

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

Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Deckert

Funktionalität eines *Stathmin*-Promotor-Polymorphismus

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Annika Wiebke Müller

aus Arolsen jetzt Bad Arolsen

Würzburg, 07.12.2022



Referent: Prof. Dr. Andreas Reif

Korreferent: Prof. Dr. Marcel Romanos

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.03.2023

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Proteinfamilie der Stathmine.....	1
1.2 Das humane <i>Stathmin</i> -Gen und das Stathmin-Protein.....	3
1.3 Stathmin und Pathologien im Bereich des zentralen Nervensystems.....	4
1.4 Mikrosatelliten	5
1.5 <i>Stathmin</i> (TAA) _n Promotor Polymorphismus	6
1.6 Ziele der Arbeit.....	6
2. Material und Methoden	8
2.1 Ethikvotum	8
2.2 Materialien	8
2.2.1 DNA-Proben.....	8
2.2.2 Bakterien und Zelllinien.....	8
2.2.3 Vektoren	9
2.2.4 Oligonukleotid <i>primer</i>	9
2.2.5 Reagenzienansätze (Kits).....	9
2.2.6 Verwendete Enzyme.....	10
2.2.7 Puffer.....	10
2.2.8 Chemikalien und Reagenzien.....	10
2.2.9 Verwendete Materialien aus eigener Herstellung	11
2.2.10 Gebrauchsmaterialien.....	11
2.2.11 Geräte	12
2.2.12 Software	13
2.3 Methoden	13
2.3.1 DNA-Extraktion aus Blutproben.....	13
2.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration und der DNA-Reinheit	13
2.3.3 Gelelektrophorese.....	14

2.3.4 Amplifikation eines DNA-Abschnitts des <i>Stathmin</i> -Gens mittels PCR	15
2.3.5 Restriktionsverdau des amplifizierten DNA-Abschnittes.....	18
2.3.6 Restriktionsverdau des Vektors pGL4.23.....	19
2.3.7 Ligation des amplifizierten DNA-Abschnittes in den Plasmidvektor pGL4.23	22
2.3.7.1 Überprüfung der Ligation des pGL4.23-Vektors mit dem Insert mittels PCR	23
2.3.8 Transformation kompetenter Bakterien mit dem rekombinanten Plasmidvektor.....	25
2.3.8.1 Identifikation der pGL4.23-Vektoren mit Insert mittels Kolonie-PCR	26
2.3.8.2 DNA-Extraktion des rekombinanten Plasmidvektors aus Bakterienkulturen.....	28
2.3.8.3 DNA-Sequenzierung des rekombinanten Plasmidvektors	29
2.3.9 Zellkultur.....	29
2.3.9.1 Kultivierung humaner Zellen	29
2.3.9.2 Transfektion menschlicher Zellen mit dem rekombinanten Plasmidvektor mittels Lipofektion.....	31
2.3.10 Luciferase-Assay.....	32
2.4 Statistische Methoden	34
3. Ergebnisse	36
3.1 Kontrolle der Amplifikation eines DNA-Abschnittes des <i>Stathmin</i> -Gens mittels Gelelektrophorese.....	36
3.2 Kontrolle der Ligation des pGL4.23-Vektors mit dem <i>Insert</i> mittels PCR und Gelelektrophorese.....	37
3.3 Ergebnisse der Sequenzierung	39
3.4 Ergebnisse der Optimierung der Transfektion	41
3.5 Statistische Auswertung der Genexpression der Promotorpolymorphismen (TAA)12 und (TAA)13 im Luciferase-Assay.....	42

4. Diskussion.....	44
4.1 Der STR-Promotor-Polymorphismus (TAA)n hat einen Einfluss auf die Promotoraktivität des <i>Stathmin</i> -Gens.....	44
4.2 Ausblick auf weiterführende Versuche.....	45
5. Zusammenfassung.....	46
6. Literaturverzeichnis	47

Appendix

I Abkürzungsverzeichnis

II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

III Danksagung

IV Eidesstattliche Erklärung

1. Einleitung

1.1 Die Proteinfamilie der Stathmine

Die Stathmin-Familie setzt sich zusammen aus phylogenetisch hoch konservierten Phosphoproteinen in Vertebraten [1, 2]. Die Gruppe beinhaltet die Proteine Stathmin [3], SCG10 (Superior cervical ganglion-10, auch Stathmin 2) [4], SCLIP (SCG10-*like protein*, auch Stathmin 3) [5] sowie RB3 (stathmin-*like protein* B3, auch Stathmin 4) und dessen Splicing-Produkte RB3'/RB3" [1, 6]. Charakteristisches Merkmal dieser Proteine ist ihre Fähigkeit, Tubulin zu binden und freizugeben, sodass sie die Menge an freiem Tubulin kontrollieren. Damit sind sie für die Gruppierung von Mikrotubuli und deren Dynamik relevant [7–11]. Dieses ist ihnen über eine C-terminal lokalisierte Stathmin-*like* Domäne (SLD) möglich, die eine 65-75%-ige Übereinstimmung der Aminosäuren-Sequenz in SCG10, SCLIP und RB3/RB3'/RB3" und Stathmin aufweist (siehe Fig. 1) [8, 10]. Die SLD besteht aus drei Subdomänen: einer proximalen Domäne, einer divergierenden prolin-reichen Domäne sowie einer langen Domäne mit zwei aufeinanderfolgenden tubulin-bindenden-Regionen [12, 13].

In der Stathmin-*like* Domäne befindet sich eine α -Helix Struktur, durch die die Interaktion mit zwei α/β -Tubulin-Heterodimeren ermöglicht wird. Für jedes Protein bilden sich spezifische Tubulin-SLD-Komplexe mit einer 2:1 Stöchiometrie aus (siehe Fig. 2). Reguliert werden diese Prozesse durch die Phosphorylierung verschiedener Bereiche der SLD [1, 14–18]. Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinen zeigen sich in der Stabilität und Kinetik der entstehenden Tubulin-SLD-Komplexe. Die Stabilität der Komplexe ist für RB3 am höchsten, für SCG10, SCLIP und Stathmin mittelgradig sowie für RB3' am schwächsten [11, 19].

Im Vergleich zu Stathmin besitzen SCG10, SCLIP und RB3 weitere N-terminale Domänen, die sie in intrazellulären Membranen verankern - unter anderem im Bereich des Golgi-Apparates und den Vesikeln [1, 5].

Wenngleich Stathmin ubiquitär im menschlichen Körper vorkommt [3], sind die anderen Proteine der Stathmin-Familie vorwiegend und einige ausschließlich auf das Nervensystem begrenzt [1, 5, 10].

In Bezug auf ihre Funktion spielen die Phosphoproteine der Stathmin-Familie eine Rolle bei der Kontrolle von Differenzierung, Reifungsprozessen und der Plastizität von Neuronen [6, 20].

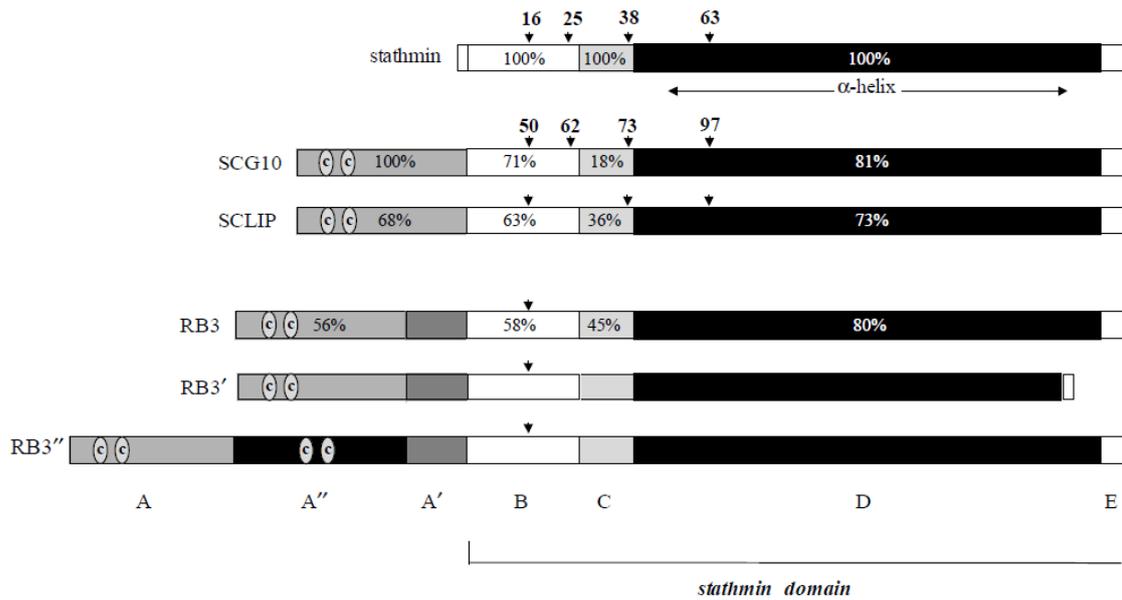


Fig. 1 Organisation der Domäne und Ähnlichkeit der Aminosäuren-Sequenz der Stathmin-Familie (Quelle des Bildes: [8])

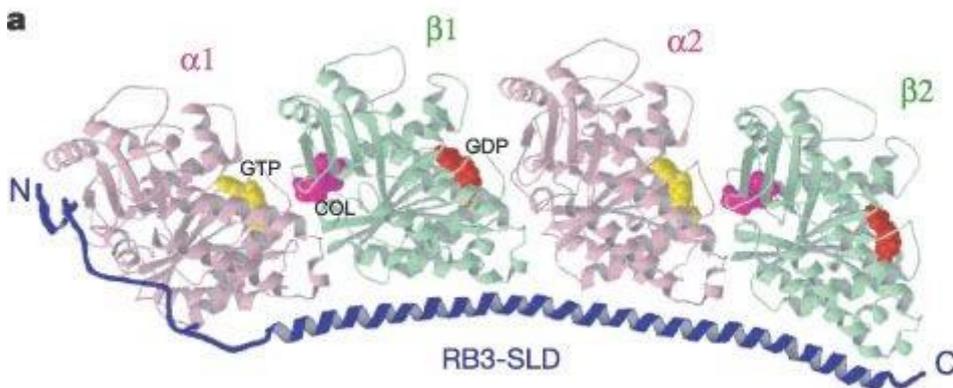


Fig. 2 RB3-Tubulin-Komplex (Quelle: [21])

1.2 Das humane *Stathmin*-Gen und das Stathmin-Protein

Das humane *Stathmin*-Gen (STMN1) besteht aus 22,8 kb (Kilo-Basenpaaren) und ist auf dem ersten Chromosom (1p36.11) lokalisiert [22, 23]. Es beinhaltet fünf Exons und kodiert für ein phylogenetisch hoch konserviertes, 18-kD (Kilodalton) schweres Phosphoprotein [23, 24] und ist auf zellulärer Ebene im Zytosol lokalisiert [25]. Neben Stathmin sind auch die Bezeichnungen Onkoprotein 18 (Op18), p17, p18, p19, 19K, LAP 18 und Metablastin gebräuchlich [1, 24]. Dieses Phosphoprotein besteht aus insgesamt 148 Aminosäuren [26]. Wie bereits beschrieben wurde, ist den Mitgliedern der Stathmin-Familie eine *Stathmin-like* Domäne gemein, die für die Mikrotubuli Destabilisierung relevant ist [8, 10, 27]. Sie besteht zum einen aus einer C-terminalen Region, die die tubulin-bindende Domäne enthält und somit die Mikrotubuli-Polymerisationsrate inhibiert. Der andere Bestandteil ist eine N-terminale Region, die die Katastrophen-Rate von Mikrotubuli erhöht [9, 23]. Als Katastrophe wird der spontane Übergang vom Wachstum der Mikrotubuli-Polymere zu deren Abnahme bezeichnet [28].

Die Aktivität des Stathmin-Proteins wird über vier Phosphorylierungsstellen (Serin 16, 25, 38 und 63) reguliert. Durch die Phosphorylierung an diesen Stellen wird das Maß der Mikrotubuli destabilisierenden Funktion des Stathmins reduziert [29].

Die am häufigsten gebrauchte Bezeichnung Stathmin leitet sich von dem griechischen Wort „stathmos“ ab, das übersetzt Relais bedeutet. Dies verdeutlicht seine Funktion im menschlichen Körper als regulatorisches Phosphoprotein, das als intrazellulärer Vermittler extrazellulärer Signale dient [3].

Aufgrund seiner Interaktion mit den Mikrotubuli spielt Stathmin u.a. eine Rolle bei der Regulation des Zell-Zyklus, bei der Zellmigration, bei der Tumormetastasierung sowie in Bezug auf die Stabilität der neuromuskulären Endplatte [30–32].

Eine entscheidende Funktion kommt Stathmin im Bereich der Entwicklung des zentralen Nervensystems zu. So ist es unter anderem von Bedeutung für die neuronale Polarisation, die axonale Spezifizierung und den Auswuchs, die neuronale Plastizität, die hippocampale Neurogenese, die Spinogenese, das N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor abhängige Gedächtnis sowie die neuronale Morphogenese [6, 33, 34]. Die Relevanz des Proteins in Bezug auf das zentrale Nervensystem wird auch anhand seiner Expression im menschlichen Körper deutlich. Obwohl Stathmin ein ubiquitär vorkommendes Protein ist, das im Vergleich zur adulten Phase vermehrt in der embryonalen Phase exprimiert wird, zeigt sich in adulten Geweben eine hohe Expressionsrate im Bereich des Gehirns sowie der Testikel [35].

1.3 Stathmin und Pathologien im Bereich des zentralen Nervensystems

Im Tiermodell mit *stmn1-Knockout*-Mäusen ließ sich eine altersabhängige Axonopathie des zentralen und des peripheren Nervensystems nachweisen [26]. Müller et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass die Deregulation von Stathmin und die dadurch bedingte Mikrotubuli-Destabilisierung eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Alzheimer Erkrankung spielen könnte [36]. Außerdem deutet sich in mehreren Studien ein möglicher Zusammenhang zwischen Stathmin und der spinalen Muskelatrophie, der amyotrophen Lateralsklerose sowie der Multiplen Sklerose an [37–40].

Insbesondere im Hinblick auf psychiatrische Erkrankungen konnte anhand von Studien ein Zusammenhang zwischen *Stathmin* und u. a. Schizophrenie [41, 42], Depressionen [43] sowie posttraumatischer Belastungsstörung [44] nachgewiesen werden.

Shumyatsky et al. konnten zunächst zeigen, dass das Stathmin-Protein in einem hohen Maße im Bereich des Nucleus lateralis (LA) der Amygdala sowie in den thalamischen und den kortikalen Strukturen vorkommt, die Informationen bezüglich Angstreaktionen zum LA senden [45]. Auch die Größe der humanen Amygdala steht in Zusammenhang mit Variationen des *Stathmin*-Gens [46].

Da die Amygdala eine wichtige Rolle bei erlernten und angeborenen Angstreaktionen spielt [47], führten Shumyatsky et al. Versuche an *stmn1-Knockout*-Mäusen in Bezug auf deren Angstverhalten durch. Hier konnte gezeigt werden, dass erlernte und angeborene Angstreaktionen durch die *Stathmin* Expression im Bereich des Nucleus lateralis und durch dessen sensorische Afferenzen beeinflusst werden. Die Knockout-Mäuse zeigten ein verschlechtertes Gedächtnis sowohl in Bezug auf die Amygdala-abhängige Angstkonditionierung als auch im Hinblick auf angeborene Angstreaktionen [45, 48]. Shumyatsky et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass bei *stmn1-Knockout*-Mäusen die Mikrotubuli-Dynamik herunterreguliert ist und hierdurch in der Amygdala eine erhöhte Anzahl an Mikrotubuli in der zusammengesetzten Form vorliegt. Auch konnte in den Versuchen deutlich gemacht werden, dass *stmn1-Knockout*-Mäuse Defizite im Bereich der Langzeitpotenzierung aufweisen [45]. Tsvetkov et al. leiten daraus ab, dass die Langzeitpotenzierung ein wesentlicher neuronaler Vermittler im Hinblick auf die Angstkonditionierung sein könnte [49]. *stmn1-Knockout*-Mäuse zeigen ein vermindertes Erinnerungsvermögen in Bezug auf Amygdala-abhängige Angstkonditionierung sowie ein Defizit in der Induktion der Langzeitpotenzierung im Bereich der afferenten Eingänge

der Amygdala. Damit ist *Stathmin* relevant für die Regulierung von angeborenen und erlernten Angstprozessen [45].

Martel et al. konnten bei *stmn1-Knockout*-Mäusen ebenfalls eine inadäquate Risikoeinschätzung auch hinsichtlich der elterlichen Fürsorge sowie Abweichungen im Hinblick auf die soziale Interaktion adulter Mäuse nachweisen. So haben weibliche *Knockout*-Mäuse unter anderem Probleme eine sichere Lokalisation für ihr Nest auszusuchen, zeigen jedoch vermehrte soziale Interaktionen in Bezug auf fremde Weibchen im eigenen Territorium [50]. Brocke et al. fanden heraus, dass das humane *Stathmin*-Gen ebenfalls einen Einfluss auf das Schreck- und das Angstverhalten beim Menschen hat. Sie untersuchten zwei verschiedene Einzelnukleotid-Polymorphismen auf deren Auswirkung hinsichtlich der Vermittlung der Schreckreaktion sowie in Bezug auf die Vermittlung der stressinduzierten Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse [51]. In einer weiteren Studie durch Ehli et al. wurden Hinweise darauf gefunden, dass das *Stathmin*-Gen auch bei kognitiven und affektkontrollierenden Prozessen eine Rolle spielt, sodass das Gen in Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen sowie psychiatrische Erkrankungen wie Schizophrenie, Autismus-Spektrum-Erkrankungen, Angsterkrankungen, Depressionen und ADHS relevant sein könnte [52]. Der enge Bezug zwischen dem *Stathmin*-Gen und der Angstverarbeitung konnte auch durch Cao et al. verdeutlicht werden, die einen Zusammenhang mit der Intensität des erneuten Erlebens von Symptomen in Hinblick auf die posttraumatische Belastungsstörung bei weiblichen Erdbebenüberlebenden feststellten [44].

1.4 Mikrosatelliten

Als Mikrosatelliten, *Short Tandem Repeat* (STR) oder *Simple Sequence Repeats* (SSRs) werden sich wiederholende Sequenzen im Genom eines Organismus bezeichnet [53, 54]. Der erste *Short Tandem Repeat* wurde 1984 durch Weller et al. charakterisiert [55], der Begriff Mikrosatellit wurde jedoch erst 1989 durch Litt et al. eingeführt [56]. Eine allgemeingültige Definition zur Länge und zur Wiederholungshäufigkeit der Mikrosatelliten liegt nicht vor, sodass sich die Angaben je nach Autor unterscheiden. Sie bestehen typischerweise aus 1 - 6 Basenpaaren, die 10 bis ~100 Mal aufeinanderfolgen [53, 54]. Sie sind weitestgehend gleichmäßig über das gesamte Genom verteilt und machen etwa 3% des menschlichen Genoms aus [57]. STRs kommen sowohl in kodierenden als auch in nichtkodierenden Regionen des menschlichen Genoms vor [54].

Aufgrund ihrer hohen Neigung zu mutieren, und der daraus resultierenden genetischen Variation, wird angenommen, dass sie bedeutsam für die Evolution des Genoms sind [58–60]. Einer der postulierten Mechanismen der hohen Variabilität der Mikrosatelliten ist das sogenannte *Replication Slippage*- oder *Slipped Strand Mismatching*-Modell. Hierbei kommt es während der Replikation zu einer Verschiebung der DNA-Polymerase mit einer Schlaufenbildung des DNA-Abschnittes. Je nachdem, auf welchem Strang dies geschieht, kann der Vorgang zu einer Expansion oder zu einem Verlust eines DNA-Abschnittes führen. [61–63].

Im Bereich des menschlichen Genoms ist ein besonderes Augenmerk auf Trinukleotid-*Repeats* zu legen, da diese mit mehreren neuromuskulären und neurodegenerativen Erkrankungen in Zusammenhang stehen. Sie enthalten jedoch hauptsächlich die Basen Cytosin und Guanin [64].

Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass STRs im Bereich von Promotorregionen die Transkriptionsaktivität beeinflussen können [59]. Bisher gibt es nur wenige veröffentlichte Studien in Bezug auf Trinukleotid-*Repeats*, die ausschließlich die Basen Adenin (A) und Thymin (T) enthalten. In einer dieser Studien konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein (AAT)_n Polymorphismus in der Nähe des *CNR1*-Gens mit der Prädisposition zu einer Kokain-Abhängigkeit assoziiert war [65].

1.5 *Stathmin* (TAA)_n Promotor Polymorphismus

Ein (TAA)_n Polymorphismus befindet sich ca. 2 kb *upstream* des ersten Exons des *Stathmin* Gens und ca. 4 kb *upstream* des Translationsstarts. In ihrer Doktorarbeit konnte Frau Dr. Heupel zeigen, dass im Hinblick auf Cluster-C-Persönlichkeitsstörungen eine signifikante Assoziation mit der genannten Trinukleotid-Wiederholung besteht. Die Signifikanz konnte für die Genotypen (TAA)₁₃ und (TAA)₁₄ nachgewiesen werden [66].

1.6 Ziele der Arbeit

Ausgangspunkt für diese Arbeit ist die Assoziation des oben beschriebenen (TAA)_n-Polymorphismus mit Cluster-C-Persönlichkeitsstörungen [66]. Da sich dieser Polymorphismus in der Promotor-Region des Gens befindet, ist eine allelspezifische Auswirkung auf die Genexpression vorstellbar [34, 66].

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit der genannte STR-Promotor-Polymorphismus die Genexpression von *Stathmin* beeinflusst. Hierfür sollen humane

Zellen aus dem Bereich des zentralen Nervensystems verwendet werden, da hier eine hohe Expressionsrate des *Stathmin*-Gens bekannt ist [35].

Zur Bestimmung der Expression soll ein Reporter-gen (Luciferase-Gen) in Form eines *Dual-Luciferase-Assays* herangezogen werden. In den das Luciferase-Reporter-gen exprimierenden Vektor soll ein Teil der Promotor-Region, die den zu untersuchenden STR-Polymorphismus enthält, kloniert werden. Durch Platzierung des Luciferase-Reporter-gens in dem zu untersuchenden Promotorabschnitt lässt sich durch die entstehende Biolumineszenz und deren statistische Auswertung ein Rückschluss auf die Promotoraktivität unterschiedlicher STR-Polymorphismen des *Stathmin*-Gens ziehen [67].

In dieser Arbeit wurden die Genotypen (TAA)12 und (TAA)13 miteinander verglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Die vorliegende Arbeit erfolgte im Rahmen der Studie „Genetische Grundlagen von Persönlichkeitsmerkmalen und korrespondierenden neuropsychologischen Maßen“ unter Herrn Prof. Dr. Andreas Reif. Das Studienvorhaben wurde am 16.10.2009 unter dem Zeichen 186/09 durch die Ethik-Kommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg genehmigt.

2.2 Materialien

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Materialien aufgelistet.

2.2.1 DNA-Proben

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen DNA (*deoxyribonucleic acid*)-Proben wurden aus EDTA (Ethyldiamintetraacetat) Blut von Patienten aus der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universitätsklinik Würzburg isoliert. Bei diesen Patienten (P063 und P678) wurde in einer vorherigen Dissertation von Frau Dr. Julia Katharina Heupel bereits der *Stathmin* (TAA)13-Genotyp für P063 und (TAA)14-Genotyp für P678 durch Resequenzierung des Promotorbereichs bestätigt [66].

2.2.2 Bakterien und Zelllinien

Es wurden die bakteriellen sowie die humanen Zellen aus den Langzeitkulturen des Labors der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universitätsklinik Würzburg verwendet.

Escherichia coli (E.coli) TOP10
SH-SY5Y Zellen

Stratagene, Waldbronn
Humane Neuroblastomzelllinie

2.2.3 Vektoren

pGL4.23	Promega, Mannheim
pGL4.74	Promega, Mannheim

2.2.4 Oligonukleotidprimer

Durch die in Kleinbuchstaben geschriebenen Basen werden die Überhänge für den Restriktionsverdau angegeben. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma *metabion international AG* (Martinsried) akquiriert.

Forward-Primer für die Herstellung des *Inserts*

5'-GCT AGC aag cct ATA AAA AGG TGC TTT TGA GGT GGG AT-3'

Reverse-Primer für die Herstellung des *Inserts*

5'-GCT AGC ctc gag CCC CAC CCT AAA GAA CAA GGA T-3'

Forward-Primer für die Sequenzierung des *pGL4.23*-Vektors mit *Insert*

5'-TTT CTC TGG CCT AAC TGG CCG G-3'

Reverse-Primer für die Sequenzierung des *pGL4.23*-Vektors mit *Insert*

5'-CAG GGC GTA GCG CTT CAT GGC-3'

2.2.5 Reagenzienansätze (Kits)

<i>Dual-Luciferase®</i>	Promega, Mannheim
<i>Reporter Assay System</i>	
<i>NucleoSpin® Extract II</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>PureYield™ Plasmid Midiprep System</i>	Promega, Mannheim
<i>TA Cloning® Kit Dual Promoter</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
<i>TransFast™ Transfection Reagent</i>	Promega, Mannheim

2.2.6 Verwendete Enzyme

Antarktische Phosphatase	New England BioLabs, Frankfurt a. M.
HindIII	New England BioLabs, Frankfurt a. M.
<i>iProof™ High-Fidelity</i>	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
DNA Polymerase	
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
XhoI	New England BioLabs, Frankfurt a. M.

2.2.7 Puffer

<i>5x iProof™ HF Buffer</i>	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
<i>Antarctic Phosphatase Reaction Buffer</i> (10X)	New England BioLabs, Frankfurt a. M.
<i>NEBuffer™ 2</i>	New England BioLabs, Frankfurt a. M.
<i>NEBuffer™ 3</i>	New England BioLabs, Frankfurt a. M.
<i>T4 DNA Ligase Reaction Buffer</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2.2.8 Chemikalien und Reagenzien

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt) oder SIGMA-Aldrich Chemie (Steinheim) in der nach Möglichkeit reinsten Form bezogen.

Ampicillin (Amp)	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
<i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA)	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
Bromphenolblau	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
<i>Dulbeccos modified eagles medium</i> (DMEM/ F-12)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Ethanol	AppliChem, Darmstadt
Ethidumbromidlösung	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim

Eisessig	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
Gibco™ Fötiales Rinderserum	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
<i>GeneRuler</i> 100 bp DNA Leiter	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Glycerol	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
Agarose LE (<i>low electroendosmosis</i>)	Biozym (Hessen, Oldendorf)
<i>Lysogeny Broth</i> (LB)	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS)	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
Polyethylenglykol 4000	AppliChem, Darmstadt
RPMI-1640 Zellmedium	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
<i>Select</i> Agar	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
Tris Base	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
Trypanblau	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
Xylen Cyanol FF	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim

2.2.9 Verwendete Materialien aus eigener Herstellung

Blaupuffer	25 mg Bromphenolblau-Xylenecyanol 1,5 ml Glycerol 10 ml H ₂ O
LB-Agar-Amp Platte	LB-Medium 15 g/l <i>Select</i> Agar 50µg/ml Ampicillin
TAE-Puffer (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure)	121 g/l Tris Base 28,5 ml Eisessig 50 ml EDTA 0,5 M/pH 8 auf 1 l mit ddH ₂ O auffüllen

2.2.10 Gebrauchsmaterialien

Alle nicht gesondert aufgeführten Gebrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf (Wesseling-Berzdorf), Fisher Scientific (Schwerte) oder Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

Falcon™ konische Zentrifugenröhrchen 15ml/50 ml	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Duran™ Weithals-Erlenmeyerkolben Eppendorf Tubes	Thermo Fisher Scientific, Schwerte Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Filme für Autoradiographie	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
Gelkassette	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
<i>GloMax® 96 Microplate</i>	Promega, Mannheim
Neubauer-Zählkammer C-Chip	NanoEnTek Inc., Seoul
PCR <i>multiwell</i> Platte 96	SIGMA-Aldrich Chemie, Steinheim
Pipetten (steril)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettenspitzen (steril)	Sarstedt, Nümbrecht
TC-Flasche	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenflaschen	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

2.2.11 Geräte

<i>B2 Mini Gel Electrophoresis Systems</i>	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Cellometer Auto T4	Nexcelom, Lawrence/USA
ChemiDoc™ UV Fotokammer	Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen
<i>Class II Biosafety Cabinets</i>	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
E431 Spannungsgerät	Consort, Turnhout/ Belgien
Promega Eluator™ <i>Vacuum Elution Device</i>	Promega, Mannheim
<i>GloMax®-Multi Detection System</i>	Promega, Mannheim
Heracell™ 150 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Heizschüttler TH 15	Edmund Bühler, Bodelshausen
<i>JB Aqua Unstirred Wasserbad</i>	Grant Instruments, Shepreth/UK
<i>Microspin FV-2400</i>	Biosan, Riga/Lettland
Mikrowelle <i>Express</i>	Sharp, Hamburg
NanoDrop™ ND1000 Photometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR <i>Thermocycler</i>	Biometra, Göttingen
PM 300 Waage	Mettler-Toledo, Gießen
ROTOFIX 32 A Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Sorvall™ Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
<i>Standard Lab-Duty oil free Pump</i>	Welch, Alton, Hampshire/ UK

ThermoMixer®	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
V150 Autoclave	Systemec, Linden
<i>Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold</i>	Promega, Mannheim
<i>Video Graphic Printer UP-895CE</i>	Sony, Tokio/Japan

Nicht gesondert aufgeführte Geräte und Apparaturen gehören zur Grundausstattung des Labors.

2.2.12 Software

<i>Primer BLAST</i>	U. S. National Library of Medicine, Rockville Pike/USA
<i>Excel Office 2019</i>	Microsoft Corporation, Seattle/USA

2.3 Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion aus Blutproben

Die Extraktion der DNA-Proben aus humanen Zellen erfolgte nach dem Standardprotokoll von Miller et al. [68]. Hierfür waren venöse Blutproben von Patienten der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Würzburg entnommen worden. Die Extraktion erfolgte durch die Mitarbeiter des Labors der Arbeitsgruppe für Psychiatrische Neurobiologie.

2.3.2 Bestimmung der DNA-Konzentration und der DNA-Reinheit

Das Prinzip der in dieser Arbeit angewendeten Konzentrationsbestimmung beruht auf der Messung der optischen Dichte mittels Absorptionsspektrometrie. Hierbei wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt nach der Formel:

Konzentration = Umrechnungsfaktor x Absorption

Der Umrechnungsfaktor bei einer optischen Schichtdicke von 1 cm beträgt etwa dsDNA (doppelsträngige DNA) \cong 50 μ g/mL [69, 70].

Die Bestimmung der Reinheit der Probe erfolgt durch die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 230 nm und 280 nm, da hierüber mögliche Kontaminationen der Lösung z. B. durch Proteine gemessen werden können. Durch den Vergleich mit der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm kann schließlich eine Aussage über die Reinheit der Probe getroffen werden. Von einer hohen Reinheit ist bei folgenden Werten auszugehen: $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$ und $A_{260}/A_{230} \geq 2,0$ [69, 70].

Alle Konzentrationsbestimmungen der verwendeten DNA-Proben wurden mit dem Photometer NanoDrop™ ND100 durchgeführt. Zunächst wurde der Nullwert mittels Pipettierung von 1 µl Lösungsmittel bestimmt. Danach wurden jeweils 1 µl der zu untersuchenden Probe aufgetragen und gemessen.

2.3.3 Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarosegelelektrophorese ist es möglich, DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und hierdurch zu identifizieren. Das Prinzip beruht auf der Porung des Agarosegels. Je höher die Agarose konzentriert ist, desto feinporiger ist das hergestellte Gel. Kleinere DNA-Fragmente können hierdurch schneller passieren als große. Die Auftrennung erfolgt durch die Anlage eines elektrischen Feldes, das bewirkt, dass die negativ geladenen DNA-Fragmente durch die Gelmatrix zum positiven Pol wandern. Die Größe des jeweiligen DNA-Stücks lässt sich mit Hilfe einer DNA-Leiter beurteilen. Zur Färbung wird der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid hinzugegeben, der in die DNA interkaliert, wobei sich die entstehende Fluoreszenz bei Anregung mit ultraviolettem Licht erhöht [70].

Aufgrund der zu erwartenden Größe wurde in dieser Arbeit ein 3%-iges Gel verwendet. Hierzu wurde das Agarosepulver in TAE (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure)-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlung der Lösung wurden, bevor diese aushärtete, 30 µg Ethidiumbromid hineingemischt. Diese Mischung wurde in einen entsprechenden Schlitten gegossen. Zur Formierung der Probenkammern wurden Taschenkämme eingebracht, in die anschließend die DNA pipettiert wurde. Die erforderliche Aushärtungszeit betrug 30 - 45 Minuten. Die Gelelektrophoresekammer wurde anschließend mit TAE-Puffer befüllt. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit Blaupuffer vermengt und in die entsprechend angelegten Probenkammern pipettiert. Hiernach erfolgte die Anlage einer 120-V-Spannung für ca. 30 - 60 Minuten. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Ergebnis in einer UV-Kammer visualisiert, fotografiert und ausgedruckt.

2.3.4 Amplifikation eines DNA-Abschnitts des *Stathmin*-Gens mittels PCR

DNA-Polymerasen sind Enzyme, die in allen Organismen für die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten zuständig sind. Auch beim Menschen finden sich diese Enzyme, die eine wichtige Rolle bei der Zellteilung mit Verdopplung des Erbguts spielen. Zunächst wird die doppelsträngige DNA mit Hilfe von Topoisomerasen und Helicasen entwirrt und gespalten. Danach wird durch die Primasefunktion der Polymerase ein kurzes RNA-Stück – der sogenannte *Primer* – synthetisiert, das an die Einzelstrang-DNA bindet und den Ausgangspunkt für die Replikation darstellt [67].

1985 stellte Kary B. Mullis eine In-vitro-Methode zur DNA-Vermehrung nach dem Vorbild des Vervielfältigungsmechanismus in Zellen vor. Bei der sogenannten Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) können auch ohne die Hilfe von Zellen spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert werden. [71]

Für die heute standardmäßig durchgeführte PCR wird zunächst eine geringe Menge DNA mit bekannter Sequenz, das sogenannte *Template*, benötigt. Außerdem sind zwei *Primer* (die den zu amplifizierenden DNA-Bereich eingrenzen), die vier DNA-Bauteile (die Desoxynukleotide) und eine hitzestabilen DNA-Polymerase erforderlich. Für letztere wird als Kofaktor Magnesium benötigt, das in Form eines geeigneten Puffers hinzugegeben wird.

Der Ablauf der PCR gliedert sich in drei Abschnitte:

- Denaturierung: Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 92 – 96 °C zur Aufspaltung der doppelsträngigen DNA
- Annealing: Anlagerung der *Primer* (bestehend aus meist 20 – 25 Nukleotiden) bei spezifischen, von der Schmelztemperatur der *Primer* abhängigen Temperaturen (zwischen 50 – 65 °C)
- Polymerisation: Komplettierung der Einzelstrang-DNA zum Doppelstrang durch die Polymerase (optimale Temperaturen für die Polymerase meist 68 – 72 °C)

Dieser Zyklus wird 25 – 40 Mal wiederholt, um eine ausreichende Amplifikation um den Faktor 10^6 bis 10^7 zu gewährleisten.

Da die PCR eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von DNA ist, müssen Verunreinigungen ausgeschlossen werden. Dazu werden PCR-Ansätze ohne DNA verwendet [72].

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um ein Stück des Promotorbereiches des *Stathmin*-Gens zu amplifizieren, der einen (TAA)_n-Polymorphismus enthält. Zunächst wurde die DNA-Sequenz mittels öffentlicher Online-Gendatenbank bestimmt [73]. Die *Primer*, die den zu amplifizierenden DNA-Bereich eingrenzen, wurden mit dem Programm *Primer-BLAST* erstellt [74]. Zur späteren Ligation in den Plasmidvektor wurden zusätzlich Überhänge für den Restriktionsverdau angefügt.

Um Fehler im Polymerisationsschritt im Bereich des TAA-Repeats zu vermeiden (siehe auch 1.4) wurde eine Polymerase mit sogenannter *Proofreading*-Funktion verwendet. Diese Korrekturfähigkeit ist durch eine 3'→5' Exonukleaseaktivität bedingt, durch die der neu synthetisierte DNA-Strang auf den fehlerhaften Einbau von Nukleotiden überprüft werden kann und diese gegebenenfalls korrigiert werden können. In dieser Arbeit wurde die thermostabile DNA-Polymerase des Archaeobakteriums *Pyrococcus furiosus* – auch Pfu-Polymerase genannt – verwendet [70].

Der hierdurch zu amplifizierende DNA-Bereich des *Stathmin*-Gens besitzt einen relativ hohen A+T-Anteil von fast 60%. Su et al. konnten zeigen, dass bei der Amplifizierung von A+T-reicher *Plasmodium-falciparum*-DNA eine entsprechende Senkung der Temperatur nötig ist, damit eine PCR erfolgreich verläuft [75]. Aus diesem Grund wurde die Temperatur des Polymerisationsschrittes entsprechend angepasst. In Optimierungsversuchen konnte gezeigt werden, dass das beste PCR-Resultat bei 65 °C erreicht wird (Fig. 3).

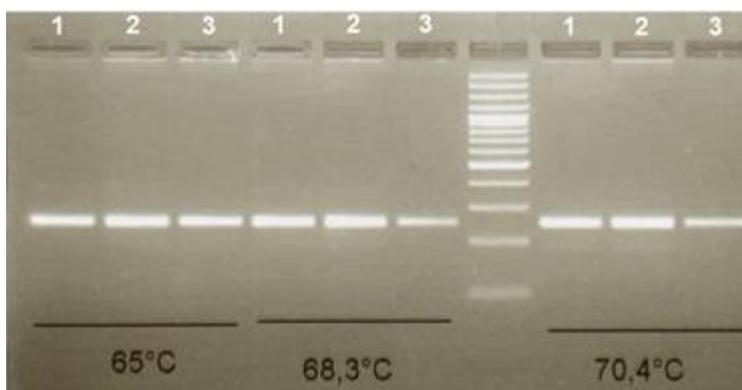


Fig. 3 Optimierungs-PCR mit drei verschiedenen DNA-Proben (Nr. 1 - 3) bei unterschiedlichen Temperaturen während des Polymerisationsschrittes, aufgetragen auf ein 3%-iges Agarosegel.

Nach Durchführung der Optimierungs-PCR wurde die folgende Zusammensetzung der Reagenzien festgelegt (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1: PCR-Ansatz für die Amplifikation eines DNA-Abschnitts des *Stathmin*-Gens

Reagenzien	Menge
PCR Puffer: - 5x <i>iProof™ HF Buffer</i> (7,5 mM MgCl ₂)	5 µl
Nukleotide: - dNTP-Mix (je 2,5 mM dGTP, dCTP, dATP, dTTP)	0,5 µl
<i>Primer</i> (verdünnt 1:10): - <i>Forward-Primer</i> - <i>Reverse-Primer</i>	1 µl 1 µl
<i>DNA Template</i> : - humane DNA (TAA(13)) ~50 ng/µl	1µl
Polymerase: - <i>iProof™ High-Fidelity DNA Polymerase</i> (2 <i>units</i> /µl)	0,25 µl
Wasser: - ddH ₂ O	16,25 µl
Endvolumen	25 µl

Um die Temperaturen gleichmäßig beibehalten zu können, wurde ein *Thermocycler* mit folgenden Einstellungen verwendet (siehe Tabelle 2):

Tabelle 2: Einstellungen des *Thermocyclers* für die Amplifikation eines DNA-Abschnitts des *Stathmin*-Gens mittels PCR

Temperatur	Zeit	Zyklen	Vorgang
98°C	30 Sekunden	1	Initiale Denaturierung
98°C	10 Sekunden		Denaturierung

62°C	20 Sekunden	30	Annealing
65°C	15 Sekunden		DNA-Polymerisation
65°C	5 Minuten	1	Terminale Polymerisation

2.3.5 Restriktionsverdau des amplifizierten DNA-Abschnittes

Restriktionsenzyme spielen eine entscheidende Rolle bei der Erzeugung rekombinanter DNA. Um DNA-Fragmente zusammenzufügen, werden diese mit den gleichen Enzymen an spezifischen Positionen geschnitten. Wird der Vorgang an bei beiden DNA-Strängen an der derselben Stelle durchgeführt, entstehen sogenannte *Blunt Ends*. Geschieht dies an unterschiedlichen Positionen der beiden DNA-Stränge, wird von *Sticky Ends* gesprochen. Im letzten Fall entstehen so jeweils einzelsträngige Überhänge. Werden zwei verschiedene DNA-Fragmente mit demselben Enzym geschnitten, sind die Enden kompatibel. Diese können im nächsten Schritt mittels enzymatischer Unterstützung in Form von Ligasen miteinander verbunden werden [70, 76].

Bei der Herstellung des *Forward-* und des *Reverse-Primers* für die oben beschriebene PCR (siehe 2.2.4) wurde darauf geachtet, dass diese jeweils spezifische Überhänge für die verwendeten Restriktionsenzyme enthalten. Es wurden Restriktionsenzyme gewählt, die sich in der *Multiple Cloning Region* (siehe 2.2.6) des Vektors pGL4.23 befinden und die dieselben Pufferbedingungen sowie Inkubationszeiten aufweisen. Durch den Enzymverdau sollten *Sticky Ends* entstehen, sodass eine gerichtete Ligation des *Inserts* in den Vektor möglich war. Die Auswahl fiel auf die Restriktionsenzyme HindIII und XhoI (siehe Fig. 4) [77, 78].



Fig. 4 Schnittstellen (markiert mit *) der Restriktionsenzyme HindIII und XhoI [77, 78]

Beide Enzyme wurden in einer Konzentration von 20 000 Einheiten/ml geliefert. Eine Einheit entspricht hierbei der Menge an Enzym, die bei 37 °C in einer Stunde 1 µg DNA verdaut [77, 78].

Es wurde ein Doppelverdau durchgeführt, wobei zur Sicherstellung des Erfolges ein Überschuss an Enzymen verwendet wurde. Das verwendete PCR-Produkt der P063-

DNA hatte eine gemessene Konzentration von 16,3 ng/μl. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65 °C für 20 Minuten.

Folgender Ansatz wurde hergestellt (siehe Tabelle 3):

Tabelle 3: Ansatz für den Restriktionsverdau des amplifizierten DNA-Abschnittes

Reagenzien	Menge
Puffer: - NEBuffer™ 2	5 μl
Enzym 1: - HindIII	1 μl
Enzym 2: - XhoI	1 μl
DNA Fragment - humane DNA (TAA(13)) P063 ~16 ng/μl	34,9 μl
BSA (<i>Bovine Serum Albumin</i>) 100 μg/ml 1:10 Verdünnung	5 μl
ddH ₂ O	3,1 μl
Endvolumen	50 μl

2.3.6 Restriktionsverdau des Vektors pGL4.23

Ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle werden als Plasmide bezeichnet. Diese können in Bakterien vervielfältigt werden. Das Plasmid beinhaltet mindestens einen Replikationsstart (*Origin Of Replication*, ori), ein Selektionsgen (z.B. ein Antibiotikaresistenzgen, Amp) und eine Klonierungsstelle (*Cloning Site*), wobei in letztere die Fremd-DNA eingebracht werden kann. Enthält die Klonierungsstelle mehr als zehn bis zwanzig Schnittstellen, wird von *Multiple Cloning Site* gesprochen. Umfasst das DNA-Fragment keinen vollständigen Promotor, muss dieser ebenfalls auf dem Plasmid-Vektor liegen [70].

Der verwendete Vektor pGL4.23 kodiert für das Luciferase-Reporter-Gen *luc2* (*Photinus pyralis*). Er enthält eine *Multiple Cloning Region*, in die ein zu untersuchender DNA-Abschnitt eingefügt werden kann. *Downstream* dieser *Multiple Cloning Site* befinden sich ein Minimalpromotor sowie ein *luc2*-Gen, das für den Luciferase Assay nötig ist (siehe 2.2.10). Um eine spätere Selektion der transformierten Bakterien zu ermöglichen, enthält der Vektor ebenfalls ein Gen für eine Ampicillin-Resistenz (siehe Fig. 5) [79].

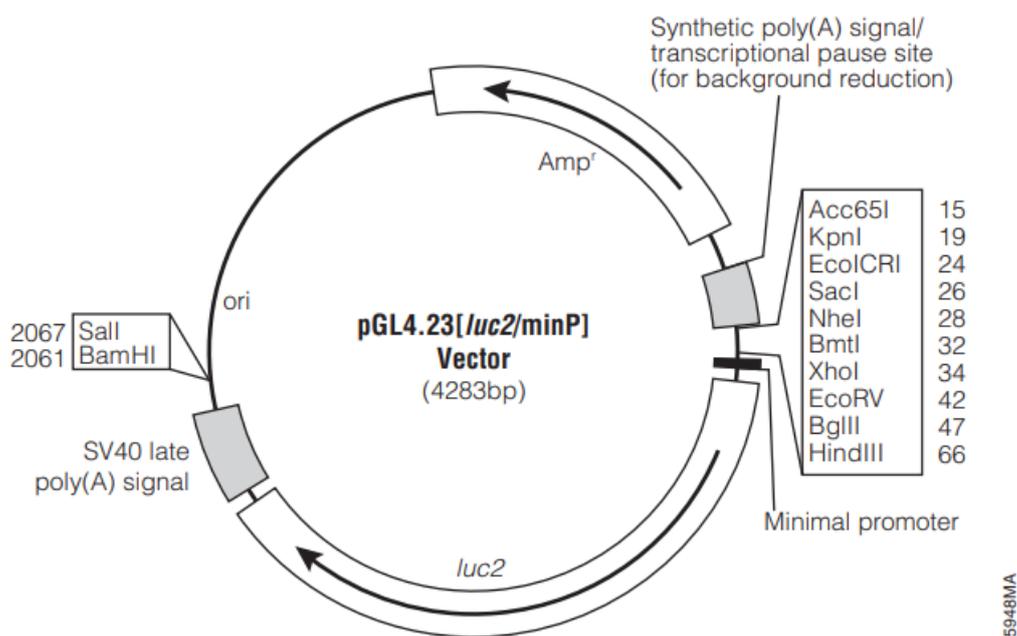


Fig. 5 Der pGL4.23-Vektor [79]

(Mit freundlicher Genehmigung der Promega Corp./Courtesy of Promega Corp.)

Der ringförmige Vektor wird durch den Restriktionsverdau in eine lineare Form gebracht, die für den weiteren Klonierungsschritt notwendig ist (siehe 2.2.7). Um zu verhindern, dass der Vektor im Folgeschritt ohne *Insert* religiert, wurden zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme eingesetzt (siehe auch 2.2.5).

Der verwendete Vektor pGL4.23 wurde aus dem Bestand der Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universitätsklinik Würzburg entnommen. Die gemessene Konzentration betrug 640,4 ng/µl. Wie bereits beschrieben, wurde ein Überschuss an Restriktionsenzymen hinzugegeben, um den Erfolg des Verdauens sicher zu stellen.

Hinsichtlich der Enzymauswahl wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Restriktionsenzyme jeweils nur an einer Stelle im Bereich der *Multiple Cloning Site* des Vektors schneiden, dass ein mindestens 10 bp großes Stück herausgeschnitten wird sowie dass sie nicht sensitiv für eine Methylierung durch die DNA-Adenin-

Methyltransferase (dam) und die DNA-Cytosin-Methyltransferase (dcm) sind. Eine Methylierung der DNA kann den Restriktionsverdau inhibieren [80].

Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 65 °C für 20 Minuten.

Folgender Ansatz wurde hergestellt (siehe Tabelle 4):

Tabelle 4: Ansatz für Restriktionsverdau des Vektors pGL4.23

Reagenzien	Menge
Puffer: - NEBuffer™ 2	5 µl
Enzym 1: - HindIII	1 µl
Enzym 2: - XhoI	1 µl
DNA Fragment - Vektor pGL4.23 640,6ng/µl	3,1 µl
BSA 100 µg/ml 1:10 Verdünnung	5 µl
ddH ₂ O	34,9 µl
Endvolumen	50 µl

Durch den Restriktionsverdau werden ein linearer Vektor sowie das herausgeschnittene 10 bp große Stück aus der *Multiple Cloning Site* erzeugt. Dabei entstehen sogenannte *Sticky Ends*, wodurch die Gefahr einer Re-Ligation des Vektors mit dem herausgeschnittenen DNA-Stück gegeben ist. Für diesen Prozess wird jedoch eine Phosphatgruppe am 5'-Ende der DNA benötigt. Diese Phosphatreste können mit Hilfe einer Phosphatase entfernt werden. Da das oben erzeugte *Insert* noch Phosphatreste aufweist, kann nur dieses mit dem Vektor ligieren. In dieser Arbeit wurde die antarktische Phosphatase verwendet, da eine Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgen kann [70]. Für die Dephosphorylierung wurden dem 50-µl-Restriktionsverdauansatz des Vektors pGL4.23 5 Einheiten antarktischer Phosphatase (entsprechend 1 µl bei einer

ausgelieferten Konzentration von 5,000 units/ml) sowie 5 µl des mitgelieferten *Antarctic Phosphatase Reaction Buffer* (10 x) zugefügt. Der Ansatz wurde anschließend für 30 Minuten bei 37 °C im *Thermocycler* inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Phosphatase bei 65 °C für 20 Minuten. Eine Einheit ist definiert als die Enzymmenge, die 1 µg Vektor-DNA in 30 Minuten bei 37°C dephosphoryliert [81]. Um den Erfolg sicherzustellen, wurde ein Überschuss an Enzym hinzugegeben.

2.3.7 Ligation des amplifizierten DNA-Abschnittes in den Plasmidvektor pGL4.23

Unter dem Begriff Ligation wird die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente unter Zuhilfenahme des Enzyms Ligase verstanden. Standardmäßig wird für diesen Prozess eine T4-DNA-Ligase verwendet [70]. In dieser Arbeit wurden nach dem Restriktionsverdau der linearisierte Plasmid-Vektor pGL4.23 mit dem durch PCR hergestellten *Insert* ligiert (siehe 2.2.5 und 2.2.6).

Für die gerichtete Ligation waren der Plasmidvektor sowie das *Insert* mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen geschnitten worden, welche jeweils *Sticky Ends* erzeugten.

Nach dem Restriktionsverdau betragen die Größe des *Insert* 233 bp (TAA(13)) plus *Sticky Ends* und die Größe des Vektors 4244 bp plus *Sticky Ends*. Standardmäßig wird im Hinblick auf die DNA-Menge drei bis fünfmal mehr DNA-Fragment als Vektor eingesetzt [70]. In dieser Arbeit wurden 50 ng Vektor eingesetzt.

Die *Insert*menge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse}_{\text{Insert}} [\text{ng}] = 5 \times \text{Masse}_{\text{Vektor}} [\text{ng}] * \frac{\text{Länge Fragment [bp]}}{\text{Länge Vektor [bp]}} \quad [70]$$

Hieraus ergab sich eine *Insert*menge von ~13,7 ng.

Der Vektor lag in einer Konzentration von 35,7 ng/µl und das *Insert* in einer Konzentration von 11,4 ng/µl vor.

Folgender Ansatz wurde daraufhin hergestellt (siehe Tabelle 5):

Tabelle 5: Ansatz für die Ligation des amplifizierten DNA-Abschnittes in den Plasmidvektor pGL4.23

Reagenzien	Menge
Puffer:	
- T4 DNA Ligase <i>Reaction Buffer</i> (10x)	2 µl
Enzym 1:	0,4 µl
- T4 DNA Ligase 5 Weiss U/µl	
DNA Fragmente:	
- Vektor pGL4.23 35,7ng/ µl (~50 ng)	1,4 µl
- Insert P063 11,4 ng/µl (~13,7 ng)	1,2 µl
50% PEG (<i>Polyethylene glycol</i>) 4000	2 µl
ddH ₂ O	13,0 µl
Endvolumen	20 µl

Eine *Cohesive End Ligation Unit* (CEU) der T4-DNA-Ligase ist definiert als die nötige Menge Enzym, die eine 50%-ige Ligation von HindIII Fragmenten einer λ-DNA in einem totalen Reaktionsvolumen von 20 µl in 30 Minuten bei 16 °C in einem 1x T4 DNA *Ligase Reaction Buffer* in 30 Minuten herbeiführt. Eine Weiss-Unit entspricht 200 CEU [82]. Unter λ-DNA wird das Genom der ca. 48 kb großen, linearen Doppelstrang-DNA des Escherichia-Virus Lambda verstanden [70].

Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne *Insert* mit 14,2 µl ddH₂O hergestellt. Die Ansätze wurde im *Thermocycler* bei 22 °C für eine Stunde inkubiert. Danach erfolgte eine Hitzeinaktivierung der T4-DNA-Ligase bei 65 °C für zehn Minuten.

2.3.7.1 Überprüfung der Ligation des pGL4.23-Vektors mit dem Insert mittels PCR

Zur Kontrolle der Ligation erfolgte eine PCR. Hierzu wurde das Ligationsprodukt (siehe 2.2.7) als DNA-*Template* verwendet. Die den zu amplifizierenden DNA-Bereich eingrenzenden *Primer* wurden mit dem Programm *Primer-BLAST* erstellt [74]. Die PCR

ergibt standardmäßig ein 459 bp (TAA(13)) großes DNA Stück, wenn das *Insert* korrekt ligiert wurde. Bei Re-Ligation des Vektors mit dem herausgeschnittenen 32bp großen Vektorstück ist das PCR Produkt 252 bp groß.

Es wurde die folgende Zusammensetzung der Reagenzien festgelegt (siehe Tabelle 6):

Tabelle 6: Ansatz für die PCR zur Überprüfung der Ligation des pGL4.23-Vektors mit dem Insert

Reagenzien	Menge
PCR Puffer: - 5x <i>iProofTM HF Buffer</i> (7,5 mM MgCl ₂)	5 µl
Nukleotide: - dNTP-Mix (je 2,5 mM dGTP, dCTP, dATP, dTTP)	0,5 µl
<i>Primer</i> (verdünnt 1:10): - <i>Forward-Primer</i> - <i>Reverse-Primer</i>	1 µl 1 µl
DNA <i>Template</i> : - Ligationsprodukte (siehe 2.2.7)	2 µl
Polymerase: - <i>iProofTM High-Fidelity DNA Polymerase</i> (2 units/µl)	0,25 µl
Wasser: - ddH ₂ O	15,25 µl
Endvolumen	25 µl

Um die Temperaturen gleichmäßig beibehalten zu können, wurde ein *Thermocycler* mit folgenden Einstellungen verwendet (siehe Tabelle 7):

Tabelle 7: Einstellungen des *Thermocyclers* für die PCR zur Überprüfung der Ligation des pGL4.23-Vektors mit dem Insert

Temperatur	Zeit	Zyklen	Vorgang
98°C	30 Sekunden	1	Initiale Denaturierung
98°C	10 Sekunden	30	Denaturierung
60°C	20 Sekunden		<i>Annealing</i>
65°C	15 Sekunden		DNA-Polymerisation
65°C	5 Minuten	1	Terminale Polymerisation

2.3.8 Transformation kompetenter Bakterien mit dem rekombinanten Plasmidvektor

Als Transformation wird das Einbringen freier DNA in kompetente Bakterien bezeichnet. Unter Kompetenz wird die Eigenschaft von Zellen verstanden, freie DNA aus dem sie umgebenden Kulturmedium aufzunehmen [70]. Zur Steigerung der Effizienz erfolgt bei der Transformation ein Hitzeschock. Die genaue Funktionsweise der Hitzeschocktransformation ist bisher nicht geklärt. In einem von Panja et al. vorgeschlagenen Modell wird davon ausgegangen, dass es durch den Hitzeschock zum einen zu einer Porenbildung auf der Zelloberfläche kommt. Hierdurch können DNA-Moleküle leichter die äußere Membran passieren. Zum anderen wird das Membranpotenzial reduziert, das der DNA den Übertritt durch die innere Membran ermöglicht [83].

In dieser Arbeit wurden *Escherichia coli* (E. coli) TOP10 der Firma Stratagene verwendet, die bereits transformationskompetent waren.

Die bei -80 °C gelagerten Bakterien wurden zunächst langsam auf Eis aufgetaut. Hiernach wurden 1 µl des Ligationsprodukts (siehe 2.2.7) mit 50 µl der Bakterienkultur in einem 1,5-ml-Eppendorf-Tube vermischt und 30 Minuten auf Eis gestellt. Um die Effizienz der Transformation zu erhöhen, erfolgte ein kurzer Hitzeschock auf einem Heizblock bei 42 °C für 30 Sekunden. Die Probe wurde anschließend für 2 Minuten auf Eis gekühlt.

Im Anschluss wurden 125 µl eines auf 37 °C vorgewärmten LB (Lysogeny Broth)-Mediums hinzugegeben und der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C und 225 rpm

auf einem Heizschüttler inkubiert. Wobei die transformierten Bakterien das auf dem Plasmidvektor befindliche Antibiotikaresistenzgen exprimieren. Danach wurden jeweils 20 µl und 100 µl des Transformationsansatzes auf 37 °C warme LB-Agar-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank belassen. Aufgrund der Antibiotikaresistenz wachsen nur Bakterien, die den pGL4.23-Vektor enthalten.

Zur Identifizierung von Bakterienkolonien mit korrekt in den pGL4.23-Vektor ligiertem *Insert* erfolgte eine Kolonie-PCR (siehe 2.2.8.1). Hierzu wurden die einzelnen Kolonien jeweils mit einer 100-µl-Pipettenspitze gepickt und in ein leeres PCR-Gefäß gestrichen. Dieselbe Pipettenspitze wurde hiernach erneut auf eine LB-Agar-Amp-Platte ausgestrichen, diese wurde beschriftet und bei 37 °C über Nacht bebrütet.

Nach Identifikation der entsprechenden Kolonien wurden diese erneut von den Platten mit einer 100-µl-Pipettenspitze gepickt und in ein Reagenzglas mit 3 ml LB-Medium und 6 µl Ampicillin (50 mg/ml) gegeben. Die Vorkultur wurde dann bei 37 °C und 225 rpm für 6 - 8 Stunden auf dem Heizschüttler inkubiert. Anschließend wurden 100 µl der Vorkultur in einen 500-ml-Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium und 0,1% Ampicillin 50 mg/ml gegeben. Diese Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 225 rpm auf einem Heizschüttler bebrütet. Aus diesen wurde schließlich mittels DNA-Extraktion die Vektor-DNA mit ligiertem *Insert* gewonnen (siehe 2.2.8.2).

2.3.8.1 Identifikation der pGL4.23-Vektoren mit Insert mittels Kolonie-PCR

Zur Bestimmung der Bakterienkolonien mit korrekt ligiertem *Insert* in den pGL4.23-Vektor erfolgte eine PCR. Hierzu wurden die einzelnen Kolonien jeweils mit einer 100-µl-Pipettenspitze gepickt und in ein leeres PCR-Gefäß gestrichen.

Dabei wurden die gleichen *Primer* wie unter 2.2.7.1. verwendet. Die PCR ergibt standardmäßig ein 456 bp (TAA(12)) bzw. ein 459 bp (TAA(13)) großes DNA-Stück, wenn das *Insert* korrekt ligiert wurde. Bei Re-Ligation des Vektors mit dem herausgeschnittenen 32 bp großen Vektorstück ist das PCR-Produkt 252 bp groß.

Es wurde die folgende Zusammensetzung der Reagenzien festgelegt (siehe Tabelle 8):

Tabelle 8: Ansatz für die Kolonie-PCR zur Identifikation der pGL4.23-Vektoren mit Insert

Reagenzien	Menge
PCR Puffer: - 5x <i>iProofTM</i> HF Buffer (7,5 mM MgCl ₂)	5 µl
Nukleotide: - dNTP-Mix (je 2,5 mM dGTP, dCTP, dATP, dTTP)	0,5 µl
<i>Primer</i> (verdünnt 1:10): - <i>Forward-Primer</i> - <i>Reverse-Primer</i>	1 µl 1 µl
Polymerase: - <i>iProofTM</i> High-Fidelity DNA Polymerase (2 units/µl)	0,25 µl
Wasser: - ddH ₂ O	17,25 µl
Endvolumen	25 µl

Um die Temperaturen gleichmäßig beibehalten zu können, wurde ein *Thermocycler* mit folgenden Einstellungen verwendet (siehe Tabelle 9):

Tabelle 9: Einstellungen des *Thermocyclers* für die die Kolonie-PCR zur Identifikation der pGL4.23-Vektoren mit Insert

Temperatur	Zeit	Zyklen	Vorgang
98°C	2 Minuten	1	Initiale Denaturierung
98°C	10 Sekunden	30	Denaturierung
60°C	20 Sekunden		<i>Annealing</i>
65°C	15 Sekunden		DNA-Polymerisation
65°C	5 Minuten	1	Terminale Polymerisation

2.3.8.2 DNA-Extraktion des rekombinanten Plasmidvektors aus Bakterienkulturen

Es gibt mehrere Methoden zur Plasmidpräparation. Eine häufig verwendete ist die alkalische Lyse. Zunächst wird die Zelle mit Natriumdodecylsulfat und mit Natriumhydroxid komplett lysiert. Zur Entfernung der RNA (*ribonucleic acid*) kann eine RNase hinzugegeben werden. Durch die Zugabe des Natriumhydroxids wird der pH-Wert ins Alkalische verschoben. Hierdurch werden die chromosomale DNA und die Plasmid-DNA denaturiert. Anschließend erfolgt eine Neutralisierung mit Kaliumacetat. Danach kann die Plasmid-DNA aufgrund ihrer spezifischen Eigenschaften schnell renaturieren. Die Masse an chromosomaler DNA renaturiert und aggregiert hingegen zu einem nicht löslichen Netzwerk. Des Weiteren bildet sich ein Komplex aus Kalium und Natriumdodecylsulfat, der wie die chromosomale DNA ausfällt. Die ausfallenden Substanzen können mittels Zentrifugation entfernt werden. Im Anschluss wird die im Überstand befindliche Plasmid-DNA mit Hilfe hoher Konzentrationen chaotroper Salze an ein Silicagel spezifisch gebunden. Danach erfolgt ein Waschschriff mit einem Salz-Ethanol-Puffer. Folgend kann die Plasmid DNA durch Lösungen mit niedriger Salzkonzentration (z.B. mit Wasser) aus dem Silicagel ausgewaschen werden [70, 84]. Für die DNA-Extraktion wurde das *Kit PureYield™ Plasmid Midiprep System* von Promega verwendet, wobei nach der entsprechenden Anleitung vorgegangen wurde. Zunächst wurden 100 ml der Übernachtskultur (siehe 2.2.8) in entsprechende Zentrifugenflaschen überführt. Diese wurden in einer Sorvall-Zentrifuge mit einem Sorvall-GSA-Rotor bei 20 °C und 5550 rpm (entspricht 5000 x g) für 10 Minuten zentrifugiert. Es bildete sich daraufhin ein Bakterienpellet am Boden der Flasche. Das überstehende Medium wurde mithilfe einer Pipette entfernt. Anschließend wurde das Pellet in 3 ml *Cell Resuspension Solution* gelöst. Danach erfolgte die Zugabe von 3 ml *Cell Lysis Solution*, die drei- bis fünfmal invertiert und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Folgend wurden 5 ml *Neutralization Solution* hinzugegeben und die Lösung fünf- bis zehnmal geschwenkt. Das Bakterienlysat wurde dann bei 20 °C und 9610 rpm (entspricht 15 000 x g) für 15 Minuten zentrifugiert. Die mitgelieferte blaue Säule *PureYield™ Clearing Column* wurde auf die weiße Säule *PureYield™ Bindung Column* gesteckt und beide Säulen wurden auf einem Vakuumverteiler (Vac-Man® der Firma Promega) befestigt. Der Zentrifugationsüberstand wurde in die blaue Säule pipettiert und es wurde ein Vakuum angelegt, bis die Flüssigkeit beider Säulen komplett durchlaufen war. Danach wurde die blaue Säule entfernt, sodass nur die weiße auf dem

Vakuumverteiler verblieb. In diese wurden 5 ml *Endotoxin Removal Wash* gegeben und die Flüssigkeit wurde erneut durch Anlage des Vakuums abgesaugt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 ml *Column Wash* sowie die Wiederholung des Vakuumschrittes. Die Membran wurde durch das erneute Anlegen des Vakuums für 30 Sekunden getrocknet. Ethanolreste an der weißen Säule wurden schließlich mit einem Tuch abgetupft.

Anschließend wurde ein 1,5 ml großes Eppendorf-Reaktionsgefäß in ein *Eluator™ Vacuum Elution Device* der Firma Promega gesteckt. In das *Device* wurde wiederum die weiße Säule platziert. Danach wurden 400 - 600 µl nukleasefreies Wasser auf die Membran der weißen Säule pipettiert und die Flüssigkeit mit Hilfe des Vakuumverteilers binnen maximal einer Minute in das Eppendorf-Gefäß überführt.

2.3.8.3 DNA-Sequenzierung des rekombinanten Plasmidvektors

Nach Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte eine Sequenzierung durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg bei München). Die hierfür erforderlichen Plasmide sowie die entsprechenden *Primer* wurden in der benötigten Menge bzw. Konzentration eingesandt.

2.3.9 Zellkultur

Im Folgenden werden die Versuche mit humanen Zellen beschrieben.

2.3.9.1 Kultivierung humaner Zellen

Für die geplanten weiteren Methoden mit Transfektion menschlicher Zellen (siehe 2.2.9.2) sowie anschließendem Luciferase-Assay (siehe 2.2.10) war zunächst die Vermehrung einer humanen Zelllinie nötig, die das zu untersuchende *Stathmin*-Gen in ausreichendem Maße exprimiert. In dieser Arbeit wurde die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y ausgewählt [85, 86].

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Zellkulturarbeiten im Zellkulturlabor der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Würzburg unter einem sterilen Abzug durchgeführt. Eine regelmäßige Desinfektion erfolgte mit UV-Licht und Ethanol.

Die humanen Zellen (SH-SY5Y) wurden aus der Langzeitkultur der Klinik entnommen. Als Nährmedium wurde DMEM/F-12 (Dulbecco's *Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture* F-12, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verwendet.

Zunächst wurden die 1-ml-Kryoröhrchen bei 37 °C im Brutschrank aufgetaut. Die Zellsuspension wurde dann in 15 ml 37 °C warmes Nährmedium überführt. Hiernach erfolgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und dem entstandenen Pellet wurden 6 ml 37 °C warmes Nährmedium zugegeben. Die Suspension wurde in eine 75-ml-Kulturflasche überführt und es wurden weitere 9 ml eines 37 °C warmen Nährmediums hinzugegeben. Dieses wurde über Nacht bei 37 °C und bei einem 5%-igen v/v CO₂-Gehalt in einem Brutschrank (Heracell 150 Inkubator, Thermo Fisher Scientific, Dreieich) inkubiert.

Da es sich bei der SH-SY5Y-Linie um adhärenente Zellen handelt, wachsen diese bei Bedeckung der gesamten Wachstumsfläche nicht ausreichend weiter. Zudem sinkt die Proliferationsrate bei zu starkem Bewuchs, das zum Absterben der Kultur führen kann [87]. Aus diesem Grund erfolgt das regelmäßige Passagieren der Zellen. Hierfür müssen die adhärenente Zellen zunächst enzymatisch gelöst und dann resuspendiert werden. Anschließend erfolgen eine Verdünnung und die Umsetzung in eine neue Kulturflasche. Eine häufig verwendete Methode zur Subkultivierung von Zelllinien ist der Gebrauch von Trypsin/EDTA. EDTA löst vor allem die Zell-Zell-Verbindungen. Es bindet bivalente Kationen (v.a. Calcium- und Magnesiumionen), die für die Adhäsion der Zellen wichtig sind und Trypsin negativ beeinflussen. Die Endopeptidase Trypsin löst die Zell-Matrix-Verbindungen [88].

Für das Passagieren der Zellen wurde zunächst das DMEM/F-12-Medium mit einer Pipette abgenommen. Hiernach erfolgte zur Entfernung von Mediumresten sowie von abgestorbenen Zellen ein Waschschrift mit 10 ml 37 °C warmer PBS (phosphatgepufferte Salzlösung). Zur Ablösung der Zellen wurden 3 ml 0,05%-Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellschicht gegeben und diese anschließend bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden nach 1 – 2 Minuten anschließend 15 ml DMEM/F-12-Medium hinzugegeben und die Zellen darin geschwenkt. Danach wurde 1 ml Zellsuspension und 14 ml 37 °C warmes Medium in eine neue Zellkulturflasche gegeben und bis zur weiteren Verwendung bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt.

Für die Transfektion (siehe 2.2.9.2) erfolgte das Aussäen der Zellen in eine 24-Well-Platte. Um die Wachstumsraten zu testen, wurden zunächst verschiedene Zellkonzentrationen ausgesät, deren Wachstum mehrere Tage lang beobachtet wurde.

Hierfür wurden die Zellen aus den 15-ml-Kulturflaschen nach dem oben beschriebenen Verfahren vom Flaschenboden gelöst und in Suspension gebracht. Hiervon wurden 10 µl abgenommen. Die Bestimmung vitaler Zellen erfolgte dann unter einer Neubauer-Zählkammer der Firma DigitalBio. Durch die Zugabe von 90 µl Trypanblau wurden tote Zellen eingefärbt und konnten so von den vitalen Zellen differenziert werden [88].

Eine Neubauerkammer besteht jeweils aus neun großen Quadraten [88]. Um die Zellzahl zu berechnen, wurden vier große Quadrate ausgezählt und deren Mittelwert berechnet. Dieser wurde entsprechend dem Faktor der verwendeten Zählkammer mit 10^4 multipliziert. Daraus ergibt sich die Zellzahl pro Milliliter.

Um die gewünschten Verdünnungen zu erhalten, wurde die Wunschkonzentration durch die gemessene Konzentration geteilt. Dies ergibt den Wert der zu pipettierenden Zellsuspension. Diese wurde mit Nährmedium bis auf 1 ml aufgefüllt und in die entsprechenden Wells der Platte pipettiert. Danach erfolgte eine dreitägige Beobachtung mit täglichem Mediumwechsel. Als Ziel für die Transfektion (siehe 2.2.9.2) sollten 80% der Oberfläche zum Zeitpunkt der Durchführung mit Zellen bewachsen sein.

2.3.9.2 Transfektion menschlicher Zellen mit dem rekombinanten Plasmidvektor mittels Lipofektion

Unter dem Begriff Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryote Zellen verstanden. Dies macht unter anderem eine heterologe Expression in Zellen möglich, d. h. die Produktion eines Proteins, das natürlicherweise in diesen nicht vorkommt [70, 88]. In dieser Arbeit wurden Zellen der Zelllinie SH-SY5Y mit dem unter 2.2.7 hergestellten Plasmidvektor transfiziert.

Um die Effizienz der Transfektion zu überprüfen, wurde zudem ein Kontrollplasmid in Form des Vektors pGL4.74 verwendet. Dieser kodiert für das Luciferase-Reporter-Gen *hRluc* (*Renilla reniformis*) [89].

Da Zellen freie DNA-Moleküle nur ungenügend aufnehmen können, gibt es verschiedene Methoden zur Steigerung der Transfektionseffizienz. In dieser Arbeit wurde die Transfektion durch kationische Liposomen durchgeführt, die auch Lipofektion genannt wird. Hierzu wurde das *TransFast™ Reagent* der Firma Promega verwendet. Bei der Lipofektion entsteht ein Liposomen-DNA-Komplex, der mit der Zellmembran fusionieren kann und den Übertritt der DNA in die Zelle erlaubt [70, 88].

Als kationisches Lipid wurde (+)-N,N [bis (2-hydroxyethyl)]-N-methyl-N- [2,3-di(tetradecanoyloxy)propyl] Ammoniumiodid verwendet. Die positive Ladung erlaubt die

Komplexierung mit den negativ geladenen Nukleinsäuren. Durch die zusätzliche Verwendung des neutralen Helferlipids Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) wird die Zelltoxizität verringert [88].

Zunächst erfolgte die Optimierung der Transfektion. Hierfür wurden unterschiedliche DNA-Mengen (0,25 µg, 0,5 µg, 0,75 µg und 1 µg) sowie verschiedene Verhältnisse von pGL4.74 zu dem Ligationsprodukt pGL4.23 getestet (1:10, 1:30, 1:50). Das Verhältnis von DNA-Menge zu *TransFast*TM Reagenz wurde auf 1:1 und 1:2 festgelegt.

Durch die Zellkulturversuche unter 2.2.9.1 ergab sich ein optimaler Bewuchs bei der Aussaat von 4×10^4 Zellen pro Well. Dabei wurde jeweils 1 ml der entsprechenden Zellsuspension in jedes Well gegeben. Danach erfolgte die Inkubation bei 37 °C über Nacht, sodass 80% der Oberfläche durch Zellen bewachsen waren.

Für die Transfektion sollte die hergestellte Lösung 200 µl betragen. Die entsprechenden Verhältnisse von Plasmid-DNA, *TransFast*TM Reagenz und Medium wurden gemäß den Optimierungsbedingungen sowie der gemessenen DNA-Konzentration berechnet. Zunächst wurde die Plasmid-DNA in 37 °C warmem, serumfreien Medium suspendiert. Hierzu wurde das *TransFast*TM Reagenz gegeben. Der Ansatz wurde für wenige Sekunden auf dem Microspin-FV-2400-Gerät (Biosan, Riga/Lettland) gemixt und danach für 10 - 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium von den ausgesäten Zellen entfernt und der Transfektionsansatz hinzugegeben. Danach erfolgte die Inkubation bei 37 °C für eine Stunde im Brutschrank. Anschließend wurden jeweils 1 ml des 37 °C warmen Mediums (mit 10% PBS) in jedes Well gegeben und der Ansatz bei 37 °C für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Um die optimalen Verhältnisse zu bestimmen, war danach die Durchführung eines Luciferase-Assays (siehe 2.2.10) notwendig. Hierbei wurde der Ansatz verwendet, bei dem die höchste Luciferase-Aktivität beider Vektoren gemessen wurde.

2.3.10 Luciferase-Assay

Um die Expression von Genen zu bestimmen, gibt es verschiedene Methoden. Eine häufig eingesetzte Möglichkeit ist das Heranziehen von Reporter genen. Diese kodieren für Proteine, die über messspezifische Methoden nachgewiesen werden können [70].

In dieser Arbeit wurde als Reporter gen das Luciferase-Gen herangezogen. Luciferasen sind Enzyme, die die Reaktion zwischen Luciferinen und Sauerstoff katalysieren.

Luciferine kommen in biolumineszenten Organismen vor und dienen dort zur Lichterzeugung [70].

Im Sinne eines *Dual-Luciferase-Assays* wurden zwei verschiedene Luciferase-Gene eingesetzt: das der Leuchtkäferart *Photinus pyralis* sowie das der Seefedernart *Renilla reniformis*. Durch die Luciferase des Organismus *Photinus pyralis* wird die Oxidation von D-Luciferin zu Oxyluciferin mithilfe der Kofaktoren ATP (Adenosintriphosphat) und Magnesium katalysiert [90]. Bei dem Organismus *Renilla reniformis* wird die Oxidation von Coelenterazin zu Coelenteramid katalysiert [91]. Bei beiden Reaktionen entsteht Licht, dessen Intensität gemessen werden kann. Die Lichtproduktion ist hierbei proportional zur Luciferasemenge. Letztere lässt wiederum Rückschlüsse auf die Genaktivität zu [70].

Das Reporterogen *luc2* (*Photinus pyralis*) wurde mittels des rekombinanten Vektors pGL4.23 in humane Zellen eingebracht (siehe 2.2.9.2), um die Genexpression bei unterschiedlichen Genotypen des STR-Promotor-Polymorphismus des *Stathmin*-Gens zu überprüfen. Da der amplifizierte Genabschnitt nicht den gesamten Promotorbereich umfasst, musste der gewählte Vektor pGL4.23 einen Minimalpromotor besitzen [79].

Der Vektor pGL4.74 dient wiederum zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und enthält hierfür einen konstitutiven Promotor (Thymidinkinase-Promotor aus dem Herpes Simplex Virus), sodass das *hRluc*-Gen kontinuierlich exprimiert wird [89].

Für den Luciferase-Assay wurde das *Dual-LuciferaseTM Reporter Assay System* von Promega verwendet.

Die Zellen (siehe 2.2.9.2) waren nach Transfektion in einer 24-Well-Platte 48 Stunden inkubiert worden (siehe 2.2.9.1). Zum Zeitpunkt der Lyse sollten die Zellen nicht mehr als 95% konfluieren.

Im ersten Schritt erfolgte die passive Lyse der Zellen, d. h. ohne mechanische Einwirkung. Hierzu wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und die Oberfläche anschließend mit 1 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde danach von den Zellen entfernt. Der 5 x *Passive Lysis Buffer* wurde zunächst durch Zugabe von destilliertem Wasser 1:5 verdünnt. Von dem entstandenen 1 x *Passive Lysis Buffer* wurden je 100 µl in jedes Well pipettiert. Die 24-Well-Platte wurde anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur und 225 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Durch die Lyse wurden die durch die Zellen synthetisierten Luciferasen freigesetzt.

Danach wurden 20 µl jedes Zelllysats in jeweils einen Well einer 96-Well-Luminometermessplatte pipettiert.

Für die Präparation des *Luciferase Assay Reagent II* (LAR II) wurde das *Luciferase Assay Substrate* in 10 ml des *Luciferase Assay Buffer II* gelöst. Das *Stop&Glo® Reagent* wurde durch Lösung eines Anteils des 50 x *Stop&Glo® Substrates* in 50 Anteilen *Stop & Glo® Buffer* hergestellt.

Für die Messung wurde anschließend das *GloMax®-Multi Detection System* der Firma Promega verwendet. Dafür wurde das voreingestellte Programm *Dual Luciferase Assay 2 injectors* ausgewählt. Für beide Injektoren war das Volumen auf 100 µl, die Verzögerung bis zur Messung auf 2 Sekunden, die Geschwindigkeit auf 200 µl/s und die Dauer der Messung pro Well auf 10 Sekunden eingestellt. Die Verzögerung der Messung nach Pipettieren des Reagenzes ist zur Umsetzung des Leuchtsubstrats in messbares Licht notwendig [88].

Vom ersten Injektor wurden zunächst 100 µl des *Luciferase Assay Reagent II* in das zu untersuchende Well gegeben und entsprechend der oben genannten Einstellungsparameter gemessen. Das LAR II liefert das Substrat für die oben beschriebene Reaktion des Luciferase-Enzyms der *Photinus pyralis*. Danach erfolgte eine Zugabe von 100 µl des *Stop&Glo® Reagents*, das die Reaktion der *Photinus-pyralis-Luciferase* stoppt und das Substrat für die *Renilla-reniformis-Luciferase* liefert. Die Messung erfolgte ebenfalls nach den oben genannten Einstellungsparametern. Die gemessenen Werte wurden von der integrierten Software in eine Microsoft-Excel-Tabelle exportiert. Anschließend erfolgte die statistische und graphische Auswertung.

2.4 Statistische Methoden

Um die einzelnen Messwerte in Bezug auf Tages- und Messschwankungen vergleichbar zu machen, wurde der Quotient *Firefly/Renilla* pro Ansatz gebildet und die einzelnen Ansätze anschließend z-transformiert. Laut dem Buch „Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler“ von J. Bortz lassen sich die z-Werte ermitteln, „indem man die Abweichung vom Mittel an der Standardabweichung relativiert“ [92].

Dafür wurde folgende Formel verwendet:

$$z = \frac{x - \bar{x}}{s}$$

x = Messwert, \bar{x} = arithmetischer Mittelwert, s = Standardabweichung

Laut J. Bortz haben „z-transformierte Werte haben einen Mittelwert von 0 und eine Standardabweichung von 1“ [92].

Die hiermit normalisierten Werte der beiden unterschiedlichen Allele wurden anschließend mithilfe eines zweiseitigen t-Tests unterschiedlicher Varianzen auf die statischen Unterschiede im Hinblick auf die Genexpression untersucht [92]. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf 5% festgelegt.

Die Berechnungen wurden eigenständig mit dem Programm Microsoft Excel berechnet und grafisch dargestellt.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der oben beschriebenen Versuche (siehe 2.2) erläutert.

3.1 Kontrolle der Amplifikation eines DNA-Abschnittes des *Stathmin*-Gens mittels Gelelektrophorese

Das zu amplifizierende DNA-Stück des *Stathmin*-Gens sollte bei erfolgreicher PCR aus ~250 Basenpaaren (± 10 Basenpaaren je nach Genotyp) bestehen (siehe 2.2.4). Zur Überprüfung erfolgte deshalb das Auftragen der PCR-Produkte auf ein 3%-iges Agarosegel, wobei diese im Anschluss durch die Gelelektrophorese aufgetrennt wurden (siehe 2.2.3).

In der Gelelektrophorese zeigte sich für die Patienten-DNA P063 mit dem Genotyp (TAA)13 das beste Ergebnis. Das PCR-Produkt hatte die erwartete Größe. Als Negativkontrolle wurde die PCR (siehe 2.2.4) ohne DNA-*Template* durchgeführt. In der Gelelektrophorese sind deshalb nur die *Primer*-Dimere sichtbar (siehe Fig. 6).

Während einer PCR kann es zu *Template*-unabhängigen *Primer*-Interaktionen kommen, wodurch u. a. *Primer*-Dimere entstehen können [93]. Trotz wiederholter Optimierungsversuche zeigte sich eine große Menge dieser Nebenprodukte.

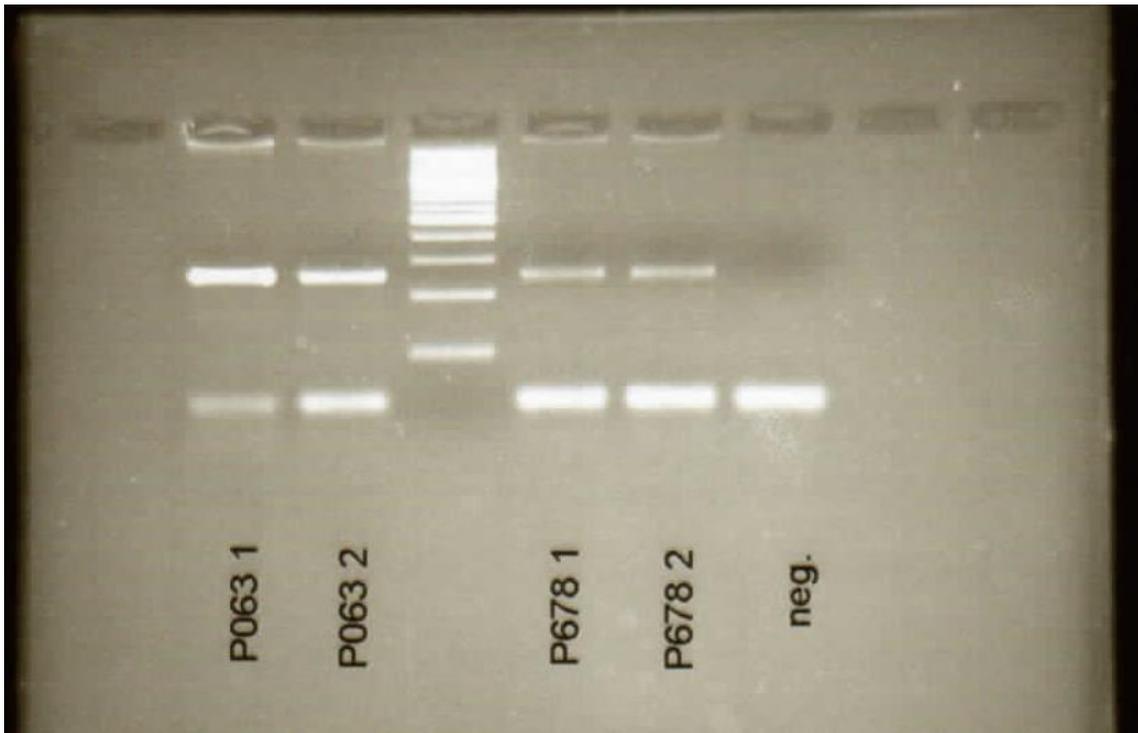


Fig. 6 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte (siehe 2.2.4), 3%-iges Gel; als Vergleichsbanden wurde in der dritten Spalte eine DNA-Leiter verwendet. Die verwendeten Patientenproben waren P063 und P678.

3.2 Kontrolle der Ligation des pGL4.23-Vektors mit dem *Insert* mittels PCR und Gelelektrophorese

Nach der Ligation des amplifizierten *Stathmin*-Promotor-Abschnittes in den Plasmidvektor pGL4.23 (siehe 2.2.7) erfolgte zur Kontrolle eine PCR mit den Ligationsprodukten (siehe 2.2.7.1). Die entstandenen PCR-Produkte sollten bei korrekter Ligation eine Größe von 459 bp (TAA(13)) bzw. 462 bp (TAA(14)) haben. Bei Re-Ligation des Vektors mit dem herausgeschnittenen 32bp großen Vektorstück ist das PCR-Produkt 252 bp groß.

Zur Überprüfung wurden die PCR-Produkte auf ein 3%-iges Agarosegel aufgetragen und es wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Fig. 7).

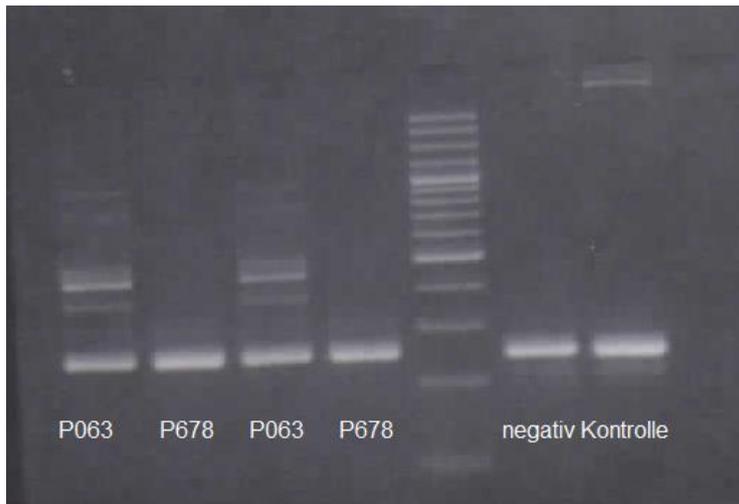


Fig. 7 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte mit Ligationsprodukten als DNA-Template (siehe 2.2.7.1), 3%-iges Gel; als Vergleichsbanden wurde jeweils in der fünften Spalte eine DNA-Leiter verwendet. Die verwendeten Patientenproben waren P063 und P678.

Trotz mehrfacher Optimierungsversuche und der Verwendung unterschiedlicher DNA-Proben war die Ligation nur mit dem DNA-*Template* P063 (Genotyp TAA(13)) erfolgreich. Die entstandenen rekombinanten Vektoren wurden zur weiteren Transformation der E. coli-Bakterien verwendet.

Im Anschluss erfolgte eine Kolonie-PCR zur Selektion positiver Klone (siehe 2.2.7.1). Bei korrekter Ligation zeigt sich in der Gelelektrophorese eine 459 bp (TAA(13)) große Bande. Bei Re-Ligation des Vektors mit dem herausgeschnittenen 32bp großen Vektorstück ist das PCR-Produkt 252 bp groß (siehe Fig. 8).



Fig. 8 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte mit gepickten Bakterienkolonien als DNA-Template, 3%-iges Gel; als Vergleichsbanden wurde jeweils in der zweiten und elften Spalte eine DNA-Leiter verwendet. Als Negativprobe diente der ursprüngliche pGL4.23 Vektor

Zur weiteren Überprüfung wurden einzelne, rekombinante pGL4.23-Vektoren, die aus den positiven Klonen extrahiert worden waren (siehe 2.2.8.2), zur Sequenzierung an die Firma Firma Eurofins MWG Operon versandt.

3.3 Ergebnisse der Sequenzierung

Durch die Sequenzierung der Eurofins MWG GmbH war die Überprüfung der DNA-Sequenzen der eingesendeten Proben möglich. Es erfolgte die Sequenzierung der rekombinanten pGL4.23-Vektoren aus zwei verschiedenen positiven Klonen. Die einzig erfolgreiche Ligation war mit der DNA P063 als *Insert* erfolgt, die den Genotyp (TAA)¹³ besitzt. In der Sequenzierung zeigte sich jedoch, dass es zu einer Spontanmutation im Bereich des TAA-Repeats gekommen war, sodass für die weiteren Versuche zwei verschiedene Genotypen mit einem (TAA)¹³- und einem (TAA)¹²-Repeat zur Verfügung standen.

Die untenstehenden FASTA-Sequenzen ergaben sich jeweils für die zwei eingesendeten Proben. Unterschiede in der DNA-Sequenz der beiden Proben sind markiert, der TAA-Repeat ist unterstrichen.

Probe 1 P063 1:10, Genotyp [(TAA)12] (Verwendung des *Forward-Kolonie-Primers*)

5' **C**CACCCTAAAGAACAAGGATCAGACTGGGTGTGGTGGCTCATGCCTGTA
ATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGACAAGAGGATTGCTTGAACCCAGGAGTTCGA
GGCCAACCTGGGCAACATAGTGAGACCCTGTCTCAATTTTTTTAAGTCAAATAAT
AATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAAAAGGACAGGAATCCCACCTCAAAG
CACCTTTTTATAAGCTTAGACACTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAGC
TTGGCAATCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGATGCCAAAACATTAAG
AAGGGCCCAGCGCCATTCTACCCACTCGAAGACGGGACCGCCGGCGAGCAGCT
GCACAAAGCCATGAAGCGCTACGCCCTGGTGCCCGGCACCATCGCCTTTACCGA
CGCACATATCGAGGTGGACATTACCTACGCCGAGTACTTCGAGATGAGCGTTCCG
CTGGCAGAAGCTATGAAGCGCTATGGGCTGAATACAAACCATCGGATCGTGGTGT
GCAGCGAGAATAGCTTGCAGTTCTTCATGCCCGTGTTGGCCCTGTTTCATCGGTGT
GGCTGTGGCCCCAGCTAACGACATCTACAACGAGCGCGAGCTGCTGAACAGCAT
GGGCATCAGCCAGCCACCGTCGTATTCGTGAGCAAGAAAGGGCTGCAAAGAT
CCTCAACGTGCAAAGAAGCTACCGATCATACAAAGATCATCATCATGGATAGCA
AGACCGACTACCAGGGCTTCAAAGCATGTACACCTTCGTGACTTCCATTTGCC
ACCCGGCTTCAACGAGTACGACTTCGTGCCCGAGAGCTTCGACCGGGACAAAAC
CATCGCCCTGATCATGAACAGTAGTGGCAGTACCGGATTGCCCAAGGCGTAG 3'

Probe 2 P063 1:5, Genotyp [(TAA)13], (Verwendung des *Forward-Kolonie-Primers*)

5' **A**CACCCTAAAGAACAAGGATCAGACTGGGTGTGGTGGCTCATGCCTGTA
ATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGACAAGAGGATTGCTTGAACCCAGGAGTTCGA
GGCCAACCTGGGCAACATAGTGAGACCCTGTCTCAATTTTTTTAAGTCAAATAAT
AATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAAAAGGACAGGAATCCCACCTCAA
AAGCACCTTTTTATAAGCTTAGACACTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCC
AGCTTGGCAATCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGATGCCAAAACATT
AAGAAGGGCCCAGCGCCATTCTACCCACTCGAAGACGGGACCGCCGGCGAGCA
GCTGCACAAAGCCATGAAGCGCTACGCCCTGGTGCCCGGCACCATCGCCTTTAC
CGACGCACATATCGAGGTGGACATTACCTACGCCGAGTACTTCGAGATGAGCGTT
CGGCTGGCAGAAGCTATGAAGCGCTATGGGCTGAATACAAACCATCGGATCGTG
GTGTGCAGCGAGAATAGCTTGCAGTTCTTCATGCCCGTGTTGGGTGCCCTGTTCA
TCGGTGTGGCTGTGGCCCCAGCTAACGACATCTACAACGAGCGCGAGCTGCTGA

ACAGCATGGGCATCAGCCAGCCCACCGTCGTATTCGTGAGCAAGAAAGGGCTGC
AAAAGATCCTCAACGTGCAAAAGAAGCTACCGATCATACAAAAGATCATCATCATG
GATAGCAAGACCGACTACCAGGGCTTCCAAAGCATGTACACCTTCGTGACTTCCC
ATTTGCCACCCGGCTTCAACGAGTACGACTTCGTGCCCCGAGAGCTTCGACCGGG
ACAAAACCATCGCCCTGATCATGAACAGTAGTGGCAGTACCGGATTGCCCAAGGC
GTAG 3'

Im Vergleich mit der FASTA-Sequenz des ursprünglich amplifizierten *Inserts* zeigten sich keine Genmutationen gegenüber den beiden sequenzierten Proben.

FASTA-Sequenz des *Inserts* TAA(12)

5' CCCCACCCTAAAGAACAAGGATCAGACTGGGTGTGGTGGCTCATGCCTG
TAATCCCAGCACTTTGGGAGGCTGAGACAAGAGGATTGCTTGAACCCAGGAGTTC
GAGGCCAACCTGGGCAACATAGTGAGACCCTGTCTCAATTTTTTTTAAAGTCAAATAA
TAATAATAATAATAATAATAATAATAATAATAAAAGGACAGGAATCCCACCTCAAAGCA
CCTTTTTAT 3'

3.4 Ergebnisse der Optimierung der Transfektion

Zur Optimierung der Transfektion (siehe 2.2.9.2) wurden unterschiedliche DNA-Mengen (0,25 µg, 0,5 µg, 0,75 µg und 1 µg), verschiedene Verhältnisse von pGL4.74 zu dem Ligationsprodukt pGL4.23 sowie unterschiedliche Verhältnisse von DNA-Menge zu *TransFast*TM Reagenz (1:1 und 1:2) getestet.

Um die optimalen Verhältnisse zu bestimmen, erfolgte hiernach die Messung mittels Luciferase-Assay (siehe 2.2.10). Die höchste Luciferase-Aktivität beider Vektoren wurde bei einer DNA-Menge von 0,75 µg, einem Verhältnis von pGL4.74 zu dem Ligationsprodukt pGL4.23 von 1:30 und einem Verhältnis von DNA-Menge zu *TransFast*TM Reagenz von 1:1 gemessen. Dieses wurde für die weiteren Messungen verwendet.

3.5 Statistische Auswertung der Genexpression der Promotorpolymorphismen (TAA)12 und (TAA)13 im Luciferase-Assay

Wie unter 2.2.10 beschrieben erfolgten jeweils drei unabhängige Messungen der In-vitro-Promotoraktivitäten der beiden *Stathmin*-Promotor-Polymorphismen (TAA)12 und (TAA)13. Pro Messung wurden jeweils vier Proben jedes Genotyps verwendet. Hierdurch ergaben sich pro Allel je 12 Messwerte.

In den Messreihen zeigten sich starke tagesabhängige Schwankungen der relativen Luciferase-Aktivität (siehe Fig. 9). Bei allen Messungen ergab sich jedoch ein Unterschied zwischen den Aktivitätsmessungen der zwei Genotypen (siehe Fig. 9).

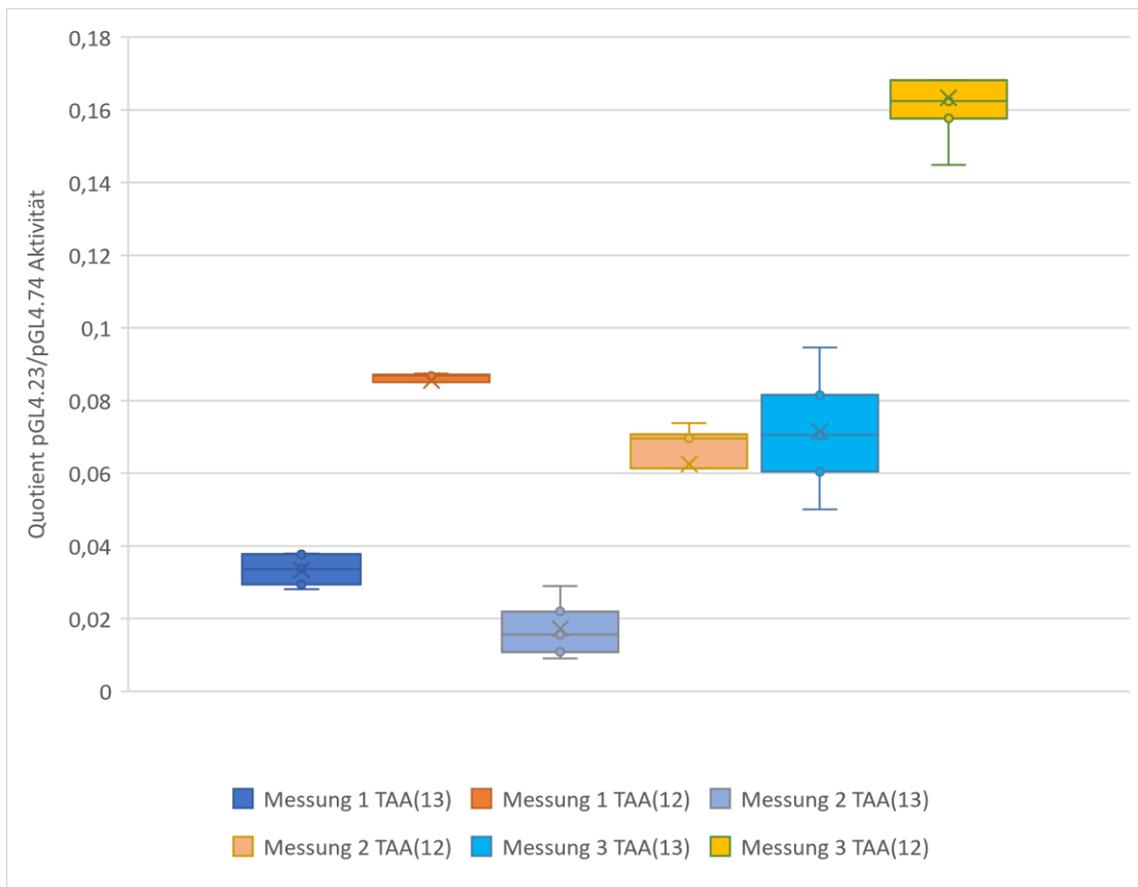


Fig. 9 Darstellung der relativen Luciferase-Aktivitäten der einzelnen Messreihen

Um die messreihenabhängigen Schwankungen auszugleichen, erfolgte eine Normalisierung der Werte mittels z-Transformation (siehe 2.3 und Fig. 10). Die medianen z-Werte sind bei einem Vergleich der beiden Allele bei dem (TAA)13-Repeat niedriger

als bei dem (TAA)12-Repeat. Im sogenannten zweiseitigen t-Test unterschiedlicher Varianzen (siehe 2.3) zeigten sich signifikant höhere z-Werte des (TAA)12-Repeats im Vergleich zum (TAA)13-Repeat ($p\text{-Wert} = 2,49073 \times 10^{-11}$).

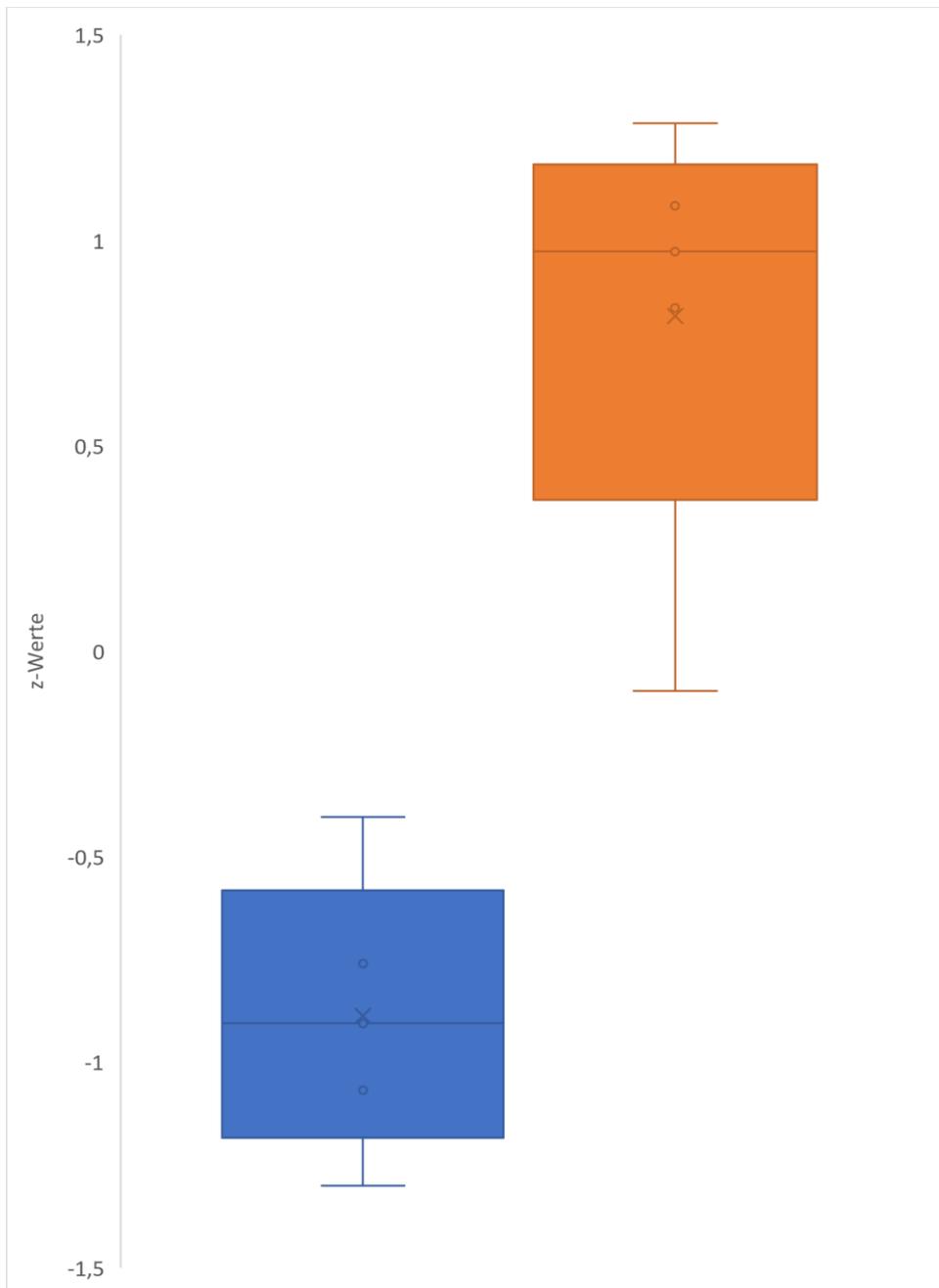


Fig. 10 Darstellung der z-Werte der relativen Luciferase-Aktivität aller Messreihen. Blaugefärbt z-Werte TAA(13), orangegefärbt z-Werte TAA(12).

4. Diskussion

4.1 Der STR-Promotor-Polymorphismus (TAA)_n hat einen Einfluss auf die Promotoraktivität des *Stathmin*-Gens.

In dem durchgeführten Luciferase-Assay konnte ein signifikanter Unterschied in der Promotoraktivität der STR-Polymorphismen (TAA)₁₂ und (TAA)₁₃ des *Stathmin*-Gens nachgewiesen werden (siehe 3.5). Die Promotoraktivität des STR-Polymorphismus (TAA)₁₂ war dabei höher als jene von (TAA)₁₃.

Bisher ist der genannte STR-Promotor-Polymorphismus nur wenig untersucht. Frau Dr. Heupel konnte in ihrer Doktorarbeit eine Assoziation im Hinblick auf Cluster-C-Persönlichkeitsstörungen finden, wobei die untersuchten Polymorphismen (TAA)₁₃ und (TAA)₁₄ waren [66]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (siehe 3.5) zeigen eine Abnahme der Promotoraktivität mit Zunahme der (TAA)-Wiederholungen. Sollte dies auf die weiteren (TAA)-Polymorphismen übertragbar sein, könnte dies auf eine Korrelation zwischen Cluster-C-Persönlichkeitsstörungen und der *Stathmin* Promotoraktivität hinweisen.

Auch weitere Dimensionen der Angstverarbeitung bzw. des Angstverhaltens könnten im Zusammenhang mit dem untersuchten *Stathmin*-Promotor-Polymorphismus stehen. Im Hinblick auf andere Polymorphismen konnte ein Einfluss der Promotoraktivität auf das Angstverhalten gefunden werden. So untersuchten Ding et al. die Auswirkung zweier Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in Bezug auf die Promotoraktivität sowie auf das Angstverhalten bei der Hunderasse English Springer Spaniel. Sie konnten zeigen, dass die Polymorphismen g. -327 A>G und g. -125 C>T sowie der Haplotyp H4H4 (H4 = GT) mit dem Angstverhalten bei der untersuchten Hunderasse assoziiert waren. Auch ergaben sich in dem durchgeführten Luciferase-Assay unterschiedliche Promotoraktivitäten bei den untersuchten Haplotypen, wobei der Haplotyp H4 die höchste Promotoraktivität aufwies [34].

Ein besser untersuchter Polymorphismus, der nur ~150 bp entfernt von dem in dieser Arbeit untersuchten STR-Promotor-Polymorphismus liegt, ist der SNP rs182455. Cao et. al konnten diesbezüglich nachweisen, dass sich durch diesen SNP die Schwere der wiedererlebten Symptome bei der posttraumatischen Belastungsstörung bei Frauen vorhersagen lässt [44]. Ehli et al. fanden in ihrer Studie Hinweise auf einen Einfluss des *STMN1*-Gens in Hinblick auf den rs182455 Polymorphismus auf kognitive und affektkontrollierende Prozesse [52]. Brocke et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass

der SNP rs182455 eine funktionelle Relevanz für den Erwerb und die Expression basaler Angst sowie für die Angstreaktion in Menschen haben könnte [51]. Auch im Hinblick hierauf erscheint der in der vorliegenden Arbeit untersuchte STR-Promotor-Polymorphismus ein möglicher Kandidat in Bezug auf die Einflussnahme der Angstverarbeitung und Regulation zu sein.

4.2 Ausblick auf weiterführende Versuche

In dieser Arbeit wurde die Funktionalität eines STR-Polymorphismus in der Promotorregion des *Stathmin*-Gens untersucht. In weiteren Versuchen muss geklärt werden, ob die Promotoraktivität mit zu- bzw. abnehmender (TAA)-Anzahl ebenfalls abnimmt bzw. ansteigt. Hierzu sind weitere Promotorstudien mit den am häufigsten beim Menschen vorkommenden STR-Promotor-Polymorphismen sinnvoll.

Aufgrund der unzureichenden Datenlage in Bezug auf die Assoziation des STR-Promotor-Polymorphismus mit psychiatrischen Erkrankungen sind weitere klinische Studien nötig, um Auswirkungen auf das klinische Erscheinungsbild zu erforschen. Auch müssen die Konsequenzen im Hinblick auf andere kompensatorische Prozesse – z.B. mit Hochregulierung anderer Proteine oder Methylierung – in Bezug auf die unterschiedliche Expression des *Stathmin*-Gens untersucht werden.

Wie bereits beschrieben, ist ein Zusammenhang des *Stathmin*-Gens mit verschiedenen psychiatrischen sowie neurologischen Erkrankungen anzunehmen. Auch in Bezug auf diese Erkrankungen erscheint der hier untersuchte STR-Promotor-Polymorphismus ein Kandidat im Hinblick auf deren Ätiologie zu sein.

5. Zusammenfassung

Bereits in vorausgegangenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass das *Stathmin*-Gen eine entscheidende Rolle im Hinblick auf erlernte und angeborene Angstreaktionen spielt [45, 48, 50]. So konnte Frau Dr. Heupel in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2013 eine Assoziation eines (TAA)_n-Polymorphismus, welcher sich ca. 2 kb upstream des ersten Exons des *Stathmin*-Gens und ca. 4 kb upstream des Translationsstarts befindet, mit Cluster-C-Persönlichkeitsstörungen belegen. Sie vermutete, dass eine Hochregulation der Expression des *Stathmin*-Gens ein Risikofaktor für die Entstehung von Cluster C Persönlichkeitsstörungen darstellen könnte [66]. Da sich der beschriebene Polymorphismus in der Promotor-Region des *Stathmin*-Gens befindet, ist eine allelspezifische Auswirkung auf die Genexpression vorstellbar [34, 66]. Um diese Vermutung zu stützen, wurde in dieser Arbeit die Auswirkung zweier Allele des STR-Polymorphismus im Bereich der Promotorregion des *Stathmin*-Gens im Hinblick auf die Promotoraktivität untersucht. Hierzu wurde die zu untersuchende Sequenz zunächst mittels Polymerase-Ketten-Reaktion vervielfältigt und anschließend in einen pGL4.23.Vektor kloniert. Im Anschluss daran erfolgte die Untersuchung der Promotoraktivität mittels eines Luciferase-Assays in der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y.

Nach statischer Auswertung der Messreihen zeigte sich eine signifikant höhere Luciferase-Aktivität des STR-Polymorphismus (TAA)₁₂ im Vergleich zu dem STR-Polymorphismus (TAA)₁₃. Hierdurch kann von einer höheren Promotoraktivität bei dem Genotyp (TAA)₁₂ gegenüber dem Genotyp (TAA)₁₃ ausgegangen werden.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die These, dass es sich bei dem *Stathmin*-Gen um ein Suszeptibilitäts-gen für die Entstehung von Cluster C Persönlichkeitsstörungen handeln könnte.

Weitere Genexpressionsanalysen zum Ausschuss anderweitiger Einflussfaktoren auf die Expression des *Stathmin*-Gens und zur Verifizierung dieser Resultate sind jedoch notwendig.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Ozon S, Maucuer A, Sobel A. The stathmin family -- molecular and biological characterization of novel mammalian proteins expressed in the nervous system. *Eur J Biochem*; DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-2-00794.x
- 2 Schubart UK, Banerjee MD, Eng J. Homology between the cDNAs encoding phosphoprotein p19 and SCG10 reveals a novel mammalian gene family preferentially expressed in developing brain. *DNA*; DOI: 10.1089/dna.1.1989.8.389
- 3 Sobel A, Bouterin MC, Beretta L et al. Intracellular substrates for extracellular signaling. Characterization of a ubiquitous, neuron-enriched phosphoprotein (stathmin). *J Biol Chem* 1989; 264 (7): 3765–3772
- 4 Stein R, Mori N, Matthews K et al. The NGF-inducible SCG10 mRNA encodes a novel membrane-bound protein present in growth cones and abundant in developing neurons. *Neuron*; DOI: 10.1016/0896-6273(88)90177-8
- 5 Ozon S, Byk T, Sobel A. SCLIP: a novel SCG10-like protein of the stathmin family expressed in the nervous system. *J Neurochem*; DOI: 10.1046/j.1471-4159.1998.70062386.x
- 6 Poulain FE, Sobel A. The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Mol Cell Neurosci*; DOI: 10.1016/j.mcn.2009.07.012
- 7 Riederer BM, Pellier V, Antonsson B et al. Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG10. *Proc Natl Acad Sci U S A*; DOI: 10.1073/pnas.94.2.741
- 8 Gavet O, Ozon S, Manceau V et al. The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 22): 3333–3346
- 9 Belmont LD, Mitchison TJ. Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell*; DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81037-5
- 10 Curmi PA, Gavet O, Charbaut E et al. Stathmin and its phosphoprotein family: general properties, biochemical and functional interaction with tubulin. *Cell Struct Funct*; DOI: 10.1247/csf.24.345

- 11 Charbaut E, Curmi PA, Ozon S et al. Stathmin family proteins display specific molecular and tubulin binding properties. *J Biol Chem*; DOI: 10.1074/jbc.M010637200
- 12 Lachkar S, Lebois M, Steinmetz MO et al. *Drosophila* stathmins bind tubulin heterodimers with high and variable stoichiometries. *J Biol Chem*; DOI: 10.1074/jbc.M109.096727
- 13 Maucuer A, Doye V, Sobel A. A single amino acid difference distinguishes the human and the rat sequences of stathmin, a ubiquitous intracellular phosphoprotein associated with cell regulations. *FEBS Letters* 1990; 264 (2): 275–278
- 14 Beretta L, Dobránsky T, Sobel A. Multiple phosphorylation of stathmin. Identification of four sites phosphorylated in intact cells and in vitro by cyclic AMP-dependent protein kinase and p34cdc2. *J Biol Chem* 1993; 268 (27): 20076–20084
- 15 Curmi PA, Andersen SS, Lachkar S et al. The stathmin/tubulin interaction in vitro. *J Biol Chem*; DOI: 10.1074/jbc.272.40.25029
- 16 Honnappa S, Cutting B, Jahnke W et al. Thermodynamics of the Op18/stathmin-tubulin interaction. *J Biol Chem*; DOI: 10.1074/jbc.M305546200
- 17 Larsson N, Marklund U, Gradin HM et al. Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol Cell Biol*; DOI: 10.1128/mcb.17.9.5530
- 18 Ozon S, Guichet A, Gavet O et al. *Drosophila* stathmin: a microtubule-destabilizing factor involved in nervous system formation. *Mol Biol Cell*; DOI: 10.1091/mbc.01-07-0362
- 19 Redeker V, Lachkar S, Siavoshian S et al. Probing the native structure of stathmin and its interaction domains with tubulin. Combined use of limited proteolysis, size exclusion chromatography, and mass spectrometry. *J Biol Chem*; DOI: 10.1074/jbc.275.10.6841
- 20 Poulain FE, Sobel A. The "SCG10-Like Protein" SCLIP is a novel regulator of axonal branching in hippocampal neurons, unlike SCG10. *Mol Cell Neurosci*; DOI: 10.1016/j.mcn.2006.10.012

- 21 Ravelli RBG, Gigant B, Curmi PA et al. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*; DOI: 10.1038/nature02393
- 22 Ferrari AC, Seuanez HN, Hanash SM et al. A gene that encodes for a leukemia-associated phosphoprotein (p18) maps to chromosome bands 1p35-36.1. *Genes Chromosomes Cancer*; DOI: 10.1002/gcc.2870020208
- 23 Huret J-L, Ahmad M, Arsaban M et al. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology in 2013. *Nucleic Acids Res*; DOI: 10.1093/nar/gks1082
- 24 Mao Q, Chen Z, Wang K et al. Prognostic Role of High Stathmin 1 Expression in Patients with Solid Tumors: Evidence from a Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem*; DOI: 10.1159/000493958
- 25 Zhu XX, Kozarsky K, Strahler JR et al. Molecular cloning of a novel human leukemia-associated gene. Evidence of conservation in animal species. *J Biol Chem* 1989; 264 (24): 14556–14560
- 26 Liedtke W, Leman EE, Fyffe REW et al. Stathmin-deficient mice develop an age-dependent axonopathy of the central and peripheral nervous systems. *Am J Pathol*; DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64866-3
- 27 Holmfeldt P, Larsson N, Segerman B et al. The catastrophe-promoting activity of ectopic Op18/stathmin is required for disruption of mitotic spindles but not interphase microtubules. *Mol Biol Cell*; DOI: 10.1091/mbc.12.1.73
- 28 Piedra F-A, Kim T, Garza ES et al. GDP-to-GTP exchange on the microtubule end can contribute to the frequency of catastrophe. *Mol Biol Cell*; DOI: 10.1091/mbc.E16-03-0199
- 29 Cassimeris L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol*; DOI: 10.1016/s0955-0674(01)00289-7
- 30 Tian X, Tian Y, Moldobaeva N et al. Microtubule dynamics control HGF-induced lung endothelial barrier enhancement. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0105912
- 31 Yip YY, Yeap YYC, Bogoyevitch MA et al. cAMP-dependent protein kinase and c-Jun N-terminal kinase mediate stathmin phosphorylation for the maintenance of

- interphase microtubules during osmotic stress. *J Biol Chem*; DOI: 10.1074/jbc.M113.470682
- 32 Lawler S. Microtubule dynamics: if you need a shrink try stathmin/Op18. *Curr Biol*; DOI: 10.1016/s0960-9822(98)70128-9
- 33 Martel G, Uchida S, Hevi C et al. Genetic Demonstration of a Role for Stathmin in Adult Hippocampal Neurogenesis, Spinogenesis, and NMDA Receptor-Dependent Memory. *J Neurosci*; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4541-14.2016
- 34 Ding X, Hu J, Zhang H et al. Genetic Variants in the STMN1 Transcriptional Regulatory Region Affect Promoter Activity and Fear Behavior in English Springer Spaniels. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0158756
- 35 Koppel J, Bouterin MC, Doye V et al. Developmental tissue expression and phylogenetic conservation of stathmin, a phosphoprotein associated with cell regulations. *J Biol Chem* 1990; 265 (7): 3703–3707
- 36 Müller T, Schrötter A, Loose C et al. A ternary complex consisting of AICD, FE65, and TIP60 down-regulates Stathmin1. *Biochim Biophys Acta*; DOI: 10.1016/j.bbapap.2012.07.017
- 37 Mastronardi FG, Moscarello MA. Molecules affecting myelin stability: a novel hypothesis regarding the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res*; DOI: 10.1002/jnr.20420
- 38 Jastorff AM, Haegler K, Maccarrone G et al. Regulation of proteins mediating neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proteomics Clin Appl*; DOI: 10.1002/prca.200800155
- 39 Wen H-L, Lin Y-T, Ting C-H et al. Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*; DOI: 10.1093/hmg/ddq058
- 40 Gagliardi D, Pagliari E, Meneri M et al. Stathmins and Motor Neuron Diseases: Pathophysiology and Therapeutic Targets. *Biomedicines*; DOI: 10.3390/biomedicines10030711
- 41 Paulson L, Martin P, Persson A et al. Comparative genome- and proteome analysis of cerebral cortex from MK-801-treated rats. *J Neurosci Res*; DOI: 10.1002/jnr.10509

- 42 Katayama T, Hattori T, Yamada K et al. Role of the PACAP-PAC1-DISC1 and PACAP-PAC1-stathmin1 systems in schizophrenia and bipolar disorder: novel treatment mechanisms? *Pharmacogenomics*; DOI: 10.2217/pgs.09.147
- 43 Teyssier J-R, Chauvet-Gelinier J-C, Ragot S et al. Up-regulation of leucocytes genes implicated in telomere dysfunction and cellular senescence correlates with depression and anxiety severity scores. *PLoS ONE*; DOI: 10.1371/journal.pone.0049677
- 44 Cao C, Wang L, Wang R et al. Stathmin genotype is associated with reexperiencing symptoms of posttraumatic stress disorder in Chinese earthquake survivors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*; DOI: 10.1016/j.pnpbp.2013.04.004
- 45 Shumyatsky GP, Malleret G, Shin R-M et al. stathmin, a gene enriched in the amygdala, controls both learned and innate fear. *Cell*; DOI: 10.1016/j.cell.2005.08.038
- 46 Stjepanović D, Lorenzetti V, Yücel M et al. Human amygdala volume is predicted by common DNA variation in the stathmin and serotonin transporter genes. *Translational Psychiatry*; DOI: 10.1038/tp.2013.41
- 47 Janak PH, Tye KM. From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*; DOI: 10.1038/nature14188
- 48 Shumyatsky GP, Tsvetkov E, Malleret G et al. Identification of a signaling network in lateral nucleus of amygdala important for inhibiting memory specifically related to learned fear. *Cell*; DOI: 10.1016/s0092-8674(02)01116-9
- 49 Tsvetkov E, Carlezon WA, Benes FM et al. Fear conditioning occludes LTP-induced presynaptic enhancement of synaptic transmission in the cortical pathway to the lateral amygdala. *Neuron*; DOI: 10.1016/s0896-6273(02)00645-1
- 50 Martel G, Nishi A, Shumyatsky GP. Stathmin reveals dissociable roles of the basolateral amygdala in parental and social behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A*; DOI: 10.1073/pnas.0807507105
- 51 Brocke B, Lesch K-P, Armbruster D et al. Stathmin, a gene regulating neural plasticity, affects fear and anxiety processing in humans. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*; DOI: 10.1002/ajmg.b.30989

- 52 Ehlis A-C, Bauernschmitt K, Dresler T et al. Influence of a genetic variant of the neuronal growth associated protein Stathmin 1 on cognitive and affective control processes: an event-related potential study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*; DOI: 10.1002/ajmg.b.31161
- 53 Bennett P. Demystified ... microsatellites. *MP, Mol Pathol*; DOI: 10.1136/mp.53.4.177
- 54 Tóth G, Gáspári Z, Jurka J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res*; DOI: 10.1101/gr.10.7.967
- 55 Weller P, Jeffreys AJ, Wilson V et al. Organization of the human myoglobin gene. *EMBO J* 1984; 3 (2): 439–446
- 56 Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 1989; 44 (3): 397–401
- 57 Abecasis GR, Altshuler D, Auton A et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*; DOI: 10.1038/nature09534
- 58 Tautz D, Trick M, Dover GA. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*; DOI: 10.1038/322652a0
- 59 Kashi Y, King D, Soller M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet*; DOI: 10.1016/s0168-9525(97)01008-1
- 60 Moxon ER, Wills C. DNA microsatellites: agents of evolution? *Sci Am*; DOI: 10.1038/scientificamerican0199-94
- 61 Levinson G, Gutman GA. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol*; DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040442
- 62 Pearson CE, Sinden RR. Trinucleotide repeat DNA structures: dynamic mutations from dynamic DNA. *Curr Opin Struct Biol*; DOI: 10.1016/s0959-440x(98)80065-1
- 63 Klitschar M, Dauber E-M, Ricci U et al. Haplotype studies support slippage as the mechanism of germline mutations in short tandem repeats. *Electrophoresis : liquid phase separation techniques : microfluidics, nanoanalysis, proteomics* 2004; 25 (20): 3344–3348

- 64 Budworth H, McMurray CT. A brief history of triplet repeat diseases. *Methods Mol Biol*; DOI: 10.1007/978-1-62703-411-1_1
- 65 Ballon N, Leroy S, Roy C et al. (AAT)_n repeat in the cannabinoid receptor gene (CNR1): association with cocaine addiction in an African-Caribbean population. *The Pharmacogenomics Journal*; DOI: 10.1038/sj.tpj.6500352
- 66 Heupel JK, Reif A. Stathmin als Kandidatengen für Cluster C Persönlichkeitsstörungen, Panikstörung und Agoraphobie [Würzburg, Universität Würzburg, Diss., 2013]. Würzburg. Im Internet: nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:20-opus-81989
- 67 Montenarh M. Replikation und Gentechnik. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer
- 68 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*; DOI: 10.1093/nar/16.3.1215
- 69 Martin Armbrrecht. Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen. Im Internet: www.eppendorf.com/product-media/doc/de/59828/Eppendorf_Detection_Application-Note_279_BioPhotometer-D30_Detection-contamination-DNA-protein-samples-photometric-measurements.pdf
- 70 Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. 7., aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013
- 71 Mullis K, Faloona F, Scharf S et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; DOI: 10.1101/sqb.1986.051.01.032
- 72 *Kück U*, Hrsg. *Praktikum der Molekulargenetik: Mit 40 Tabellen*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 2005
- 73 STMN1 stathmin 1 [Homo sapiens (human)]. Im Internet: www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3925
- 74 Ye J. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction

- 75 Su XZ, Wu Y, Sifri CD et al. Reduced extension temperatures required for PCR amplification of extremely A+T-rich DNA. *Nucleic Acids Res*; DOI: 10.1093/nar/24.8.1574
- 76 Christen P, Jaussi R, Benoit R. *Biochemie und Molekularbiologie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten*. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum; 2016
- 77 New England BioLabs Inc. HindIII. Im Internet: international.neb.com/products/r0104-hindiii
- 78 New England BioLabs Inc. XhoI. Im Internet: international.neb.com/products/r0146-xhoi
- 79 Promega Corporation. pGL4.23[luc2/minP] Vector. Im Internet: nld.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/a/pgl423-vector.pdf?la=en
- 80 Marinus MG, Løbner-Olesen A. DNA Methylation. *EcoSal Plus*; DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2013
- 81 New England BioLabs Inc. Antarctic Phosphatase. Im Internet: international.neb.com/products/m0289-antarctic-phosphatase
- 82 Thermo Scientific. T4 DNA Ligase, 5 Weiss U/μL. Im Internet: assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011987_T4_DNA_Ligase_5_Weiss_1000_Weiss_U_U_G.pdf
- 83 Panja S, Aich P, Jana B et al. How does plasmid DNA penetrate cell membranes in artificial transformation process of *Escherichia coli*? *Mol Membr Biol*; DOI: 10.1080/09687680802187765
- 84 Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*; DOI: 10.1093/nar/7.6.1513
- 85 Byrne F. Investigation of stathmin's role in neuroblastoma drug resistance, differentiation and metastasis 2012
- 86 Murillo JR, Goto-Silva L, Sánchez A et al. Quantitative proteomic analysis identifies proteins and pathways related to neuronal development in differentiated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *EuPA Open Proteom*; DOI: 10.1016/j.euprot.2017.06.001

- 87 Kovalevich J, Langford D. Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods Mol Biol*; DOI: 10.1007/978-1-62703-640-5_2
- 88 Gstraunthaler G, Lindl T. *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2013
- 89 Promega Corporation. pGL4.74[hRluc/TK] Vector. Im Internet: nld.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/a/pgl474-vector.pdf?la=en
- 90 Gomi K, Kajiyama N. Oxyluciferin, a luminescence product of firefly luciferase, is enzymatically regenerated into luciferin. *J Biol Chem*; DOI: 10.1074/jbc.M105528200
- 91 Shimomura O, Johnson FH. Chemical nature of bioluminescence systems in coelenterates. *Proc Natl Acad Sci U S A*; DOI: 10.1073/pnas.72.4.1546
- 92 Bortz J, Schuster C. *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler: Mit 163 Tabellen*. Limitierte Sonderausgabe, 7., vollständig überarberarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2016
- 93 Brownie J, Shawcross S, Theaker J et al. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Res*; DOI: 10.1093/nar/25.16.3235

I Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Cytosin
CEU	<i>Cohesive End Ligation Unit</i>
dam	DNA-Adenin-Methyltransferase
ddATP	Desoxyadenosintriphosphat
dcm	DNA-Cytosin-Methyltransferase
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM/F-12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DOPE	Dioleoylphosphatidylethanolamin
dsDNA	Doppelsträngige DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (1g = 9.81 Meter pro Sekunde)
kb	Kilo-Basenpaaren (= 1000 Basenpaare)
kD	Kilodalton
l	Liter
LA	Nucleus lateralis
LAR II	<i>Luciferase Assay Reagent II</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar (1 mM = 1 mmol/l)
mmol	Millimol

N	Stickstoff
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nt	Nukleotide
ori	Origin Of <i>Replication</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylen Glycol
Pfu	Pyrococcus furiosus
RB3	<i>Stathmin-like protein B3</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SCG10	<i>Superior cervical ganglion-10</i>
SCLIP	<i>SCG10-like protein</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SLD	Stathmin-like Domäne
SSRs	<i>Simple Sequence Repeats</i>
Stmn1	Stathmin 1
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
T	Thymin
TAE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
V	Volt
v/v	Volumenprozent
λ	Lambda
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
%	Prozent
°C	Grad Celsius

II Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Fig. 1 Organisation der Domäne und Ähnlichkeit der Aminosäuren-Sequenz der Stathmin-Familie (Quelle des Bildes: [8])

(Das *Copyright* für die Verwendung des Bildes wurde über das Copyright Clearance Center, Inc. erworben)

Fig. 2 RB3-Tubulin-Komplex (Quelle: [21])

(Das *Copyright* für die Verwendung des Bildes wurde über das Copyright Clearance Center, Inc. erworben)

Fig. 3 Optimierungs-PCR mit drei verschiedenen DNA-Proben

Fig. 4 Schnittstellen der Restriktionsenzyme HindIII und XhoI [77, 78]

(Die Abbildung wurde eigenständig nach den Informationen aus den angegebenen Quellen erstellt.)

Fig. 5 Der pGL4.23-Vektor [79]

(Die Verwendung des Bildes wurde nach Kontaktaufnahme mit Frau Dr. Anette Leue der Firma Promega genehmigt.)

Fig. 6 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte

Fig. 7 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte mit Ligationsprodukten als DNA-*Template*

Fig. 8 Agarosegelelektrophorese der PCR-Produkte mit gepickten Bakterienkolonien als DNA-*Template*

Fig. 9 Darstellung der relativen Luciferase-Aktivitäten der einzelnen Messreihen

(Der Boxplot wurde eigenständig mit dem Programm Excel erstellt.)

Fig. 10 Darstellung der z-Werte der relativen Luciferase-Aktivität aller Messreihen

(Der Boxplot wurde eigenständig mit dem Programm Excel erstellt.)

Tabelle 1: PCR-Ansatz für die Amplifikation eines DNA-Abschnitts des *Stathmin*-Gens

Tabelle 2: Einstellungen des *Thermocyclers* für die Amplifikation eines DNA-Abschnitts des *Stathmin*-Gens mittels PCR

Tabelle 3: Ansatz für den Restriktionsverdau des amplifizierten DNA-Abschnittes

Tabelle 4: Ansatz für den Restriktionsverdau des Vektors pGL4.23

Tabelle 5: Ansatz für die Ligation des amplifizierten DNA-Abschnittes in den Plasmidvektor pGL4.23

Tabelle 6: Ansatz für die PCR zur Überprüfung der Ligation des pGL4.23-Vektors mit dem Insert

Tabelle 7: Einstellungen des *Thermocyclers* für die PCR zur Überprüfung der Ligation des pGL4.23-Vektors mit dem Insert

Tabelle 8: Ansatz für die Kolonie-PCR zur Identifikation der pGL4.23-Vektoren mit Insert

Tabelle 9: Einstellungen des *Thermocyclers* für die die Kolonie-PCR zur Identifikation der pGL4.23-Vektoren mit Insert

Alle Tabellen wurden eigenständig erstellt.

III Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas Reif bedanken. Für seine Unterstützung, seine wertvollen Ratschläge sowie seine Geduld bin ich überaus dankbar. Darüber hinaus bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas und die Bewertung dieser Doktorarbeit sowie die mir ermöglichte Arbeit im Labor.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Romanos für die Übernahme der Zweitkorrektur dieser Doktorarbeit.

Auch gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Reif, hier im Besonderen Dr. Heike Weber, Joyce Auer und Theresia Töpner für die gute Betreuung, die hilfreichen Ratschläge sowie die wissenschaftliche Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie sowie bei meinem Freund bedanken, deren Unterstützung und stetiger Glaube in mich zur Vollendung dieser Doktorarbeit geführt haben.

IV Eidesstattliche Erklärung

Vorname, Name: Annika Wiebke Müller

Straße: Geldershofstraat 21

Postleitzahl / Ort: 6663KN Nijmegen, Niederlande

Eidesstattliche Erklärung

für die Publikation meiner an der

Medizinischen Fakultät

der Universität Würzburg angefertigten Dissertation.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation mit dem Titel Funktionalität eines *Stathmin*-Promotor-Polymorphismus eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die vorgelegte Dissertation wurde bisher bei keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form eingereicht; sie ist nicht identisch mit einer von mir verfassten Magister-, Diplom- oder Zulassungsarbeit.

Die meinem Promotionsverfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg sind mir bekannt.

Nijmegen, den 07.12.2022