

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und
Psychotherapie der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

**Untersuchungen zur molekularen Funktionalität des
NOS1 Exon 1f VNTR**

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Universität Würzburg

vorgelegt von Martin Reuß

aus Marktsteinach

Würzburg, im August 2013

Referent: Prof. Dr. Andreas Reif

Koreferent: Prof. Dr. Harald Wajant

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2017

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Genetische Ursachen psychischer Erkrankungen	4
1.2	<i>NOS1</i> und deren Expression	7
1.3	Regulation und Lokalisation von NOS-I	8
1.4	Die Wirkungsweise von NOS-I auf molekularer Ebene.....	9
1.4.1	Die NOS-I – vermittelte Katalyse	10
1.4.2	Protein – Proteininteraktion von NOS-I mit dem Serotonintransporter	12
1.5	Verbindungen zwischen <i>NOS1/NOS-I</i> und <i>NOS3/NOS-III</i> und der bipolar-affektiven Störung.....	13
1.6	Periphere Marker des nitriergen Systems bei psychischen Erkrankungen	14
1.7	Gen – Umweltinteraktionen und Epigenetik	15
1.8	B – und Z – DNA.....	17
1.9	Fragestellung	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Material	19
2.1.1	DNA	19
2.1.2	Chemikalien	19
2.1.3	Puffer	21
2.1.4	Verbrauchsmaterial.....	22
2.1.5	Geräte.....	23
2.1.6	Software und Datenbanken	24
2.1.7	Enzyme.....	25
2.1.8	Antikörper	25
2.1.9	Kits.....	26
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Das Bisulfit – PCR Sequenzier Protokoll	26

2.2.2	Methylierungsanalyse durch Pyrosequenzierung	35
2.2.3	Quantifizierung der Z – DNA – Bildung im <i>NOS1</i> Exon 1f VNTR	38
2.2.4	Periphere Marker der NOS-Aktivität und periphere Expression von <i>NOS1</i> und <i>NOS3</i>	41
3	Ergebnisse	46
3.1	Methylierungsuntersuchungen im <i>NOS1</i> Exon 1f Promoter.....	46
3.1.1	Ergebnisse der Klonierung in pCRII.....	46
3.1.2	Ergebnisse aus dem Bisulfit – PCR Sequenzierungsprotokoll	48
3.1.3	Ergebnisse der Pyrosequenzierung	48
3.2	Untersuchung der DNA Sekundärstruktur im <i>NOS1</i> Exon 1f Promotor	51
3.2.1	Ergebnisse der ELISA gegen Z – DNA	51
3.2.2	Dot – Blot	52
3.3	Bestimmung peripherer Marker von <i>NOS1/NOS-I</i> und <i>NOS3/NOS-III</i> bei Bipolar–affektiv erkrankten Patienten, ADHS-Patienten und Kontrollen	54
3.3.1	Bestimmung des NO _x ⁻ -Spiegels	54
3.3.2	Bestimmung der Expression von <i>NOS3</i> und <i>NOS1</i> in Leukozyten	57
4	Diskussion.....	59
4.1	Methylierungsanalyse	60
4.2	Sekundärstruktur des <i>NOS1</i> Exon 1f VNTR	64
4.3	Bestimmung peripherer Marker des <i>NOS1/NOS-I</i> – und des <i>NOS3/NOS-III</i> – Systems bei der Bipolar affektiven Störung	65
5	Zusammenfassung	68
6	Abbildungsverzeichnis.....	70
7	Tabellenverzeichnis.....	70

8	Abkürzungsverzeichnis.....	72
9	Nukleotidsequenzen	73
9.1	Epigenetik.....	73
9.1.1	Die <i>NOS1</i> Exon 1f CpG Island (chr12:117,797,846-117,800,000).....	73
9.1.2	Primersequenzen für die Amplifikation der CGI	76
9.1.3	Primersequenz für die Kolonie-PCR	78
9.1.4	Primersequenzen für die Pyrosequenzierung	78
9.1.5	Sequenzen von Pyro A und Pyro B.....	78
9.2	DNA – Sekundärstruktur im <i>NOS1</i> Exon 1f VNTR.....	79
9.2.1	Vektor 8F' (29 Wiederholungen)	79
9.2.2	Vektor 53F' (24 Wiederholungen)	79
9.2.3	Vektor 150F' (19 Wiederholungen)	80
10	Literaturverzeichnis.....	80
11	Lebenslauf.....	99

1 Einleitung

1.1 Genetische Ursachen psychischer Erkrankungen

Menschen unterscheiden sich in der Nukleotidreihenfolge (Sequenz) ihrer DNA. Unterscheidungsstellen, bei welchen die Häufigkeit des selteneren Allels mehr als 1 % beträgt, bezeichnet man als Polymorphismen. [1, 2] Diese Polymorphismen tragen zur individuellen Anfälligkeit gegenüber häufigen psychischen Krankheiten wie der Schizophrenie [3, 4], dem Aufmerksamkeitsdefizit – Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) [5, 6] oder der bipolar-affektiven Störung (BPD) [7, 8] bei.

Die einfachste Art von Polymorphismen sind Einzelnukleotidpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), bei diesen ist ein einzelnes Nukleotid entweder durch ein anderes ersetzt, ist zusätzlich vorhanden oder fehlt ganz. Das *1000 Genomes Project Consortium* hat 2010 eine Karte mit 15 Millionen SNPs, die ca. 90% aller SNPs repräsentieren, vorgestellt. [9] Mit Satelliten – DNA werden tandemartig wiederholte DNA – Abschnitte bezeichnet. Je nach Größe der repetitiven Einheit und der Gesamtgröße des Abschnitts wird der Bereich als Satellit, Minisatellit oder Mikrosatellit bezeichnet. Ein Synonym für Minisatellit ist *Variable number of tandem repeats* (VNTR, variable Tandemwiederholungsanzahl). [10, 11] Die letzte hier vorgestellte Art genomischer Polymorphismen sind sog. *Copy number variations* (CNV). Bei einem CNV liegen mehr oder weniger Kopien eines größeren genomischen Bereichs vor. Diese CNVs machen vermutlich 12 % der gesamten Varianz des Genoms aus. [12, 13] Ein Spezialfall dieser CNVs sind numerische Chromosomenabberationen wie die Trisomie 21. Weitere Einzelheiten zu den CNVs können der umfangreichen Übersichtsliteratur entnommen werden. [14–18]

Bei der Betrachtung einiger seltener erblicher Krankheiten wie dem Prader – Willi – Syndrom [19], dem Rett – Syndrom [20] oder Chorea Huntington [21] konnten definierte Veränderungen im Genom gefunden werden, welche die jeweilige Erkrankung mit nahezu 100 % Wahrscheinlichkeit (oder Penetranz) auslösen. Für die meisten häufigeren Erkrankungen (s. o.) wurden jedoch keine Sequenzunterschiede gefunden, die mit ähnlich hohen Wahrscheinlichkeitswerten die betreffende Krankheit verursachen. Vielmehr tragen mehrere Gene bzw. Polymorphismen in diesen Genen im Zusammenspiel mit Umweltfaktoren zur Krankheitsentstehung bei, man spricht auch von einem komplexen Erbgang. [16]

Einige wenige Polymorphismen können als nicht-synonyme SNPs die Aminosäuresequenz des Proteins verändern und so u. a. Krankheitsrisiken modifizieren. [22] Die meisten Polymorphismen wirken auf molekularer Ebene aber vermutlich subtiler, z. B. über die Genexpressionsstärke oder mRNA – Splicing. So wird z. B. für die CNVs angenommen, dass durch eine fehlende Kopie die Proteinmenge erniedrigt wird. Darüber hinaus können Fusionsproteine durch die Veränderung der chromosomalen Struktur entstehen oder regulatorisch wirkende DNA – Sequenzen könnten hinzugefügt oder entfernt werden. [23, 16] Die genaue molekulare Funktion der meisten Polymorphismen, insbesondere der meisten SNPs und VNTRs ist jedoch noch unbekannt. [24, 25]

Die einfachste Möglichkeit einen Zusammenhang zwischen einem Gen und einem Phänotyp, also z. B. einer Krankheit oder einem Persönlichkeitsmerkmal herzustellen, ist es, eine Assoziationsstudie durchzuführen. In einer solchen Studie wird untersucht, ob es unterschiedliche Verteilungen einzelner Polymorphismen in Gruppen unterschiedlichen Phänotyps gibt. Ein signifikanter Unterschied in der Verteilung des Polymorphismus / der Polymorphismen zwischen den Gruppen legt dann nicht nur zwischen Phänotyp und Polymorphismus einen Zusammenhang nahe, sondern auch zwischen dem Gen, in dem der Polymorphismus liegt und dem Phänotyp. [26, 27]

Zur Integration der Ergebnisse der durchgeführten Assoziationsstudien bei multifaktoriellen Krankheiten wurden zwei ätiologische Modelle aufgestellt: Das “*common disease – rare variant*“ (verbreite Krankheit – seltenes Krankheitsallel) Modell und das “*common disease – common variant*“ (verbreitete Krankheit – verbreitetes Allel) Modell. [28] Mit Hilfe des *common disease – rare variant* Modells erklärt man den genetischen Einfluss auf die Krankheitsentstehung durch viele selten vorkommende Polymorphismen, insbesondere durch seltene CNVs, die die Wahrscheinlichkeit des Krankheitsausbruches stark erhöhen. [29, 30] Besonders Familien, in denen die komplex vererbten Krankheiten häufig vorkommen, werden in diesem Modell berücksichtigt. Die betroffenen Familienmitglieder haben demnach einen oder mehrere seltene Polymorphismen, die das Krankheitsrisiko stark ansteigen lassen. [31] Jedoch handelt es sich hier um sog. private Mutationen, die nur in den jeweiligen Familien eine Rolle spielen. Diese Fälle können durch das *common disease – common variant* Modell besser erklärt werden. Nach diesem Modell gibt es viele häufige Polymorphismen, die das Krankheitsrisiko nur moderat steigern, die aber miteinander interagieren und so in Summe das Risiko überschwellig werden lassen; besonders SNPs wurden hier untersucht. [32–35]

In genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) zeigten sich gemäß dem *common disease – common variant* Modell viele verschiedene SNPs, die in der Experimentalgruppe nur wenig stärker verbreitet sind. Um solche Polymorphismen, die eine geringe Assoziation zur komplexen Krankheit zeigen, zu detektieren, wird die Stichproben oft auf mehrere zehntausend Teilnehmer ausgedehnt. [36] Nichtsdestoweniger ist der genetische Einfluss auf das Erkrankungsrisiko verschiedener komplexer Krankheiten, welches durch Zwillingsstudien ermittelt wurde, durch bekannte genetische Varianten nur zu etwa 10% erklärbar. [37] Das Unvermögen, die genetische Komponente des Krankheitsrisikos zu erklären, wird auch als „missing heritability problem“ bezeichnet. [25, 38, 39] Wegen methodischer Schwierigkeiten wurden VNTRs in einem genomweiten Ansatz bislang nicht untersucht, der Beitrag zum Gesamtrisiko ist deswegen schwer abzuschätzen. [10]

1.2 NOS1 und deren Expression

NOS1 gilt als eines der komplexesten Gene des Menschen, mit seiner genomischen Größe von 240 kb [40] besitzt es mehr Nukleotide als das Genom des kleinsten bekannten Bakteriums. [41] *NOS1* verfügt über 28 in allen Transkripten vorkommende Exons und zwölf alternative erste Exons. Für elf dieser alternativen Exons wurde jeweils eine eigene Promotorregion detektiert, die als Startpunkt für die Transkription dienen kann. Nach der Transkription wird das alternative erste Exon an das Exon 2 gespleisst. Das Startcodon für die Translation liegt meistens im Exon 2, das Stopcodon auf dem Exon 29. [42–45] *NOS1* kodiert für die neuronale Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS oder NOS-I), die nicht nur in neuronalem Gewebe sondern u. a. im Respirationstrakt, im Muskel- und im Nierengewebe exprimiert wird. [46–48] Neben *NOS1* existieren beim Menschen noch die immunologische (iNOS bzw. NOS-II kodiert durch *NOS2*) [49] und die endotheliale NOS (eNOS bzw. NOS-III kodiert durch *NOS3*) [50]. Einen Überblick über alle NOS liefern folgende Übersichtsarbeiten. [51, 52]

Da die alternativen ersten Exons von *NOS1* durch unterschiedliche Gruppen untersucht wurden, ergeben sich unterschiedliche Nomenklaturen und Sequenzen der alternativen ersten Exons [44, 43, 53, 54]. Ein Vergleich der Nomenklaturen der alternativen Exons und ihre Reihenfolge in 5′ – 3′ Richtung ist Tab. 1 zu entnehmen.

Tabelle 1. Nomenklaturvergleich der alternativen ersten Exons von *NOS1*

Boissel	1a	1b	1c ^a	1d	1e	1f	1g	1h ^a	1i	1j	1k	1l
Wang	1d	1a	1b	1c	1e	1f	1g	1h	nd ^c	1i	AS ^b	nd ^c

^a wurde in die Nomenklatur aufgenommen, in der Studie aber nicht gefunden.

^b nach Wang et al. zwischen einem alternativen Exon und Exon 2 eingefügt.

^c von Wang et al. nicht gefunden.

Mit Hilfe von [43, 40, 42, 55]

Im Folgenden wird die Nomenklatur von Wang et al. verwendet. [40]

Nos1 ist bei Mäusen und Ratten weniger komplex als beim Menschen, so gibt es bei der Maus drei [56] und bei der Ratte sechs [57, 58] alternative erste Exons. Bei der Untersuchung dieser Exons zeigte sich, dass die menschlichen Exons 1f und 1g evolutionär hoch konserviert sind, sie entsprechen bei der Maus den Exons 1b und 1a und bei der Ratte den Exons 1a und 1p. [42, 56, 58–60]

Bei Genen mit alternativen ersten Exons in der 5' – untranslatierten Region werden die einzelnen alternativen ersten Exons zellspezifisch exprimiert, dies ist z. B. auch bei *BDNF* der Fall. [60] Die am häufigsten exprimierten Transkripte von *NOS1* im Gehirn sind jene mit den alternativen Exons 1c, 1f und 1g. [44] Verschiedene Transkriptionsfaktoren sind in der Lage, die Transkription einzelner alternativer Exons zu fördern. [44, 53, 45, 61] Im Rahmen der Erforschung dieser induzierten Genexpression zeigte sich, dass die Expression der Exons 1f und 1c reziprok reguliert ist, ein Phänomen, das für das Auftreten der hypertropen Pylorusstenose von Bedeutung ist. [62]

Der Promoter des Exon 1f verfügt über eine TATA – Box und hat in seiner Sequenz potentielle Bindungsstellen für verschiedene transaktivierende Faktoren wie CREB oder den Östrogenrezeptor. [63] Obwohl es als gesichert gilt, dass CREB und der Östrogenrezeptor 1 α die Expression von *NOS1* im Allgemeinen steigern können, [56, 64] konnte in Luciferase – Reportergen – Assays die Aktivität des *NOS1* Exon 1f Promoters durch CREB und durch Östrogene nicht gesteigert werden. [63, 65]

1.3 Regulation und Lokalisation von NOS-I

Durch die Translation der transkribierten mRNA entsteht das Enzym NOS-I. Neben der Regulation über die Geschwindigkeit der Genexpression kann NOS-I auch posttranslational über Phosphorylierungen durch die Proteinkinasen A

[66], C [66], über die Ca^{2+} -abhängige Kinase CaMKII [67–69][68–70], über den NMDA – Rezeptor [70] und auch über Nitrosylierungen [71] reguliert werden.

Die Isoformen NOS-I α und NOS-I μ von NOS-I besitzen am Aminoterminus eine PDZ – Domäne, die im Exon 2 codiert ist und über die die Befestigung an der postsynaptischen Membran erfolgt. Bindungspartner der PDZ – Domäne ist der PSD 93/95 – Komplex. NOS-I β und NOS-I γ besitzen keine PDZ – Domäne, da bei ihnen das Exon 2 weggespleisst wird, die Translation beginnt bei NOS-I β im Exon 1a, bei NOS-I γ im Exon 5. [72–74] Mittlerweile wird angenommen, dass die ausschließlich in den Mitochondrien lokalisierte mitochondriale NOS (mtNOS) identisch mit NOS-I ist, da diese eine identische Masse aufweist und *Nos1* knockdown Mäuse keine mtNos besitzen. mtNOS ist vor allem für die Regulation der Atmungskette von Bedeutung. [75–77]

Huang et al. stellten *Nos1* knock-down (kd) Mäuse durch Deletion von Exon 2 her. *Nos1* bzw. NOS-I konnten weder im Northern Blot, im Western Blot oder mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich gewebesabhängig eine Restaktivität von NOS-I von 0,2 % bis 7 %. [78] Diese Restaktivität ist der Anwesenheit der Splicing – Varianten NOS-I β und NOS-I γ geschuldet, die zum einen kein Exon 2 besitzen, also auch bei deletiertem Exon 2 exprimiert werden, zum anderen nicht an der postsynaptischen Membran lokalisiert sind, da sie nicht an PSD 93/95 binden können. [73]

Neben NOS-I gehören der NMDA – Rezeptor (NMDAR) und die lösliche Guanylatcyclase (sGC) zu Bindungspartnern des PSD 93/95. Durch diesen Komplex ist NOS-I räumlich mit dem aktivierenden Calciumstrom aus dem NMDAR und mit seinem Effektor der sGC verknüpft. [79, 80] Der PSD 93/95 selbst ist durch einen Palmitinsäurerest an der postsynaptischen Membran fixiert. [80, 81]

1.4 Die Wirkungsweise von NOS-I auf molekularer Ebene

1.4.1 Die NOS-I – vermittelte Katalyse

NOS-I lagert sich in Dimeren zusammen, welche jeweils aus einer Oxygenierungs- und einer Reduktionsdomäne bestehen, die durch eine Polypeptidkette verbunden sind. [82] Die aminoterminalen Oxygenierungsdomäne beinhaltet Bindungsstellen für Häm, Tetrahydrobiopterin und L-Arginin, [83, 84] während die carboxyterminale Reduktionsdomäne Bindungsstellen für NADPH, FMN und FAD besitzt. Die Polypeptidkette, welche die beiden Domänen verbindet, ist Bindungsstelle für mit Ca^{2+} beladenem Calmodulin. [85] Durch Anlagern von Calmodulin an das dimerisierte NOS-I erfolgt die Aktivierung, [86] L-Arginin, NADPH und O_2 können nun in einer Zweischrittreaktion zu Citrullin, NADP und NO umgesetzt werden. Monomere NOS-I-Proteine sind nicht aktivierungsfähig. [87] Zum genauen Reaktionsmechanismus sei auf Übersichtsarbeiten verwiesen. [72, 87, 88]

Während NO durch seine Radikalität eine kurze Halbwertszeit besitzt, verleiht ihm seine Gasförmigkeit die Fähigkeit, Zellmembranen per Diffusion zu überwinden. Mit Hilfe der Diffusion wird im Gehirn ein nur in Abhängigkeit zur Entfernung zur NOS-I stehender NO – Gradient aufgebaut, wodurch eine größere Anzahl von Neuronen moduliert wird. [89]

NO leitet Signale zum einen über die Aktivierung von Guanylatcyclasen, zum anderen über die Nitrosylierung von Aminosäuren weiter. Für die Regulation der Vasomotorik über das Endothel wurde die Wirkung eines Endothelium – derived – relaxing – factors (EDRF) beschrieben, der im Gefäßmuskel über die Aktivierung von Guanylatcyclasen wirkt. [90] Für die Identifikation von NO als EDRF [91] wurde Louis J. Ignarro, Ferid Murad und Robert Furchgott 1998 der Nobelpreis verliehen.

Es wurde postuliert, dass NO an der Synapse neben seiner Wirkung als EDRF, als retrograder Transmitter, ausgesandt von NOS-I in der Postsynapse, die Langzeitpotenzierung (LTP), also lang überdauernde Veränderungen in der synaptischen Übertragung, vermittelt. [92–94] Weitergeleitet werden soll das

NO – Signal über zwei verschieden lokalisierte Guanylatcyclasen, die sich in den ϵ -Proteinuntereinheiten unterscheiden. Bei Vorliegen einer $\epsilon 1$ – Untereinheit bezeichnet man den Rezeptor als NO – GC1 Rezeptor, bei Vorliegen einer $\epsilon 2$ – als NO – GC2 – Rezeptor. Während der NO – GC2 – Rezeptor eine PDZ – Domäne besitzt und so an den PSD 93/95 angegliedert werden kann, befindet sich der NO – GC1 – Rezeptor v. a. in präterminalen Axonendigungen. [95, 96] Das durch die GC hergestellte cGMP wirkt zum einen direkt an durch cyclische Nukleotide schaltbaren Ionenkanälen, zum anderen über Proteinkinasen und hier v. a. über die Proteinkinase G (PKG). [97–99] Durch Diffusion von NO aus der Postsynapse zur Präsynapse sollen also vermittelt über die Aktivierung des NO – GC1 – Rezeptors die PKG und cGMP – abhängige Ionenkanäle für die synaptische Verstärkung verantwortlich sein. [100–102] Von anderen Arbeitsgruppen wird die Bedeutung von NO für die LTP jedoch angezweifelt. [103] Neben der LTP kann durch den NO – GC – cGMP – Signaltransduktionsweg die Transmitterfreisetzung der monoaminergen Systeme erleichtert werden. [104]

Zusätzlich zur Aktivierung der GC ist NO durch sein ungepaartes Elektron in der Lage, die Aminosäuren Tyrosin und Cystein kovalent zu binden. Die Nitrosylierung von Tyrosin soll dabei nur im Zustand des oxidativen Schocks auftreten, [105] während die des Cysteins ein weitverbreiteter physiologischer Signaltransduktionsmechanismus ähnlich dem der Phosphorylierung von Serin, Threonin und Tyrosin ist. Demnach werden z. B. der NMDAR und NOS-I selbst durch die Nitrosylierung einer Thiolgruppe eines Cysteinrestes im Sinne eines negativen Feedbacks inaktiviert. [106–109] Weitere nitrosylierbare Thiolgruppen von Cysteinresten bestehen u. a. auch in den Transportern der monoaminergen Systeme. Durch Nitrosylierung dieser Reste werden die Aktivitäten der Proteine und damit die Wiederaufnahme dieser Neurotransmitter gehemmt. Neben den monoaminergen Transportern wird auch die Tryptophanhydroxylase, das Schrittmacherenzym der Serotoninsynthese, auf diese Weise gehemmt. [110–112] Die Nitrosylierung eines Tyrosinrestes stellt einen Zellschaden mit Bezug zur malignen Entartung, zu ischämischen Zuständen und zur Neurodegeneration dar, [113, 114] ob im

normal arbeitenden Gehirn tyrosinnitrosylierende NO-Konzentrationen durch physiologische Ca^{2+} -Konzentrationen erreicht werden, ist fraglich. [105]

NO, das nicht durch Nitrosylierung verbraucht wird, kann nicht – enzymatisch und enzymatisch abgebaut werden. Nicht – enzymatisch wird NO in einer Autooxidationsreaktion mit Protonen zu Nitrit oxidiert. Im enzymatischen Abbau wird es zum einen durch Caeruloplasmin zu Nitrit, zum andern durch oxygeniertes Hämoglobin und Myoglobin zu Nitrat abgebaut. [115, 116]

Nitrit und Nitrat sind jedoch keine Abfallprodukte von NO, sondern ein Zwischenspeicher. Durch die Xanthinoxidoreduktase, durch Deoxyhämoglobin und durch Antioxidantien wie den Polyphenolen und den Vitaminen E und C können Nitrit und Nitrat wieder zu NO reduziert werden. Die Reduktion durch Deoxyhämoglobin steigert die NO – Konzentration bei Hypoxie, ein wichtiger physiologischer Mechanismus zur Vasodilatation bei Sauerstoffmangel. [117]

1.4.2 Protein – Proteininteraktion von NOS-I mit dem Serotonintransporter

Nicht nur über seine katalytische Aktivität, sondern auch über Protein – Proteininteraktionen mit dem Serotonintransporter (5-HTT) kann NOS-I Einfluss auf das serotonerge System nehmen. Neben der in vivo auftretenden Nitrosylierung und der modulierten Wiederaufnahme durch cGMP, beeinflusst NOS-I so über einen dritten Weg das serotonerge System. 5-HTT bindet über seine carboxyterminale Domäne an die PDZ – Domäne von NOS-I, sodass NOS-I nicht mehr an die Synapse transportiert werden kann und gleichzeitig die Aktivität des 5-HTT sinkt. Gegensätzlich dazu aktiviert 5-HTT bei Aufnahme von Serotonin aus dem synaptischen Spalt NOS-I durch einen von der Ca^{2+} -Konzentration unabhängigen Mechanismus. Dieser Mechanismus ist ein negativer Feedback, der nach erhöhter Wiederaufnahme von Serotonin gesteigert über die Aktivierung des NO – GC – cGMP – Transduktionsweges die Wiederaufnahme von Serotonin durch die Protein – Proteininteraktion hemmt. Es wird darüber spekuliert, ob NOS-I so zur Feineinstellung der tonischen Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt beiträgt. [104, 118–

120] Der Serotonin Rezeptor 1a (5-HT_{1a}R), der eine wichtige Rolle in der Regulation von Furcht und Angst spielt, kann bei Aktivierung die Expression von *NOS1* inhibieren und dadurch die Expression von CREB – abhängigen Genen fördern. Für die anxiolytische Wirkung des 5-HT_{1a}R ist demnach die Inaktivierung der NOS-I – Aktivität und die darauffolgende Aktivierung von CREB nötig. [121] Für die Aggressivität gibt es ähnliche Befunde: In *Nos1* kd – Tieren ist die Aggressivität erhöht, durch Aktivierung des 5-HT_{1a}R wird diese zwar verringert, doch ist eine höhere Konzentration im Vergleich zu Wildtyptieren nötig, um messbare Effekte zu erzielen.[118, 122]

1.5 Verbindungen zwischen *NOS1*/*NOS-I* und *NOS3*/*NOS-III* und der bipolar-affektiven Störung

Befunde auf verschiedenen Ebenen legen einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen im nitrinergen System und verschiedenen psychischen Krankheiten nahe. Hier soll kurz auf den Zusammenhang der Verbindung dieses Systems mit der BPD und dem ADHS eingegangen werden.

In der Promotorregion des Exon 1f liegt der *NOS1* Exon 1f VNTR, ein beim Menschen polymorpher Dinukleotidrepeat der Form (GT)_n. Bei anderen Tieren wie der Maus und der Ratte ist der Repeat zwar auch vorhanden, jedoch deutlich kürzer und vermutlich nicht polymorph. [55] Auf molekularer Ebene führt der *NOS1* Exon 1f – Promoter mit längeren VNTR (l – Allel) im Luciferase-Assay zu einer gesteigerten Expression des Reportergens. [63, 65] Mit Hilfe elektrophysiologischer Testverfahren und mit Fragebogentests konnten kurze Allelvarianten (s-Allel) mit erhöhter Impulsivität in Verbindung gebracht werden. [63, 123–127]

Zur Untersuchung genetischer Faktoren psychischer Krankheiten wie der BPD werden Endophänotypen untersucht. Endophänotypen sind über Generationen hinweg vererbte Biomarker, die mit gewissen Krankheiten assoziiert sind und unabhängig von diesen erkennbar sind, also z. B. auch nach medikamentöser Einstellung oder bei phänotypisch gesunden Angehörigen auftreten. In

Familien in denen die Krankheit häufig auftritt, sind das Auftreten der Krankheit und der Endophänotyp stark korreliert. [128, 129] Impulsivität ist ein Endophänotyp der BPD und des ADHS. [130, 131, 131, 132] So verwundert es nicht, dass Patienten, die an adultem ADHS leiden, häufiger kurze (s) – Allele als gesunde Probanden besitzen. [63] s – Allele sind auch bei der Parkinsonerkrankung [65], bei der Demenz vom Alzheimer Typ [133, 134] und im Zusammenhang mit einem anderen SNP bei der Schizophrenie [135] häufiger vertreten. Im Zusammenhang mit der Impulsivität zeigte sich in einer weiteren Studie, dass sich Personen mit den Genotypen s/s und s/l durch eine höhere adaptive Impulsivität im Vergleich zu Teilnehmern mit l/l Genotyp auszeichnen. Diese höhere adaptive (d. h. der Situation angepasste) Impulsivität bei Personen mit s/s – und s/l – Genotypen war jedoch mit einem schlechteren Abschneiden bei psychologischen Tests verbunden, die auf Gewissenhaftigkeit abzielen. Wenn zum Risikogenotyp aversive Umweltfaktoren wie widrige Familienverhältnisse hinzukamen, wurde neben der adaptiven auch die maladaptive (d. h. die nicht der Situation angepasste) Impulsivität gesteigert. Im Gegensatz dazu wurde die maladaptive Impulsivität bei Teilnehmern mit l/l-Genotyp auf das Niveau von Teilnehmern mit s/s – und s/l – Genotyp durch belastende Lebensereignisse angehoben. [125] Polymorphismen im Bereich des gesamten *NOS1* – Genlocus‘ (12q22 – 24) sind in einer Vielzahl von GWAS und Genkopplungsuntersuchung mit der BPD verknüpft worden.[136–144] -In einer Fall – Kontroll – Studie unserer Arbeitsgruppe wurde darüber hinaus ein protektiver Haplotyp von *NOS3* gefunden, der in der Gruppe der Kontrollpersonen signifikant häufiger vertreten war. Der Haplotyp besteht aus drei Polymorphismen, einem SNP in der Promotorregion (T786C – SNP oder rs2070744), einem VNTR im Intron 4 und dem nicht – synonymen G894T – SNP (rs1799983). [135]

1.6 Periphere Marker des nitrinergen Systems bei psychischen Erkrankungen

Um die direkten Auswirkungen des nitrinergen Systems an vielen Probanden zu untersuchen, sind wegen der begrenzten Verfügbarkeit humanen Gewebes

periphere Biomarker nötig. Fluide Biomarker, gewonnen aus peripherem Gewebe sollen Auskunft darüber geben, ob das nitrinerge System in psychischen Erkrankungen stärker aktiv ist. Aufgrund von Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen kann dann eventuell eine frühere Diagnose gestellt werden, Aussagen über die Effektivität von Therapien getroffen werden oder eine Prognoseabschätzung erfolgen. Potentielle periphere Biomarker der BPD sind Nitrit und Nitrat sowie die Expression der NO-Synthasen in Leukozyten. Die direkte Konzentrationsmessung von NO in Körperflüssigkeiten ist aufgrund der geringen Halbwertszeit nicht zielführend, weswegen als Surrogatparameter die Konzentrationen der Intermediaten Nitrit und Nitrat bestimmt werden. Bei Patienten die unter einer BPD leiden, war im Vergleich zu Kontrollen in verschiedenen Studien eine Erhöhung der Nitrit- und Nitrat-Spiegel im Blutserum sowie im Lysat von polymorphen neutrophilen Zellen zu beobachten. [145] Ähnliche Befunde gibt es auch für die Schizophrenie. [146–148] Jedoch fanden Srivastava et al. eine Erniedrigung des Nitritspiegels im Blutserum von Patienten die an einer Schizophrenie leiden. [149]

1.7 Gen – Umweltinteraktionen und Epigenetik

Die Erscheinung, dass das Genom und die Umwelt bei der Ausbildung von Phänotypen zusammenwirken, wird als Gen – Umweltinteraktion bezeichnet. Neben *NOS1*, wurden für viele weitere Kandidatengene unterschiedlicher psychischer Erkrankungen Gen – Umweltinteraktionen festgestellt, z.B. bei 5 – *HTT* [150, 151] der Monoaminoxidase A [152, 153] und der Catechol – O – Methyltransferase [154, 155]. Menschen mit protektiven Genotyp sind tendenziell vor den Folgen aversiv – erlebter Umwelteinflüsse wie mütterlicher Zurückweisung geschützt, dieser Schutz vor aversiven Umwelteinflüssen wird auch als Resilienz bezeichnet. [156] Gen – Umweltinteraktionen werden auf molekularer Ebene mit epigenetischen Mechanismen erklärt.[157–159] Die Epigenetik beschäftigt sich mit der von der DNA – Sequenz unabhängigen Vererbung von Phänotypen. Epigenetische Mechanismen sind die Modifikation

von Histonmolekülen[160] und die Methylierung von Cytosin am C5 – Atom [161] und die Weitergabe sich selbst regulierender Transkriptionsfaktoren [162]. Im Folgenden soll auf die Rolle der Methylierung von Cytosin im Rahmen der Epigenetik eingegangen werden.

DNA – Methyltransferasen (DNMTs) können am C5 – Atom von Cytosin eine Methylgruppe anbringen. Cytosin, welches sich in 5' – Richtung vor einem Guanin befindet, ist besonders häufig methyliert. Diese 5' – CpG – 3' Einheiten tragen die Bezeichnung CpG – sites. [160] Stellen im Genom, die deutlich mehr sites als statistisch zu erwarten wäre beinhalten, werden als CpG – Inseln (CGI) bezeichnet. CGIs zeigen eine Häufung in Promoterbereichen; solche CGIs sind häufig komplett methyliert. Methyl – CpG – binding – proteins (MeCPs) und Proteine, die modifizierte Histonpartikel binden, kompaktieren im Zusammenspiel das Chromatin, sodass die Wahrscheinlichkeit für die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den DNA – Strang sinkt. Umweltfaktoren regulieren die Methylierung u. a. über die Aktivität der DNMTs und über die Menge an Cofaktoren, die für die Methylierung nötig sind z. B. das S – Adenosylmethionin. [163] Die de – novo – Methylierung wird durch die DNMT – Isoformen 3a und 3b katalysiert. [164, 165] Der Methylierungsstatus wird über die Mitose an beide Tochterzellen weitergegeben. Da der Replikationsmechanismus der DNA semikonservativ ist, enthalten beide Tochterzellen jeweils einen Strang mit dem Methylierungsmuster, der neusynthetisierte Strang hat zunächst kein Methylierungsmuster. Durch DNMT1 wird das Methylierungsmuster durch Ergänzen der hemimethylierten CpG – Sites mit einer weiteren Methylgruppe komplettiert. [166] In etwa 10 % der Sites arbeitet die DNMT1 jedoch nicht korrekt, und da kein Reparatursystem existiert, das Fehler im Methylierungsmuster detektiert, überdauern diese Fehler. Das Methylierungsmuster ist also auch stochastischen Effekten unterworfen. [167] Die aktive Demethylierung der DNA erfolgt vermutlich über DNA – Glycosylasen, also DNA-Reparaturenzyme. [168, 169] Weitere Einzelheiten finden sich in der umfangreichen Übersichtsliteratur [170–174].

1.8 B – und Z – DNA

Während für nicht – synonyme SNPs meist nur indirekte Befunde (z. B. die Modifikation der Genexpression) zu molekularen Mechanismen vorliegen, sind für VNTRs molekulare Grundlagen der Phänotypveränderung untersucht, diese liegen in der DNA – Struktur. 1953 stellten James Watson und Francis Crick ihr Modell für den räumlichen Bau der DNA vor. Nach diesem Modell sind zwei DNA – Einzelstränge über Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleotidbasen miteinander verbunden. [175] Die räumliche Struktur dieses Doppelstranges ergibt eine rechtshändige Doppelhelix mit 10,2 Basenpaaren pro Windung. Im Zellkern liegt DNA zumeist in dieser Konformation vor, die auch als B – DNA bezeichnet wird. Die erste Konformationsbestimmung einer definierten doppelsträngigen DNA – Sequenz erfolgte an einem 5'-(CpG)₃-3' Oligonukleotid. Dieses Oligonukleotid ist in einer Doppelhelix zusammengelagert, im Unterschied zur B – DNA ist sie jedoch linkshändig, es gibt pro Windung 12 Basenpaare und das Phosphodiesterückgrat verläuft Zick-Zack-artig. Das Zick-Zack-artige Phosphodiesterückgrat gab dieser Konformation auch ihren Namen: Z – DNA. [176] Z – DNA tritt in Regionen mit Purin – Pyrimidin – Wiederholungen, z. B. in Minisatelliten auf; solche Regionen sind in Promotorregionen stärker verbreitet als statistisch zu erwarten ist. [177] Das Ausbilden von Z – DNA kann durch eine hohe Ionenstärke, v. a. durch divalente Metallkationen und durch Polyamine gesteigert werden. [178, 176] Am Übergang zwischen Z – und B – DNA wird die Doppelhelix aufgelöst und es liegen in einem kleinen Bereich zwei Einzelstränge vor. Die Basen liegen frei und können so leicht durch Noxen verändert werden, dies wird als Grund für die Häufung von SNPs um die putativen Z – DNA – Regionen angesehen. [179] Darüber hinaus können durch die Umwandlung von B – DNA in Z – DNA Spannungen innerhalb der DNA abgebaut werden. Solche Spannungen treten z. B. bei Replikations- und Transkriptionsvorgängen auf. Weniger Spannung im Doppelstrang bedeutet auch, dass weniger Energie durch den Transkriptionsapparat aufgewendet werden muss, um die DNA zu entwinden, die Transkription wird damit

erleichtert. [176] Z – DNA bindet außerdem schwächer an Histone als B – DNA, dies führt dazu, dass die DNA in einem Z – DNA – Bereich schwächer kompaktiert ist und Transkriptionsfaktoren besser an ihre Erkennungsstellen binden können. [180]

1.9 Fragestellung

In dieser Arbeit soll ein Beitrag zur Aufklärung der Funktionalität des *NOS1* Exon 1f VNTR geleistet werden. Von Rife et al. wurde ein potentieller molekularer Mechanismus für die unterschiedliche Expression von *NOS1* in Abhängigkeit zum VNTR – Status vorgeschlagen. [65] Danach führt die verminderte Ausbildung von Z – DNA, verursacht durch den kleineren *NOS1* Exon 1f VNTR, zur verminderten Genexpression. Die verminderte Genexpression ist dann für die erhöhten Krankheitsrisiken und die stärkere Impulsivität verantwortlich. Mit Hilfe der von Thomas et al. entwickelten Methode der Z – DNA – Detektion [181, 182] soll die These von Rife et al., dass die Länge des *NOS1* Exon 1f VNTR die Z – DNA je nach VNTR – Länge moduliert, einer Prüfung unterzogen werden.

Neben dem molekularen Mechanismus für die Verminderung der Genexpression bei kurzem *NOS1* Exon 1f VNTR soll auch ein molekularer Mechanismus für die beobachtete Gen – Umweltinteraktion gefunden werden. Da der Bereich des Exon 1f in einer CGI liegt, liegt die Vermutung nahe, dass die Methylierung von CpG – sites in dieser Insel die Verbindung zwischen Umwelt und Genom moderiert. Um dieser These nachzugehen, soll ein Protokoll etabliert werden, mit dessen Hilfe die Methylierung der gesamten CGI ermittelt werden kann. Die Ergebnisse dieser Methylierungsanalyse sollten anschließend benutzt werden, um einen Bereich abzugrenzen, der in einer größeren Stichprobe mit Hilfe der Pyrosequenzierung analysiert werden sollte. Unsere These war weiterhin, dass die CGI in Abhängigkeit zur Länge des VNTR differentiell methyliert ist.

Neben der molekularen Funktionalität des *NOS1* Exon 1f VNTR sollten periphere Biomarker der BPD und des ADHS identifiziert werden. Eine Erhöhung des NO_x^- -Spiegels bei der BPD wurde bereits in Vorstudien ermittelt. Eine Übersichtsstudie, die diese Erhöhung ermittelte, wurde von Andreazza et al. durchgeführt. [145] In dieser Arbeit sollen nun erstmalig Patienten in allen Phasen der BPD eingeschlossen und miteinander verglichen werden. Außerdem wurden erstmals ADHS – Patienten auf ihren NO_x^- -Spiegel im Vergleich zu Kontrollen untersucht. Dabei soll weiterhin die Methodik der NO_x^- -Messung optimiert werden. Daneben wurden weitere mögliche periphere nitrinerge Biomarker der BPD und des ADHS, nämlich die Expression von *NOS3* und *NOS1* in Leukozyten, auf ihre Spezifität und Sensitivität hin geprüft.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 DNA

Primer wurden von Metabion, Planegg, Deutschland bezogen (Sequenzen siehe Abschnitt Nukleotidsequenzen).

Plasmidkonstrukte aus pGL3 wurden im Vorfeld der Arbeit hergestellt (Sequenzen siehe Abschnitt Nukleotidsequenzen).

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

X – Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess, Oldendorf, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sample Loading Solution (SLS)	Beckman Coulter, Brea, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie, St. Louis, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethidiumbromid	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Select – agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LB – Broth high salt	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
D – Turboampicillin	Agilent, Santa Clara, USA
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Amersham™ ECL Western Blotting Detection Reagents	General Electrics, Fairfield, USA
Milchpulver	J. M. Gabler Saliter GmbH & Co. KG – Milchwerk, Obergünzburg/Allgäu, Deutschland

Blocking Reagent	Roche Diagnostics, Risch, Schweiz
PyroMark Annealing Buffer (250 ml)	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Binding Buffer (200 ml)	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Denaturation Sol. (500 ml)	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Wash Buffer (conc., 200 ml)	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.3 Puffer

<i>Puffer</i>	<i>Konzentration in mM</i>	<i>Reagenz</i>
PBS (Phosphate Buffered Saline)	137	NaCl
	2,7	KCl
	8,1	Na ₃ PO ₄
	1,5	KH ₂ PO ₄
TBS-T (Tris Buffered Saline-with Tween 20)	100	Tris – HCl (pH = 7,5)
	150	NaCl
	0,05 %	Tween 20
TBS (Tris Buffered Saline)	100	Tris – HCl (pH = 7,5)
	150	NaCl
10x GoldStar Buffer (pH	750	Tris HCl

9)	200	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	0.1%	Tween 20

<i>Puffer</i>	<i>Menge</i>	<i>Reagenz</i>
Blaupuffer	10 ml	H ₂ O
	1,5 ml	Glycerol
	25 mg	Bromphenolblau – Xylen-Cyanol

2.1.4 Verbrauchsmaterial

<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>
10, 100 und 1000 µl Biosphere® Filterpipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
0,2 ml / Multiply®-µStripPro, PCR Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Nitrocellulose PVDF 0,45 µm Filter Paper	Invitrogen, Carlsbad, USA
Parafilm M	American National Can, Chicago, USA
96 well PCR Platte	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

PyroMark Q96 HS Plate	Qiagen, Hilden, Deutschland
-----------------------	-----------------------------

2.1.5 Geräte

Gerät	Hersteller
Thermocycler	
CFX 384 TM – Real – Time PCR Detection System	Biorad, Hercules, USA
T – Gradient Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
T1 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	
Micro Zentrifuge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
C1301 – 230V	Labnet International Inc, Edison, USA
PicoFuge® Microcentrifuge	Agilent, Santa Clara, USA
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Mikro Rapid K	HettichLab, Tuttlingen, Deutschland
Rotanta 96 RS	HettichLab, Tuttlingen, Deutschland
Sorvall RC 5C	Thermo Scientific, Waltham, USA
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Wasserbäder	
Wasserbad GFL 1083	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Wasserbad 2764	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sonstiges	
KS 501 Laborschüttler	IKA, Staufen, Deutschland
NanoDrop 1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
ChemiDoc	Biorad Laboratories, Hercules, USA
Multiskan Spectrum Microplate Spectrophotometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Waage Mettler PM 300	Mettler – Toledo, Leicester, UK
Eismaschine AF 100	Scotsman, Vernon Hills, USA
Vortex Microspin FV 2400	Lab4you, Berlin, Deutschland
Bakterienbrutschrank	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Inkubator mit Drehtisch KS 15 und Th15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
PyroMark Q96 Vacuum Workstation	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Q96 MD	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.6 Software und Datenbanken

Statistica Version 9.1, StatSoft, Tulsa USA

Epidesigner, Sequenom, San Diego, USA

Datenbank	Quelle
BLAT	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat [55]
UCSC	http://www.genome.ucsc.edu [183]
Z – Hunt	http://gac-web.cgrb.oregonstate.edu/zDNA/ [184]
BiQ – Analyzer	http://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/download.php [185]
Ensembl	http://www.ensembl.org [186]

2.1.7 Enzyme

Restriktionsenzyme: Scal, Taq, EcoRI, Scal, Xho, XbaI

New England Biolabs, Ipswich, USA

House Taq, Eigenproduktion

2.1.8 Antikörper

Antikörper

Hersteller

Anti – Z – DNA Polyclonal Antibody

Thermo Scientific, Waltham, USA

Rabbit Anti Sheep Polyclonal IgG

Thermo Scientific, Waltham, USA

Antibody

2.1.9 Kits

<i>Kit</i>	<i>Hersteller</i>
HotStar HiFidelity Polymerase Kit	Qiagen, Hilden, Germany
TA Cloning® Kit (with pCR®II vector) with One Shot® aTOP10F´ Chemically Competent E. coli	Invitrogen, Carlsbad, USA
TOPO TA Cloning® Kit (with pCR®4 vector) with One Shot® TOP10F Chemically Competent E. coli	Invitrogen, Carlsbad, USA
Research EZ DNA Methylation Kit	Zymo, Orange, USA
EpiTect Bisulfite Kit (48)	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR Purification Kit	Qiagen Hilden, Deutschland
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Nitrite/Nitrate Assay Kit, colorimetric	sigma – aldrich, St Louis, USA
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Biorad Laboratories, Hercules, USA
iQ™ SYBR® Green Supermix	Biorad Laboratories, Hercules, USA
PyroMark Gold Q96 CDT Reagents	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Das Bisulfit – PCR Sequenzier Protokoll

2.2.1.1 Bisulfitierung der DNA mit dem Qiagen Epiect Kit

Zur Bisulfitierung wurde das Epiect Bisulfite Kit von Qiagen verwendet. Im Unterschied zu anderen Kits läuft hier die Bisulfitierungsreaktion schneller ab und die DNA wird durch den DNA Protect Buffer vor Fragmentierung geschützt, sodass die PCR schon mit geringerer Templatemenge ablaufen kann.

DNA von zwei Probanden (einer mit homozygot langem *NOS1* Exon 1f VNTR, einer mit homozygot kurzem *NOS1* Exon 1f VNTR) wurde auf ihre Methylierung in der *NOS1* Exon 1f CGI hin untersucht. Zur Unterscheidung unmethylierter und methylierter CpG – sites wurde die DNA einer Bisulfitierungsreaktion unterzogen. Durch die Bisulfitierung wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, während methyliertes Cytosin erhalten bleibt. In der nachfolgenden Polymerase – Kettenreaktion (PCR) wird das aus dem unmethylierten Cytosin entstandene Uracil wie eine Thyminbase behandelt, die korrespondierende Base des unmethylierten Cytosins ist also Adenin und nicht Guanin wie beim methylierten Cytosin.

Zur Bisulfitierung wurden 200 ng der DNA Proben in jeweils ein 200 µl PCR – Gefäß vorgelegt und mit RNase – freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Zu diesem Ansatz wurden 85 µl des Bisulfit – Mix und 35 µl des DNA Protect Buffer hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde durchgemischt und durchlief danach folgendes Programm in einem Thermocycler.

Tabelle 2 Reaktionsbedingungen Bisulfit-PCR

Temperatur	Zeit
95 °C	5 min
60 °C	25 min
95 °C	5 min
60 °C	85 min

95 °C	5 min
60 °C	175 min
20°C	Pause

Nach der Bisulfitierungsreaktion erfolgte die Aufreinigung. Das Reaktionsgemisch wurde dazu in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 560 µl Buffer BL gemischt. Nach Durchmischen wurde der Ansatz in eine Spin Column überführt und eine Minute mit 13 000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und 500 µl Buffer BW wurde auf die Säulenmembran pipettiert. Die Säule wurde eine Minute bei 13 000 rpm zentrifugiert und das Eluat wurde abermals verworfen. Anschließend wurde 500 µl Buffer BD auf die Säule pipettiert, dieser Ansatz inkubierte 15 Minuten bis auch dieser Puffer abzentrifugiert und verworfen wurde. Danach wurde zweimal mit 500 µl Buffer BW gewaschen. Nach den Waschsritten inkubierten die geöffneten Säulen bei 56 °C um Waschlösungsreste zu entfernen. Die Säulen wurden dann auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und 20 µl EB wurde auf die Membran pipettiert. Durch Zentrifugieren bei 12 000 rpm für 1 Minute wurde der EB mit darin gelöster und aufgereingter Bisulfit – DNA in das Reaktionsgefäß überführt. Die Elution wurde dann nochmals wiederholt. Das Eluat wurde in 4,2 µl Aliquots in 200 µl PCR Reaktionsgefäßen aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

2.2.1.2 Bisulfit-PCR mit dem Platinum PCR Super Kit von Invitrogen

Mit der Bisulfit-DNA wurde dann eine Polymerase-Kettenreaktion mit 50 µl Gesamtvolumen durchgeführt. Eine PCR dient der Amplifikation spezifischer DNA – Sequenzen. In einer zyklischen Kettenreaktion bestehend aus Denaturierung, Annealen und Polymerisierung werden Kopien eines bestimmten Bereichs eines eingesetzten Templates erstellt. Durch Hitze wird bei der Denaturierung der Doppelstrang in Einzelstränge aufgetrennt, sodass

sich beim Annealen die Primer an die komplementär – spezifischen DNA – Sequenzen der beiden Einzelstränge anlagern können. Die zugesetzte DNA – Polymerase kann von diesem Startpunkt aus den komplementären Strang synthetisieren. In einem solchen Zyklus wird das Template also verdoppelt. Da eine hitzestabile DNA – Polymerase z. B. von *Thermus aquaticus* verwendet wird, kann der Zyklus mehrmals ablaufen und die DNA – Menge theoretisch exponentiell gesteigert werden. Das Pipettierschema der PCR war dabei:

Tabelle 3 Pipettierschema Bisulfit-PCR mit Platinum PCR SuperMix

Platinum PCR SuperMix	45 µl
F-Primer (100 µM)	0,125 µl
R-Primer (100 µM)	0,125 µl
H2O	0,75 µl
Bisulfit – DNA	4 µl

Der Platinum PCR Super Mix besteht aus einem Reaktionspuffer und einer proof – reading Polymerase.

Die Reaktionsbedingungen können Tabelle 4 entnommen werden.

Tabelle 4 Reaktionsbedingungen Bisulfit-PCR

94 °C	5 min	
94 °C	1 min	40 Zyklen
60 °C	30 s	
72 °C	45 s	
72 °C	7 min	

10 °C	Pause
-------	-------

2.2.1.3 Vorbereitung der Amplicons auf die Ligation

Die Amplicons wurden anschließend mit einer Agarose – Gelelektrophorese überprüft. Zur Herstellung des Agarosegels wurden 2 g Agarose und 100 ml TAE – Puffer in der Mikrowelle bis zum Auflösen der Agarose gekocht. Anschließend kühlte die aufgelöste Agarose unter ständigem Rühren bis auf Handwärme ab. Zur herabgekühlten Flüssigkeit wurden dann 3 µl Ethidiumbromid gegeben und das Gemisch wurde dann in eine dafür vorgesehene Form gegossen. Eine kammförmige Plastikvorrichtung sorgte an der oberen Seite des Gels für das Entstehen von Geltaschen. Das ausgehärtete Gel wurde dann in eine mit TAE befüllte Elektrophorese–Laufbox getaucht. Anschließend wurden die Geltaschen mit den PCR–Produkten, vermischt mit einem Ladepuffer, befüllt. Als Referenz wurde in eine weitere Geltasche die sogenannte Leiter pipettiert, welche DNA–Moleküle bekannter Größe enthält.

Eine Spannungsquelle baute ein elektrisches Feld mit der Kathode auf Höhe der Taschen und der Anode in Laufrichtung des Gels auf. Die negativ geladenen DNA–Moleküle wandern durch die polymerisierte Agarose zur Anode. Die kleineren Moleküle können dabei durch das Agarosenetz schneller wandern, sodass eine Auftrennung nach der Größe erfolgt. Das Ethidiumbromid im Gel lagert sich der DNA an, sodass Addukte entstehen, die mit UV – Licht sichtbar gemacht werden können. Durch Vergleich der Proben mit der Leiter konnte auf die Länge der einpipettierten Amplicons geschlossen werden.

25 µl der PCR wurden auf diese Weise in ein 2 % Agarosegel geladen und das PCR Produkt wurde dann aus dem Gel mit einem Gelextraktionskit extrahiert. Dazu wurde das Gel mit Hilfe des Transilluminators mit UV Licht durchleuchtet. Das durch das UV – Licht sichtbar gemachte PCR–Produkt wurde dann mit

einem Messer aus dem Gel ausgeschnitten und abgewogen. Anschließend wurde das Gel in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit dem Buffer QG versetzt. Das Volumen in Mikroliter des Buffers QG entsprach dem dreifachen der Masse des ausgeschnittenen Gelstückes in Milligramm. Das Reaktionsgefäß inkubierte dann 10 Minuten bei 50°C im Thermoblock. Zu diesem Gemisch wurde Isopropanol in einem Volumen in Mikroliter gegeben, welches identisch war mit der Masse des Gelstückes in Milligramm. Anschließend wurde der Ansatz in eine MinElute Säule überführt, eine Minute bei 13 000 rpm zentrifugiert und das Eluat wurde verworfen. Zum Waschen wurden 500 µl Buffer QG und dann 750 µl Buffer PE auf die Säule pipettiert, jeweils eine Minute mit 13000 rpm abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluats wurde die leere Säule ein weiteres Mal mit 13 000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und 30 µl EB wurden auf die Membran pipettiert. Die DNA wurde dann durch Zentrifugieren für eine Minute mit 11 000 rpm in das Auffanggefäß eluiert.

Um die Ligation zu erleichtern wurde an dieses Amplicon danach dATPs angehängt. Nach einer Polymerasisation fügt die DNA-Polymerase sequenzunabhängig an das Amplicon einen überhängenden dATP-Rest an. Diese dATPs können nach einiger Zeit jedoch abfallen. Für die Ligation sind die überstehenden dATPs am Amplicon zum Anfügen an die überstehenden dTTPs des Vektors nötig, um so ein ringförmiges Plasmid zu erstellen. Durch Inkubation der Amplicons mit dATPs, einer Taq – Polymerase und einem geeigneten Puffer können etwaige abgefallene dATPs wieder angefügt werden. Um die dATPs an die Amplicons anzuhängen, inkubierten folgende Reagenzien bei 72 °C für 10 Minuten in einem Thermocycler.

Tabelle 5 Pipettierschema Erstellung dATP-Überhänge

8 µl	Aus dem Gel extrahiertes PCR Produkt
1 µl	GoldStar Buffer
1 µl	20 mM dATP

0,5 µl	House Taq
--------	-----------

2.2.1.4 Ligation der PCR Produkte in pCR4 und Transformation

Im fertig etablierten Protokoll wurde der pCR4 Vektor mit dem TOPO TA Cloning Kit verwendet. Das TOPO TA Cloning Kit enthält eine Topoisomerase. Die Topoisomerase ist ähnlich wie die Ligase anderer Kits in der Lage zwei DNA – Stücke zu verbinden. Sie ist nach Herstellerangaben jedoch effizienter, außerdem sind für die Ligation nur 5 Minuten Inkubationszeit statt mehrerer Stunden nötig. Der Vektor pCR 4 ist linearisiert und mit dTTP Überhängen für das Anhängen des PCR – Produktes versehen. In pCR4 ist durch das Linearisieren ein Gen inaktiviert dessen Expression für das Bakterium nicht mit dem Leben vereinbar ist. Wenn die Bakterien nach abgeschlossener Transformationsreaktion auf Kanamycin–Agarplatten ausplattiert wurden, können nur diejenigen überleben, welche das Plasmid enthalten also kanamycinresistent sind. Wenn jedoch das ursprünglich durchtrennte Gen durch Ligation wieder repariert wird, sterben diese Bakterien ab, sodass nur Kolonien mit Bakterien überleben können, welche ein Plasmid mit eingefügtem PCR – Produkt enthalten.

Folgender Ligationsansatz inkubierte bei 22 °C im Thermocycler für 5 Minuten:

Tabelle 6 Reaktionsansatz TOPO TA Cloning Kit

PCR – Produkt mit dATP Überhängen	4 µl
Salt Solution	1 µl
pCR 4 Vektor	1 µl

2 µl des Ligationsansatzes wurden in ein Gefäß mit 50 µl chemisch kompetent gehaltenen TOP10F Bakterien einpipettiert. Nach 30–minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien einem 30–sekündigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und anschließend wieder auf Eis überführt. Nach Zugabe von

250 µl S.O.C-Medium. inkubierte das Reaktionsgefäß dann in horizontaler Lage 1 Stunde in einem Drehinkubator bei 37 °C mit 225 rpm. Auf drei 25 µg/ml Kanamycin-haltige LB-Agarplatten wurden 10 µl, 100 µl und der Rest der Bakteriensuspension ausplattiert. Die Agarplatten inkubierten bei 37 °C über Nacht.

2.2.1.5 Kolonie-PCR

In einer Kolonie-PCR dienen Bakterienklone aus einer Kolonie als Template. In einem für diese Zwecke modifizierten Reaktionsansatz, kann so ein Teilbereich des Bakteriengenoms, hier ein Teil des einklonierten Amplicons, amplifiziert werden. Wenn das Amplicon bei der Kontrolle auf dem Agarosegel die richtige Größe besaß, konnte auf eine erfolgreiche Klonierung geschlossen werden.

Für die Kolonie – PCR wurde folgendes Pipettierschema pro Ansatz verwendet:

Tabelle 7 Pipettierschema Kolonie-PCR

15 mM MgCl ₂ – Puffer	2,5 µl
dNTP (2,5 mM)	0,5 µl
Primer (M13 Forward)	1 µl
Primer (M13 Reverse)	1 µl
H ₂ O	18,8 µl
House – Taq	0,2 µl

-Mit Hilfe einer 100 µl Filterpipettenspitze wurde eine Probe einer Kolonie entnommen und in das PCR Gefäß überführt. Der Ansatz durchlief folgendes Programm:

Tabelle 8 Reaktionsbedingungen Kolonie-PCR

96 °C	5 min	
96 °C	30 s	40 Zyklen
58 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	3 min	
4 °C	Pause	

Nach Kontrolle der PCR–Produkte auf einem 2% Agarosegel wurden diese für die Sequenzierung vorbereitet.

2.2.1.6 Vorbereitung der Sequenzierung

4 µl des PCR–Produkts wurden mit 0,5 µl des Shrimp–Alkaline–Phosphatase–Mix gemischt und 15 Minuten bei 37 °C und anschließend zwei Minuten bei 96 °C inkubiert. Nach Abkühlen des Verdauung wurde dieser auf zwei Reaktionsansätze zu je 2 µl aufgeteilt. In beide Ansätze wurden jeweils 2 µl des Q–Kits und 4 µl Wasser gegeben. 1 µl des Forward– bzw. des Reverse–Primers wurden zu jeweils einem der Ansätze gegeben. Im Thermocycler durchliefen die Ansätze folgendes Programm:

Tabelle 9 Amplifikation der Bisulfit-PCR-Amplicons

95 °C	2 min
98 °C	30 s
56 °C	30 s
60 °C	1 min 30 s
10 °C	Pause

Die Ansätze wurden dann mit 10 µl Wasser, 2 µl einer 0,1 M EDTA Lösung (pH = 8,0), 2 µl einer 3 M NaOAc – Lösung (pH = 5,2) und 1 µl Glycogen versetzt und gemischt. Zu diesen Gemischen wurden jeweils 60 µl kalter 100 % Ethanol gegeben und die Ansätze wurden 5 Minuten bei 14 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das entstandene Pellet wurde mit 180 µl kaltem 70 % Ethanol gewaschen. Nach abermaligen Zentrifugieren wurde der Überstand wieder abdekantiert und das Pellet trocknete für 5 Minuten zum Schutz der neusynthetisierten, von Proteinen ungeschützten DNA-Doppelstränge in einer Dunkelkammer. Das Pellet wurde dann in 35 µl SLS gelöst, die Lösung wurde in eine 96 well Platte überführt und es erfolgte die Sequenzierreaktion am Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie.

2.2.2 Methylierungsanalyse durch Pyrosequenzierung

Neben der Bisulfit – Sequenzierung wurde die Methylierung eines Teils der *NOS1* Exon 1f VNTR CGI in einer größeren Stichprobe (n=54) mit Hilfe der Pyrosequenzierung bestimmt. Dabei wurden zwei Abschnitte im *NOS1* Exon 1f – Promoter untersucht, die als Pyro A und Pyro B definiert wurden. Die Sequenzen von Pyro A und Pyro B sowie der Primer können dem Nukleotidverzeichnis entnommen werden. Die untersuchten CpG – sites sind in der im Anhang angefügten Sequenz der CGI violett markiert.

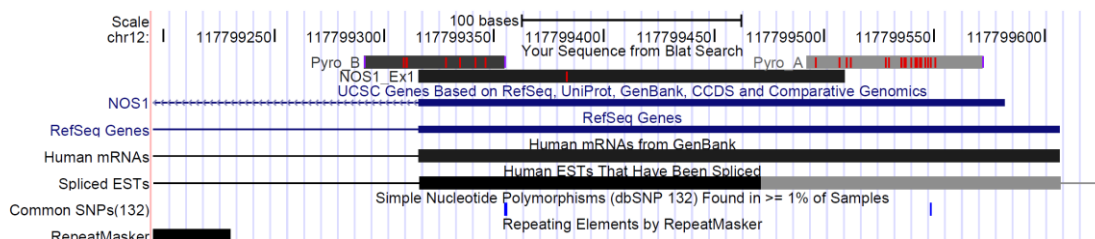


Abbildung 1 Pyro A und Pyro B im Verhältnis zum Exon 1f

Zur Vorbereitung der Pyrosequenzierung wurde die aus Blut extrahierte DNA mit Hilfe des bereits beschriebenen Qiagen Epitect Kits bisulfitiert und die

Bisulfitierungslösung durch Aufreinigen entfernt. Neben der DNA wurden auch Standard – DNA Proben mit festgelegtem Methylierungsgrad (100%, 50%, 0%) untersucht. Analog zur Bisulfit – Sequenzierung wurden die zu untersuchenden Regionen mit Hilfe einer PCR amplifiziert, wobei einer der beiden Primer mit Biotin markiert war.

Das Pipettierschema der Bisulfit – PCR für die Pyrosequenzierung war:

Tabelle 10 Bisulfit-PCR für Pyrosequenzierung

Qiagen PCR Buffer	2,5
dNTP (2,5 mM)	0,5 µl
Primer Forward (10 µM)	1µl
Primer Reverse (10 µM)	1µl
H ₂ O	18,8µl
House – Taq	0,2 µl
Bisulfit – DNA	1 µl

Die Ansätze durchliefen im Thermocycler folgendes Programm (Tab. 11).

Tabelle 11. Reaktionsbedingungen Bisulfit-PCR für Pyrosequenzierung

95 °C	5 min
95 °C	30 s
T _{ann}	30 s

72 °C	20 s
72 °C	10 min
10 °C	Pause

Die Annealing-Temperatur T_{ann} war für Pyro A 58°C für Pyro B 56°C. Für Pyro A durchlief der Ansatz 42 Zyklen für Pyro B 40 Zyklen.

Über die Biotinmarkierung wurde das Amplicon anschließend über Streptavidin, an Sepharosekügelchen gebunden. Dazu inkubierte folgender Ansatz in einer 96 well PCR-Platte auf einem Schüttler für 5 Minuten.

Tabelle 12 Reaktionsansatz der Bindung der Amplicons an Sepharose

10 µl	Bisulfit – PCR – Produkt
2 µl	Streptavidin Sepharose HP – beads
40 µl	Binding Buffer
28 µl	H ₂ O

Gleichzeitig wurde in einer weiteren 96 well Platte 0,5 µl des jeweiligen Sequenzierprimers und 11,5 µl Annealing Buffer pro Amplicon angesetzt.

Auf der PyroMark Q96 Vacuum Workstation wurden die an die Sepharosekügelchen angelagerten PCR-Produkte abgetrennt und aufgereinigt. Dazu wurden zunächst die Sondenköpfe der Workstation mit Wasser gewaschen. Durch ein angelegtes Vakuum wurden anschließend die Sepharosekügelchen auf der Sondenoberfläche immobilisiert. Die Kügelchen wurden dann für 20 Sekunden mit 70 % Ethanol gewaschen und in die Denaturation Solution überführt. Nach dem Waschen der Kügelchen in Wasser wurde der

Sondenkopf auf die vorbereitete Sequenzierplatte gesteckt und das Vakuum wurde abgelassen, sodass die aufgereinigten Sepharosekugeln mitsamt der befestigten PCR-Produkte in die vorbereitete Sequenzierplatte fielen. Die Platte wurde für 2 Minuten auf 72°C erhitzt und kühlte auf Raumtemperatur ab, wodurch die Sequenzierprimer an die Amplicons banden.

Die eigentliche Sequenzierreaktion fand im PyroMark Q96 MD – Bisulfidsequenzierer statt. Die Kartusche des Sequenzierers wurde im Vorfeld mit den verschiedenen Nukleotiden, dem Enzym und dem Enzymsubstrat befüllt.

Nukleotide, die laut Vorhersage durch die Datenbank UCSC durch die Polymerase eingebaut werden, wurden durch den Sequenzierer einzeln mit Hilfe einer Spritze in den Reaktionsraum gegeben. Durch den Einbau des Nukleotids wurde Pyrophosphat freigesetzt, das durch die im Reaktionsraum befindliche Sulfurylase mit Adenosinphosphosulfat zu ATP und Sulfat umgesetzt wurde. Das entstandene ATP wurde dann zu Adenosinmonophosphat und zwei Phosphatresten unter Abgabe eines Lichtquants abgebaut. Wenn ein Nukleotid in den Reaktionsraum gegeben wurde, das nicht komplementär zum jeweiligen auf der Matrize war, erfolgte kein Einbau des Nukleotids und damit keine Photonenfreisetzung. Bei teilweise methyliertem Cytosin wurde durch die Bisulfidierung in einigen DNA-Molekülen eine Umwandlung von Cytosin in Uracil verhindert, daraus folgend entsteht durch Zugabe von dGTP bzw. dATP nur eine jeweils kleinere Lichtausbeute. Aus dem Verhältnis der Lichtenergien bei der Zugabe von dGTP und dATP konnte der Methylierungsgrad berechnet werden.

2.2.3 Quantifizierung der Z – DNA – Bildung im *NOS1* Exon 1f VNTR

2.2.3.1 Vervielfältigung und Präparation der Plasmide

Zur Untersuchung von pGL3 – Plasmiden die den *NOS1* Exon 1f Promoter mit verschiedener *NOS1* Exon 1f VNTR Länge enthielten, wurden diese

zusammen mit einem pGL3 Vektor ohne Insert entsprechend obigen Protokolls in TOP10F⁺ Bakterien eingeführt. Die Bakterien wurden dann auf Ampicillinplatten ausplattiert und jeweils eine Kolonie mit Hilfe einer 100 µl Pipettenspitze in 100 ml ampicillinhaltiges LB – Medium überführt. Der Behälter mit dem LB – Medium inkubierte unter Schütteln bei 37 °C über Nacht. Die in die Bakterien eingeführten Plasmide wurden anschließend mit Hilfe des Wizard® Plus SV Midipreps DNA Purification System isoliert. Zunächst wurden die Suspensionen in Sorvall-Zentrifugenbehälter überführt und 10 Minuten bei 5000g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet im Sorvallgefäß wurde mit Hilfe von 6 ml Cell Resuspension Solution resuspendiert. Zur Suspension wurden dann 6 ml Cell Lysis Solution gegeben und das Gefäß wurde vorsichtig invertiert. Nach 3-minütiger Inkubation wurden 10 ml Neutralisationslösung zum Ansatz gegeben, der Behälter wurde dann vorsichtig invertiert und dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Sorvallgefäß wurde dann bei 15000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Die zum Kit gehörende Vorsäule wurde auf die eigentliche Säule gesteckt, in die Vorsäule wurde der Überstand aus dem Sorvallgefäß gegeben und ein Vakuum wurde angelegt. Nach Absaugen der Flüssigkeit wurde die Vorsäule verworfen und die Filtermembran mit 5 ml Endotoxin Removal Solution und 20 ml Waschlösung gewaschen. Auf die Filtrationssäule wurde zur Elution 500 µl nukleasefreies Wasser gegeben und durch das angelegte Vakuum in das 1,5 ml Reaktionsgefäß im Eluator gesaugt. Die Plasmidkonzentration wurde im NanoDrop – Fotometer bestimmt.

2.2.3.2 Dot – Blot – Untersuchungen

Mit dem Dot – Blot sollte überprüft werden, ob sich im *NOS1* Exon 1f Promoter Z – DNA ausbildet. Auf eine Nitrocellulosemembran wurden 2 µl von Plasmidlösungen verschiedener DNA-Konzentrationen oder Wasser pipettiert. Die Plasmide wurden dann auf der Nitrocellulosemembran durch eine dreiminütige Inkubation auf dem UV – Transilluminator fixiert. Die anschließenden Inkubationen der Membran erfolgten in einem

Inkubationsgefäß, in das die jeweiligen Lösungen gegeben wurden. Die Inkubation fand auf einem Schüttler statt der mit ca. 40 rpm rotierte. Zum Blockieren unspezifischer Antikörperbindungsstellen inkubierte die Membran zunächst für 45 Minuten in TBS–T mit 1 % BSA. Die Membran wurde dann in der gleichen Lösung welcher der Primärantikörpers in einer Konzentration von 1,5 µg/ml beigemischt wurde für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit TBS–T gewaschen. Dann inkubierte die Membran für 30 Minuten in einer Lösung aus TBS–T mit 1 % BSA in dem der Sekundärantikörper in einem Volumenverhältnis von 1:5000 gelöst war. Die Membran wurde anschließend für 15 Minuten und zweimal für 1,5 Minuten in TBS-T und einmal für 5 Minuten in TBS gewaschen. Nach der Inkubation wurde die Membran in einen Vernichtungsbeutel überführt und dort mit ECL–Reagenz (GE Healthcare) überschichtet. Nach zehnminütiger Inkubationszeit erfolgte die Auswertung am ChemiDoc.

Quantifiziert wurde die Bindung des Antikörpers mit ImageJ. Dieses Programm ermittelt als Maß für die Farbstoffproduktion und damit die Bindung des Z – DNA – Antikörpers das Produkt des Durchmessers und des Grauwertes eines Punktes, dieses Produkt trägt die Bezeichnung Integrated Density. Nach Einstellen des Hintergrundes auf einen einheitlichen weißen Farbton wurden die zu untersuchenden Dots manuell ausgewählt.

2.2.3.3 Bestimmung der Z-DNA-Bildung mittels ELISA

Eine weiterer Test zur Bestimmung der Z – DNA – Bildung in einer Sequenz ist der Enzyme – linked immunosorption assay (ELISA).

Zum Befestigen der DNA (Coaten) auf der 96 well Platte wurden eine 0,0001 % Protaminsulfatlösung und die DNA Coating Solution verwendet. Für das Beschichten mit Protaminsulfat inkubierten 100 µl der Protaminsulfatlösung pro well für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf der 96 well Platte. Das Protaminsulfat wurde dann entfernt und 100 µl der DNA – Lösung wurde in verschiedenen Konzentrationen in die Wells pipettiert. Für das Coaten mit DNA

Coating Solution wurde die DNA Lösung mit dem gleichen Volumen Coating Solution in einem Sorvall – Zentrifugenglas gemischt. Nach zehninütiger Inkubation auf dem Drehtisch bei 150 rpm wurden 100 µl des Gemischs in die betreffenden wells der 96 well Platte pipettiert. Die auf beide Weisen beschichteten Platten inkubierten über Nacht bei Raumtemperatur. Die DNA–Lösung wurde dann entfernt und jedes Vertiefung wurde viermal mit 200 µl PBS gewaschen. Danach wurden die wells mit 200 µl Blockmilch befüllt und die Platte inkubierte 2 Stunden. Anschließend wurde in jedes well 100 µl einer Blockmilchlösung gegeben, die den Antikörper gegen Z – DNA in einer Konzentration von 1,5 µg/ml enthielt. Daraufhin wurde wiederum viermal mit 200 µl PBS pro well gewaschen. In die Vertiefungen wurde dann jeweils 100 µl einer Blockmilchlösung gegeben, in der der Sekundärantikörper in einer 1:10000 Verdünnung gelöst war. Nach 1,5 Stunden Inkubation und viermaligem Waschen mit 200 µl PBS pro Vertiefung wurde 100 µl des Farbstoffreagenz TMB in jedes Vertiefung gegeben. TMB wird durch die an den Sekundärantikörper befestigte Meerrettich-Peroxidase gespalten, sodass ein blauer Farbstoff entsteht. Nach 20-minütiger Inkubationszeit wurde die Farbstoffbildung mit 50 µl Stop Solution beendet. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Farbstoffbildung durch Messung der Extinktion bei 450 nm im Vergleich zur Extinktion bei 540 nm im Plattenfotometer.

2.2.4 Periphere Marker der NOS-Aktivität und periphere Expression von *NOS1* und *NOS3*

2.2.4.1 Bestimmung von Nitrit und Nitrat im Serum von BPD – Patienten, ADHS – Patienten und Kontrollen

Es wurde der NO_x^- -Gehalt im Serum von Individuen mit ADHS ($n = 14$), BPD ($n = 37$) und gesunden Kontrollen ($n = 29$) gemessen. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde Blutserum von den nüchternen Teilnehmern der Studie durch Zentrifugieren aus Vollblut gewonnen. Zur Vorbereitung der fotometrischen Bestimmung des NO_x^- -Gehalts im Serum wurden zunächst die Serumproteine durch Filtration entfernt. 300 µl des Patientenserum wurden pro Vertiefung in

eine 96 Vertiefung Platte die mit Ultracell – 10 am Boden ausgekleidet war pipettiert. Diese Filterplatte wurde auf eine normale 96 well Platte gestellt und sechs Stunden mit 3.000 rpm zentrifugiert. Diese Prozedur wurde mit weiteren 300 µl des Serums wiederholt und beide Filtrate wurden zusammengeführt. Das zusammengeführte Filtrat wurde bis zum Verbrauch bei -20 °C gelagert.

Die Extinktion der Standards und der Proben wurde jeweils in Triplikaten gemessen. Für die ersten vier Triplikate wurden 80 µl eines NO_3^- -Standards verschiedener Konzentration (100, 50, 25 und 0 µMol/l) eingesetzt. Für die Proben wurde das Serum im Verhältnis 1:1 mit dem im Kit mitgelieferten Puffer gemischt und anschließend 80 µl dieser Lösung in die betreffenden Vertiefungen pipettiert. Zu den Standards und den Proben wurde jeweils 10 µl der Nitratreduktase und des Kofaktors gegeben und der Ansatz inkubierte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Durch Zugabe der Nitratreduktase wird das Nitrat vollständig in Nitrit umgesetzt. Danach wurden 50 µl des Griess Reagent A pro Vertiefung einpipettiert. Nach der Inkubationszeit von 5 Minuten wurde der Ansatz mit 50 µl Griess Reagent B vervollständigt. Griess Reagent A besteht aus Sulfanilamid welches Nitrit bindet, über eine Azo-Kupplung mit dem Griess Reagent B entsteht der über Fotometrie nachweisbare Azo-Farbstoff. [187] Die Auswertung erfolgte im Plattenfotometer unter Messung der Extinktion bei 540 nm. Die Extinktion der Standardproben wurde gegen deren Konzentration angetragen und daraus eine Eichgerade ermittelt. Mit Hilfe der Eichgerade konnte von der Extinktion der Proben auf die NO_x^- -Konzentration geschlossen werden.

2.2.4.2 Bestimmung der Genexpression von NOS-I und NOS-III in Leukozyten

2.2.4.2.1 Reverse Transkription der Gesamt – RNA in Leukozytenlysat

Das Ausmaß der Expression von *NOS1* und *NOS3* in Leukozyten wurde mit der quantitativen Realtime – PCR (qRT – PCR) bestimmt. Dazu wurde im Vorfeld Blut der Teilnehmer in PAX – Röhrchen abgenommen und die im Blut

befindlichen Leukozyten wurden extrahiert und lysiert. Die gesamte mRNA die sich im Lysat befand wurde dann in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben.

Im iScript – Kit befinden sich dT Oligomere, die unspezifisch an 3' – Poly – A – Enden von mRNA binden und als Startpunkt für die reverse Transkription dienen. Komplementäre dNTPs werden von diesem Startpunkt durch die Moloney – Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (MMLV) eingebaut, sodass aus mRNA revers – komplementäre cDNA entsteht. Der Reaktionsansatz war wie folgt

Tabelle 13 Reaktionsansatz der reversen Transkription mit iScript

RNA aus PAX Röhrchen	V _{500ng}
5x iScript Reaction Mix	4µl
Nuklease freies Wasser	15µl-V _{500ng}
iScript Reverse Transcriptase	1µl

V_{500ng} steht für dasjenige Volumen aus der RNA Extraktion, welches 500 ng enthält. Im Thermocycler durchlief jeder Ansatz folgendes Programm:

Tabelle 14 Reaktionsbedingungen der reversen Transkription mit iScript

25 °C	5 min
30 °C	42 min
85 °C	5 min
4 °C	Pause

Die Lagerung der Proben erfolgte bei – 20 °C.

2.2.4.2.2 Quantitative Realtime – PCR

Die Quantifizierung der *NOS1* – und *NOS3* – Genexpression erfolgt über die Quantifizierung der cDNA. cDNA dient als Template für eine PCR mit spezifischen Primern. Der SYBR® Green Fluoreszenzfarbstoff im Reaktionsansatz interkaliert in die neu gebildete doppelsträngige DNA, wodurch diese fluoresziert. Mit Hilfe des verwendeten Realtimacyclers kann die Fluoreszenzstärke in jedem Zyklus ermittelt werden, mit steigender Zyklenzahl und damit steigender Ampliconzahl steigt die Fluoreszenz. Während der Amplifikation steigt die Anzahl der PCR Produkte aufgrund der geringen Templateanzahl zunächst nur mäßig an, steigert sich dann aber exponentiell, bis sie schließlich kaum noch ansteigt, da nach der Denaturierungsreaktion auch im Verhältnis zur Anzahl der korrespondierenden Stränge wenige Primer für das Annealen zur Verfügung stehen. Je mehr cDNA (und damit RNA) sich im Reaktionsgefäß befindet, desto früher findet der Übergang von der ersten in die exponentielle Phase statt. Der Übergangszyklus bei der die Fluoreszenz eine gewisse Schwelle (Threshold) übersteigt, erhält die Bezeichnung Threshold Cycle (CT).

Für die Haushaltsgene und das Zielgen wurden auf einer jeweils eigenen 384 – well – Platte folgende Substanzen pro Vertiefung zusammenpipettiert:

Tabelle 15 Reaktionsansatz für die reverse Transkription

SYBR Green Mix	5 µl
Primer Mix	1 µl
H2O	3 µl
cDNA	1 µl

Die Bestimmung der Fluoreszenz erfolgte jeweils in Triplikaten. Die Proben durchliefen im CFX 384 C1000 Realtime – Thermocycler folgendes Programm:

Tabelle 16 Reaktionsbedingungen für die reverse Transkription

95 °C	Initiale Denaturierung	5 min	
95 °C	Zyklische Denaturierung	10 s	39 Zyklen
60 °C	Zyklisches Annealing und Polymerisation	30 s	
95 °C	Endannealing	10 s	
In Schritten von 65 °C bis 95 °C	Schmelzkurve	In 5 s – Schritten	

Reaktionsbedingungen für die reverse Transkriptionsreaktion

Nicht nur die Genexpressionsstärke in der jeweiligen Zelle hat einen Einfluss auf die Anzahl der mRNA-Kopien des Zielgens im Reaktionsansatz, weitere Faktoren sind Unterschiede in der Qualität der RNA im Lysat und unterschiedliche Gesamt-RNA-Mengen. Um diese Störvariablen bei der Bestimmung der Genexpressionsstärke auszuschalten, wird nicht die Gesamtmenge an *NOS1* bzw. *NOS3* cDNA im Leukozytenlysat bestimmt, vielmehr wird die relative Expression des Zielgens im Vergleich zur Expression sogenannter Haushaltsgene ermittelt. Haushaltsgene zeichnen sich durch eine konstante Genexpression im zu untersuchenden Gewebe aus, sie sind also ein Maß für die gesamte Genexpression in den untersuchten Leukozyten. Der auch als Normalisierung bezeichnete Vergleich der RNA – Mengen wurde mit Hilfe der Haushaltsgene GAPDH, ACTB, ALAS und 18S durchgeführt, für jedes Haushaltsgen wurde also - analog zu den Zielgenen – eine weitere PCR durchgeführt. Vor der Normalisierung mussten noch die Ct-Werte und die PCR-Effizienz aus der im Cyclyer bestimmten Fluoreszenz mit Hilfe des Programms LinReg bestimmt werden. Die Berechnung des Normalisierungsfaktors (NF) erfolgte mit dem Programm geNORM, ein Programm, das auch die einzelnen Haushaltsgene auf ihre Verwendbarkeit überprüft. Die relative Genexpression wurde dann mit Hilfe folgender Formel

bestimmt:

$$Q_N(NOS3) = \frac{E}{\frac{ctx - ct_{min}}{NF}}$$

Q_N steht dabei für die relative Genexpression, E steht für die durchschnittliche Effizienz der PCR – Reaktion für das entsprechende Gen, ctx ist der mittlere ct Wert der Probe. ct_{min} steht für den kleinsten threshold cycle des jeweiligen Gens.

Für die Schmelzkurvenerstellung wurde der Reaktionsansatz zunächst auf 65°C abgekühlt und dann in 5 Sekunden dauernden Schritten von 65°C auf 95°C erwärmt. Durch das Erwärmen sollte die Fluoreszenz Schritt für Schritt abnehmen, da mit steigender Temperatur DNA immer seltener doppelsträngig vorliegt. Wenn keine weiteren doppelsträngigen DNA–Moleküle als die qRT–PCR–Amplicons vorliegen (z. B. andere Amplicons als das erwünschte PCR–Amplicon oder Primerdimere) hat diese Schmelzkurve nur ein Maximum. Auf diese Weise wurde die Spezifität der qRT–PCR überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Methylierungsuntersuchungen im *NOS1* Exon 1f Promoter

3.1.1 Ergebnisse der Klonierung in pCRII

Bei der Klonierung in pCRII waren nur wenige Klone mit dem richtigen Insert im Plasmid auswertbar. Die Auswertung erfolgte mit dem BiQ–Analyser. Dieses Programm vergleicht die Sequenz des Bisulfit–Amplicons mit der C → T–konvertierten Sequenz aus einer Gendatenbank. Der Anteil der methylierten CpG–sites wird in Abbildung 2 und Abbildung 3 für die beiden untersuchten Individuen angezeigt:

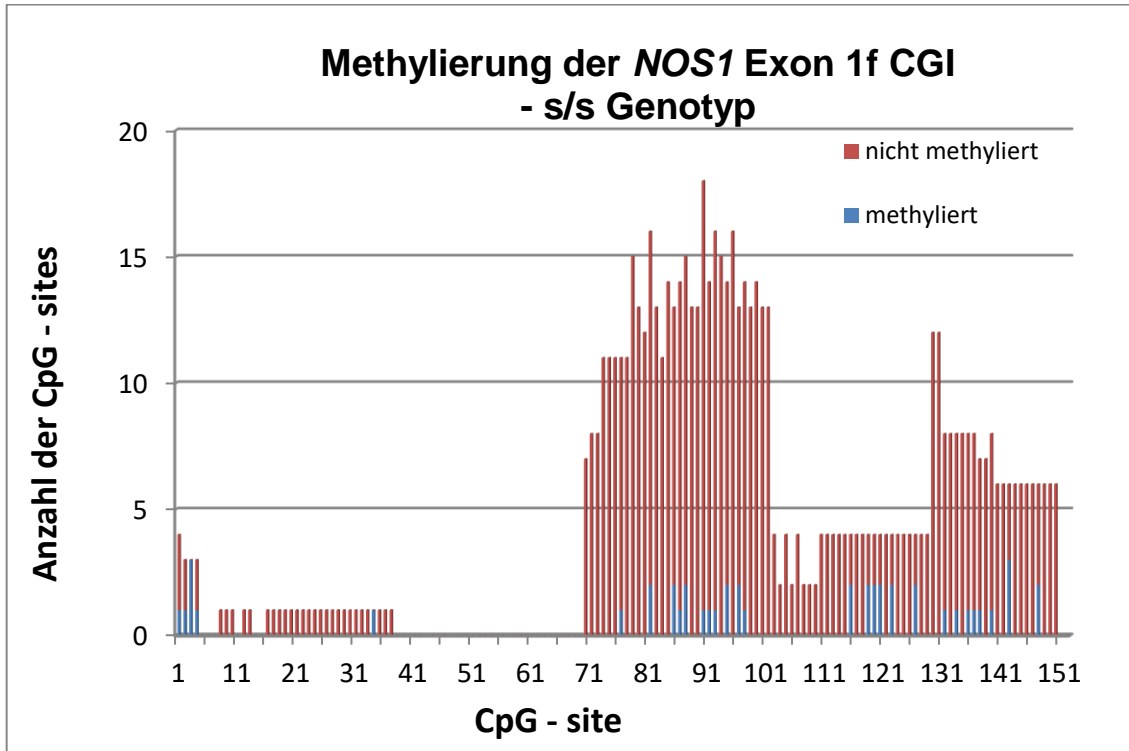


Abbildung 2 Methylierung der *NOS1* Exon 1f CGI – s/s-Genotyp

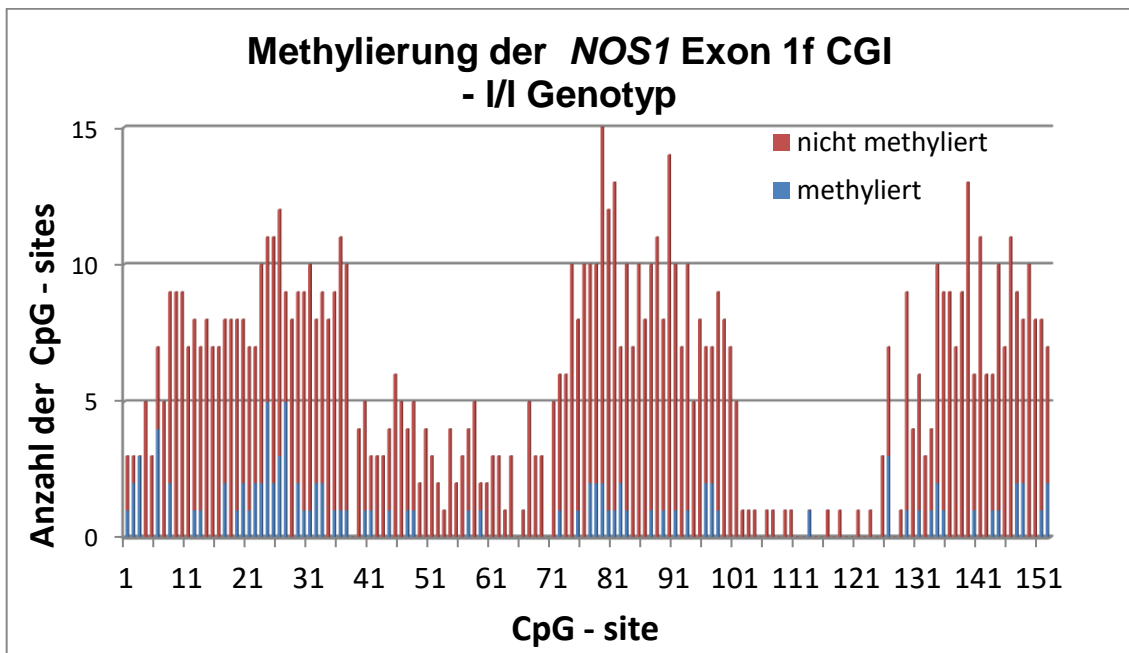


Abbildung 3 Methylierung der *NOS1* Exon 1f CGI –I/I-Genotyp

Auf der Abszisse ist die Nummer der betreffenden CpG–site angegeben, ausgehend vom Negativstrang der DNA in 5'→3'–Richtung. Anhand der Ordinate kann die Anzahl der methylierten CpG – sites ermittelt werden. Der Sequenzausschnitt der CGI mit den verzeichneten CpG – sites ist unten unter Punkt 9, Nukleotidsequenzen angegeben.

3.1.2 Ergebnisse aus dem Bisulfit – PCR Sequenzierungsprotokoll

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Protokoll etabliert, das die Methylierungsanalyse der *NOS1* Exon 1f CGI ermöglicht. Für eine Testperson mit langem *NOS1* Exon 1f VNTR konnten für das Primerpaar 1 sechs Kolonien mit eigenem einklonierten PCR–Produkt sequenziert werden. Die Methylierung ist für jede der vier untersuchten CpG – sites in einem Balkendiagramm angegeben, wie sie durch das Programm BiQ – Analyzer ermittelt wurde. Die amplifizierten Sequenzen, sowie deren Positionen können dem Anhang entnommen werden.

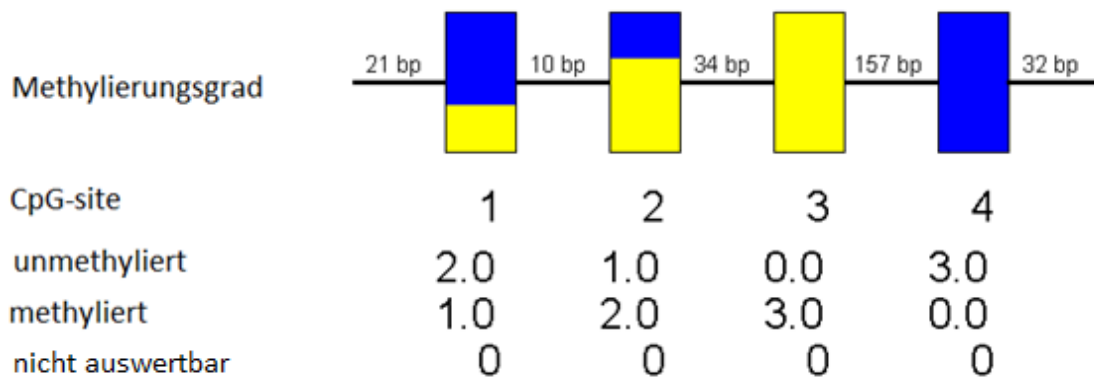


Abbildung 4 Methylierung der CpG-sites in Amplicon 1 bei homozygot langem *NOS1* Exon 1f VNTR (Blau unmethylierte CpG-sites, gelb methylierte CpG-sites)

3.1.3 Ergebnisse der Pyrosequenzierung

DNA wurde aus Leukozyten im Vorfeld dieser Arbeit extrahiert. Die untersuchten Teilnehmer (n=54) hatten keine psychiatrische Vorerkrankung. Die Methylierung der einzelnen CpG – sites wurde in

Abhängigkeit der VNTR–Länge bestimmt. Die Stichprobe bestand aus 29 Teilnehmern mit homozygot langem NOS1 Exon 1f VNTR sowie 25 Teilnehmern homozygot kurzem NOS1 Exon 1f VNTR. Die der DNA der Teilnehmer wurde bisulfitiert und anschließend wurden zwei kleinere Sequenzabschnitte mit Hilfe eines Pyrosequenzierers sequenziert. Die jeweiligen Methylierungen können den Tabellen entnommen werden. Bei vier der untersuchten CpG–Sites war die Anteile der Methylierungen nicht normalverteilt, hier wurde ein Mann–Whitney–U–Test zur Detektion signifikanter Methylierungsunterschiede verwendet, bei den anderen, normalverteilten Methylierungsanteilen wurde jeweils ein Student t – Test verwendet.

Tabelle 17 prozentualer Methylierungsgrad der CpG-sites in Amplicon A

CpG-site	1	2	3
I/I Genotyp ± SD	39,0 ± 6,96	42,7 ± 7,35	15,8 ± 3,69
s/s Genotyp ± SD	39,0 ± 5,41	43,7 ± 8,12	15,8 ± 3,67

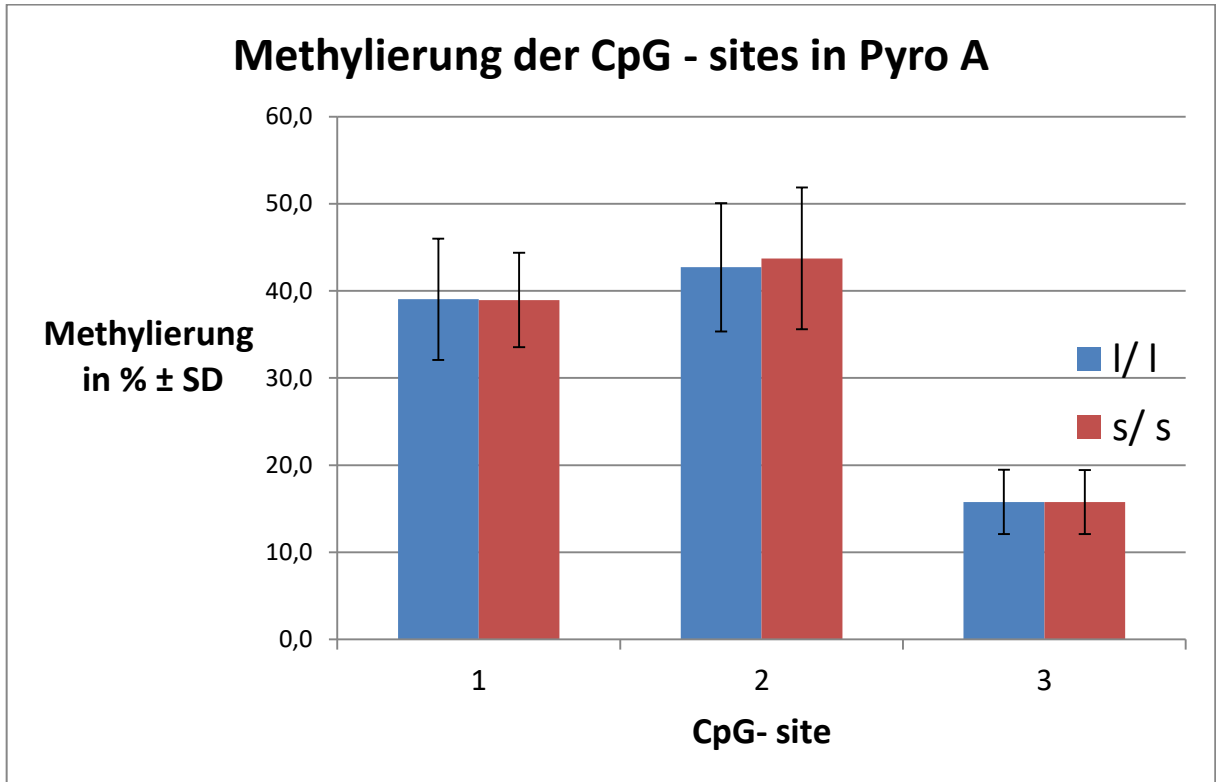


Abbildung 5 Methylierung der CpG-sites in Pyro A

Tabelle 18 Methylierungsgrad in Prozent der CpG-sites in Primer B

CpG	1	2	3	4	5
Methylierung in % ± SD	13,0 ± 2,31	5,4 ± 2,32	8,6 ± 1,45	7,2 ± 1,64	8,8 ± 2,39
Methylierung in % bei s/s Genotyp ± SD	13,5 ± 2,53	5,3 ± 2,79	8,2 ± 2,63	6,5 ± 1,43	7,6 ± 2,55

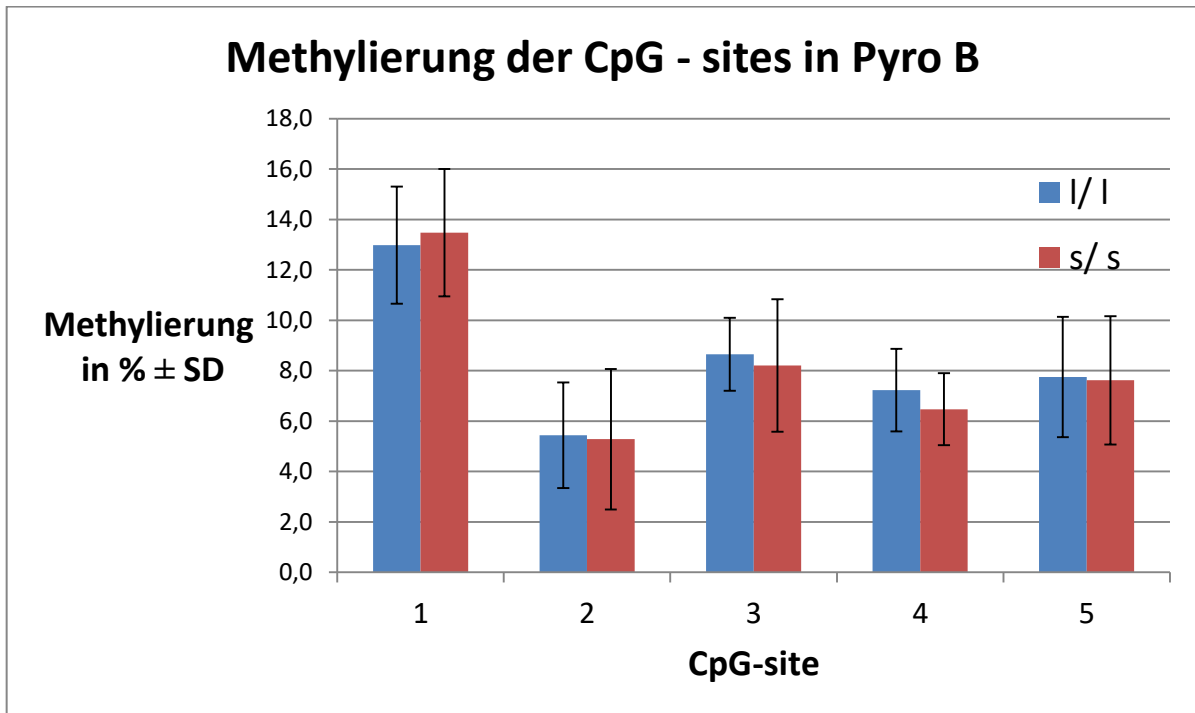


Abbildung 6 Methylierung der CpG-sites in Pyro A

Für keine der mit der Pyrosequenzierung untersuchten CpG–Sites ergaben sich signifikante Unterschiede in der Methylierung in Abhängigkeit zum VNTR–Genotyp. ($p > 0,2$ für alle CpG–Sites nach Bonferroni–Korrektur)

3.2 Untersuchung der DNA Sekundärstruktur im *NOS1* Exon 1f Promotor

3.2.1 Ergebnisse der ELISA gegen Z – DNA

Unabhängig von der verwendeten Coating–Methode war die höchste Extinktion der ELISA gegen Z–DNA beim Kontrollvektor ohne Insert zu beobachten.

Bei Verwendung der DNA–Coating–Solution war die zweithöchste Extinktion mit dem Plasmid mit dem längsten Repeat (29 CA-Repeats) zu beobachten. Die Unterschiede zwischen den anderen Vektoren (19 und 24 CA-Repeats) waren nicht signifikant.

Bei Verwendung der Protaminsulfatlösung war die zweithöchsten Extinktion beim Plasmid mit 24 CA-Repeats zu beobachten, es folgen die Plasmide mit

der höchsten (29 CA-Repeats) und geringsten (19 CA-Repeats) Repeat-Länge. Auf eine statistische Auswertung wurde wegen der Erhöhung der Extinktionen der Plasmide mit den verschiedenen Repeatanzahlen gegenüber der Negativkontrolle verzichtet.

Tabelle 19 Extinktion der ELISA gegen Z-DNA

Coating – Substanz	DNA Coating solution	Protaminsulfat
Vektor		
pGL3 basic-Vektor (ohne Insert)	1,27	0,41
19 CA-Repeats	0,51	0,09
24 CA-Repeats	0,48	0,13
29 CA-Repeats	0,61	0,12

3.2.2 Dot – Blot

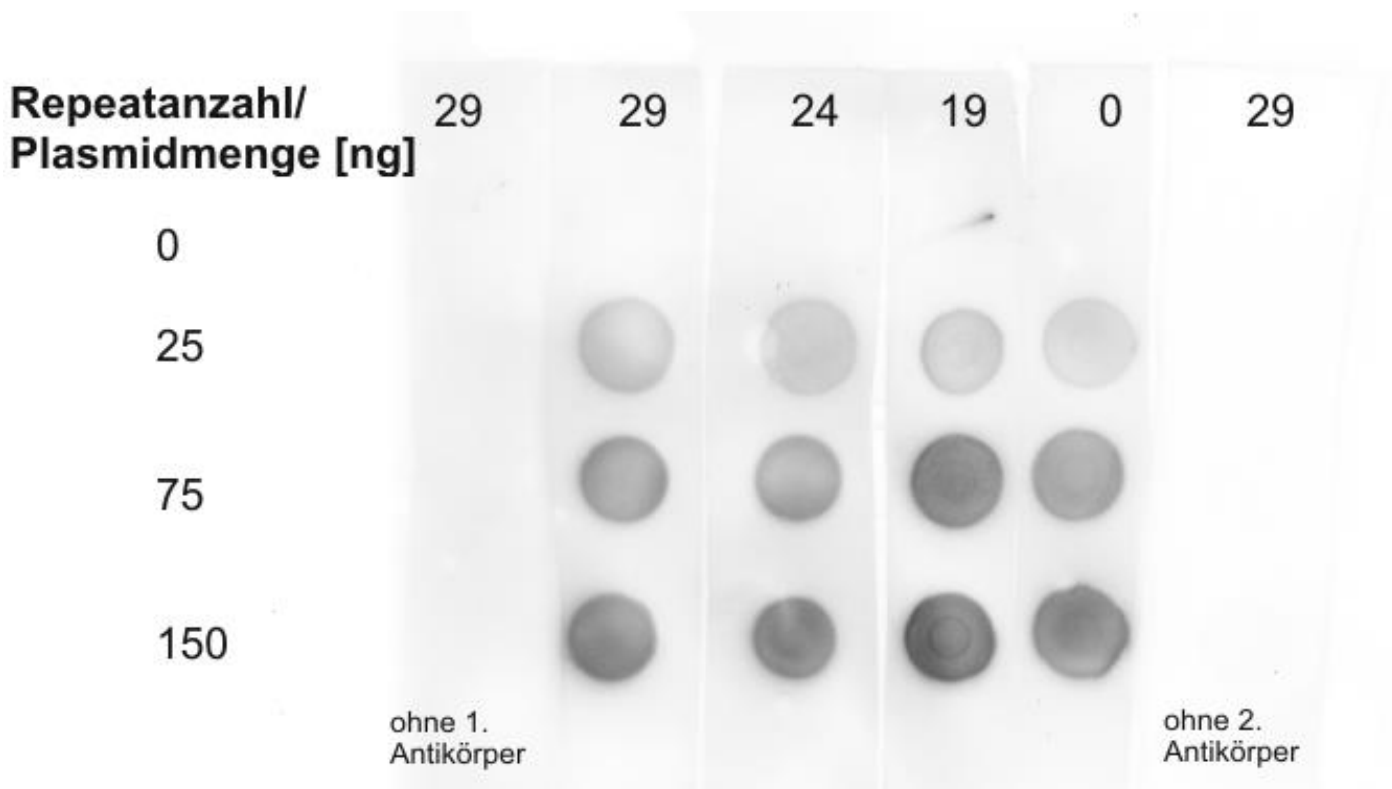


Abbildung 7 Nitrocellulos-Membran des Dot-Blots bei Auswertung mit dem ChemiDoc

Obige Aufnahme der Nitrocellulosemembran wurde als Grundlage für die quantitative Bestimmung der Färbung mit dem Programm ImageJ verwendet. Nach Einstellen einer einheitlichen Hintergrundfarbe wurden die kreisförmigen „Dots“ mit Hilfe des Programms *ImageJ* auf obigem Bild eingezeichnet. Sowohl die Fläche (Area) als auch die mittlere Färbung (Mean) wurden daraufhin vom Programm ermittelt. Das Produkt aus diesen Faktoren ist die *Integrated Density*, die ein Maß für die Bindung des Antikörpers ist.

Tabelle 20 Quantitative Auswertung des Dot-Blots mit ImageJ

Anzahl der GT - Wiederholungen im Plasmid	Masse _{DNA} [ng]	Area	Mean	Integrated Density
29	25	0,094	11984,025	1132,349
29	75	0,094	20857,724	1969,515

29	150	0.094	27258,859	2562,120
24	25	0.103	12098,772	1248,209
24	75	0.087	19165,286	1658,797
24	150	0.084	27164,070	2277,006
19	25	0.074	12810,452	953,894
19	75	0.103	27640,522	2849,909
19	150	0.090	33007,811	2979,687
0 (Plasmid ohne Insert)	25	0.084	11083,012	926,276
0 (Plasmid ohne Insert)	75	0.095	20918,567	1981,745
0 (Plasmid ohne Insert)	150	0.110	25714,923	2831,527

Es zeigte sich, dass die stärkste Bindung des Antikörpers gegen Z-DNA auf den Dots erfolgte, auf denen das Plasmid mit der geringsten Wiederholungsanzahl des *NOS1* Exon 1f VNTR war. Es folgen die Dots mit dem pGL3 – Vektor ohne Insert und die Plasmide mit der längsten bzw. mittleren Wiederholungsanzahl im VNTR, wobei zwischen letztgenannten nur ein geringer Unterschied bestand. Auf eine statistische Auswertung wurde wegen der niedrigeren Extinktionen der Plasmide mit den verschiedenen Repeatanzahlen gegenüber der Negativkontrolle verzichtet.

3.3 Bestimmung peripherer Marker von *NOS1*/*NOS-I* und *NOS3*/*NOS-III* bei Bipolar-affektiv erkrankten Patienten, ADHS-Patienten und Kontrollen

3.3.1 Bestimmung des NO_x^- -Spiegels

--. Es zeigte sich eine signifikante Abweichung zwischen den BPD-Patienten, den ADHS-Patienten und den Kontrollen ($p=0,00226$). In einer Post – hoc –

Analyse wurden die Unterschiede zwischen diesen drei Gruppen untersucht, hierbei zeigte sich in einem zweiseitigem Student's t-Test nach Bonferroni-Korrektur eine signifikante Erhöhung des NO_x^- -Spiegels der BPD-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe ($p=0,006$), die Erhöhung gegenüber der Gruppe mit ADHS war nicht signifikant ($p=0,11$). Zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit ADHS gab es keine signifikanten Unterschiede (nach Korrektur $p=1,00$).

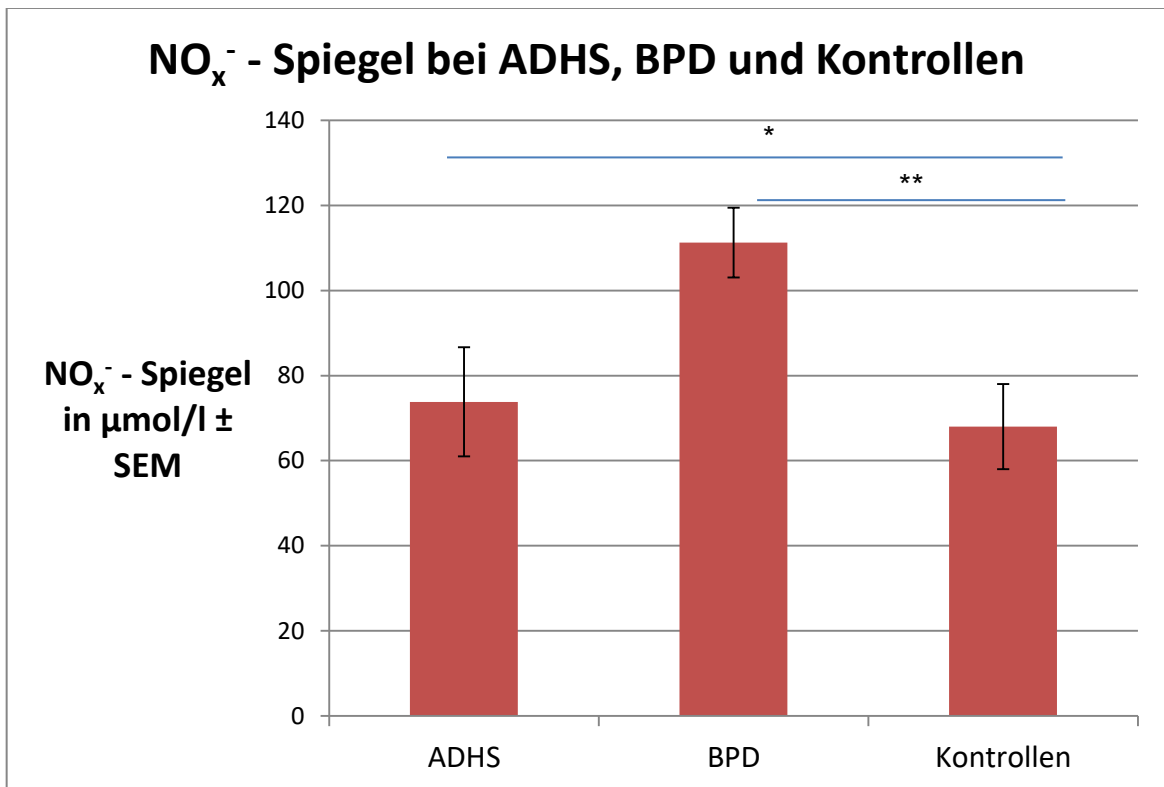


Abbildung 8 NO_x⁻-Spiegel bei BPD, ADHS und Kontrollpersonen

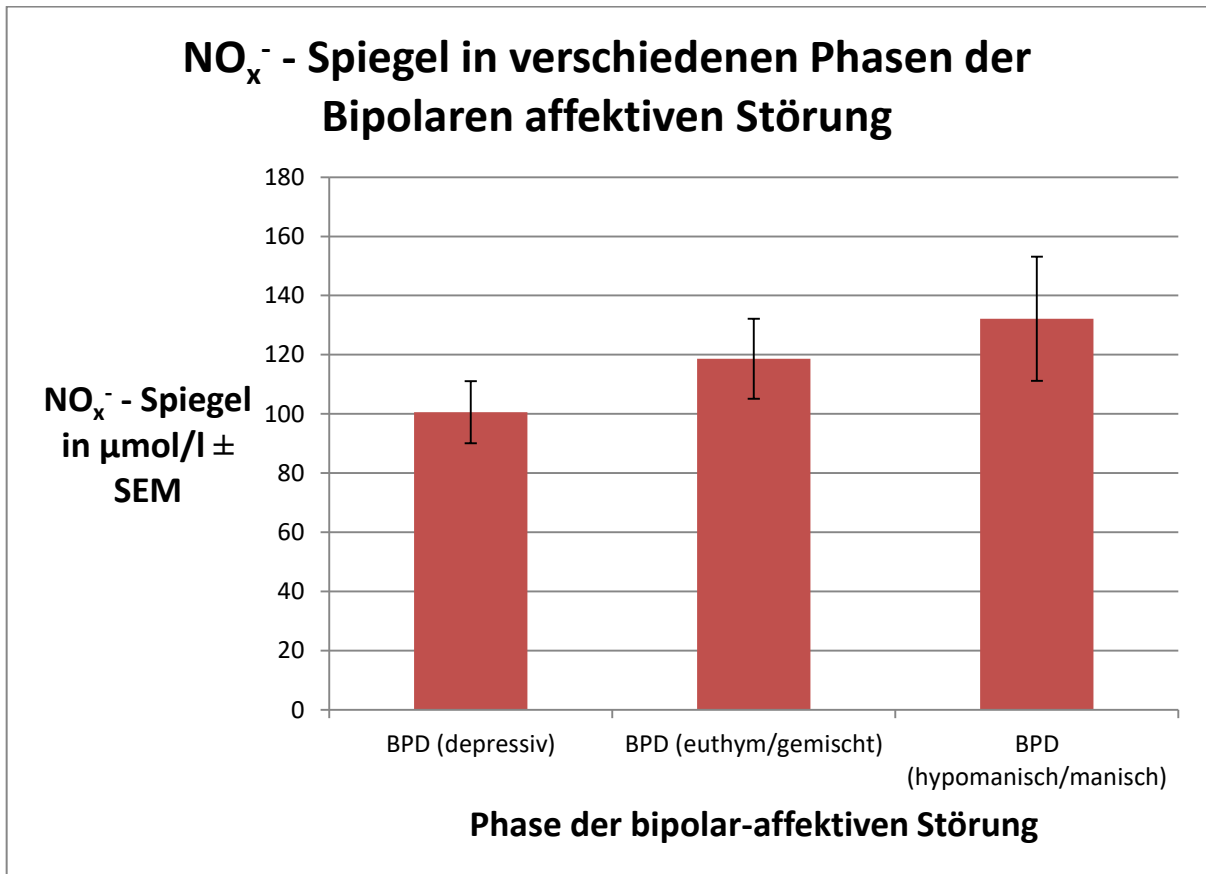


Abbildung 9 NO_x⁻-Spiegel im Serum in verschiedenen Phasen der BPD

Anschließend wurde die BPD Gruppe weiter differenziert nach der Episodenpolarität zum Blutabnahmezeitpunkt. Hierbei zeigten sich höhere NO_x⁻ Spiegel bei Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in einer hypomanen oder manischen Phase befunden haben. Euthyme Patienten hatten wiederum einen tendenziell höheren NO_x⁻-Spiegel als depressive Patienten. Die Unterschiede zwischen den drei Gruppen waren in einer one – way – ANOVA jedoch nicht signifikant ($p = 0,30$).

Tabelle 21 NO_x⁻-Spiegel im Blutserum und NOS3 Expression in Leukozyten von Kontrollen ADHS-Patienten und BPD-Patienten

Gruppe	[NO _x ⁻] in µMol/l ± SEM	Q NOS3 ± SEM
--------	---	--------------

Kontrollen	68,01 ± 9,98	0,428 ± 0,0804
ADHS – Patienten	73,83 ± 8,19	0,380 ± 0,0719
BPD – Patienten	111,23 ± 12,83	0,394 ± 0,0359
<i>depressiv</i>	<i>101,34 ± 10,86</i>	<i>0,448 ± 0,0450</i>
<i>euthym /gemischt</i>	<i>121,67 ± 12,57</i>	<i>0,340 ± 0,1150</i>
<i>hypomanisch/manisch</i>	<i>143,73 ± 22,13</i>	<i>0,240 ± 0,0771</i>

3.3.2 Bestimmung der Expression von *NOS3* und *NOS1* in Leukozyten

Zwischen den drei Gruppen ADHS, BPD und den Kontrollen konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der *NOS3* – Expression festgestellt werden ($p = 0,859$). Es zeigte sich ein Trend einer *NOS3* – Überexpression bei Kontrollen gegenüber der ADHS-und der BPD-Gruppe. Bei Patienten in der depressiven Phase war die *NOS3*–Expression am höchsten, gefolgt von der gemischt/euthymen Gruppe und dann der Gruppe mit den (hypo)manischen manischen Patienten. Die Unterschiede zwischen den Subgruppen der BPD waren jedoch nicht signifikant ($p = 0,15$).

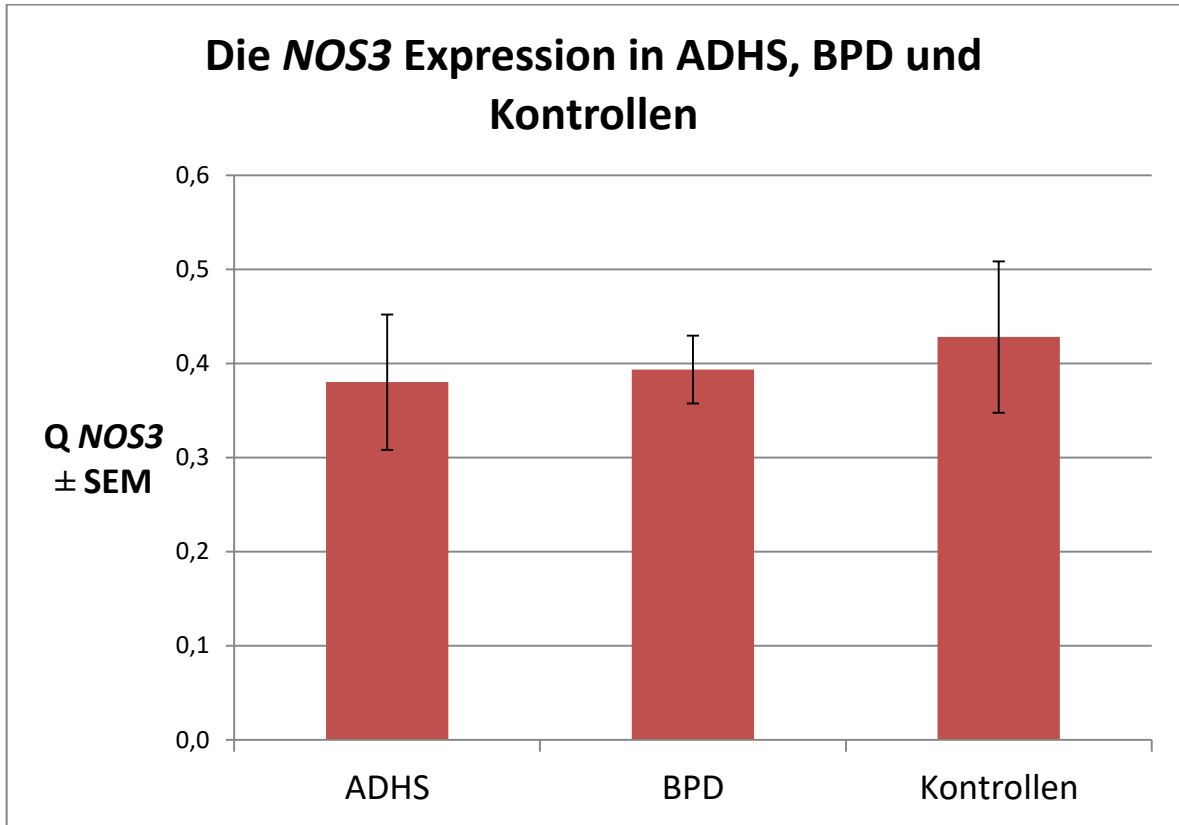


Abbildung 10 Vergleich der NOS3 Expression bei Patienten mit ADHS und BPD sowie einer Kontrollgruppe

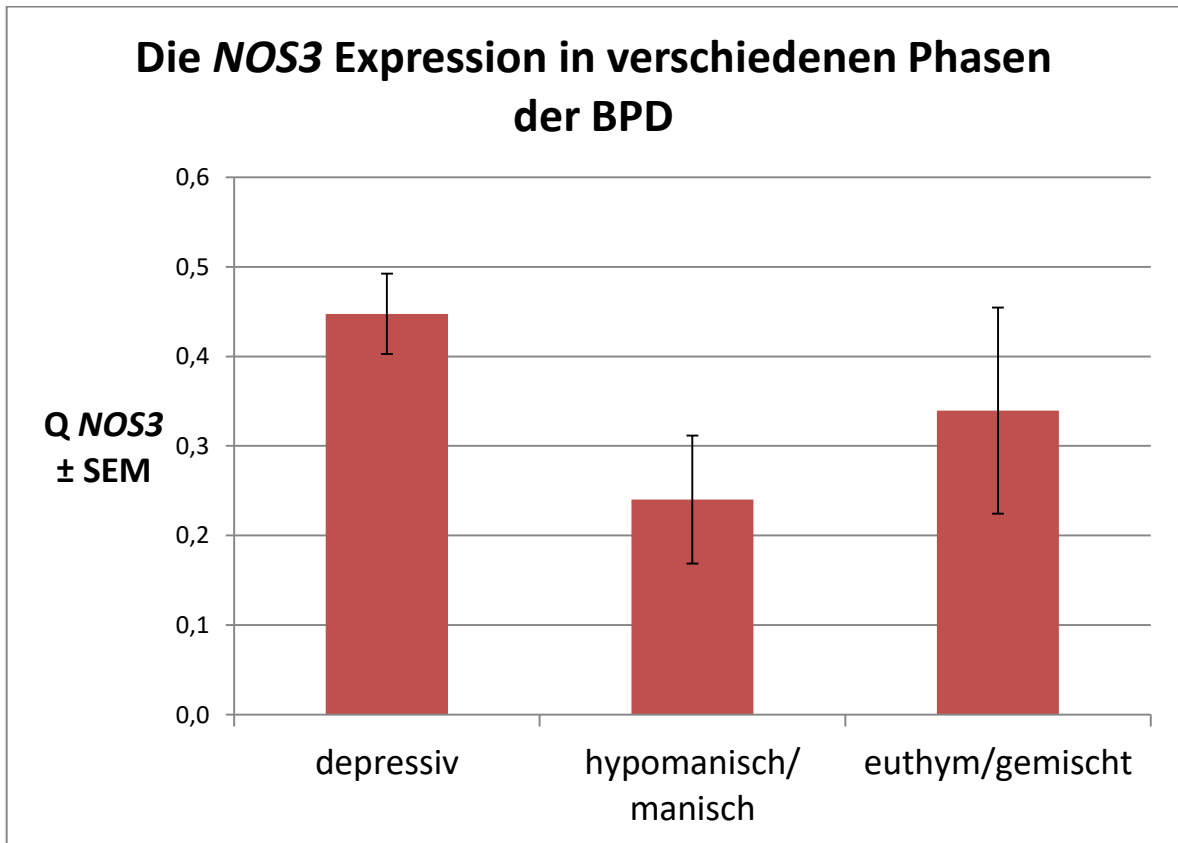


Abbildung 11 *NOS3* Expression in verschiedenen Phasen der BPD

Das Expressionsniveau von *NOS3* war allgemein sehr viel niedriger als das der Haushaltsgene.

NOS1 mRNA konnte in Leukozyten nicht nachgewiesen werden.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen des *NOS1* Exon1f VNTR auf DNA-, RNA- und Enzymproduktebene untersucht. Es wurden Unterschiede der Methylierung in der *NOS1* Exon1f CGI in Abhängigkeit zum *NOS1* Exon1f VNTR untersucht, daneben wurde untersucht, ob der *NOS1* Exon1f-VNTR Z-DNA ausbildet. Abschließend wurde untersucht, ob sich Patienten, die unter einer bipolar-affektive Erkrankung leiden, hinsichtlich der Expression von *NOS1* und *NOS3* sowie ihres Nitrits und Nitratgehaltes von Kontrollen unterscheiden.

4.1 Methylierungsanalyse

Die CGI im Bereich des *NOS1* Exon 1f VNTR ist im Vergleich zu anderen CGI in anderen Genen mit etwa 2200 bp sehr groß. Es wurde beschrieben, dass lange CGIs besonders in Promotorbereichen von Genen mit mehreren Transkriptionsstartpunkten und gewebsspezifischer Expression dieser Transkripte vorkommen. Die CGIs sollen in diesen Genen die Aktivierung der einzelnen Transkriptionsstartpunkte regulieren. [188] Generell führt die Zunahme der Methylierung in einer CGI zu einer Repression der Expression, [189] es gibt jedoch einige Ausnahmen. [190]

In dieser Arbeit sollte ein Protokoll etabliert werden, mit dessen Hilfe die Untersuchung eines großen Sequenzbereiches möglich ist. Theoretisch kann der Bereich, der mit einer Sequenzierung analysierbar ist, bis zur maximalen Ampliconlänge der PCR ausgeweitet werden. Dadurch wird die Methylierung jedoch überschätzt, da durch das Bisulfitieren v. a. die unmethylierten DNA-Moleküle geschädigt werden und deswegen für eine Amplifikation nicht zur Verfügung stehen. Im Rahmen der Etablierung des Protokolls zeigte sich auch, dass für die Ligation hohe Anforderungen an die Reinheit des Amplicons gestellt werden. Nur nach Aufreinigung und unter Verwendung eines für Verschmutzungen weniger anfälligen Ligierungskits konnten einige Amplicons erfolgreich inkloniert werden.

Mittels der Methode der Pyrosequenzierung konnten in keiner der acht untersuchten CpG-sites signifikante Methylierungsunterschiede in Abhängigkeit der VNTR-Länge festgestellt werden. Die Ergebnisse einer Pyrosequenzierung lassen im Allgemeinen keine Rückschlüsse auf die Funktionalität der gesamten *NOS1* Exon 1f CGI zu, da mit der Pyrosequenzierung nur sehr wenige CpG-sites untersucht werden können. Im Allgemeinen ist die Pyrosequenzierung z. B. im Vergleich zum Sequenom – EpiTyper[®]-System und dem Bisulfit-PCR Sequenzierungs-Protokoll die einfachere und schnellere Methode, um die Methylierung von CpG-sites zu ermitteln. Eine genaue Beschreibung und eine Diskussion von Vor- und

Nachteilen findet sich in der Übersichtsliteratur. [191, 192] Mit dem Sequenom-System wird die Methylierung von CpG – sites mit Hilfe eines Massenspektrometers ermittelt. Zunächst wird wie beim Bisulfit-PCR Sequenzierungs-Protokoll die zu untersuchende DNA bisulfitiert und die Region von Interesse mittels PCR vervielfältigt. Anschließend werden die Amplicons in RNA transkribiert und mit einer Nukleotid-abhängigen RNase geschnitten. Die Masse der entstandenen Bruchstücke ist davon abhängig, ob die dort enthaltenen CpG – sites vor der Bisulfitierung methyliert waren. Durch die Transkription entsteht aus methyliertem Cytosin Guanin und aus unmethyliertem Cytosin Adenin, so dass die RNA Bruchstücke vorher methylierter DNA 16 Da schwerer sind als die RNA Bruchstücke zuvor methylierter DNA. Im Massenspektrometer kann das Mengenverhältnis der beiden unterschiedlich schweren RNA – Bruchstücke ermittelt werden, woraus sich dann Aussagen über die Methylierung der CpG-site innerhalb dieser Sequenz ableiten lassen. [193] Bei der *NOS1* Exon 1f CGI konnte diese Methode nicht angewandt werden, da sich durch die vielen Insertions- und Deletionspolymorphismen die Massen der RNA-Bruchstücke bei gleicher Methylierung von vornherein unterscheiden. Dadurch wird die Berechnung der Methylierung aus den Massen der RNA – Bruchstücke zu komplex.

Hinsichtlich der Untersuchung des Einflusses verschiedener SNPs auf das Methylierungsmuster konnte gezeigt werden, dass insbesondere die cis-lokalisierten SNPs das Methylierungsmuster ändern. Um diejenigen SNPs zu detektieren, die das Methylierungsmuster beeinflussen, wird nach sogenannter allelspezifischer Methylierung gesucht. Dabei wird im Genom der Teilnehmer nach SNPs gesucht, für die diese heterozygot sind, anschließend wird die Methylierung der CpG-sites auf beiden DNA-Strängen bestimmt, die sich in der Nähe des SNPs befinden und miteinander verglichen. Die Angaben über den Anteil von differenziell methylierten CpG-sites in der Nähe von heterozygoten SNPs reicht von 0,16% bis 10 %. [194–197]

Die *NOS1* Exon 1f CGI wurde bisher noch nicht auf ihre Methylierung untersucht, jedoch gibt es Befunde zur Methylierung in CpG-sites im Exon 2

von *NOS1*. Diese CpG-sites liegen in einer Konsensussequenz des *steroidogenic factor 1*. Breton et al. fanden keinen Zusammenhang zwischen der Methylierung in dieser CpG-site und dem Anteil von NO an der Ausatemluft. [198]

Gegenstand unserer Studie war Leukozyten-DNA, über deren Untersuchung wir Rückschlüsse auf den Methylierungsstatus im Gehirn zu ziehen versuchten. Ob das Methylierungsmuster im peripheren Gewebe dem Methylierungsmuster im Gehirn entspricht, wurde von Bustos et al. untersucht, diese fanden Unterschiede zwischen dem Methylierungsmuster im Gehirn und dem in der Milz, während es nur geringe interindividuelle Unterschiede bei Betrachtung des gleichen Gewebes gab. [199] Auch zwischen den einzelnen Hirnregionen wurden in mehreren Untersuchungen starke Unterschiede im Methylierungsmuster gefunden. [200–202] In einer neueren Studie von Davies et al. konnten diese Unterschiede bestätigt werden, die Unterschiede zwischen den Teilnehmern war deutlich kleiner als die zwischen den einzelnen Geweben von Teilnehmern. Jedoch zeigte sich dass die Unterschiede in der Methylierung von peripherem Gewebe und von neuronalen Gewebe häufig korreliert sind. Das heisst interindividuelle Unterschiede in der Methylierung peripheren Gewebes gehen mit Unterschieden in der Methylierung von neuronalem Gewebes einher. [203] Bei der Betrachtung der Methylierungsmuster eineiiger Zwillinge, die über dasselbe Genom verfügen und deren Methylierungsmuster deswegen keine durch Polymorphismen vermittelten Unterschiede aufweisen, zeigen sich schon im Kindesalter starke Unterschiede im Methylierungsmuster, die sich mit zunehmendem Alter noch weiter verstärken. [204, 205] Auch in fertig differenzierten Neuronen wird das Methylierungsmuster noch stark verändert. [206]

Trotz dieser Zweifel an der Validität wird bei der Untersuchung des Methylierungsmusters beim Menschen hauptsächlich peripheres Gewebe untersucht, da humanes Hirngewebe kaum zur Verfügung steht. Bei Patienten, die an BPD leiden, wurde z. B. in Leukozyten-DNA eine signifikante

Steigerung der Methylierung der CGI im Promotorbereich des 5HTR_{1A} gefunden. [207]

Neben *NOS1* besitzt auch *BDNF* alternative erste Exons, die teilweise in einer CGI liegen. Die starke Homologie des Gens ermöglicht bei *BDNF* im Gegensatz zu *NOS1* die Untersuchung des Methylierungsmusters am Tiermodell. Im Gehirn der Maus und der Ratte führt die Hypermethylierung der *bdnf* – CGI zur Transkriptionsrepression. [208, 209] Diese Befunde können zumindest zum Teil auch auf den Menschen übertragen werden, so fand sich bei Suizidenten eine verstärkte Methylierung im *BDNF* Exon IV Promoter mit nachfolgender Transkriptionsrepression bei Untersuchung des Wernicke-Areals. [210] Bei depressiven Patienten ist die *BDNF* – Expression vermindert. Durch Gabe von Antidepressiva bzw. durch eine Behandlung mittels Elektrokrampftherapie konnte im Maus-Depressionsmodell die *BDNF* – Expression wieder auf normale Werte angehoben werden. [211]

Fuchikama et al. haben mit einem im Vergleich zu unserer Studie ähnlichem Design die Methylierung in der *BDNF* Exon IV CGI und der *BDNF* Exon I CGI in der Leukozyten – DNA von depressiven Patienten und Kontrollen untersucht. [212] Sie verwendeten dabei das Sequenom EpiTyper[®]-System. Dabei stellten sie fest, dass die CGI um das Exon IV bei den depressiven Studienteilnehmern hypomethyliert ist. Die Autoren schlagen nun vor, die Methylierung als Biomarker für die Depression zu verwenden, dabei ist jedoch anzumerken, dass - wie oben bereits erwähnt - die Hypermethylierung im Gehirn mit nachfolgender Transkriptionsrepression charakteristisch für die Depression ist. Es erscheint wahrscheinlicher, dass die Hypomethylierung in den Leukozyten eine Folge der Medikation ist oder ein Kompensationsmechanismus nach der Transkriptionsrepression im Gehirn ist. [213] Die Amplicons der Bisulfit-PCR waren über 400 Basenpaare lang, hier besteht wie bereits erwähnt das Risiko, den Anteil methylierter DNA zu überschätzen.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchung konnte kein Beitrag zur Beleuchtung der Gen-Umwelt-Interaktion im *NOS1* Exon 1f VNTR geleistet werden. Die Etablierung eines stabilen Protokolls, mit dem die Sequenzierung nach Einklonieren möglich wäre, war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Eine differenzielle Methylierung zweier zufällig ausgewählten, sehr kleiner Sequenzen der *NOS1* Exon 1f CGI in einer kleinen Stichprobe konnte nicht nachgewiesen werden. Die Hypothese bezüglich der Gen-Umwelt-Interaktion konnte also im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft werden. Aufgrund der kleinen Stichprobe und des kleinen untersuchten Bereichs sollte von den Ergebnissen der Pyrosequenzierung nicht auf eine gleiche Methylierung bei verschiedenen VNTR-Längen geschlossen werden.

4.2 Sekundärstruktur des *NOS1* Exon 1f VNTR

Rife et al. schlugen einen molekularen Mechanismus der gesteigerten *NOS1*-Expression im Luciferase-Assay vor. Demnach sorgt die stärkere Ausbildung von Z-DNA bei langem *NOS1* Exon 1f VNTR für die differentielle Gen-Expression. Die Unterschiede in der Genexpression wiederum würden die phänotypischen Unterschiede bei Menschen mit unterschiedlichem VNTR-Genotyp erklären. [65] Allgemein sind in – vitro – Assays weniger geeignet, die Auswirkung von auf die Genexpression modulatorischen Polymorphismen zu ermitteln. [214]

Mit Hilfe des Programms Z-Hunt kann eine Vorhersage getroffen werden, ob eine bestimmte DNA – Sequenz eine Z-Konformation ausbildet. [184] Die von uns verwendeten Plasmide haben zwei putative Z-DNA bildende Sequenzen. Eine dieser Sequenzen ist die einklonierte Region um den *NOS1* Exon 1f VNTR, die andere befindet sich auf dem pGL3-Vektor. Für diese Stelle wurde eine deutlich geringere Wahrscheinlichkeit für die Bildung von Z-DNA ermittelt. Je länger der *NOS1* Exon 1f VNTR, desto mehr Z-DNA sollte sich nach Vorhersage von Z-Hunt bilden. Um die Ausbildung der Z-Konformation in Plasmiden messen zu können, wurde ein ähnliches Protokoll wie das von Thomas et al. verwendet. [182, 181] Mit Hilfe dieses Protokolls kann der

Nachweis der Z-DNA-Bildung auf einer 96 well Mikrotiterplatte durch einen ELISA erfolgen. Es konnte durch die Autoren gezeigt werden, dass die Bindung des verwendeten Anti-Z-DNA-Antikörper spezifisch an Z-DNA erfolgt. Auch eine zirkuläre Ringstruktur wie ein Plasmid ändert nichts an der Ausbildung von Z-DNA in einem Insert. Im Gegensatz zur Theorie von Rife et al. jedoch war die Extinktion im Plasmid ohne Insert, die als Negativkontrolle verwendet wurde, am größten. Auch durch Verändern des DNA-Fixierungsmittels, durch verschiedene Verhältnisse aus Primär- und Sekundär-Antikörper und durch Linearisieren des Plasmids konnte keine Veränderung erzielt werden. Darüber hinaus zeigte sich im Dot-Blot eine abweichende Reihenfolge der Extinktionswerte für die einzelnen Plasmide zu der in der ELISA ermittelten. In den hier beschriebenen Experimenten konnte also zusammenfassend kein Nachweis erbracht werden, dass als Funktion der *NOS1* Exon 1f VNTR Repeatlängen linkshändige DNA ausgebildet wird. Aufgrund der fehlenden Retest-Reliabilität und Validität der Ergebnisse wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Bei der Planung der weiteren Experimente sollte darauf geachtet werden, dass zunächst getestet wird, ob der verwendete Primärantikörper tatsächlich Z – DNA bindet. Darüber hinaus sollte an anderen Nukleotidketten mit definierter Z-DNA-Bildung eine Validierung der Menge der Antikörperbindung an linkshändige DNA stattfinden.

4.3 Bestimmung peripherer Marker des *NOS1*/*NOS-I* – und des *NOS3*/*NOS-III* – Systems bei der Bipolar affektiven Störung

Da NO wegen seiner kurzen Halbwertszeit nur schwer bestimmt werden kann, werden zur Untersuchung der Gesamtaktivität der NOS im menschlichen Körper die metastabilen Metaboliten NO_2^- und NO_3^- bestimmt. Vorbefunde legen nahe, dass diese Metaboliten (NO_x^-) im Blutserum von BPD-Patienten erhöht sind. So wurde in einer Metaanalyse von sieben Studien mit allerdings nur 225 Patienten (mit 132 manischen, 32 depressiven und 49 euthymen Patienten) und 175 Kontrollen durch Andreatza et al. eine signifikante ($p =$

0,02) Erhöhung des NO_x^- -Gehalts festgestellt. [145] Die hier betrachteten Studien [215–220] stammen aus dem Umfeld eines Zentrums (der Universität von Gaziantep), eine Überlappung der untersuchten Stichproben kann aus den Angaben zur Stichprobe in den Veröffentlichung nicht ausgeschlossen werden. Bei Betrachtung der Methodik fällt außerdem auf, dass in fünf der Studien nicht angegeben wird ob und gegebenenfalls wie die Proben vor der NO_x^- -Bestimmung de-proteiniert wurden. Blutserum weist aufgrund der Serumproteine eine spezifische Gelbfärbung auf, die die fotometrische Bestimmung des Farbstoffgehaltes beeinflussen kann. In der Beschreibung der NO_x^- -Bestimmung der beiden anderen Veröffentlichungen wird auf eine Publikation von Cortas und Wakid verwiesen, diese haben vor der Messung eine De-proteinierung mit Somogyi Reagenz vorgenommen. [221] Ob dies in den o. g. Studien der Fall war, lässt sich aus den betrachteten Publikationen nicht ableiten. In der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie wurden Proteine und andere makromolekulare Substanzen mit einem Molekulargewicht von mehr als 10 000 Dalton abfiltriert, sodass das Eluat farblos war.

Für die Erstellung der Eichgeraden, aus der man aus der Extinktion der Reaktionslösung die NO_x^- -Konzentration bestimmt, wurden in den zuvor durchgeführten Studien wässrige Nitritlösungen verwendet. Bei nüchternen Patienten befinden sich die Plasmakonzentrationen von Nitrit zwischen 50 bis 300 nMol/l, also fast zwei Größenordnungen unterhalb der Nitratkonzentration, die mit 20 – 40 $\mu\text{Mol/l}$ im Blutplasma angegeben wird. [117, 222–225] Durch das Verwenden des Nitritstandards können also nur dann Absolutwerte ermittelt werden, wenn die Reduktion von Nitrat zu Nitrit vollständig abgelaufen ist. In den vorher durchgeführten Studien wurde nicht getestet, wie effizient die dort durchgeführte Reduktion durch mit Kupfer überzogenen Cadmiumgranula ist, auch eine Reduktion über das Nitrit hinaus z. B. zu NO oder N_2 ist vorstellbar, da das eingesetzte Reduktionsmittel sehr unspezifisch ist. [226]

Die in der vorliegenden Arbeit verfolgte Methode des NO_x^- -Nachweises wurde in einer Studie von Marzinzig et al. validiert. [226] Über unsere Versuche zur NO_x^- -Bestimmung ist jedoch kritisch anzumerken, dass die NO_x^- -Konzentration

im Serum von Kontrollpersonen bei 68,01 $\mu\text{Mol/l}$ und damit außerhalb der Spanne die in der Literatur angegeben wird. [227] Diese Anreicherung könnte Folge einer allgemeinen Anreicherung kleinerer Ionen im Filtrat aufgrund der Donnan – Verteilung sein. Serumproteine verbleiben wegen ihrer Größe oberhalb des Filters. Durch den kolloidosmotischen Druck der Serumproteine verbleibt auch etwa die Hälfte des Serums oberhalb des Filters. Durch die Anreicherung von negativ geladenen Makromolekülen oberhalb der Membran entsteht dort ein negativer Ladungsüberschuss, der negativ geladene Anionen wie NO_x^- -Ionen ins Filtrat zwingt, sodass diese dort angereichert werden.

Die gemessenen NO_x^- -Spiegel sind also sowohl von der Menge an Serumproteinen und deren Ladung, also auch vom pH – Wert im Blut zur Zeit der Filtration abhängig. Ausserdem ist die an einer Probe wirkende Zentrifugalkraft abhängig von der Position auf der 96-Well Platte. Bei Proben die in eine äussere Platte pipettiert wurden, erhielt man allgemein weniger Filtrat, da hier die Entfernung zum Mittelpunkt geringer war. Sodass insgesamt davon ausgegangen werden kann, dass die absoluten NO_x^- – Konzentrationen sowie die Unterschiede der NO_x^- - Konzentrationen zwischen den Proben stark verändert wurde. Trotz der bereits angeführten methodischen Unwägbarkeiten der Vorbefunde und insbesondere auch in unserer Studie konnte die Erhöhung der NO_x^- -Konzentration in dieser Arbeit repliziert werden. Im Gegensatz zu den vorherigen Studien wurden hier erstmals BPD–Patienten in allen Phasen der Erkrankung eingeschlossen und miteinander verglichen. Wegen der relativ kleinen Stichprobe konnten die Unterschiede der NO_x^- -Konzentration nicht signifikant werden.

Insgesamt bleibt jedoch zu beachten, dass zur Zeit wenig über die genaue Bedeutung der in verschiedenen Experimenten gemessenen Erhöhung der NO_x^- -Spiegel in verschiedenen psychiatrischen (Schizophrenie, Bipolar affektive Störung) und nicht–psychiatrischen Krankheiten (Sepsis, Gastroenteritis) [228], aber auch nach körperlicher Belastung [229–231] bekannt ist. Die Vermutung dass der erhöhte NO_x^- -Spiegel nun durch eine gesteigerte Katalyse von NOS-I oder durch eine gesteigerte *NOS1* –

Expression zustande kommt, bleibt vage, da dies auch aufgrund der Aktivität der anderen NOS (NOS-II oder NOS-III) zustande kommen könnte. Daneben besteht die Möglichkeit der NOS-unabhängigen NO-Produktion. [117]

Bei der Bestimmung der Genexpression von *NOS3* mittels qRT-PCR zeigte sich allgemein ein sehr niedriges Expressionsniveau dieses Gens in den Experimentalgruppen und der Kontrollgruppe. Es waren im Durchschnitt 29,5 Zyklen nötig um die Fluoreszenzschwelle zu überschreiten. qRT-PCR mit *NOS1* als Zielgen zeigte keine Expression dieses Gens im Leukozytenlysat. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen konnte in einer Untersuchung von Wallerath et al. eine Expression von *NOS1* jedoch nicht von *NOS3* in neutrophilen Granulozyten gefunden werden. [232] Zusammenfassend können die Vorbefunde, die in methodisch saubereren und besser geplanten Studien erhoben wurden hinsichtlich des NO_x^- - Spiegels weder bestätigt noch abgelehnt werden.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, auf welchem molekularem Weg die *NOS1* Exon 1f VNTR – Länge eine Verhaltensmodifikation sowie die Auftretswahrscheinlichkeit psychischer Krankheiten moderiert, zum einen direkt, zum anderen über Gen – Umwelt – Interaktionen. Zur weiteren Untersuchung der Gen – Umwelt – Interaktion wurde die Methylierung von CpG – Abfolgen einer genaueren Betrachtung unterzogen. Mit Hilfe des Bisulfit-PCR-Protokolls konnten keine gesicherten Aussagen zur Höhe der Methylierung in einzelnen CpG – sites getroffen werden. Mit Hilfe der ebenfalls angewandten Pyrosequenzierung konnten keine Unterschiede in der Methylierung in einem kleinen Sequenzbereich der beiden untersuchten Bereiche der *NOS1* Exon 1f CGI gefunden werden. Als nächstes sollte also die *NOS1* Exon 1f CGI mit einem verbesserten Bisulfit-PCR Sequenzierprotokoll analysiert werden, um dann Regionen mit in Abhängigkeit zum VNTR

stehenden differentiellen Methylierung mit der Pyrosequenzierung genauer zu untersuchen.

Die von Rife et al. aufgestellte These, dass die molekulare Ursache der unterschiedlichen *NOS1* Exon 1f Expression in der unterschiedlichen Bildung von Z – DNA im *NOS1* Exon 1f VNTR liegt, konnte weder bestätigt noch widerlegt werden. Mit Hilfe der von Thomas et al. entwickelten Methode der Z–DNA–Detektion konnte nicht zwischen Z–DNA und anderen DNA-Sekundärstrukturen unterschieden werden. Mit der Überprüfung mit einer Positivkontrolle könnte die Validität der Methode und die Qualität des Z–DNA bindenden Antikörpers getestet werden.

Vorherige Befunde die auf eine Erhöhung der NO_3^- - und NO_2^- -Konzentrationen bei Patienten mit Bipolar-affektiver Störung hindeuten konnten in einer Stichprobe von 55 Personen repliziert werden. Die NO_x^- -Konzentrationen waren bei Patienten in der manischen oder hypomanischen Phase am größten, gefolgt von euthymen Patienten bzw. solchen in einem Mischzustand und depressiven Patienten, ohne dass diese Unterschiede signifikant waren. In dieser Arbeit wurde die NO_x^- -Bestimmungsmethode durch Entfernen von Serumproteinen und durch Verwenden eines Nitratstandards verändert, dies führt jedoch zu starken methodischen Ungenauigkeiten. *NOS1* mRNA konnte im untersuchten Leukozytenlysat nicht detektiert werden. Die Unterschiede in der *NOS3* Expression in Leukozyten waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen den drei Gruppen.

Durch die Replikation der erhöhten NO_x^- -Konzentrationen im Serum von BPD – Patienten wird die Bedeutung des NO–Systems für psychische Erkrankungen nochmals unterstrichen. Auch wenn unsere Studie im Vergleich zu den schon mit methodischen Unabwägbarkeiten behafteten Vorstudien, weitere methodische Schwächen aufweist. Die Konzentrationserhöhung kann nicht durch eine gesteigerte Expression der verschiedenen NO-Synthasen in Leukozyten erklärt werden, was dafür sprechen könnte, dass die erhöhte NO–

Produktion bei bipolar affektiven Patienten den NO-Metabolismus im Gehirn widerspiegelt.

6 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Pyro A und Pyro B im Verhältnis zum Exon 1f	35
Abbildung 2 Methylierung der NOS1 Exon 1f CGI – s/s-Genotyp	47
Abbildung 3 Methylierung der NOS1 Exon 1f CGI –l/l-Genotyp	47
Abbildung 4 Methylierung der CpG-sites in Amplicon 1 bei homozygot langem NOS1 Exon 1f VNTR (Blau unmethylierte CpG-sites, gelb methylierte CpG-sites)	48
Abbildung 5 Methylierung der CpG-sites in Pyro A	50
Abbildung 6 Methylierung der CpG-sites in Pyro A	51
Abbildung 7 Nitrocellulos-Membran des Dot-Blots bei Auswertung mit dem ChemiDoc	53
Abbildung 8 NO _x ⁻ -Spiegel bei BPD, ADHS und Kontrollpersonen	55
Abbildung 9 NO _x ⁻ -Spiegel im Serum in verschiedenen Phasen der BPD.....	56
Abbildung 10 Vergleich der NOS3 Expression bei Patienten mit ADHS und BPD sowie einer Kontrollgruppe	58
Abbildung 11 NOS3 Expression in verschiedenen Phasen der BPD	59

7 **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Nomenklaturenvergleich der alternativen ersten Exons von NOS1	7
---	---

Tabelle 3 Pipettierschema Bisulfit-PCR mit Platinum PCR SuperMix	29
Tabelle 4 Reaktionsbedingungen Bisulfit-PCR	29
Tabelle 5 Pipettierschema Erstellung dATP-Überhänge	31
Tabelle 6 Reaktionsansatz TOPO TA Cloning Kit.....	32
Tabelle 7 Pipettierschema Kolonie-PCR.....	33
Tabelle 8 Reaktionsbedingungen Kolonie-PCR	33
Tabelle 9 Amplifikation der Bisulfit-PCR-Amplicons	34
Tabelle 10 Bisulfit-PCR für Pyrosequenzierung	36
Tabelle 11 Reaktionsbedingungen Bisulfit-PCR für Pyrosequenzierung	36
Tabelle 12 Reaktionsansatz der Bindung der Amplicons an Sepharose.....	37
Tabelle 13 Reaktionsansatz der reversen Transkription mit iScript	43
Tabelle 14 Reaktionsbedingungen der reversen Transkription mit iScript	43
Tabelle 15 Reaktionsansatz für die reverse Transkription	44
Tabelle 16 Reaktionsbedingungen für die reverse Transkription	44
Tabelle 17 prozentualer Methylierungsgrad der CpG-sites in Amplicon A	49
Tabelle 18 Methylierungsgrad in Prozent der CpG-sites in Primer B	50
Tabelle 19 Extinktion der ELISA gegen Z-DNA.....	52
Tabelle 20 Quantitative Auswertung des Dot-Blots mit ImageJ	53
Tabelle 21 NOx--Spiegel im Blutserum und NOS3 Expression in Leukozyten von Kontrollen ADHS-Patienten und BPD-Patienten	56

8 Abkürzungsverzeichnis

5-HT _{1a} R	Serotonintransporter 1a
5-HTT	Serotonintransporter
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit – Hyperaktivitätssyndrom
BPD	Bipolar affektive Störung
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	complementary DNA
CGI	CpG-Insel
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNV	Copy number variation
CREB	cAMP response - binding protein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Deoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
ELISA	Enzyme – linked immunosorption assay
GC	Guanylatcyclase
GWAS	Genome – wide association study
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB	Luria-Broth
LTP	Langzeitpotenzierung
MeCP	Methyl CpG binding protein
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mtNOS	mitochondriale Stickstoffmonoxidsynthase
NMDAR	N-methyl-D-aspartat Rezeptor
NOS1	Nitric oxide synthase 1
Nos1 kd	Nitric oxide synthase 1 knockdown mouse
NOS2	Nitric oxide synthase 2
NOS3	Nitric oxide synthase 3
NOSI	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NOSII	induzierbare/ immunologische Stickstoffmonoxidsynthase
NOSIII	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
NO _x ⁻	NO ₂ ⁻ und NO ₃ ⁻
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR.....	<i>Polymerase - Kettenreaktion</i>
PDZ.....	<i>Post synaptic density</i>
PKG.....	<i>Proteinkinase G</i>
PSD 93/95.....	<i>Post synaptic density protein 93/ 95</i>
qRT – PCR.....	<i>quantitative Realtime – PCR</i>
SEM	<i>Standardfehler</i>
sGC.....	<i>lösliche Guanylatcyclase</i>
SLS	<i>Sample Loading Solution</i>
SNP.....	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TAE	<i>Tris base, acetic acid, edta</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline, Tris Buffered Saline</i>
TMB.....	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine</i>
VNTR	<i>Variable number of tandem repeats</i>
X – Gal	<i>5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid</i>

9 Nukleotidsequenzen

9.1 Epigenetik

9.1.1 Die *NOS1* Exon 1f CpG Island (chr12:117,797,846-117,800,000)

Nachfolgend die Sequenz der *NOS1* Exon 1f CGI mit den durch die Bisulfite – PCR amplifizierten DNA – Bereichen. Die einzelnen CpG – Sites sind mit einer grünen Hintergrundfarbe markiert, die bekannten Polymorphismen mit einer blauen Hintergrundfarbe. Die CpG – sites die mit der Pyrosequenzierung untersucht wurden sind mit einer violetten Hintergrundfarbe markiert. Die Sequenz wurde der Datenbank Ensembl entnommen.

<p>AACTTCCAGGGCCACTCAGGGGCCTTGCCTCCGAGTCCCG GAAGGGGCTCTCTCGGGACTGCGCCCCAGAGGACGCCAGAC GCTCGCCCCACCCCCAGGGCACTGTGACCAGAGAGCTCAT GGCTCTCCAAGTCCGCATCAGGCTGTCTGGGGTAGACATCT AGAGAGGAGAGGCTCTCACGGAGAAGGCAGCCGAGGAGGGC AGGAACCTTTCCAGTGA CTCCCCTGGGTTCTGGTCCTAGATM GACSC TTTACTTGTTGCGTGACCTTCGGTAAGTCTCTTCATCTTT CCCAGCCTCAGTTTCTCATCTGTAA</p>	Primer 35
<p>Positivstrang TTACAGATGAGAACTGAGGCTGGGAAAGATGAAGAGACTTA CCGAAGGTCACGCAACAAGTAAAGSGTKATCTAGGACCAGAAC CCAGGGGAGTCACTGGAAAGTTCTGCCCTCCTCGGCTGCC TTCTCCGTGAGAGCCTCCTCTCTAGATGTCTACCCAGACA GCCTGATGCGGAGCTTGGAGAGCCATGAGCTCTCTGGTCACA GTGCCCTGGGGGTGGGGGCGAGCGTCTGGCGTCTCTGGG GCGCAGTCCCGAGAGAGCCCTTCCGGGACTCTCGGACGCAA GGCCCTGAGTGGCCCTGGAAGTTGGATCCCCCGGGGACCC TGCTCCGAACCCTGGCCACCTGGAAGCAACCTCATCGAGCG CTCCTTCCACTGCCAGCCCCGAACCGTGGCGAACGCGCC CCTCGGCCTCCCTAGAGCCTCCTTTGCGGGAGAAGCACA TTCCAGGTTTGGAGACGGCGCTTTACACCCCAATCTCGC CCAGACGGGAAGAAGTGAGAGGTGCGGGCGGCCCCGCCATGA CCGCGGGAGGAGAGCGCAAGGAGGCTCCTCGCAAAGTTGGA GGCCAGGC CGGAGCGATGTTCCGGGAGCGGAGCCCTCCAG CCTCGGGCCCCAGCCGCGGACAGCTGGCAGTGCCAAAGAC TCCGCCATTACCTGCGGCTCGCAGTTGCGATTGCGCCGCGAGA GTCGGGCACCGAGGAAGGCGTAAAGTTGAGCTTGGGCAGGT ACAACGGTCCCCAGGGACTGGCATCCCCAGCCCGGGTGC CCGCGGGAGGGTAGCGAGCTGTGCCAAGGGCTCCGCCATTA CCGSCAGCGCACAGCTCGGAGCCAAGCGCGCGGCTGAGGAA CGACTAGGGTCTTGCAAAGTTGGAGCCTGGGCGCGTAGACC CCCGGACCGGAGCCCCCGCCTGAGGCCGCCCGCTAGGAG GAAAATGAGGCCGCCCGAACCAAGTTGGGACGCGCAGCAA GCCCGAGCCTTCCGCGCACACCAGGGGCTCGGGCGGGAGYG GGGAGCCCTGGGGACGGAGAAGGGGCGCGGGACGCCTGGAT CAGGAACTCACCTGACGCGGAGCCGGGCAGCGCCGAGGCTG CCTCTTCCGCGCTGCGCACCCGCCCGCCCGCCTCGTACTCCTC CTCTTCCCTCCCGGGCGCCCGCGGCGCGCGCTCCGGGTTT TGAATCCTCCGAGTCCGCCGCCCGCGCGGCTGGAGGGCGC CGGTTGCACCCACTCGCCTCCTGGTAGGAGCCGCGCGCGTC CCTCCCCTTCCCCTCCGCTTTGTGCCTCCAA RATCCCTCCCA CCCCCTCTCCCCTAGCCCCACTCCTCCCTTCTTTCTTCCCT CCCCTTGCGTCCCCTCCCTCAGCCTCAGCGAACCCAAGTTCCG GGA CGRAGGCTGCGGGCTTCCC CGGCGCAGTGCTGGGCGCC CCGCGCGCGCCCTGGCTCACCCCGTCCGCTCGGCCGCTGC</p>	Primer 17
<p>TTCCAGGTTTGGAGACGGCGCTTTACACCCCAATCTCGC CCAGACGGGAAGAAGTGAGAGGTGCGGGCGGCCCCGCCATGA CCGCGGGAGGAGAGCGCAAGGAGGCTCCTCGCAAAGTTGGA GGCCAGGC CGGAGCGATGTTCCGGGAGCGGAGCCCTCCAG CCTCGGGCCCCAGCCGCGGACAGCTGGCAGTGCCAAAGAC TCCGCCATTACCTGCGGCTCGCAGTTGCGATTGCGCCGCGAGA GTCGGGCACCGAGGAAGGCGTAAAGTTGAGCTTGGGCAGGT ACAACGGTCCCCAGGGACTGGCATCCCCAGCCCGGGTGC CCGCGGGAGGGTAGCGAGCTGTGCCAAGGGCTCCGCCATTA CCGSCAGCGCACAGCTCGGAGCCAAGCGCGCGGCTGAGGAA CGACTAGGGTCTTGCAAAGTTGGAGCCTGGGCGCGTAGACC CCCGGACCGGAGCCCCCGCCTGAGGCCGCCCGCTAGGAG GAAAATGAGGCCGCCCGAACCAAGTTGGGACGCGCAGCAA GCCCGAGCCTTCCGCGCACACCAGGGGCTCGGGCGGGAGYG GGGAGCCCTGGGGACGGAGAAGGGGCGCGGGACGCCTGGAT CAGGAACTCACCTGACGCGGAGCCGGGCAGCGCCGAGGCTG CCTCTTCCGCGCTGCGCACCCGCCCGCCCGCCTCGTACTCCTC CTCTTCCCTCCCGGGCGCCCGCGGCGCGCGCTCCGGGTTT TGAATCCTCCGAGTCCGCCGCCCGCGCGGCTGGAGGGCGC CGGTTGCACCCACTCGCCTCCTGGTAGGAGCCGCGCGCGTC CCTCCCCTTCCCCTCCGCTTTGTGCCTCCAA RATCCCTCCCA CCCCCTCTCCCCTAGCCCCACTCCTCCCTTCTTTCTTCCCT CCCCTTGCGTCCCCTCCCTCAGCCTCAGCGAACCCAAGTTCCG GGA CGRAGGCTGCGGGCTTCCC CGGCGCAGTGCTGGGCGCC CCGCGCGCGCCCTGGCTCACCCCGTCCGCTCGGCCGCTGC</p>	Primer 17
<p>TTCCAGGTTTGGAGACGGCGCTTTACACCCCAATCTCGC CCAGACGGGAAGAAGTGAGAGGTGCGGGCGGCCCCGCCATGA CCGCGGGAGGAGAGCGCAAGGAGGCTCCTCGCAAAGTTGGA GGCCAGGC CGGAGCGATGTTCCGGGAGCGGAGCCCTCCAG CCTCGGGCCCCAGCCGCGGACAGCTGGCAGTGCCAAAGAC TCCGCCATTACCTGCGGCTCGCAGTTGCGATTGCGCCGCGAGA GTCGGGCACCGAGGAAGGCGTAAAGTTGAGCTTGGGCAGGT ACAACGGTCCCCAGGGACTGGCATCCCCAGCCCGGGTGC CCGCGGGAGGGTAGCGAGCTGTGCCAAGGGCTCCGCCATTA CCGSCAGCGCACAGCTCGGAGCCAAGCGCGCGGCTGAGGAA CGACTAGGGTCTTGCAAAGTTGGAGCCTGGGCGCGTAGACC CCCGGACCGGAGCCCCCGCCTGAGGCCGCCCGCTAGGAG GAAAATGAGGCCGCCCGAACCAAGTTGGGACGCGCAGCAA GCCCGAGCCTTCCGCGCACACCAGGGGCTCGGGCGGGAGYG GGGAGCCCTGGGGACGGAGAAGGGGCGCGGGACGCCTGGAT CAGGAACTCACCTGACGCGGAGCCGGGCAGCGCCGAGGCTG CCTCTTCCGCGCTGCGCACCCGCCCGCCCGCCTCGTACTCCTC CTCTTCCCTCCCGGGCGCCCGCGGCGCGCGCTCCGGGTTT TGAATCCTCCGAGTCCGCCGCCCGCGCGGCTGGAGGGCGC CGGTTGCACCCACTCGCCTCCTGGTAGGAGCCGCGCGCGTC CCTCCCCTTCCCCTCCGCTTTGTGCCTCCAA RATCCCTCCCA CCCCCTCTCCCCTAGCCCCACTCCTCCCTTCTTTCTTCCCT CCCCTTGCGTCCCCTCCCTCAGCCTCAGCGAACCCAAGTTCCG GGA CGRAGGCTGCGGGCTTCCC CGGCGCAGTGCTGGGCGCC CCGCGCGCGCCCTGGCTCACCCCGTCCGCTCGGCCGCTGC</p>	Primer 35
<p>CCCGGACCGGAGCCCCCGCCTGAGGCCGCCCGCTAGGAG GAAAATGAGGCCGCCCGAACCAAGTTGGGACGCGCAGCAA GCCCGAGCCTTCCGCGCACACCAGGGGCTCGGGCGGGAGYG GGGAGCCCTGGGGACGGAGAAGGGGCGCGGGACGCCTGGAT CAGGAACTCACCTGACGCGGAGCCGGGCAGCGCCGAGGCTG CCTCTTCCGCGCTGCGCACCCGCCCGCCCGCCTCGTACTCCTC CTCTTCCCTCCCGGGCGCCCGCGGCGCGCGCTCCGGGTTT TGAATCCTCCGAGTCCGCCGCCCGCGCGGCTGGAGGGCGC CGGTTGCACCCACTCGCCTCCTGGTAGGAGCCGCGCGCGTC CCTCCCCTTCCCCTCCGCTTTGTGCCTCCAA RATCCCTCCCA CCCCCTCTCCCCTAGCCCCACTCCTCCCTTCTTTCTTCCCT CCCCTTGCGTCCCCTCCCTCAGCCTCAGCGAACCCAAGTTCCG GGA CGRAGGCTGCGGGCTTCCC CGGCGCAGTGCTGGGCGCC CCGCGCGCGCCCTGGCTCACCCCGTCCGCTCGGCCGCTGC</p>	Primer 15
<p>CCCGGACCGGAGCCCCCGCCTGAGGCCGCCCGCTAGGAG GAAAATGAGGCCGCCCGAACCAAGTTGGGACGCGCAGCAA GCCCGAGCCTTCCGCGCACACCAGGGGCTCGGGCGGGAGYG GGGAGCCCTGGGGACGGAGAAGGGGCGCGGGACGCCTGGAT CAGGAACTCACCTGACGCGGAGCCGGGCAGCGCCGAGGCTG CCTCTTCCGCGCTGCGCACCCGCCCGCCCGCCTCGTACTCCTC CTCTTCCCTCCCGGGCGCCCGCGGCGCGCGCTCCGGGTTT TGAATCCTCCGAGTCCGCCGCCCGCGCGGCTGGAGGGCGC CGGTTGCACCCACTCGCCTCCTGGTAGGAGCCGCGCGCGTC CCTCCCCTTCCCCTCCGCTTTGTGCCTCCAA RATCCCTCCCA CCCCCTCTCCCCTAGCCCCACTCCTCCCTTCTTTCTTCCCT CCCCTTGCGTCCCCTCCCTCAGCCTCAGCGAACCCAAGTTCCG GGA CGRAGGCTGCGGGCTTCCC CGGCGCAGTGCTGGGCGCC CCGCGCGCGCCCTGGCTCACCCCGTCCGCTCGGCCGCTGC</p>	Primer 5
<p>CCCGGACCGGAGCCCCCGCCTGAGGCCGCCCGCTAGGAG GAAAATGAGGCCGCCCGAACCAAGTTGGGACGCGCAGCAA GCCCGAGCCTTCCGCGCACACCAGGGGCTCGGGCGGGAGYG GGGAGCCCTGGGGACGGAGAAGGGGCGCGGGACGCCTGGAT CAGGAACTCACCTGACGCGGAGCCGGGCAGCGCCGAGGCTG CCTCTTCCGCGCTGCGCACCCGCCCGCCCGCCTCGTACTCCTC CTCTTCCCTCCCGGGCGCCCGCGGCGCGCGCTCCGGGTTT TGAATCCTCCGAGTCCGCCGCCCGCGCGGCTGGAGGGCGC CGGTTGCACCCACTCGCCTCCTGGTAGGAGCCGCGCGCGTC CCTCCCCTTCCCCTCCGCTTTGTGCCTCCAA RATCCCTCCCA CCCCCTCTCCCCTAGCCCCACTCCTCCCTTCTTTCTTCCCT CCCCTTGCGTCCCCTCCCTCAGCCTCAGCGAACCCAAGTTCCG GGA CGRAGGCTGCGGGCTTCCC CGGCGCAGTGCTGGGCGCC CCGCGCGCGCCCTGGCTCACCCCGTCCGCTCGGCCGCTGC</p>	Primer 31
<p>CCCGGACCGGAGCCCCCGCCTGAGGCCGCCCGCTAGGAG GAAAATGAGGCCGCCCGAACCAAGTTGGGACGCGCAGCAA GCCCGAGCCTTCCGCGCACACCAGGGGCTCGGGCGGGAGYG GGGAGCCCTGGGGACGGAGAAGGGGCGCGGGACGCCTGGAT CAGGAACTCACCTGACGCGGAGCCGGGCAGCGCCGAGGCTG CCTCTTCCGCGCTGCGCACCCGCCCGCCCGCCTCGTACTCCTC CTCTTCCCTCCCGGGCGCCCGCGGCGCGCGCTCCGGGTTT TGAATCCTCCGAGTCCGCCGCCCGCGCGGCTGGAGGGCGC CGGTTGCACCCACTCGCCTCCTGGTAGGAGCCGCGCGCGTC CCTCCCCTTCCCCTCCGCTTTGTGCCTCCAA RATCCCTCCCA CCCCCTCTCCCCTAGCCCCACTCCTCCCTTCTTTCTTCCCT CCCCTTGCGTCCCCTCCCTCAGCCTCAGCGAACCCAAGTTCCG GGA CGRAGGCTGCGGGCTTCCC CGGCGCAGTGCTGGGCGCC CCGCGCGCGCCCTGGCTCACCCCGTCCGCTCGGCCGCTGC</p>	Primer 8
<p>CCCGGACCGGAGCCCCCGCCTGAGGCCGCCCGCTAGGAG GAAAATGAGGCCGCCCGAACCAAGTTGGGACGCGCAGCAA GCCCGAGCCTTCCGCGCACACCAGGGGCTCGGGCGGGAGYG GGGAGCCCTGGGGACGGAGAAGGGGCGCGGGACGCCTGGAT CAGGAACTCACCTGACGCGGAGCCGGGCAGCGCCGAGGCTG CCTCTTCCGCGCTGCGCACCCGCCCGCCCGCCTCGTACTCCTC CTCTTCCCTCCCGGGCGCCCGCGGCGCGCGCTCCGGGTTT TGAATCCTCCGAGTCCGCCGCCCGCGCGGCTGGAGGGCGC CGGTTGCACCCACTCGCCTCCTGGTAGGAGCCGCGCGCGTC CCTCCCCTTCCCCTCCGCTTTGTGCCTCCAA RATCCCTCCCA CCCCCTCTCCCCTAGCCCCACTCCTCCCTTCTTTCTTCCCT CCCCTTGCGTCCCCTCCCTCAGCCTCAGCGAACCCAAGTTCCG GGA CGRAGGCTGCGGGCTTCCC CGGCGCAGTGCTGGGCGCC CCGCGCGCGCCCTGGCTCACCCCGTCCGCTCGGCCGCTGC</p>	Primer 7

<i>Primer 6</i>	
Forward	5'-aggaagagagAAAAGATGTATGTTTTGGAGTTTAGA-3'
Reverse	5'-cagtaatacgactcactatagggagaaggctCCCCTCCCTCAACCTCAAC-3'
<i>Primer 7</i>	
Forward	5'-aggaagagagGGAGGGATTTTGGAGGTATAAAG-3'
Reverse	5'-cagtaatacgactcactatagggagaaggctCTAAAATCTTACAAAATTAACC TAAAC-3'
<i>Primer 8</i>	
Forward	5'-aggaagagagGTTAGGTGAGTTTTTGATTTAGG-3'
Reverse	5'-cagtaatacgactcactatagggagaaggctAAACTAACATCCCCCAACCC-3'
<i>Primer 15</i>	
Forward	5'-aggaagagagAAATTTGGGAAAGTTGTGTTTTTTT-3'
Reverse	5'-cagtaatacgactcactatagggagaaggctATAACCCTAAAATTAATCCCC C-3'
<i>Primer 17</i>	
Forward	5'-aggaagagagGGGGGATTTAATTTTTAGGGTTATT-3'
Reverse	cagtaatacgactcactatagggagaaggctTCACTAAAAAATTCCTACCCTCC T-3'
<i>Primer 31</i>	
Forward	5'-aggaagagagGATTAGGGTTTTGTAAAGTTGGAG-3'
Reverse	5'-cagtaatacgactcactatagggagaaggctCAAATAAATTCCTAATCCAAAC- 3'
<i>Primer 34</i>	
Forward	5'-aggaagagagGTAAGGTTTTTGAGTGGTTTTGGA-3'
Reverse	5'-cagtaatacgactcactatagggagaaggctTTATACCTACCCAACTCAACTTT A-3'
<i>Primer 35</i>	

Forward	5'-aggaagagagGGTTGGGAAAGATGAAGAGATTTAT-3'
Reverse	5'- cagtaatacgcactcactatagggagaaggctAAAATTACTTCCAATAACCAAAA TTC-3'

9.1.3 Primersequenz für die Kolonie-PCR

<i>Primer M13</i>	
Forward	5'-GTAAAACGACGGCAGT-3'
Reverse	5'-TTCACACAGGAAACAGCTATGACC-3'

9.1.4 Primersequenzen für die Pyrosequenzierung

<i>Pyro A</i>	
Forward Primer	5'-GGAAATTAGGTTATATAAAAGATGTAT-3'
Reverse Primer	5'-TAATATCCCTCCTTTATCCTATCAT-3'
Sequenzierprimer	5'-ATGTATGTTTTGGAGTTTAGA-3'
<i>Pyro B</i>	
Forward Primer	5'-GTTGGGTGAGGAGTTATTTAG-3'
Reverse Primer	5'-CACTCCTCCCTTCTTTCT-3'
Sequenzierprimer	5'-CCTCCCTCAACCTCA-3'

9.1.5 Sequenzen von Pyro A und Pyro B

Die Bindungsstelle des Sequenzierprimers wurde grün markiert, der durch die Pyrosequenzierung analysierbare Bereich rot, die analysierten CpG – sites violett.

9.1.5.1 Pyro A

ATGTATGCTTTGGAGCCAGAGCGGCTCTTTAATGAGGGTTGCGACGT

9.1.5.2 Pyro B

CCTCCCTCAGCCTCAGCGAACCCAAGTTCGGGACGRAGGCTGCGGGCTI
CCCCG

9.2 DNA – Sekundärstruktur im NOS1 Exon 1f VNTR

Sequenzen der Inserts in pGL3 – basic sequenziert mit RVprimer3-F

(5'-CTAGCAAATAGGCTGTCCC-3')

9.2.1 Vektor 8F' (29 Wiederholungen)

CCTCCTCTGCCCAAATAGACCTGCCCTGCCCTGCGTGGCTACTACATTCA
GCCCTATCCAGGCTCCCAGAAATTGTCATTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
GTGTGTGTGTGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTTTCCTGATAGA
AAAAAAAAAATGGAAATTAGGTTATATAAAAGATGTATGCTTTGGAGCCCA
GAGCGGCTCTTTAATGAGGGTTGCGACGTCTCCCTCCCCACACCCATAA
ACCAGTCGGGTTGGACGTCACTGCTAATTCGTTTCAGTGATGATAGGATA
AAGGAGGGACATTAAGAAATAAATCCCCCTCACGACCCTCGCTGAGCTC
ACGGCTCAGTCCCTACATATTTATGCCGCGTTTCCAGCCGCCGGGTGAGG
AGCTACTTAGCGCCGCGGCTCCTCCGAGGGGCGG

9.2.2 Vektor 53F' (24 Wiederholungen)

CCACTACATTCAGCCCTATCCAGGCTCCCAGAAATTGTCATTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTATGTGTGCGTGTGTGTGTGTGTTTCCTGATAG
AAAAAAAAAAAAAATGGAAATTAGGTTATATAAAAGATGTATGCTTTGGAGCC
CAGAGCGGCTCTTTAATGAGGGTTGCGACGTCTCCCTCCCCACACCCAT
AAACCAGTCGGGTTGGACGTCACTGCTAATTCGTTTCAGTGATGATAGGA

TAAAGGAGGGACATTAAGAAATAAATTCCCCCTCACGACCCTCGCTGAGC
TCACGGCTCAGTCCCTACATATTTATGCCGCGTTTCCAGCCGCTGGGTGA
GGAGCTACTTAGCGCCGCGGCTCCTCCGAGGGGCGG

9.2.3 Vektor 150F' (19 Wiederholungen)

CCACTACATTCAGCCCTATCCAGGCTCCCAGAAATTGTCATTGTGTGTGTG
TGTGTGTGTGTGTATGTGTGTGTGTGTGTGTGTTTCCTGATAGAAAGAAAA
ATGGAAATTAGGTTATATAAAAGATGTATGCTTTGGAGCCCAGAGCGGCTC
GTTTAATGAGGGTTGCGACGTCTCCCTCCCCACACCATAAACAGTCGG
GTTGGACGTCACTGCTAATTCGTTTCAGTGATGATAGGATAAAGGAGGGA
CATTAGAAATAAATTCCCCCTCACGACCCTCGCTGAGCTCACGGCTCAG
TCCCTACATATTTATGCCGCGTTTCCAGCCGCTGGGTGAGGAGCTACTTA
GCGCCGCGGCTCCTCCGAGGGGCGG

10 Literaturverzeichnis

1. <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/mutationsanddisorders/genemutation>.
2. http://genome.wellcome.ac.uk/doc_WTD020780.html.
3. The International Schizophrenia Consortium (2008/09/11/print). Rare chromosomal deletions and duplications increase risk of schizophrenia. *Nature* **455**, 237–241.
4. The International Schizophrenia Consortium (2009). Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. *Nature* **460**, 748–752.
5. Neale BM, Medland SE, Ripke S, Asherson P, Franke B, Lesch K, Faraone SV, Nguyen TT, Schäfer H, Holmans P, Daly M, Steinhausen H, Freitag C, Reif A, Renner TJ, Romanos M, Romanos J, Walitza S, Warnke A, Meyer J, Palmason H, Buitelaar J, Vasquez AA, Lambregts-Rommelse N, Gill M, Anney RJL, Langley K, O'Donovan M, Williams N, Owen M, Thapar A, Kent L, Sergeant J, Roeyers H, Mick E, Biederman J, Doyle A, Smalley S, Loo S, Hakonarson H, Elia J, Todorov A, Miranda A, Mulas F, Ebstein RP, Rothenberger A, Banaschewski T, Oades RD, Sonuga-Barke E, McGough J, Nisenbaum L, Middleton F, Hu X & Nelson S (2010). Meta-analysis of genome-wide association studies of attention-deficit/hyperactivity disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* **49**, 884–897.

6. Neale BM, Lasky-Su J, Anney R, Franke B, Zhou K, Maller JB, Vasquez AA, Asherson P, Chen W, Banaschewski T, Buitelaar J, Ebstein R, Gill M, Miranda A, Oades RD, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen HC, Sonuga-Barke E, Mulas F, Taylor E, Laird N, Lange C, Daly M & Faraone SV (2008). Genome-wide association scan of attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Med. Genet.* **147B**, 1337–1344.
7. Djurovic S, Gustafsson O, Mattingsdal M, Athanasiu L, Bjella T, Tesli M, Agartz I, Lorentzen S, Melle I, Morken G & Andreassen OA (2010/10/01). A genome-wide association study of bipolar disorder in Norwegian individuals, followed by replication in Icelandic sample. *J Affect Disord* **126**, 312–316.
8. Moskvina V, Craddock N, Holmans P, Nikolov I, Pahwa JS, Green E, Owen MJ & O'Donovan MC (2008). Gene-wide analyses of genome-wide association data sets: evidence for multiple common risk alleles for schizophrenia and bipolar disorder and for overlap in genetic risk. *Mol Psychiatry* **14**, 252–260.
9. 1000 Genomes Consortium (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* **467**, 1061–1073.
10. Hannan AJ (2010/2//). Tandem repeat polymorphisms: modulators of disease susceptibility and candidates for []missing heritability'. *Trends in Genetics* **26**, 59–65.
11. Plohl M, Luchetti A, Mestrovic N & Mantovani B (2008). Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* **409**, 72–82.
12. Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, Listewnik ML, Donahoe PK, Qi Y, Scherer SW & Lee C (2004). Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat. Genet* **36**, 949–951.
13. Sebat J, Lakshmi B, Troge J, Alexander J, Young J, Lundin P, Månér S, Massa H, Walker M, Chi M, Navin N, Lucito R, Healy J, Hicks J, Ye K, Reiner A, Gilliam TC, Trask B, Patterson N, Zetterberg A & Wigler M (2004). Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science* **305**, 525–528.
14. Merikangas AK, Corvin AP & Gallagher L (2009/12/01). Copy-number variants in neurodevelopmental disorders: promises and challenges. *Trends Genet* **25**, 536–544.
15. Fanciulli M, Petretto E & Aitman TJ (2010). Gene copy number variation and common human disease. *Clinical Genetics* **77**, 201–213.
16. Stankiewicz P & Lupski JR (2010). Structural Variation in the Human Genome and its Role in Disease. *Annu. Rev. Med.* **61**, 437–455.
17. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, Fiegler H, Shapero MH, Carson AR, Chen W, Cho EK, Dallaire S, Freeman JL, Gonzalez JR, Gratacos M, Huang J, Kalaitzopoulos D, Komura D, MacDonald JR, Marshall CR, Mei R, Montgomery L, Nishimura K, Okamura K, Shen F, Somerville MJ, Tchinda J, Valsesia A, Woodwark C, Yang F, Zhang J, Zerjal T, Zhang J, Armengol L, Conrad DF, Estivill X, Tyler-Smith C, Carter NP,

- Aburatani H, Lee C, Jones KW, Scherer SW & Hurles ME (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature* **444**, 444–454.
18. Wain LV, Armour JAL & Tobin MD (2009). Genomic copy number variation, human health, and disease. *The Lancet* **374**, 340–350.
19. Cassidy SB (1997). Prader-Willi syndrome. *Journal of Medical Genetics* **34**, 917–923.
20. Amir RE & Zoghbi HY (2000). Rett syndrome: Methyl-CpG-binding protein 2 mutations and phenotype–genotype correlations. *Am. J. Med. Genet.* **97**, 147–152.
21. Walker FO (2007). Huntington's disease. *The Lancet* **369**, 218–228.
22. Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B & Weinberger DR (2003). The BDNF val66met Polymorphism Affects Activity-Dependent Secretion of BDNF and Human Memory and Hippocampal Function. *Cell* **112**, 257–269.
23. Cook Jr EH & Scherer SW (2008/10/16/print). Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature* **455**, 919–923.
24. Knight JC (2005-02-01). Regulatory polymorphisms underlying complex disease traits. *Journal of Molecular Medicine* **83**, 97–109.
25. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ & Topol EJ (2009/04//print). Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* **10**, 241–251.
26. Hattersley AT & McCarthy MI (2005/10/8/). What makes a good genetic association study? *The Lancet* **366**, 1315–1323.
27. Rebbeck TR, Spitz M & Wu X (2004/08//print). Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. *Nat Rev Genet* **5**, 589–597.
28. Altshuler D, Daly MJ & Lander ES (2008/11/07). Genetic Mapping in Human Disease. *Science* **322**, 881–888.
29. Sebat J, Levy DL & McCarthy SE (2009). Rare structural variants in schizophrenia: one disorder, multiple mutations; one mutation, multiple disorders. *Trends in Genetics* **25**, 528–535.
30. St Clair D (2009/01/01). Copy Number Variation and Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* **35**, 9–12.
31. McClellan JM, Susser E & King M (2007/3/1). Schizophrenia: a common disease caused by multiple rare alleles. *The British Journal of Psychiatry* **190**, 194–199.
32. Goldstein DB (2009). Common Genetic Variation and Human Traits. *New England Journal of Medicine* **360**, 1696–1698.
33. Pritchard JK & Cox NJ (2002). The allelic architecture of human disease genes: common disease–common variant...or not? *Human Molecular Genetics* **11**, 2417–2423.

34. Schork NJ, Murray SS, Frazer KA & Topol EJ (2009/6//). Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Current Opinion in Genetics & Development* **19**, 212–219.
35. Bodmer W & Bonilla C (2008). Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nat Genet* **40**, 695–701.
36. Manolio TA (2010). Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N. Engl. J. Med* **363**, 166–176.
37. So H, Gui AHS, Cherny SS & Sham PC (2011). Evaluating the heritability explained by known susceptibility variants: a survey of ten complex diseases. *Genet. Epidemiol* **35**, 310–317.
38. Eichler EE, Flint J, Gibson G, Kong A, Leal SM, Moore JH & Nadeau JH (2010/06//print). Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet* **11**, 446–450.
39. Feero WG, Guttmacher AE & Manolio TA (2010/07/08). Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. *New England Journal of Medicine* **363**, 166–176.
40. Wang Y, Newton DC, Robb GB, Kau C, Miller TL, Cheung AH, Hall AV, VanDamme S, Wilcox JN & Marsden PA (1999/10/12). RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 12150–12155.
41. Nakabachi A, Yamashita A, Toh H, Ishikawa H, Dunbar HE, Moran NA & Hattori M (2006). The 160-Kilobase Genome of the Bacterial Endosymbiont *Carsonella*. *Science* **314**, 267-267.
42. Zhang T, Haws P & Wu Q (2004/01/01). Multiple Variable First Exons: A Mechanism for Cell- and Tissue-Specific Gene Regulation. *Genome Research* **14**, 79–89.
43. Boissel J-, Zelenka M, Gödtel-Armbrust U, Feuerstein TJ & Förstermann U (March 2003). Transcription of Different Exons 1 of the Human Neuronal Nitric Oxide Synthase Gene Is Dynamically Regulated in a Cell- and Stimulus-Specific Manner. *Biological Chemistry* **384**, 351–362.
44. Bros M, Boissel J, Gödtel-Armbrust U & Förstermann U (2006/4//). Transcription of human neuronal nitric oxide synthase mRNAs derived from different first exons is partly controlled by exon 1-specific promoter sequences. *Genomics* **87**, 463–473.
45. Saur D, Neuhuber WL, Gengenbach B, Huber A, Schusdziarra V & Allescher H (2002/02/01). Site-specific gene expression of nNOS variants in distinct functional regions of rat gastrointestinal tract. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **282**, G349-G358.
46. Mundel P, Bachmann S, Bader M, Fischer A, Kummer W, Mayer B & Kriz W (1992). Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells. *Kidney Int* **42**, 1017–1019.

47. Sheffield M, Mabry S, Thibeault DW & Truog WE (2006). Pulmonary nitric oxide synthases and nitrotyrosine: findings during lung development and in chronic lung disease of prematurity. *Pediatrics* **118**, 1056–1064.
48. Stamler JS & Meissner G (2001). Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. *Physiol. Rev* **81**, 209–237.
49. Geller DA, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Nussler AK, Di Silvio M, Wang SC, Nakayama DK, Simmons RL, Snyder SH & Billiar TR (1993). Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **90**, 3491–3495.
50. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN, Lamas S & Michel T (1992). Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* **307**, 287–293.
51. Stuehr DJ, Santolini J, Wang Z, Wei C & Adak S (2004/08/27). Update on Mechanism and Catalytic Regulation in the NO Synthases. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 36167–36170.
52. Alderton WK, Cooper CE & Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* **357**, 593–615.
53. Bros M, Boissel J, Gödtel-Armbrust U & Förstermann U (2007/12/15/). The untranslated region of exon 2 of the human neuronal nitric oxide synthase (NOS1) gene exerts regulatory activity. *Gene* **405**, 36–46.
54. Wang Y, Newton DC & Marsden PA (1999). Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. *Critical Reviews in Neurobiology* **13**, 21–43.
55. Kent WJ (2002/04/01). BLAT—The BLAST-Like Alignment Tool. *Genome Research* **12**, 656–664.
56. Sasaki M, Gonzalez-Zulueta M, Huang H, Herring WJ, Ahn S, Ginty DD, Dawson VL & Dawson TM (2000). Dynamic regulation of neuronal NO synthase transcription by calcium influx through a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8617–8622.
57. Oberbäumer I, Moser D & Bachmann S (1998). Nitric Oxide Synthase 1 mRNA: Tissue-Specific Variants from Rat with Alternative First Exons. *Biological Chemistry* **379**, 913–919.
58. Bachir LK, Garrel G, Lozach A, Laverriere J & Counis R (2003). The Rat Pituitary Promoter of the Neuronal Nitric Oxide Synthase Gene Contains an Sp1-, LIM Homeodomain-Dependent Enhancer and a Distinct Bipartite Gonadotropin-Releasing Hormone-Responsive Region. *Endocrinology* **144**, 3995–4007.
59. Lee MA, Cai L, Hübner N, Lee YA & Lindpaintner K (1997/09/15). Tissue- and development-specific expression of multiple alternatively spliced transcripts of rat neuronal nitric oxide synthase. *J Clin Invest* **100**, 1507–1512.

60. Pruunsild P, Kazantseva A, Aid T, Palm K & Timmusk T (2007). Dissecting the human BDNF locus: Bidirectional transcription, complex splicing, and multiple promoters. *Genomics* **90**, 397–406.
61. Saur D, Seidler B, Paehge H, Schusdziarra V & Allescher H (2002/07/12). Complex Regulation of Human Neuronal Nitric-oxide Synthase Exon 1c Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 25798–25814.
62. Saur D, Vanderwinden J, Seidler B, Schmid RM, Laet M de & Allescher H (2004/02/10). Single-nucleotide promoter polymorphism alters transcription of neuronal nitric oxide synthase exon 1c in infantile hypertrophic pyloric stenosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 1662–1667.
63. Reif A, Jacob CP, Rujescu D, Herterich S, Lang S, Gutknecht L, Baehne CG, Strobel A, Freitag CM, Giegling I, Romanos M, Hartmann A, Rosler M, Renner TJ, Fallgatter AJ, Retz W, Ehlis A & Lesch K (2009). Influence of Functional Variant of Neuronal Nitric Oxide Synthase on Impulsive Behaviors in Humans. *Arch Gen Psychiatry* **66**, 41–50.
64. Scordalakes EM, Shetty SJ & Rissman EF (2002). Roles of estrogen receptor α and androgen receptor in the regulation of neuronal nitric oxide synthase. *J. Comp. Neurol.* **453**, 336–344.
65. Rife T, Rasoul B, Pullen N, Mitchell D, Grathwol K & Kurth J (2009). The effect of a promoter polymorphism on the transcription of nitric oxide synthase 1 and its relevance to Parkinson's disease. *J. Neurosci. Res.* **87**, 2319–2325.
66. Bredt DS & Snyder SH (1992). Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* **8**, 3–11.
67. Nakane M, Mitchell J, Förstermann U & Murad F (1991). Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **180**, 1396–1402.
68. Komeima K, Hayashi Y, Naito Y & Watanabe Y (2000). Inhibition of Neuronal Nitric-oxide Synthase by Calcium/ Calmodulin-dependent Protein Kinase II \pm through Ser847 Phosphorylation in NG108-15 Neuronal Cells. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 28139–28143.
69. Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Nakazawa A, Fukunaga K, Miyamoto E, Takayasu M, Tokuda M & Yoshida J (2002). Phosphorylation of Neuronal Nitric Oxide Synthase at Ser847 by CaM-KII in the Hippocampus of Rat Brain After Transient Forebrain Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 1098–1106.
70. Rameau GA, Chiu L & Ziff EB (2004). Bidirectional Regulation of Neuronal Nitric-oxide Synthase Phosphorylation at Serine 847 by the N-Methyl-d-aspartate Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14307–14314.
71. Sayed N, Baskaran P, Ma X, van den Akker F & Beuve A (2007). Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **104**, 12312–12317.

72. Guix FX, Uribealago I, Coma M & Muñoz FJ (2005). The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology* **76**, 126–152.
73. Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC & Bredt DS (1996). Interaction of Nitric Oxide Synthase with the Postsynaptic Density Protein PSD-95 and ± 1 -Syntrophin Mediated by PDZ Domains. *Cell* **84**, 757–767.
74. Brenman JE, Xia H, Chao DS, Black SM & Bredt DS (1997). Regulation of Neuronal Nitric Oxide Synthase through Alternative Transcripts. *Dev Neurosci* **19**, 224–231.
75. Cleeter MWJ, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S & Schapira AHV (1994). Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide: Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Letters* **345**, 50–54.
76. Elfering SL, Sarkela TM & Giulivi C (2002). Biochemistry of Mitochondrial Nitric-oxide Synthase. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 38079–38086.
77. Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi S, Groat WC de & Peterson J (2001). Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 14126–14131.
78. Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH & Fishman MC (1993). Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* **75**, 1273–1286.
79. Conroy WG, Liu Z, Nai Q, Coggan JS & Berg DK (2003/06/05). PDZ-Containing Proteins Provide a Functional Postsynaptic Scaffold for Nicotinic Receptors in Neurons. *Neuron* **38**, 759–771.
80. Russwurm M, Wittau N & Koesling D (2001). Guanylyl Cyclase/PSD-95 Interaction. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 44647–44652.
81. Burette A, Zabel U, Weinberg RJ, Schmidt HHHW & Valtschanoff JG (2002). Synaptic Localization of Nitric Oxide Synthase and Soluble Guanylyl Cyclase in the Hippocampus. *J. Neurosci.* **22**, 8961–8970.
82. Lowe PN, Smith D, Stammers DK, Riveros - Moreno V, Moncada S, Charles I & Boyhan A (1996). Identification of the domains of neuronal nitric oxide synthase by limited proteolysis. *Biochem. J.* **314**, 55–62.
83. Sheta EA, McMillan K & Masters BS (1994). Evidence for a bidomain structure of constitutive cerebellar nitric oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 15147–15153.
84. Crane BR, Arvai AS, Gachhui R, Wu C, Ghosh DK, Getzoff ED, Stuehr DJ & Tainer JA (1997). The Structure of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Domain and Inhibitor Complexes. *Science* **278**, 425–431.

85. Daff S (2003). Calmodulin-dependent regulation of mammalian nitric oxide synthase. *Biochemical Society Transactions* **31**, 502–505.
86. Craig DH, Chapman SK & Daff S (2002/09/13). Calmodulin Activates Electron Transfer through Neuronal Nitric-oxide Synthase Reductase Domain by Releasing an NADPH-dependent Conformational Lock. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 33987–33994.
87. Hemmens B & Mayer B. Enzymology of Nitric Oxide Synthases. In *Nitric Oxide Protocols*, pp. 1–32.
88. Daff S (2010). NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide* **23**, 1–11.
89. Kiss JP & Vizi ES (2001). Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. *Trends in Neurosciences* **24**, 211–215.
90. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV & Jothianandan D (1984). Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol* **6 Suppl 2**, S336-43.
91. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE & Chaudhuri G (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 9265–9269.
92. O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER & Arancio O (1991/12/15). Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 11285–11289.
93. Böhme GA, Bon C, Stutzmann JM, Doble A & Blanchard JC (1991). Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur. J. Pharmacol* **199**, 379–381.
94. Schuman E & Madison D (1991). A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* **254**, 1503–1506.
95. Lu Y, Kandel ER & Hawkins RD (1999). Nitric Oxide Signaling Contributes to Late-Phase LTP and CREB Phosphorylation in the Hippocampus. *J. Neurosci.* **19**, 10250–10261.
96. Szabadits E, Cserep C, Ludanyi A, Katona I, Gracia-Llanes J, Freund TF & Nyiri G (2007). Hippocampal GABAergic Synapses Possess the Molecular Machinery for Retrograde Nitric Oxide Signaling. *J. Neurosci.* **27**, 8101–8111.
97. Hopper RA & Garthwaite J (2006). Tonic and Phasic Nitric Oxide Signals in Hippocampal Long-Term Potentiation. *J. Neurosci.* **26**, 11513–11521.
98. Garthwaite J (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *European Journal of Neuroscience* **27**, 2783–2802.
99. Garthwaite J (2010). New insight into the functioning of nitric oxide-receptive guanylyl cyclase: physiological and pharmacological implications. *Molecular and Cellular Biochemistry* **334**, 221–232.

100. Garthwaite J (2008). Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *European Journal of Neuroscience* **27**, 2783–2802.
101. Guevara-Guzman R, Emson PC & Kendrick KM (1994). Modulation of In Vivo Striatal Transmitter Release by Nitric Oxide and Cyclic GMP. *Journal of Neurochemistry* **62**, 807–810.
102. Arancio O, Kiebler M, Lee CJ, Lev-Ram V, Tsien RY, Kandel ER & Hawkins RD (1996). Nitric Oxide Acts Directly in the Presynaptic Neuron to Produce Long-Term Potentiation in Cultured Hippocampal Neurons. *Cell* **87**, 1025–1035.
103. Malenka RC & Bear MF (2004). LTP and LTD: An Embarrassment of Riches. *Neuron* **44**, 5–21.
104. Chanrion B, La Mannoury Cour C, Bertaso F, Lerner-Natoli M, Freissmuth M, Millan MJ, Bockaert J & Marin P (2007). Physical interaction between the serotonin transporter and neuronal nitric oxide synthase underlies reciprocal modulation of their activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 8119–8124.
105. Hopper R, Lancaster B & Garthwaite J (2004). On the regulation of NMDA receptors by nitric oxide. *European Journal of Neuroscience* **19**, 1675–1682.
106. Rengasamy A & Johns RA (1993). Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Molecular Pharmacology* **44**, 124–128.
107. Park SK, Lin HL & Murphy S (1994). Nitric Oxide Limits Transcriptional Induction of Nitric Oxide Synthase in CNS Glial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201**, 762–768.
108. Ravichandran LV, Johns RA & Rengasamy A (1995). Direct and reversible inhibition of endothelial nitric oxide synthase by nitric oxide. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **268**, H2216-H2223.
109. Lane P, Hao G & Gross SS (2001). S-Nitrosylation Is Emerging as a Specific and Fundamental Posttranslational Protein Modification: Head-to-Head Comparison with O-Phosphorylation. *Sci. STKE* **2001**, re1.
110. Kaye DM, Gruskin S, Smith AI & Esler MD (2000). Nitric oxide mediated modulation of norepinephrine transport: identification of a potential target for S-nitrosylation. *British Journal of Pharmacology* **130**, 1060–1064.
111. Kiss JP, Hennings ECP, Zsilla G & Vizi ES (1999). A possible role of nitric oxide in the regulation of dopamine transporter function in the striatum. *Neurochemistry International* **34**, 345–350.
112. Kuhn DM & Arthur RE (1996). Inactivation of Brain Tryptophan Hydroxylase by Nitric Oxide. *Journal of Neurochemistry* **67**, 1072–1077.
113. Ischiropoulos H (2003). Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **305**, 776–783.
114. Ischiropoulos H (2009/4/15/). Protein tyrosine nitration--An update. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **484**, 117–121.

115. Epstein FH, Moncada S & Higgs A (1993). The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *New England Journal of Medicine* **329**, 2002–2012.
116. Shiva S, Wang X, Ringwood LA, Xu X, Yuditskaya S, Annavajhala V, Miyajima H, Hogg N, Harris ZL & Gladwin MT (2006). Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis. *Nat Chem Biol* **2**, 486–493.
117. Lundberg JO, Gladwin MT, Ahluwalia A, Benjamin N, Bryan NS, Butler A, Cabrales P, Fago A, Feelisch M, Ford PC, Freeman BA, Frenneaux M, Friedman J, Kelm M, Kevil CG, Kim-Shapiro DB, Kozlov AV, Lancaster JR, Lefer DJ, McColl K, McCurry K, Patel RP, Petersson J, Rassaf T, Reutov VP, Richter-Addo GB, Schechter A, Shiva S, Tsuchiya K, van Faassen EE, Webb AJ, Zuckerbraun BS, Zweier JL & Weitzberg E (2009). Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nat Chem Biol* **5**, 865–869.
118. Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM & Nelson RJ (2001/01/30). Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 1277–1281.
119. Zhu C, Hewlett WA, Francis SH, Corbin JD & Blakely RD (2004). Stimulation of serotonin transport by the cyclic GMP phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil. *European Journal of Pharmacology* **504**, 1–6.
120. Garthwaite J (2007/05/08). Neuronal nitric oxide synthase and the serotonin transporter get harmonious. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 7739–7740.
121. Zhang J, Huang X, Ye M, Luo C, Wu H, Hu Y, Zhou Q, Wu D, Zhu L & Zhu D (2010). Neuronal Nitric Oxide Synthase Alteration Accounts for the Role of 5-HT_{1A} Receptor in Modulating Anxiety-Related Behaviors. *J. Neurosci.* **30**, 2433–2441.
122. Chiavegatto S & Nelson RJ (2003/9). Interaction of nitric oxide and serotonin in aggressive behavior. *Hormones and Behavior* **44**, 233–241.
123. Retz W, Reif A, Freitag CM, Retz-Junginger P & Rösler M (2010). Association of a functional variant of neuronal nitric oxide synthase gene with self-reported impulsiveness, venturesomeness and empathy in male offenders. *J Neural Transm* **117**, 321–324.
124. Laas K, Reif A, Herterich S, Eensoo D, Lesch K & Harro J (2010). The effect of a functional NOS1 promoter polymorphism on impulsivity is moderated by platelet MAO activity. *Psychopharmacology (Berl.)* **209**, 255–261.
125. Reif A, Kiive E, Kurrikoff T, Paaver M, Herterich S, Konstabel K, Tulviste T, Lesch K & Harro J (2010-06-29). A functional NOS1 promoter polymorphism interacts with adverse environment on functional and dysfunctional impulsivity. *Psychopharmacology*, 1–10.
126. Kopf J, Schecklmann M, Hahn T, Dieler AC, Herrmann MJ, Fallgatter AJ & Reif A (2011). NOS1 ex1f-VNTR polymorphism affects prefrontal oxygenation during response inhibition tasks. *Hum. Brain Mapp*, n/a.

127. Hoogman M, Aarts E, Zwiets M, Slaats-Willems D, Naber M, Onnink M, Cools R, Kan C, Buitelaar J & Franke B (2011). Nitric Oxide Synthase Genotype Modulation of Impulsivity and Ventral Striatal Activity in Adult ADHD Patients and Healthy Comparison Subjects. *American Journal of Psychiatry* **168**, 1099–1106.
128. Gottesman II & Gould TD (2003/4/1). The Endophenotype Concept in Psychiatry: Etymology and Strategic Intentions. *Am J Psychiatry* **160**, 636–645.
129. Almasy L & Blangero J (2001). Endophenotypes as quantitative risk factors for psychiatric disease: Rationale and study design. *Am. J. Med. Genet.* **105**, 42–44.
130. Congdon E & Canli T (2005). The Endophenotype of Impulsivity: Reaching Consilience Through Behavioral, Genetic, and Neuroimaging Approaches. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews* **4**, 262–281.
131. Chamberlain SR & Sahakian BJ (2007). The neuropsychiatry of impulsivity. *Curr Opin Psychiatry* **20**, 255–261.
132. P.Najt, J.Perez, M.Sanches, M. A. M.Peluso, D.Glahn & J. C.Soaes (2007). Impulsivity and bipolar disorder. *Eur Neuropsychopharmacol* **17**, 313–320.
133. Reif A, Grünblatt E, Herterich S, Wichart I, Rainer MK, Jungwirth S, Danielczyk W, Deckert J, Tragl K, Riederer P & Fischer P. Association of a Functional NOS1 Promoter Repeat with Alzheimer's Disease in the VITA Cohort. *Journal of Alzheimer's Disease*.
134. Galimberti D, Scarpini E, Venturelli E, Strobel A, Herterich S, Fenoglio C, Guidi I, Scalabrini D, Cortini F, Bresolin N & Lesch KaRA (2008/09/01). Association of a NOS1 promoter repeat with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **29**, 1359–1365.
135. Reif A, Herterich S, Strobel A, Ehli A, Saur D, Jacob CP, Wienker T, Topner T, Fritzen S, Walter U, Schmitt A, Fallgatter AJ & Lesch K (2006). A neuronal nitric oxide synthase (NOS-I) haplotype associated with schizophrenia modifies prefrontal cortex function. *Mol Psychiatry* **11**, 286–300.
136. Ewald H, Flint T, Kruse TA & Mors O (2002). A genome-wide scan shows significant linkage between bipolar disorder and chromosome 12q24.3 and suggestive linkage to chromosomes 1p22-21, 4p16, 6q14-22, 10q26 and 16p13.3. *Mol Psychiatry* **7**, 734–744.
137. Ewald H, Degn B, Mors O & Kruse TA (1998). Significant linkage between bipolar affective disorder and chromosome 12q24. *Psychiatric Genetics* **8**.
138. Buttenchønna HN, Foldagerab L, Flintalnger TJ, Olsena ML, Deleurana T, Nyegaardc M, Hansena MM, Kallunkid P, Christensend KV, Blackwood DH, Muir WJ, Straarupa SE, Alsa TD, Nordentofte M & Børglumac ADaMO (2010). Support for a bipolar affective disorder susceptibility locus on chromosome 12q24.3. *Psychiatric Genetics* **20**, 93–101.
139. Curtis D, Kalsi G, Brynjolfsson J, McInnis M, O'Neill J, Smyth C, Moloney E, Murphy P, McQuillan A, Petursson H & Gurling H (2003). Genome scan of

pedigrees multiply affected with bipolar disorder provides further support for the presence of a susceptibility locus on chromosome 12q23-q24, and suggests the presence of additional loci on 1p and 1q. *Psychiatric Genetics* **13**, 77–84.

140. Degn B, Lundorf MD, Wang A, Vang M, Mors O, Kruse TA & Ewald H (2001). Further evidence for a bipolar risk gene on chromosome 12q24 suggested by investigation of haplotype sharing and allelic association in patients from the Faroe Islands. *Mol Psychiatry* **6**, 450–455.

141. Morissette J, Villeneuve A, Bordeleau L, Rochette D, Laberge C, Gagné B, Laprise C, Bouchard G, Plante M, Gobeil L, Shink E, Weissenbach J & Barden N (1999). Genome-wide search for linkage of bipolar affective disorders in a very large pedigree derived from a homogeneous population in Quebec points to a locus of major effect on chromosome 12q23 q24. *Am. J. Med. Genet.* **88**, 567–587.

142. Shink E, Morissette J, Sherrington R & Barden N (2004). A genome-wide scan points to a susceptibility locus for bipolar disorder on chromosome 12. *Mol Psychiatry* **10**, 545–552.

143. Maziade M, Roy M, Chagnon YC, Cliche D, Fournier J, Montgrain N, Dion C, Lavalley J, Garneau Y, Gingras N, Nicole L, Pires A, Ponton A, Potvin A, Wallot H & Merette C (2004). Shared and specific susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder: a dense genome scan in Eastern Quebec families. *Mol Psychiatry* **10**, 486–499.

144. Knight J, Rochberg NS, Saccone SF, Nurnberger JI & Rice JP (2010). An investigation of candidate regions for association with bipolar disorder. *Am. J. Med. Genet.* **153B**, 1292–1297.

145. Andreazza AC, Kauer-Sant'anna M, Frey BN, Bond DJ, Kapczinski F, Young LT & Yatham LN (2008). Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J Affect Disord* **111**, 135–144.

146. Das I, Khan NS, Puri BK, Sooranna SR, Bellerocche J de & Hirsch SR (1995). Elevated platelet calcium mobilization and nitric oxide synthase activity may reflect abnormalities in schizophrenic brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **212**, 375–380.

147. Li Y, Zhu J, Tian G, Li N, Li Q, Ye M, Zheng H, Yu J, Wu H, Sun J, Zhang H, Chen Q, Luo R, Chen M, He Y, Jin X, Zhang Q, Yu C, Zhou G, Sun J, Huang Y, Zheng H, Cao H, Zhou X, Guo S, Hu X, Li X, Kristiansen K, Bolund L, Xu J, Wang W, Yang H, Wang J, Li R, Beck S, Wang J & Zhang X (2010/11/09). The DNA Methylome of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *PLoS Biol* **8**, e1000533.

148. Atmaca M, Tezcan E & Ustundag B. Plasma nitric oxide and leptin values in patients with olanzapine-induced weight gain. *J Psychiatr Res* **41**, 74–79.

149. Srivastava N, Barthwal MK, Dalal PK, Agarwal AK, Nag D, Srimal RC, Seth PK & Dikshit M (2001). Nitrite content and antioxidant enzyme levels in the blood of schizophrenia patients. *Psychopharmacology (Berl.)* **158**, 140–145.

150. Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A & Poulton R (2003/07/18). Influence of Life Stress on Depression: Moderation by a Polymorphism in the 5-HTT Gene. *Science* **301**, 386–389.
151. Zalsman G, Huang Y, Oquendo MA, Burke AK, Hu X, Brent DA, Ellis SP, Goldman D & Mann JJ (2006). Association of a Triallelic Serotonin Transporter Gene Promoter Region (5-HTTLPR) Polymorphism With Stressful Life Events and Severity of Depression. *Am J Psychiatry* **163**, 1588–1593.
152. Caspi A, McClay J, Moffitt TE, Mill J, Martin J, Craig IW, Taylor A & Poulton R (2002/08/02). Role of Genotype in the Cycle of Violence in Maltreated Children. *Science* **297**, 851–854.
153. Kim-Cohen J, Caspi A, Taylor A, Williams B, Newcombe R, Craig IW & Moffitt TE (2006/06/27/online). MAOA, maltreatment, and gene-environment interaction predicting children's mental health: new evidence and a meta-analysis. *Mol Psychiatry* **11**, 903–913.
154. Avshalom Caspi, Terrie E. Moffitt, Mary Cannon, Joseph McClay, Robin Murray, HonaLee Harrington, Alan Taylor, Louise Arseneault, Ben Williams, Antony Braithwaite, Richie Poulton & Ian W. Craig (2005). Moderation of the Effect of Adolescent-Onset Cannabis Use on Adult Psychosis by a Functional Polymorphism in the Catechol-O-Methyltransferase Gene: Longitudinal Evidence of a Gene X Environment Interaction. *Biol Psychiatry* **57**, 1117–1127.
155. Iris-Tatjana Kolassa, Stephan Kolassa, Verena Ertl, Andreas Papassotiropoulos & Dominique J. -F. De Quervain (2010). The Risk of Posttraumatic Stress Disorder After Trauma Depends on Traumatic Load and the Catechol-O-Methyltransferase Val158Met Polymorphism. *Biol Psychiatry* **67**, 304–308.
156. Feder A, Nestler EJ & Charney DS (2009). Psychobiology and molecular genetics of resilience. *Nat Rev Neurosci* **10**, 446–457.
157. McGowan PO & Szyf M (2010/7//). The epigenetics of social adversity in early life: Implications for mental health outcomes. *Neurobiology of Disease* **39**, 66–72.
158. Dudley KJ, Li X, Kobor MS, Kippin TE & Bredy TW (2011). Epigenetic mechanisms mediating vulnerability and resilience to psychiatric disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*.
159. Weaver ICG, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M & Meaney MJ (2004/08//print). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* **7**, 847–854.
160. Jaenisch R & Bird A (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics* **33**, 245–254.
161. Bird A (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature* **447**, 396–398.
162. Bonasio R, Tu S & Reinberg D (2010/10/29). Molecular Signals of Epigenetic States. *Science* **330**, 612–616.

163. McGowan PO, Meaney MJ & Szyf M (2008). Diet and the epigenetic (re)programming of phenotypic differences in behavior. *Brain Research* **1237**, 12–24.
164. Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A & Cheng X (2007). Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* **449**, 248–251.
165. Hata K, Okano M, Lei H & Li E (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* **129**, 1983–1993.
166. Jeltsch A. Molecular Enzymology of Mammalian DNA Methyltransferases. In *DNA Methylation: Basic Mechanisms*. (Doerfler W & Böhm P, eds), pp. 203–225. Springer Berlin Heidelberg.
167. Hermann A, Gowher H & Jeltsch A (2004). Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 2571–2587.
168. Zhu J (2009). Active DNA Demethylation Mediated by DNA Glycosylases. *Annu. Rev. Genet* **43**, 143–166.
169. Wu SC & Zhang Y (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 750–750.
170. Illingworth RS & Bird AP (2009/6/5/). CpG islands – ‘A rough guide’. *FEBS Letters* **583**, 1713–1720.
171. Zhao Z & Han L (2009). CpG islands: Algorithms and applications in methylation studies. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **382**, 643–645.
172. Bernstein BE, Meissner A & Lander ES (2007). The Mammalian Epigenome. *Cell* **128**, 669–681.
173. Sharma RP, Gavin DP & Grayson DR (2010/09//print). CpG Methylation in Neurons: Message, Memory, or Mask[quest]. *Neuropsychopharmacology* **35**, 2009–2020.
174. Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M & Schubeler D (2007/04//print). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* **39**, 457–466.
175. Watson J & Crick F (1953). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737–738.
176. Rich A & Zhang S (2003). Z-DNA: the long road to biological function. *Nat Rev Genet* **4**, 566–572.
177. Schroth GP, Chou PJ & Ho PS (1992). Mapping Z-DNA in the human genome. Computer-aided mapping reveals a nonrandom distribution of potential Z-DNA-forming sequences in human genes. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 11846–11855.

178. Rich A, Nordheim A & Wang AHJ (1984). The Chemistry and Biology of Left-Handed Z-DNA. *Annu. Rev. Biochem.* **53**, 791–846.
179. Ha SC, Lowenhaupt K, Rich A, Kim Y & Kim KK (2005/10/20/print). Crystal structure of a junction between B-DNA and Z-DNA reveals two extruded bases. *Nature* **437**, 1183–1186.
180. Garner MM & Felsenfeld G (1987/8/5/). Effect of Z-DNA on nucleosome placement. *Journal of Molecular Biology* **196**, 581–590.
181. Thomas TJ, Gunnia UB & Thomas T (1991). Polyamine-induced B-DNA to Z-DNA conformational transition of a plasmid DNA with (dG-dC)_n insert. *J. Biol. Chem* **266**, 6137–6141.
182. Thomas TJ, Baarsch MJ & Messner RP (1988). Immunological detection of B-DNA to Z-DNA transition of polynucleotides by immobilization of the DNA conformation on a solid support. *Anal. Biochem* **168**, 358–366.
183. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM & Haussler D (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res* **12**, 996–1006.
184. Ho PS, Ellison MJ, Quigley GJ & Rich A (1986). A computer aided thermodynamic approach for predicting the formation of Z-DNA in naturally occurring sequences. *EMBO J* **5**, 2737–2744.
185. Bock C, Reither S, Mikeska T, Paulsen M, Walter J & Lengauer T (2005). BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* **21**, 4067–4068.
186. Kersey PJ, Lawson D, Birney E, Derwent PS, Haimel M, Herrero J, Keenan S, Kerhornou A, Koscielny G, Kähäri A, Kinsella RJ, Kulesha E, Maheswari U, Megy K, Nuhn M, Proctor G, Staines D, Valentin F, Vilella AJ & Yates A (2010). Ensembl Genomes: extending Ensembl across the taxonomic space. *Nucleic Acids Res* **38**, D563-9.
187. Ghafourifar P, Parihar MS, Nazarewicz R, Zenebe WJ & Parihar A (2008). Detection assays for determination of mitochondrial nitric oxide synthase activity; advantages and limitations. *Meth. Enzymol* **440**, 317–334.
188. Elango N & Yi SV (2011). Functional Relevance of CpG Island Length for Regulation of Gene Expression. *Genetics* **187**, 1077–1083.
189. Brenet F, Moh M, Funk P, Feierstein E, Viale AJ, Socci ND & Scandura JM (2011). DNA methylation of the first exon is tightly linked to transcriptional silencing. *PLoS ONE* **6**, e14524.
190. Ushijima T (2005). Innovation: Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nat Rev Cancer* **5**, 223–231.
191. Dejeux E, abdalaoui HE, Gut IG & Tost J. Identification and Quantification of Differentially Methylated Loci by the Pyrosequencing Technology. In *DNA Methylation*, pp. 189–205.

192. Reed K, Poulin ML, Yan L & Parissenti AM (2010/2/1/). Comparison of bisulfite sequencing PCR with pyrosequencing for measuring differences in DNA methylation. *Analytical Biochemistry* **397**, 96–106.
193. Ehrich M (2005). Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 15785–15790.
194. Shoemaker R, Deng J, Wang W & Zhang K (2010/07/01). Allele-specific methylation is prevalent and is contributed by CpG-SNPs in the human genome. *Genome Research* **20**, 883–889.
195. Hellman A & Chess A (2010). Extensive sequence-influenced DNA methylation polymorphism in the human genome. *Epigenetics & Chromatin* **3**, 11.
196. Kerkel K, Spadola A, Yuan E, Kosek J, Jiang L, Hod E, Li K, Murty VV, Schupf N, Vilain E, Morris M, Haghghi F & Tycko B (2008). Genomic surveys by methylation-sensitive SNP analysis identify sequence-dependent allele-specific DNA methylation. *Nat Genet* **40**, 904–908.
197. Schalkwyk LC, Meaburn EL, Smith R, Dempster EL, Jeffries AR, Davies MN, Plomin R & Mill J (2010). Allelic Skewing of DNA Methylation Is Widespread across the Genome. *The American Journal of Human Genetics* **86**, 196–212.
198. Breton CV, Byun H, Wang X, Salam MT, Siegmund K & Gilliland FD (2011). DNA Methylation in the ARG-NOS Pathway is Associated With Exhaled Nitric Oxide in Asthmatic Children. *American journal of respiratory and critical care medicine*.
199. Bustos C de, Ramos E, Young J, Tran R, Menzel U, Langford C, Eichler E, Hsu L, Henikoff S, Dumanski J & Trask B (2009). Tissue-specific variation in DNA methylation levels along human chromosome 1. *Epigenetics & Chromatin* **2**, 7.
200. Ladd-Acosta C, Pevsner J, Sabunciyan S, Yolken RH, Webster MJ, Dinkins T, Callinan PA, Fan J, Potash JB & Feinberg AP (2007). DNA Methylation Signatures within the Human Brain. *The American Journal of Human Genetics* **81**, 1304–1315.
201. Xin Y, Chanrion B, Liu M, Galfalvy H, Costa R, Ilievski B, Rosoklija G, Arango V, Dwork AJ, Mann JJ, Tycko B, Haghghi F & Kato T (2010). Genome-Wide Divergence of DNA Methylation Marks in Cerebral and Cerebellar Cortices. *PLoS ONE* **5**, e11357.
202. Iwamoto K, Bundo M, Ueda J, Oldham MC, Ukai W, Hashimoto E, Saito T, Geschwind DH & Kato T (2011). Neurons show distinctive DNA methylation profile and higher interindividual variations compared with non-neurons. *Genome Research*.
203. Davies MN, Volta M, Pidsley R, Lunnon K, Dixit A, Lovestone S, Coarfa C, Harris RA, Milosavljevic A, Troakes C, Al-Sarraj S, Dobson R, Schalkwyk LC & Mill J (2012). Functional annotation of the human brain methylome identifies

tissue-specific epigenetic variation across brain and blood. *Genome Biology* **13**, R43.

204. Chung C, Wong Y, Caspi A, Williams B, Craig IW, Houts R, Ambler A & Moffitt TEaMJ (2010). A longitudinal study of epigenetic variation in twins. *Epigenetics* **5**, 516–526.

205. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, Ballestar ML, Heine-Suñer D, Cigudosa JC, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector TD, Wu Y, Plass C & Esteller M (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 10604–10609.

206. Siegmund KD, Connor CM, Campan M, Long TI, Weisenberger DJ, Binizskiewicz D, Jaenisch R, Laird PW & Akbarian S (2007). DNA methylation in the human cerebral cortex is dynamically regulated throughout the life span and involves differentiated neurons. *PLoS ONE* **2**, e895.

207. Carrard A, Salzmann A, Malafosse A & Karege F (2011). Increased DNA methylation status of the serotonin receptor 5HTR1A gene promoter in schizophrenia and bipolar disorder. *Journal of affective disorders*.

208. Aid T, Kazantseva A, Piirsoo M, Palm K & Timmusk T (2007). Mouse and ratBDNF gene structure and expression revisited. *J. Neurosci. Res* **85**, 525–535.

209. Martinowich K (2003). DNA Methylation-Related Chromatin Remodeling in Activity-Dependent Bdnf Gene Regulation. *Science* **302**, 890–893.

210. Keller S, Sarchiapone M, Zarrilli F, Videtic A, Ferraro A, Carli V, Sacchetti S, Lembo F, Angiolillo A, Jovanovic N, Pisanti F, Tomaiuolo R, Monticelli A, Balazic J, Roy A, Marusic A, Cocozza S, Fusco A, Bruni CB, Castaldo G & Chiariotti L (2010). Increased BDNF promoter methylation in the Wernicke area of suicide subjects. *Arch. Gen. Psychiatry* **67**, 258–267.

211. Boulle F, van den Hove DLA, Jakob SB, Rutten BP, Hamon M, van Os J, Lesch K, Lanfume L, Steinbusch HW & Kenis G (2011). Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*.

212. Fuchikami M, Morinobu S, Segawa M, Okamoto Y, Yamawaki S, Ozaki N, Inoue T, Kusumi I, Koyama T, Tsuchiyama K, Terao T & Hashimoto K (2011). DNA Methylation Profiles of the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Gene as a Potent Diagnostic Biomarker in Major Depression. *PLoS ONE* **6**, e23881.

213. Molendijk ML, Bus BAA, Spinhoven P, Penninx BWJH, Kenis G, Prickaerts J, Voshaar RO & Elzinga BM (2010). Serum levels of brain-derived neurotrophic factor in major depressive disorder: state–trait issues, clinical features and pharmacological treatment. *Mol Psychiatry* **16**, 1088–1095.

214. Cirulli ET & Goldstein DB (2007). In vitro assays fail to predict in vivo effects of regulatory polymorphisms. *Hum. Mol. Genet* **16**, 1931–1939.

215. Savas HA, Herken H, Yäreklı M, Uz E, Tutkun H, Zoroälu SS, Äzen ME, Cengiz B & Akyol Ä (2002). Possible Role of Nitric Oxide and Adrenomedullin in Bipolar Affective Disorder. *Neuropsychobiology* **45**, 57–61.
216. Savas H, Gergerlioglu H.S., Gurel A., Selek S. & Savas E. (2005). Increased xanthine oxidase and malondialdehyde levels in euthymic bipolar patients. *Klinik Psikiyatri Dergisi* **8**, 180–185.
217. Gergerlioglu HS, Savas HA, Bulbul F, Selek S, Uz E & Yumru M (2007). Changes in nitric oxide level and superoxide dismutase activity during antimanic treatment. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **31**, 697–702.
218. Selek S, Savas HA, Gergerlioglu HS, Bulbul F, Uz E & Yumru M (2008). The course of nitric oxide and superoxide dismutase during treatment of bipolar depressive episode. *J Affect Disord* **107**, 89–94.
219. Ozcan ME, Gulec M, Ozerol E, Polat R & Akyol O (2004). Antioxidant enzyme activities and oxidative stress in affective disorders. *Int Clin Psychopharmacol* **19**, 89–95.
220. Yanik M, Vural H, Tutkun H, Zorođlu SS, Savař HA, Herken H, Koçyiđit A, Keleř H & Akyol O (2004). The role of the arginine-nitric oxide pathway in the pathogenesis of bipolar affective disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **254**, 43–47.
221. Cortas NK & Wakid NW (1990). Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin. Chem* **36**, 1440–1443.
222. Lundberg JO & Govoni M (2004). Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med* **37**, 395–400.
223. Rassaf T, Feelisch M & Kelm M (2004). Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radic. Biol. Med* **36**, 413–422.
224. Kelm M, Preik-Steinhoff H, Preik M & Strauer BE (1999). Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc. Res* **41**, 765–772.
225. Gladwin MT, Shelhamer JH, Schechter AN, Pease-Fye ME, Waclawiw MA, Panza JA, Ognibene FP & Cannon RO (2000). Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 11482–11487.
226. Marzinzig M, Nussler AK, Stadler J, Marzinzig E, Barthlen W, Nussler NC, Beger HG, Morris SM & Brückner UB (1997). Improved methods to measure end products of nitric oxide in biological fluids: nitrite, nitrate, and S-nitrosothiols. *Nitric Oxide* **1**, 177–189.
227. Lundberg JO, Weitzberg E & Gladwin MT (2008/02//print). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **7**, 156–167.

228. Crawford JH, Chacko BK, Pruitt HM, Pikhova B, Hogg N & Patel RP (2004). Transduction of NO-bioactivity by the red blood cell in sepsis: novel mechanisms of vasodilation during acute inflammatory disease. *Blood* **104**, 1375–1382.
229. Urdahl KB, Jenkins MK & Norton SD (1991). Accessory cell-derived costimulatory signals regulate T cell proliferation. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **636**, 33–42.
230. Lewis TV, Dart AM, Chin-Dusting JP & Kingwell BA (1999). Exercise training increases basal nitric oxide production from the forearm in hypercholesterolemic patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **19**, 2782–2787.
231. Jungersten L, Ambring A, Wall B & Wennmalm A (1997). Both physical fitness and acute exercise regulate nitric oxide formation in healthy humans. *J. Appl. Physiol* **82**, 760–764.
232. Wallerath T, Gath I, Aulitzky WE, Pollock JS, Kleinert H & Förstermann U (1997). Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Thromb. Haemost* **77**, 163–167.

11 Lebenslauf