receptor superfamily: the second decade.** *Cell* 1995, **83**:835-839.
106. Beato M, Klug J: **Steroid hormone receptors: an update.** *Hum Reprod Update* 2000, **6**:225-236.
107. Beato M: **Gene regulation by steroid hormones.** *Cell* 1989, **56**:335-344.
108. Tsai MJ, O'Malley BW: **Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members.** *Annu Rev Biochem* 1994, **63**:451-486.
109. Yamashita S: **Localization and functions of steroid hormone receptors.** *Histol Histopathol* 1998, **13**:255-270.
110. Hall JM, McDonnell DP: **The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens.** *Endocrinology* 1999, **140**:5566-5578.
111. Osborne CK, Schiff R: **Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications.** *J Clin Oncol* 2005, **23**:1616-1622.
112. Kumar V, Chambon P: **The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer.** *Cell* 1988, **55**:145-156.
113. Göttlicher M, Heck S, Herrlich P: **Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action.** *J Mol Med (Berl)* 1998, **76**:480-489.
114. O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U: **Genomic targets of nuclear estrogen receptors.** *Mol Endocrinol* 2004, **18**:1859-1875.
115. Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustafsson JA, Safe S: **Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements.** *J Biol Chem* 2000, **275**:5379-5387.
116. Karin M, Liu Z, Zandi E: **AP-1 function and regulation.** *Curr Opin Cell Biol* 1997, **9**:240-246.
117. Safe S: **Transcriptional activation of genes by 17 beta-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions.** *Vitam Horm* 2001, **62**:231-252.
118. Lösel R, Wehling M: **Nongenomic actions of steroid hormones.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, **4**:46-56.
119. Pietras RJ, Szego CM: **Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells.** *Nature* 1977, **265**:69-72.
120. Simoncini T, Genazzani AR: **Non-genomic actions of sex steroid hormones.** *Eur J Endocrinol* 2003, **148**:281-292.
121. Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I: **Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae.** *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **263**:257-262.
122. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Varone G, Caruso A, Genazzani AR: **Dehydroepiandrosterone modulates endothelial nitric oxide synthesis via direct genomic and nongenomic mechanisms.** *Endocrinology* 2003, **144**:3449-3455.

123. Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, Liu P, German Z, Sherman TS, Mendelsohn ME, Anderson RG, Shaul PW: **Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae.** *Circ Res* 2000, **87**:E44-52.
124. Morley P, Whitfield JF, Vanderhyden BC, Tsang BK, Schwartz JL: **A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium.** *Endocrinology* 1992, **131**:1305-1312.
125. Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, McDonnell DP: **Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:4686-4691.
126. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS: **Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, **91**:8517-8521.
127. Gu Q, Moss RL: **17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade.** *J Neurosci* 1996, **16**:3620-3629.
128. Mayr B, Montminy M: **Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001, **2**:599-609.
129. Herzig S, Hedrick S, Morante I, Koo SH, Galimi F, Montminy M: **CREB controls hepatic lipid metabolism through nuclear hormone receptor PPAR-gamma.** *Nature* 2003, **426**:190-193.
130. Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Martin Villalba A, Tronche F, Kellendonk C, Gau D, Kapfhammer J, et al: **Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration.** *Nat Genet* 2002, **31**:47-54.
131. Carlezon WA, Duman RS, Nestler EJ: **The many faces of CREB.** *Trends Neurosci* 2005, **28**:436-445.
132. Barco A, Bailey CH, Kandel ER: **Common molecular mechanisms in explicit and implicit memory.** *J Neurochem* 2006, **97**:1520-1533.
133. Gonzalez GA, Yamamoto KK, Fischer WH, Karr D, Menzel P, Biggs W, Vale WW, Montminy MR: **A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence.** *Nature* 1989, **337**:749-752.
134. Gonzalez GA, Montminy MR: **Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133.** *Cell* 1989, **59**:675-680.
135. Brindle PK, Montminy MR: **The CREB family of transcription activators.** *Curr Opin Genet Dev* 1992, **2**:199-204.
136. Sassone-Corsi P: **Transcription factors responsive to cAMP.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995, **11**:355-377.
137. Dash PK, Karl KA, Colicos MA, Prywes R, Kandel ER: **cAMP response element-binding protein is activated by Ca²⁺/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**:5061-5065.
138. Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME: **CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases.** *Science* 1991, **252**:1427-1430.
139. Bacsikai BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, Adams SR, Kaang BK, Kandel ER, Tsien RY: **Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in Aplysia sensory neurons.** *Science* 1993, **260**:222-226.

140. Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, Tsien R, Montminy MR: **Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A.** *Mol Cell Biol* 1993, **13**:4852-4859.
141. Lonze BE, Ginty DD: **Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system.** *Neuron* 2002, **35**:605-623.
142. Shaywitz AJ, Greenberg ME: **CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals.** *Annu Rev Biochem* 1999, **68**:821-861.
143. Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P: **CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription.** *Cell* 1991, **64**:739-749.
144. Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P: **Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor.** *Cell* 1993, **75**:875-886.
145. Daly JW: **Forskolin, adenylate cyclase, and cell physiology: an overview.** *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* 1984, **17**:81-89.
146. Torrey EF, Webster M, Knable M, Johnston N, Yolken RH: **The stanley foundation brain collection and neuropathology consortium.** *Schizophr Res* 2000, **44**:151-155.
147. Higgs BW, Elashoff M, Richman S, Barci B: **An online database for brain disease research.** *BMC Genomics* 2006, **7**:70.
148. Bodovitz S: **The neural correlate of consciousness.** *J Theor Biol* 2008, **254**:594-598.
149. Seidman LJ, Yurgelun-Todd D, Kremen WS, Woods BT, Goldstein JM, Faraone SV, Tsuang MT: **Relationship of prefrontal and temporal lobe MRI measures to neuropsychological performance in chronic schizophrenia.** *Biol Psychiatry* 1994, **35**:235-246.
150. Bunney WE, Bunney BG: **Evidence for a compromised dorsolateral prefrontal cortical parallel circuit in schizophrenia.** *Brain Res Brain Res Rev* 2000, **31**:138-146.
151. Lewis DA: **Neuroplasticity of excitatory and inhibitory cortical circuits in schizophrenia.** *Dialogues Clin Neurosci* 2009, **11**:269-280.
152. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** *Nucleic Acids Res* 1988, **16**:1215.
153. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**:5463-5467.
154. Bradford MM: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248-254.
155. Gould SJ, Subramani S: **Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology.** *Anal Biochem* 1988, **175**:5-13.
156. Knudsen: *Analysis of DNA micorarray data.* second Edition edn: John Wiley & Sons, Inc.; 2004.
157. García-Durán M, de Frutos T, Díaz-Recasens J, García-Gálvez G, Jiménez A, Montón M, Farré J, Sánchez de Miguel L, González-Fernández F, Arriero MD, et al: **Estrogen stimulates neuronal nitric oxide synthase protein expression in human neutrophils.** *Circ Res* 1999, **85**:1020-1026.
158. Texereau J, Marullo S, Hubert D, Coste J, Dusser DJ, Dall'Ava-Santucci J, Dinh-Xuan AT: **Nitric oxide synthase 1 as a potential modifier gene of**

- decline in lung function in patients with cystic fibrosis.** *Thorax* 2004, **59**:156-158.
159. Silberberg G, Ben-Shachar D, Navon R: **Genetic analysis of nitric oxide synthase 1 variants in schizophrenia and bipolar disorder.** *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010, **153B**:1318-1328.
 160. Rich A, Nordheim A, Wang AH: **The chemistry and biology of left-handed Z-DNA.** *Annu Rev Biochem* 1984, **53**:791-846.
 161. Brahmachari SK, Meera G, Sarkar PS, Balagurumoorthy P, Tripathi J, Raghavan S, Shaligram U, Pataskar S: **Simple repetitive sequences in the genome: structure and functional significance.** *Electrophoresis* 1995, **16**:1705-1714.
 162. Rothenburg S, Koch-Nolte F, Haag F: **DNA methylation and Z-DNA formation as mediators of quantitative differences in the expression of alleles.** *Immunol Rev* 2001, **184**:286-298.
 163. Sharma VK, Kumar N, Brahmachari SK, Ramachandran S: **Abundance of dinucleotide repeats and gene expression are inversely correlated: a role for gene function in addition to intron length.** *Physiol Genomics* 2007, **31**:96-103.
 164. Vasudevaraju P, Bharathi, Garruto RM, Sambamurti K, Rao KS: **Role of DNA dynamics in Alzheimer's disease.** *Brain Res Rev* 2008, **58**:136-148.
 165. Deans Z, Dawson SJ, Xie J, Young AP, Wallace D, Latchman DS: **Differential regulation of the two neuronal nitric-oxide synthase gene promoters by the Oct-2 transcription factor.** *J Biol Chem* 1996, **271**:32153-32158.
 166. Li Y, Li G, Li C, Zhao Y: **Identification of nuclear factor-kappaB responsive element within the neuronal nitric oxide synthase exon 1f-specific promoter.** *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007, **39**:247-254.
 167. Carbone DL, Moreno JA, Tjalkens RB: **Nuclear factor kappa-B mediates selective induction of neuronal nitric oxide synthase in astrocytes during low-level inflammatory stimulation with MPTP.** *Brain Res* 2008, **1217**:1-9.
 168. Li Y, Zhao Y, Li G, Wang J, Li T, Li W, Lu J: **Regulation of neuronal nitric oxide synthase exon 1f gene expression by nuclear factor-kappaB acetylation in human neuroblastoma cells.** *J Neurochem* 2007, **101**:1194-1204.
 169. Cargnello M, Roux PP: **Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2011, **75**:50-83.
 170. Park HS, Mo JS, Choi EJ: **Nitric oxide inhibits an interaction between JNK1 and c-Jun through nitrosylation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **351**:281-286.
 171. Lee VM, Trojanowski JQ: **Mechanisms of Parkinson's disease linked to pathological alpha-synuclein: new targets for drug discovery.** *Neuron* 2006, **52**:33-38.
 172. Ischiropoulos H: **Oxidative modifications of alpha-synuclein.** *Ann N Y Acad Sci* 2003, **991**:93-100.
 173. Bönsch D, Lederer T, Reulbach U, Hothorn T, Kornhuber J, Bleich S: **Joint analysis of the NACP-REP1 marker within the alpha synuclein gene concludes association with alcohol dependence.** *Hum Mol Genet* 2005, **14**:967-971.
 174. Zhao X, Tang R, Gao B, Shi Y, Zhou J, Guo S, Zhang J, Wang Y, Tang W, Meng J, et al: **Functional variants in the promoter region of Chitinase 3-**

- like 1 (CHI3L1) and susceptibility to schizophrenia. *Am J Hum Genet* 2007, **80**:12-18.**
175. Talkowski ME, Seltman H, Bassett AS, Brzustowicz LM, Chen X, Chowdari KV, Collier DA, Cordeiro Q, Corvin AP, Deshpande SN, et al: **Evaluation of a susceptibility gene for schizophrenia: genotype based meta-analysis of RGS4 polymorphisms from thirteen independent samples.** *Biol Psychiatry* 2006, **60**:152-162.
176. Harrison PJ, Weinberger DR: **Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence.** *Mol Psychiatry* 2005, **10**:40-68; image 45.
177. Ratnam J, Teichberg VI: **Neurofilament-light increases the cell surface expression of the N-methyl-D-aspartate receptor and prevents its ubiquitination.** *J Neurochem* 2005, **92**:878-885.
178. Lang UE, Puls I, Muller DJ, Strutz-Seebohm N, Gallinat J: **Molecular mechanisms of schizophrenia.** *Cell Physiol Biochem* 2007, **20**:687-702.
179. Kirkebøen KA, Strand OA: **The role of nitric oxide in sepsis--an overview.** *Acta Anaesthesiol Scand* 1999, **43**:275-288.
180. Brown GC, Borutaite V: **Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1658**:44-49.
181. Brown GC: **Nitric oxide and neuronal death.** *Nitric Oxide* 2010, **23**:153-165.
182. Thomas DD, Espey MG, Ridnour LA, Hofseth LJ, Mancardi D, Harris CC, Wink DA: **Hypoxic inducible factor 1alpha, extracellular signal-regulated kinase, and p53 are regulated by distinct threshold concentrations of nitric oxide.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:8894-8899.
183. Thomas DD, Ridnour LA, Espey MG, Donzelli S, Ambis S, Hussain SP, Harris CC, DeGraff W, Roberts DD, Mitchell JB, Wink DA: **Superoxide fluxes limit nitric oxide-induced signaling.** *J Biol Chem* 2006, **281**:25984-25993.
184. Lancaster JR: **Nitroxidative, nitrosative, and nitrative stress: kinetic predictions of reactive nitrogen species chemistry under biological conditions.** *Chem Res Toxicol* 2006, **19**:1160-1174.
185. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA: **Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families.** *Science* 1993, **261**:921-923.
186. Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, Cooper NR, Eikelenboom P, Emmerling M, Fiebich BL, et al: **Inflammation and Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 2000, **21**:383-421.
187. Law A, Gauthier S, Quirion R: **Say NO to Alzheimer's disease: the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type.** *Brain Res Brain Res Rev* 2001, **35**:73-96.
188. Galimberti D, Scarpini E, Venturelli E, Strobel A, Herterich S, Fenoglio C, Guidi I, Scalabrini D, Cortini F, Bresolin N, et al: **Association of a NOS1 promoter repeat with Alzheimer's disease.** *Neurobiol Aging* 2008, **29**:1359-1365.
189. Reif A, Grünblatt E, Herterich S, Wichart I, Rainer MK, Jungwirth S, Danielczyk W, Deckert J, Tragl KH, Riederer P, Fischer P: **Association of a functional NOS1 promoter repeat with Alzheimer's disease in the VITA cohort.** *J Alzheimers Dis* 2011, **23**:327-333.

190. **Prevalence of chronic diseases in older Italians: comparing self-reported and clinical diagnoses. The Italian Longitudinal Study on Aging Working Group.** *Int J Epidemiol* 1997, **26**:995-1002.
191. Lo HS, Hogan EL, Soong BW: **5'-flanking region polymorphism of the neuronal nitric oxide synthase gene with Parkinson's disease in Taiwan.** *J Neurol Sci* 2002, **194**:11-13.
192. van Os J, Kenis G, Rutten BP: **The environment and schizophrenia.** *Nature* 2010, **468**:203-212.
193. van Os J, Rutten BP, Poulton R: **Gene-environment interactions in schizophrenia: review of epidemiological findings and future directions.** *Schizophr Bull* 2008, **34**:1066-1082.
194. Johansson C, Jackson DM, Zhang J, Svensson L: **Prepulse inhibition of acoustic startle, a measure of sensorimotor gating: effects of antipsychotics and other agents in rats.** *Pharmacol Biochem Behav* 1995, **52**:649-654.
195. Wiley JL, Golden KM, Bowen SE: **Effects of modulation of nitric oxide on acoustic startle responding and prepulse inhibition in rats.** *Eur J Pharmacol* 1997, **328**:125-130.
196. Klamer D, Pålsson E, Revesz A, Engel JA, Svensson L: **Habituation of acoustic startle is disrupted by psychotomimetic drugs: differential dependence on dopaminergic and nitric oxide modulatory mechanisms.** *Psychopharmacology (Berl)* 2004, **176**:440-450.
197. Klamer D, Engel JA, Svensson L: **Phencyclidine-induced behaviour in mice prevented by methylene blue.** *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004, **94**:65-72.
198. Klamer D, Engel JA, Svensson L: **The neuronal selective nitric oxide synthase inhibitor, Nomega-propyl-L-arginine, blocks the effects of phencyclidine on prepulse inhibition and locomotor activity in mice.** *Eur J Pharmacol* 2004, **503**:103-107.
199. Klamer D, Pålsson E, Fejgin K, Zhang J, Engel JA, Svensson L: **Activation of a nitric-oxide-sensitive cAMP pathway with phencyclidine: elevated hippocampal cAMP levels are temporally associated with deficits in prepulse inhibition.** *Psychopharmacology (Berl)* 2005, **179**:479-488.
200. Bernstein HG, Bogerts B, Keilhoff G: **The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review.** *Schizophr Res* 2005, **78**:69-86.
201. Andreasen NC, O'Leary DS, Flaum M, Nopoulos P, Watkins GL, Boles Ponto LL, Hichwa RD: **Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naïve patients.** *Lancet* 1997, **349**:1730-1734.
202. Xing G, Chavko M, Zhang LX, Yang S, Post RM: **Decreased calcium-dependent constitutive nitric oxide synthase (cNOS) activity in prefrontal cortex in schizophrenia and depression.** *Schizophr Res* 2002, **58**:21-30.
203. Coyle JT: **The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia.** *Harv Rev Psychiatry* 1996, **3**:241-253.
204. Coyle JT: **Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis.** *Cell Mol Neurobiol* 2006, **26**:365-384.
205. Murray CJ, Lopez AD: **Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study.** *Lancet* 1997, **349**:1498-1504.
206. Levinson DF: **The genetics of depression: a review.** *Biol Psychiatry* 2006, **60**:84-92.
207. Lundquist G: **Somatic and mental stress as causative factors in depression.** *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1961, **162**:267-271.

208. Saveanu RV, Nemeroff CB: **Etiology of depression: genetic and environmental factors.** *Psychiatr Clin North Am* 2012, **35**:51-71.
209. Zhou QG, Hu Y, Hua Y, Hu M, Luo CX, Han X, Zhu XJ, Wang B, Xu JS, Zhu DY: **Neuronal nitric oxide synthase contributes to chronic stress-induced depression by suppressing hippocampal neurogenesis.** *J Neurochem* 2007, **103**:1843-1854.
210. Khovryakov AV, Podrezova EP, Kruglyakov PP, Shikhanov NP, Balykova MN, Semibratova NV, Sosunov AA, McKhann G, Airapetyants MG: **Involvement of the NO synthase system in stress-mediated brain reactions.** *Neurosci Behav Physiol* 2010, **40**:333-337.
211. Warner-Schmidt JL, Duman RS: **Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment.** *Hippocampus* 2006, **16**:239-249.
212. Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ: **Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action.** *Nat Neurosci* 2006, **9**:519-525.
213. Altman J, Das GD: **Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats.** *J Comp Neurol* 1965, **124**:319-335.
214. Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH: **More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment.** *Nature* 1997, **386**:493-495.
215. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH: **Neurogenesis in the adult human hippocampus.** *Nat Med* 1998, **4**:1313-1317.
216. Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E: **Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:3168-3171.
217. Shariful Islam AT, Nakamura K, Seki T, Kuraoka A, Hirata K, Emson PC, Kawabuchi M: **Expression of NOS, PSA-N-CAM and S100 protein in the granule cell migration pathway of the adult guinea pig forebrain.** *Brain Res Dev Brain Res* 1998, **107**:191-205.
218. Islam AT, Kuraoka A, Kawabuchi M: **Morphological basis of nitric oxide production and its correlation with the polysialylated precursor cells in the dentate gyrus of the adult guinea pig hippocampus.** *Anat Sci Int* 2003, **78**:98-103.
219. Moreno-López B, Noval JA, González-Bonet LG, Estrada C: **Morphological bases for a role of nitric oxide in adult neurogenesis.** *Brain Res* 2000, **869**:244-250.
220. Chen J, Tu Y, Moon C, Matarazzo V, Palmer AM, Ronnett GV: **The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance.** *Dev Biol* 2004, **269**:165-182.
221. Packer MA, Stasiv Y, Benraiss A, Chmielnicki E, Grinberg A, Westphal H, Goldman SA, Enikolopov G: **Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:9566-9571.
222. Moreno-López B, Romero-Grimaldi C, Noval JA, Murillo-Carretero M, Matarredona ER, Estrada C: **Nitric oxide is a physiological inhibitor of neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and olfactory bulb.** *J Neurosci* 2004, **24**:85-95.
223. Zhu XJ, Hua Y, Jiang J, Zhou QG, Luo CX, Han X, Lu YM, Zhu DY: **Neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide inhibits neurogenesis in the**

- adult dentate gyrus by down-regulating cyclic AMP response element binding protein phosphorylation.** *Neuroscience* 2006, **141**:827-836.
224. Harkin AJ, Bruce KH, Craft B, Paul IA: **Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test.** *Eur J Pharmacol* 1999, **372**:207-213.
225. Harkin A, Connor TJ, Walsh M, St John N, Kelly JP: **Serotonergic mediation of the antidepressant-like effects of nitric oxide synthase inhibitors.** *Neuropharmacology* 2003, **44**:616-623.
226. Joca SR, Guimarães FS: **Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects.** *Psychopharmacology (Berl)* 2006, **185**:298-305.
227. Suzuki E, Yagi G, Nakaki T, Kanba S, Asai M: **Elevated plasma nitrate levels in depressive states.** *J Affect Disord* 2001, **63**:221-224.
228. Millan MJ: **Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application.** *Pharmacol Ther* 2006, **110**:135-370.
229. Angulo J, Peiró C, Sanchez-Ferrer CF, Gabancho S, Cuevas P, Gupta S, Sáenz de Tejada I: **Differential effects of serotonin reuptake inhibitors on erectile responses, NO-production, and neuronal NO synthase expression in rat corpus cavernosum tissue.** *Br J Pharmacol* 2001, **134**:1190-1194.
230. Harvey BH, Retief R, Korff A, Wegener G: **Increased hippocampal nitric oxide synthase activity and stress responsiveness after imipramine discontinuation: role of 5HT 2A/C-receptors.** *Metab Brain Dis* 2006, **21**:211-220.
231. Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, et al: **Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants.** *Science* 2003, **301**:805-809.
232. Malberg JE: **Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action.** *J Psychiatry Neurosci* 2004, **29**:196-205.
233. Yu YW, Chen TJ, Wang YC, Liou YJ, Hong CJ, Tsai SJ: **Association analysis for neuronal nitric oxide synthase gene polymorphism with major depression and fluoxetine response.** *Neuropsychobiology* 2003, **47**:137-140.
234. Okumura T, Kishi T, Okochi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Tsunoka T, Inada T, et al: **Genetic association analysis of functional polymorphisms in neuronal nitric oxide synthase 1 gene (NOS1) and mood disorders and fluvoxamine response in major depressive disorder in the Japanese population.** *Neuropsychobiology* 2010, **61**:57-63.
235. Craig I, Plomin R: **Quantitative trait loci for IQ and other complex traits: single-nucleotide polymorphism genotyping using pooled DNA and microarrays.** *Genes Brain Behav* 2006, **5 Suppl 1**:32-37.
236. Tandon K, McGuffin P: **The genetic basis for psychiatric illness in man.** *Eur J Neurosci* 2002, **16**:403-407.
237. Bouchard TJ, Jr., Loehlin JC: **Genes, evolution, and personality.** *Behav Genet* 2001, **31**:243-273.
238. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL: **Association of anxiety-related traits**

- with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region.** *Science* 1996, **274**:1527-1531.
239. Nelson RJ, Demas GE, Huang PL, Fishman MC, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH: **Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase.** *Nature* 1995, **378**:383-386.
240. Kriegsfeld LJ, Dawson TM, Dawson VL, Nelson RJ, Snyder SH: **Aggressive behavior in male mice lacking the gene for neuronal nitric oxide synthase requires testosterone.** *Brain Res* 1997, **769**:66-70.
241. Saudou F, Amara DA, Dierich A, LeMeur M, Ramboz S, Segu L, Buhot MC, Hen R: **Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor.** *Science* 1994, **265**:1875-1878.
242. Bouwknecht JA, Hijzen TH, van der Gugten J, Maes RA, Hen R, Olivier B: **Absence of 5-HT(1B) receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT(1B) knockout mice.** *Biol Psychiatry* 2001, **49**:557-568.
243. Salis PJ, Dewsbury DA: **p-chlorophenylalanine facilitates copulatory behaviour in male rats.** *Nature* 1971, **232**:400-401.
244. Albert DJ, Walsh ML: **Neural systems and the inhibitory modulation of agonistic behavior: a comparison of mammalian species.** *Neurosci Biobehav Rev* 1984, **8**:5-24.
245. Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM, Nelson RJ: **Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:1277-1281.
246. Chanrion B, Mannoury la Cour C, Bertaso F, Lerner-Natoli M, Freissmuth M, Millan MJ, Bockaert J, Marin P: **Physical interaction between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:8119-8124.
247. Marin P, Chanrion B, Bockaert J: **[When two molecules involved in the regulation of mood meet: mutual modulation of the serotonin transporter and neuronal NO-synthase].** *Med Sci (Paris)* 2007, **23**:554-555.
248. Chiavegatto S, Nelson RJ: **Interaction of nitric oxide and serotonin in aggressive behavior.** *Horm Behav* 2003, **44**:233-241.
249. Reif A, Kiive E, Kurrikoff T, Paaver M, Herterich S, Konstabel K, Tulviste T, Lesch KP, Harro J: **A functional NOS1 promoter polymorphism interacts with adverse environment on functional and dysfunctional impulsivity.** *Psychopharmacology (Berl)* 2011, **214**:239-248.
250. Hoogman M, Aarts E, Zwiers M, Slaats-Willemse D, Naber M, Onnink M, Cools R, Kan C, Buitelaar J, Franke B: **Nitric oxide synthase genotype modulation of impulsivity and ventral striatal activity in adult ADHD patients and healthy comparison subjects.** *Am J Psychiatry* 2011, **168**:1099-1106.
251. Ströhle A, Stoy M, Wrase J, Schwarzer S, Schlagenhauf F, Huss M, Hein J, Nedderhüt A, Neumann B, Gregor A, et al: **Reward anticipation and outcomes in adult males with attention-deficit/hyperactivity disorder.** *Neuroimage* 2008, **39**:966-972.
252. Hariri AR, Brown SM, Williamson DE, Flory JD, de Wit H, Manuck SB: **Preference for immediate over delayed rewards is associated with magnitude of ventral striatal activity.** *J Neurosci* 2006, **26**:13213-13217.
253. Orelund L, Hallman J, Damberg M: **Platelet MAO and personality--function and dysfunction.** *Curr Med Chem* 2004, **11**:2007-2016.

Literaturverzeichnis

254. Laas K, Reif A, Herterich S, Eensoo D, Lesch KP, Harro J: **The effect of a functional NOS1 promoter polymorphism on impulsivity is moderated by platelet MAO activity.** *Psychopharmacology (Berl)* 2010, **209**:255-261.
255. Retz W, Reif A, Freitag CM, Retz-Junginger P, Rösler M: **Association of a functional variant of neuronal nitric oxide synthase gene with self-reported impulsiveness, venturesomeness and empathy in male offenders.** *J Neural Transm* 2010, **117**:321-324.
256. Fusar-Poli P: **Voxel-wise meta-analysis of fMRI studies in patients at clinical high risk for psychosis.** *J Psychiatry Neurosci* 2012, **37**:106-112.
257. Lodish H, Berk A, SL Z: **Molecular Cell Biology.** 4 edn: New York: W. H. Freeman; 2000.

6. Anhang

Sequenz: Nos1_Ex1f_31

```

          10          20          30          40          50
1 ntgcagtgca ggtgccagac atttctctat cgataggtac cgagctctta 50
51 cgcgtagctag cccctcctc tgcccaaata gacctgccct gccctgcgtg 100
101 gctactacat tcagccctat ccaggtccc agaaattgtc attgtgtgtg 150
151 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtatgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 200
201 tgtttcctga tagaaaaaaa aaaatggaaa ttaggttata taaaagatgt 250
251 atgcttttga gccagagcg gctcttttaa tgagggttgc gacgtctccc 300
301 tccccacacc cataaaccag tcgggttga cgtcactgct aattcgttc 350
351 agtgatgata ggataaagga gggacattaa gaaataaatt cccctcacg 400
401 accctcgctg agctcacggc tcaagtcctt acatatttat tgccccgcgt 450
451 tttccnn 457

```

pGL3

30 Repeats = 60 bp

Längenunterschied zwischen Nos1_Ex1f_31 und Nos1_Ex1f_31mod: 38 bp

Sequenz: Nos1_Ex1f_31mod

```

          10          20          30          40          50
1 ntgcagtgca ggtgccagac atttctctat cgataggtac cgagctctta 50
51 cgcgtagctag cccctactac attcagccct atccaggctc ccagaaattg 100
101 tcattgtgtg tgtgtgtgtg tcgtgtgtcg tgtgtgtgtg tatgtgtgtg 150
151 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtt tcctgataga aaaaaaaaaa tggaaattag 200
201 gttatataaa agatgtatgc tttggagccc agagcggctc ttttaattag 250
251 ggttgcgacg tctccctccc cacaccata aaccagtcgg gttggacgct 300
301 actgctaatt cgtttcagtg atgataggat aaaggagggg cattaagaaa 350
351 taaattcccc ctcacgacct tcgctgagct cacggctcag tccctacata 400
401 tttatgccgc gtttcagcc gctgggtgag gagctactta gcgccgccc 450
451 tcct 454

```

pGL3

32 Repeats = 64 bp

Sequenz: Nos1_Ex1f_25

```

          10          20          30          40          50
1 ntgcagtgca ggtgccagac atttctctat cgataggtac cgagctctta 50
51 cgcgtagctag ccccttctc tgcccaaata gacctgccct cccctgcgtg 100
101 gctactacat tcagccctat ccaggtccc agaaattgtc attgtgtgtg 150
151 tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtttcctga 200
201 tagaaaaaaa aatggaaatt aggttatata aaagatgtat gctttggagc 250
251 ccagagcggc tcttttaatg agggttgcga cgtctccctc cccacacca 300
301 taaaccagtc gggttgacg tctactgctaa ttcgtttcag tgatgatagg 350
351 ataaaggagg gacattaaga aataaattcc ccctcacgac cctcgctgag 400
401 ctcacggctc agtccctaca tatttatgcc cgtttccag ccggtgggtg 450
451 aggagctact tagcgccgag ctcctccgag gggcgggggc tcgagatctg 500
501 catctaagta gcttgcattc cggctctgtg gtaaan 536

```

pGL3

25 Repeats = 50 bp

Längenunterschied zwischen Nos1_Ex1f_25 und Nos1_Ex1f_25mod: 38 bp

Anhang

Sequenz: Nos1_Ex1f_25mod

```
      10      20      30      40      50
1  tgcggtgccg acatttctct atcgataggt accgagctct tacgcggtgct 50
51 agccccctta cattcagccc tatccaggct cccagaaatt gtcattgtgt 100
101 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtatgtgt gcgtgtgtgt gtgtgtttcc 150
151 tgatagaaaa aaaaaaaaaatg gaaattaggt tatataaaag atgtatgctt 200
201 tggagcccag agcggctctt ttaatgaggg ttgcgacgct tccctcccca 250
251 cacccataaa ccagtcgggt tggacgtcac tgctaattcg tttcagtgat 300
301 gataggataa aggagggaca ttaagaaata aattccccct cacgaccctc 350
351 gctgagctca cggctcagtc cctacatatt tatgccgcgt ttccagccgc 400
401 tgggtgagga gctcttagcg ccgcggtccc tccgaggggc gggggctcga 450
451 gatctgcgat ctaagtaagc ttggcattcc ggtnctgttg gtaaagcccc 500
501 tggaaagacc aacataaag aaggccggcg cttcatccn t 541
```

pGL3

25 Repeats = 50 bp

Sequenz: Nos1_Ex1f_20

```
      10      20      30      40      50
1  atttatgcgt gntanccctt tttgngcaaa nanacacggn cctcncnngg 50
51 ggggattaca ctttagncnc gatacacggn cccacaaaaa gtcacantgt 100
101 gtgtgtgtgt gtgtgtgtat gtgtgtgtgt gtgtgttttc ctgatagaaa 150
151 aaaaaatgga aattagggtta tataaaagat gtatgctttg gagcccagag 200
201 cggctctttt aatgaggggt gcgacgtctc ccctcccca cacccataaa 250
251 ccagtcgggt tggacgtcac tgctaattcg tttcagtgat gataggataa 300
301 aggagggaca ttaagaaata aattccccct cacgaccctc gctgagctca 350
351 cggctcagtc cctacatatt tatgccgcgt ttccagccgc tgggtgagga 400
401 gctacttagc gccgcggtcc ctccgagggg cgggggctcg agatctgcga 450
451 tctaagtaag cttggcatcc ggtactgtgg aaagccacca 490
```

pGL3

19 Repeats = 38 bp

Längenunterschied zwischen Nos1_Ex1f_20 und Nos1_Ex1f_20mod: 38 bp

Sequenz: Nos1_Ex1f_20mod

```
      10      20      30      40      50
1  catttctcta tngataggac cgagctctta cgcgtgctta gccccacta 50
51 cattcagccc tatccaggct cccagaaatt gtcattgtgt gtgtgtgtgt 100
101 gtgtgtgtat gtgtgtgtgt gtgtgtgttt cctgatagaa agaaaaatgg 150
151 aaattagggt atataaaaga tgtatgcttt ggagcccaga gcggctcgtt 200
201 taatgaggggt tgcgacgtct ccctccccac acccataaac cagtcgggtt 250
251 ggacgtcact gctaattcgt ttcagtgatg ataggataaa ggagggacat 300
301 taagaaataa attccccctc acgaccctcg ctgagctcac ggctcagtc 350
351 ctacatattt atgccgcggt tccagccgct ggggtgaggag ctacttagcg 400
401 ccgcggtccc tccgaggggc gggggctcga gatctgcgat ctaagtaagc 450
451 tggcatccgg tactgtngaa agccacca 478
```

pGL3

21 Repeats = 42 bp

Anhang

Sequenz: Nos1_Ex1f_20mod_INV

```
          10          20          30          40          50
  1 ntgcagtgca ggtgccagac atttctctat cgataggtac cgagctctta 50
  51 cgcgtgctag cccccgccc tcggaggagc cgcggcgcta agtagctcct 100
 101 caccagcgg ctggaaacgc ggcataaata tgtagggact gagccgtgag 150
 151 ctcagcgagg gtcgtgaggg ggaatttatt tcttaatgtc cctcctttat 200
 201 cctatcatca ctgaaacgaa ttagcagtga cgtccaaccc gactgggtta 250
 251 tgggtgtggg gagggagacg tcgcaaccct cattaaaaga gccgctctgg 300
 301 gctccaaagc atacatcttt tatataacct aatttccatt ttttttctat 350
 351 caggaaacac acacacacac acacatacac acacacacac acacacaatg 400
 401 acaatttctg ggagcctgga tagggctgaa tgtagtgggg gctcgagatc 450
 451 tgcgatctaa gtaagcttgg cattccggtc tgttggtaaa gccccatgga 500
 501 agacccaaaa cata                                     514
```

pGL3

20 Repeats = 40 bp

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von der Ethik-Kommission der Universität Würzburg genehmigt (Antrag 142/03, Votum 186/09, Votum 205/09).

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Reif für die Überlassung des Themas, der Vergabe der Arbeit und der geduldigen, motivierenden Betreuung der Dissertation.

Bei Herrn Prof. Dr. K.-P. Lesch bedanke ich mich für die Möglichkeit, die molekularbiologischen Experimente im Labor für psychiatrische Neurobiologie der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Würzburg durchzuführen.

Für die Betreuung der Laborarbeit und die unschätzbare Anleitung beim Erstellen der Genkonstrukte bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. L. Gutknecht.

Für die unermüdliche Unterstützung in allen Fragen der Laborarbeit, möchte ich mich beim gesamten Laborteam bedanken, insbesondere bei Frau G. Ortega und Frau T. Töpner.

Frau Dr. S. Herterich aus dem Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie danke ich für die Durchführung der Genotypisierung der DNA des BA 46.

Frau Dr. L. Weißflog danke ich für die Korrekturhinweise am Methodenteil.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für die stetige Motivation während des Studiums und der Dissertation.

Frau Dr. K. Blecharz, die mich mit fachlichem und emotionalem Beistand ausdauernd begleitet, bin ich zutiefst dankbar.