

**Strukturelle und funktionelle Untersuchung der Promotorregionen der
menschlichen *PAX3*-, *PAX6*- und *PAX7*-Gene: Bedeutung von
Polymorphismen für schizophrene Erkrankungen**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Yana Sygaylo
aus
Elektrostal, Russische Föderation

Würzburg 2002

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung:
Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meiner Grossmutter
T. S. Malachova

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Okladnova, O., Syagailo, Y.V., Tranitz, M., Stöber, G., Riederer, P., Mössner, R., Lesch, K.P. (1998). **A promoter-associated polymorphic repeat modulates *PAX-6* expression in human brain.** Biochem Biophys Res Commun 248, 402-5.

Okladnova, O., Syagailo, Y.V., Tranitz, M., Riederer, P., Stöber, G., Mössner, R., Lesch, K.P. (1999). **Functional characterization of the human *PAX3* gene regulatory region.** Genomics 57, 110-9.

Stöber, G., Syagailo, Y.V., Okladnova, O., Jungkunz, G., Knapp, M., Beckmann, H., Lesch, K.P. (1999). **Functional *PAX-6* gene-linked polymorphic region: potential association with paranoid schizophrenia.** Biol Psychiatry 45, 1585-91.

Deckert, J., Catalano, M., Syagailo, Y.V., Bosi, M., Okladnova, O., Di Bella, D., Nöthen, M.M., Maffei, P., Franke, P., Fritze, J., Maier, W., Propping, P., Beckmann, H., Bellodi, L., Lesch, K.P. (1999). **Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder.** Hum Mol Genet 8, 621-4.

Syagailo, Y.V., Stöber, G., Grässle, M., Reimer, E., Knapp, M., Jungkunz, G., Okladnova, O., Meyer, J., Lesch, K.P. (2001). **Association analysis of the functional monoamine oxidase A gene promoter polymorphism in psychiatric disorders.** Am J Med Genet 105, 168-71.

Syagailo, Y.V., Okladnova, O., Reimer, E., Grässle, M., Mössner, R., Gattenlöhner, S., Marx, A., Meyer, J., Lesch, K.P. (2002). **Structural and functional characterization of the human *PAX7* 5'-flanking regulatory region.** Gene 294, 259-68.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	5
Abkürzungen.....	8
1. Einleitung	10
1.1. Die Familie der Pax-Gene	10
1.2. Pax3, Pax6 und Pax7	12
1.2.1. Pax3, Pax6 und Pax7 in der Neurogenese	12
1.3. Pax3, Pax7 und Somitogenese.....	16
1.4. Organogenese und Sinnesorgane	18
1.5. Pax3, Pax7 und Oncogenese	19
1.6. Neuroentwicklungshypothese der Schizophrenie	19
1.7. Assoziationsstudien: eine Strategie für die Identifizierung der Kandidatengene bei komplexen Erkrankungen	22
2. Material und Methoden	24
2.1. Material	24
2.1.1. Patienten und gesunde Probanden.....	24
2.1.2. Zelllinien.....	24
2.1.3. Bakterienstämme.....	25
2.1.4. Bibliotheken.....	25
2.1.5. Vektoren.....	25
2.1.6. Synthetische Oligonukleotide	25
2.1.7. Chemikalien und sonstige Reagenzien.....	26
2.1.8. Reagenziensätze („Kits“)	28
2.1.9. Sterilisation	29
2.1.10. Puffer und Stammlösungen.....	29
2.1.11. Medien, Agarplatten und Antibiotika.....	34
2.1.11.1. Medien für Bakterien.....	34
2.1.11.2. Antibiotika	34
2.1.11.3. X-Gal-Platten.....	34
2.1.12. Medien für Zellkultur.....	35
2.1.13. Geräte.....	35
2.1.14. Gebrauchsgüter.....	36
2.2. Methoden.....	37
2.2.1. Isolierung von Nucleinsäuren	37
2.2.1.1. Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe	37
2.2.1.2. Isolierung grösserer Mengen von Plasmid-DNA	38
2.2.1.3. Minipräparation von Plasmid-DNA.....	39
2.2.1.4. Plasmid-Minipräparation nach Qiagen-Protokoll	39
2.2.1.5. Isolierung von PAC-DNA im grossen Massstab	40
2.2.1.6. Isolierung von Gesamt-RNA	41
2.2.1.7. Isolierung von poly(A) ⁺ -RNA	42
2.2.1.8. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	42
2.2.2. Enzymatische Modifikation und Klonierungstechniken von DNA.....	43
2.2.2.1. DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen.....	43
2.2.2.2. Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden	44
2.2.2.3. Ligation eines DNA-Inserts in einen Plasmid-Vektor	44
2.2.2.4. Klonierung von PCR-Produkten	44
2.2.2.5. Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	45
2.2.2.6. Hitzetransformation von Bakterien.....	46
2.2.2.7. Elektroporation	46

2.2.3.	Gelelektrophorese von DNA und RNA	47
2.2.3.1.	Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.2.3.2.	Längenstandards	47
2.2.3.3.	Präparation von DNA aus Agarosegelen	48
2.2.3.4.	Elektrophorese von RNA im Agarosegel.....	48
2.2.3.5.	Hochauflösende Polyacrylamidgelelektrophorese	49
2.2.4.	Transfer von DNA-Fragmenten: Southern-Blotting	49
2.2.5.	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	50
2.2.6.	Aufreinigung radioaktiver DNA-Sonden.....	51
2.2.7.	Endmarkierung von Oligonukleotiden und 5'-dephosphorylierte DNA-Leiter	51
2.2.8.	Synthese radioaktiv markierter RNA-Sonde.....	52
2.2.8.1.	Herstellung der radioaktiv markierten <i>PAX3</i> -RNA-Probe für Ribonuklease- Protektionsassay.....	52
2.2.9.	Hybridisierung radioaktiver Sonden an membrangebundener RNA.....	52
2.2.10.	Hybridisierung radioaktiver Sonden an membrangebundener DNA	53
2.2.11.	DNA-Sequenzierung.....	53
2.2.11.1.	Radioaktive Sequenzierung mit [α - ³⁵ S]dATP	54
2.2.11.2.	Nicht-radioaktive Sequenzierung.....	54
2.2.12.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	55
2.2.13.	RT-PCR	57
2.2.14.	Kompetitive PCR.....	57
2.2.14.1.	Kompetitive PCR für die Quantifizierung von <i>PAX6</i> -mRNA	59
2.2.15.	Methoden zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes	60
2.2.15.1.	5'-RACE (<i>5' Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)	60
2.2.15.2.	Primer-Extension-Analyse.....	63
2.2.15.3.	Ribonuklease-Protektionsassay.....	64
2.2.16.	Reporterassay	65
2.2.16.1.	Kultivieren von Zellen.....	65
2.2.16.2.	Herstellung der Reportergenkonstrukten des <i>PAX3</i> -Promotors	65
2.2.16.3.	Herstellung der Reportergenkonstrukten des <i>PAX7</i> -Promotors	66
2.2.16.4.	Herstellung der Reportergenkonstrukten des <i>MAOA</i> -Promotors	67
2.2.16.5.	Transfektion.....	67
2.2.16.6.	Lysis von Zellen.....	68
2.2.16.7.	Luciferase-Assay.....	68
2.2.16.8.	β -Galaktosidase-Assay	68
2.2.16.9.	Proteinbestimmung	69
3.	Ergebnisse.....	70
3.1.	Charakterisierung und funktionelle Untersuchung des mit dem <i>PAX6</i>-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus	70
3.1.1.	Bestimmung der Allelverteilung innerhalb einer Kontrollgruppe.....	70
3.1.2.	Funktionelle Untersuchung des mit dem <i>PAX6</i> -Gen assoziierten Promotorpolymorphismus	72
3.2.	Assoziationsanalyse der <i>PAX6</i>-LPR und der Schizophrenie.....	74
3.3.	Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Promotorregion des menschlichen <i>PAX3</i>-Gens	77
3.3.1.	Isolierung der 5'-flankierenden regulatorischen Region des humanen <i>PAX3</i> -Gens	77
3.3.2.	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des <i>PAX3</i> -Gens.....	79
3.3.2.1.	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des <i>PAX3</i> -Gens mittels Primer-Extension.....	79
3.3.2.2.	Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des <i>PAX3</i> -Gens mittels Ribonuklease- Protektion-Analyse	80
3.3.3.	Promotoraktivität und Analyse der regulatorischen Elemente in Promotorregion des <i>PAX3</i> -Gens	83
3.3.3.1.	Computergestützte Analyse potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in der Promotorregion des <i>PAX3</i> -Gens	83
3.3.3.2.	Analyse der Promotoraktivität des <i>PAX3</i> -Gens	83
3.3.4.	Charakterisierung und funktionelle Untersuchung des mit dem <i>PAX3</i> -Gen assoziierten Promotorpolymorphismus.....	86
3.3.4.1.	Bestimmung der Allelverteilung innerhalb der Kontrollgruppe	87
3.3.4.2.	Funktionelle Untersuchung des mit dem <i>PAX3</i> -Gen assoziierten Promotorpolymorphismus.....	88

3.4. Assoziationsanalyse der PAX3-LPR und der Schizophrenie.....	89
3.5. Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Promotorregion des menschlichen PAX7-Gens	92
3.5.1. Isolierung der 5'-flankierenden regulatorischen Region des humanen <i>PAX7</i> -Gens	92
3.5.2. Expressionsanalyse des <i>PAX7</i> -Gens	93
3.5.3. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des <i>PAX7</i> -Gens	95
3.5.3.1. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des <i>PAX7</i> -Gens mittels Primer-Extension	95
3.5.3.2. 5'-RACE (<i>5'-Rapid Amplifikation of c-DNA Ends</i>).....	96
3.5.4. Promotoraktivität und Analyse der regulatorischen Elemente in Promotorregion des <i>PAX7</i> -Gens	97
3.5.5. Charakterisierung und funktionelle Untersuchung des mit dem <i>PAX7</i> -Gen assoziierten Promotorpolymorphismus.....	101
3.5.5.1. Bestimmung der Allelverteilung innerhalb einer Kontrollgruppe	101
3.5.5.2. Funktionelle Untersuchung des mit dem <i>PAX7</i> -Gen assoziierten Promotorpolymorphismus.....	102
3.6. Assoziationsanalyse der PAX7-LPR und der Schizophrenie.....	103
4. Anhang: Assoziationsanalyse des mit dem MAOA-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus und psychischer Erkrankungen.....	105
5. Diskussion.....	110
5.1. Promotorregion des menschlichen <i>PAX3</i> -Gens	110
5.2. Promotorregion des menschlichen <i>PAX7</i> -Gens	114
5.3. Polymorphe repetitive Elemente in den Promotorregionen der <i>PAX3</i> -, <i>PAX6</i> - und <i>PAX7</i> -Genen	117
5.4. Assoziationsanalysen von Polymorphismen der <i>PAX3</i> -, <i>PAX6</i> - und <i>PAX7</i> -Promotorregionen mit der Schizophrenieerkrankung.....	124
6. Zusammenfassung	127
7. Summary	130
8. Literaturverzeichnis	132
9. Lebenslauf	149
10. Danksagung.....	150

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
etc.	<i>et cetera</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
FKHR	<i>Fork Head Domain-Gen</i>
g	Gramm
GAP-43	<i>growth-associated protein 43</i>
GAPDH	D-Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
IAA	Isoamylalkohol
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilo-Basen
l	Litr
LB	Luria-Bertoni-Nährmedium
M	Molar (mol/l)
mA	Milliamper
MAOA	Monoaminoxidase A
MAOA-LPR	mit dem <i>MAOA</i> -Gen verbundene polymorphe Region
min	Minuten
Mio.	Million
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MOPS	3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure
μCi	Mikrocurie (1 Ci = 3,7x10 ¹⁰ Bequerel)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
N-CAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PAC	<i>P1-derived artificial chromosome</i>
Pax	Paired-Box enthaltendes Protein
<i>Pax</i>	für Paired-Box enthaltendes Protein kodierendes Gen
PAX-LPR	mit dem <i>PAX</i> -Gen verbundene polymorphe Region
PBS	Phosphat-gepufferte Saline-Lösung
pc	<i>post coitum</i>

PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDGFR α	<i>platelet-derived growth factor receptor α</i>
pmol	picomol
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription/ Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Unit
u.a.	unter anderen
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
V	Volt
W	Watt
w/v	<i>weight/volume</i>
Vol.	Volumen
v/v	<i>volume/volume</i>
X-Gal	5- Bromo -4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Die Familie der *Pax*-Gene

Pax-Gene sind eine Familie von Entwicklungsgenen, die für nukleare Transkriptionsfaktoren kodieren. Die *Pax*-Gene wurden auf Grund der Sequenzhomologie zu *Drosophila melanogaster*-Segmentierungsgenen identifiziert (Bopp et al., 1986; Deutsch et al., 1988). Charakteristisch für diese Gene ist das Vorhandensein einer Paired-Box (Pax), ein konserviertes Aminosäuremotiv mit DNA-Bindungsaktivität (Noll, 1993; Treisman et al., 1991). Zusätzlich zur Paired-Domäne (128 Aminosäuren) enthalten die Gene ein zweites konserviertes DNA-Bindungsmotiv, die Paired-ähnliche Homeodomäne (61 Aminosäuren). Eine andere charakteristische strukturelle Eigenschaft ist ein Protein-Protein-Interaktionsmotiv, ein sogenanntes Octapeptid (OP), das sich zwischen Paired- und Homeodomänen befindet. Die Gene, welche eine Paired-Box enthalten, sind über viele systematische Gruppen hoch konserviert und wurden im Genom von Vertebraten, Arthropoden, Mollusken, Cestoden und Ascidien gefunden (Gruss and Walther, 1992).

Neun verschiedene Mitglieder der Pax-Genfamilie wurden aus dem Genom von Mäusen und Menschen isoliert und als *Pax1* (*PAX1* beim Menschen) bis *Pax9* (*PAX9*) bezeichnet (Tremblay and Gruss, 1994). Die Gene werden in vier paralogen Gruppen entsprechend ihrer Strukturähnlichkeiten und Paired-Domäne-Homologie aufgeteilt (siehe Tabelle 1.1) (Deutsch and Gruss, 1991; Walther et al., 1991). Paraloge Gene, die zu einer Genklasse zusammengefasst sind, entstanden wahrscheinlich als Ergebnis von Duplikation- und Divergenz-Prozessen in der Evolution (Bopp et al., 1986; Frigerio et al., 1986; Kessel and Gruss, 1990; Schubert et al., 1993). Die Klassifikation der Gene erfolgte in Anlehnung an Ähnlichkeit in ihrer Exon-Intron-Struktur, ihre Proteinstruktur und ihre Expressionsmuster.

Die erste Genklasse besteht aus *Pax1* und *Pax9*, die eine Paired-Domäne und eine hoch konservierte Octapeptidsequenz kodieren, aber keine Homeodomänesequenz enthalten. Die zweite Klasse ist durch *Pax3* und *Pax7* vertreten, die zusätzlich zu diesen zwei Sequenzen auch eine vollständige Homeodomäne kodieren. *Pax2*, *Pax5* und *Pax8* bilden die dritte Klasse. Die Gene kodieren für je eine Paired-Domäne, ein Octapeptid und nur partiell für die Homeodomäne. *Pax4* und *Pax6* aus der vierten Klasse kodieren für die Paired- und Homeodomäne, aber nicht für das Octopeptid.

Alle *Pax*-Gene werden während der Embryogenese ab ungefähr 8-9,5 Tage *post coitum* (pc) exprimiert (Tremblay and Gruss, 1994). Man beobachtet ihre Expression zeitlich und räumlich reguliert entlang der ganzen antero-posterioren Achse. Diese Expression findet während der gesamten Entwicklung statt und kann in einigen Fällen in adulten Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Im allgemeinen werden die *Pax*-Gene, welche eine Homeobox enthalten, früher exprimiert, wobei ihre Expression vorwiegend auf mitotisch aktive Zellen beschränkt ist. Dagegen scheinen die *Pax*-Gene, die keine Homeobox enthalten, eher an Regulationsprozessen in differenzierenden Zellen beteiligt zu sein. Während der Neurogenese und Organogenese spielen *Pax*-Gene eine wichtige Rolle bei einigen induktiven Prozessen, in der Differenzierung spezieller Zelltypen und in der Etablierung verschiedener anatomischer Grenzen.

Tabelle 1.1. *Pax*-Gene: Grundstruktur, Lokalisation, Maus-Mutante und assoziierte menschliche Erkrankungen

<i>Pax</i> -Gene	Genstruktur		Lokalisation		Maus-Mutante		Menschliche Syndrome
	Paired-Domäne	OP Homeo-Domäne	Maus	Mensch	natürlich	<i>Knock-out</i>	
Gruppe I <i>Pax1</i> <i>Pax9</i>			2 12	20p11 14q12-q13	Undulated nicht bekannt	- +	nicht bekannt Oligodontie
Gruppe II <i>Pax2</i> <i>Pax5</i> <i>Pax8</i>			19 4 2	10q25 9p13 2q12-q14	<i>Kdr.Pax2^{neu}</i> nicht bekannt nicht bekannt	+ + +	Renales Colobom nicht bekannt Angeborener Hypothyroidismus
Gruppe III <i>Pax3</i> <i>Pax7</i>			1 4	2q35 1p36.2	<i>Splotch</i> nicht bekannt	- +	Waardenburg I, III nicht bekannt
Gruppe IV <i>Pax4</i> <i>Pax6</i>			6 2	7q32 11p13	nicht bekannt <i>Small eye</i>	+ -	nicht bekannt Aniridie, Peter's Anomalie

Helix-Struktur

Einer Reihe pathologischer Zustände bei Menschen und Mäusen werden Mutationen innerhalb der *Pax*-Genfamilie zugeordnet, die in Tabelle 1.1 dargestellt sind. Zusätzlich ist eine aberrante Regulation von *Pax*-Genen in der humanen Tumorgenese involviert. Dies veranschaulicht, dass eine pathologische Hochregulation oder auch Herunterregulation der Gene dramatische Konsequenzen auf Entwicklungsprozesse und auf das Sicherstellen der normalen Funktionen von unterschiedlichen Gewebearten hat.

1.2. *Pax3, Pax6 und Pax7*

1.2.1. *Pax3, Pax6 und Pax7 in der Neurogenese*

Die Zellen des Nervensystems stammen vom Ektoderm, der äusseren Schicht des Embryos. Innerhalb des Ektoderms leiten sich die Zellen, die im weiteren zu Neuronen und Gliazellen werden, von einer speziellen Zellschicht, die als Neuralplatte bezeichnet wird, ab. Nachdem sich die Neuralplatte in eine rohrähnliche Struktur, das sogenannte Neuralrohr, zusammengefaltet hat, teilt sich das ursprüngliche Ektoderm in drei Zellengruppen: 1) das innen plazierte Neuralrohr, das im weiteren das Gehirn und das Rückenmark bildet; 2) die äusserlich plazierte Epidermis der Haut; 3) die Zellen der Neuralkrone, die aus dem Bereich zwischen Neuralrohr und Epidermis auswandern und sich in den späteren Entwicklungsphasen in periphere Neurone und Gliazellen, Pigmentzellen der Haut und einige andere Zelltypen differenzieren. Am vorderem Ende des Neuralrohrs entstehen die drei sogenannten Hirnbläschen, aus welchen sich die Vorläufer der drei Hauptbereiche des Gehirns entwickeln: Prosencephalon oder Vorderhirn (Hirnrinde und basale Ganglia), Mesencephalon oder Zwischenhirn und Rhombencephalon oder Hinterhirn. In der späteren Entwicklung bilden sich zwei Strukturen aus dem primitiven Vorderhirn aus: Das Telencephalon, woraus die zerebralen Hemisphären entstehen, und das Diencephalon, Vorläufer von Thalamus und Hypothalamus. In dieser Phase der Entwicklung bleibt das Mesencephalon ungetrennt. Aus dem Rhombencephalon entstehen Metencephalon (Pons und Zerebellum) und Myelencephalon (Medulla).

Pax3, *Pax6* und *Pax7* gehören zu der früh exprimierten Gruppe der *Pax*-Gene. Ihr Expressionsmuster wurde am besten in der murinen Embryogenese (Goulding et al., 1991; Jostes et al., 1991; Walther and Gruss, 1991) untersucht (Abb. 1.1). Im Falle der *Pax3*- und *Pax6*-Gene stimmt ihr Expressionsmuster während der frühen Emryonalentwicklung bei Menschen (Gerard et al., 1995; Terzic and Saraga-Babic, 1999) mit aus Maus- und Hühnerembryo (Goulding et al., 1993b) gewonnenen Daten überein.

In der murinen Embryogenese wurde die Expression aller drei Gene im Stadium der drei Hirnbläschen (Tage 8-8,5 p.c.) in den mitotisch aktiven Zellen des ventrikulären Neuroepitheliums oder der sogenannten ventrikulären Zone entlang der anterior-posterioren Achse des Neuralrohrs beobachtet. Die *Pax3*-Expression setzt früher als die der anderen *Pax*-Gene an und wird noch vor der Schliessung des Neuralrohrs detektiert. Seine Expression ist

essentiell für die vollständige Faltung der Neuralplatte. Die Expression von *Pax6* und *Pax7* fängt mit der Schliessung des Neuralrohrs an. Die ventrikuläre Zone ist eine aktiv proliferierende Schicht von Zellen und generiert eine Population der Stammzellen für das zentrale Nervensystem (ZNS).

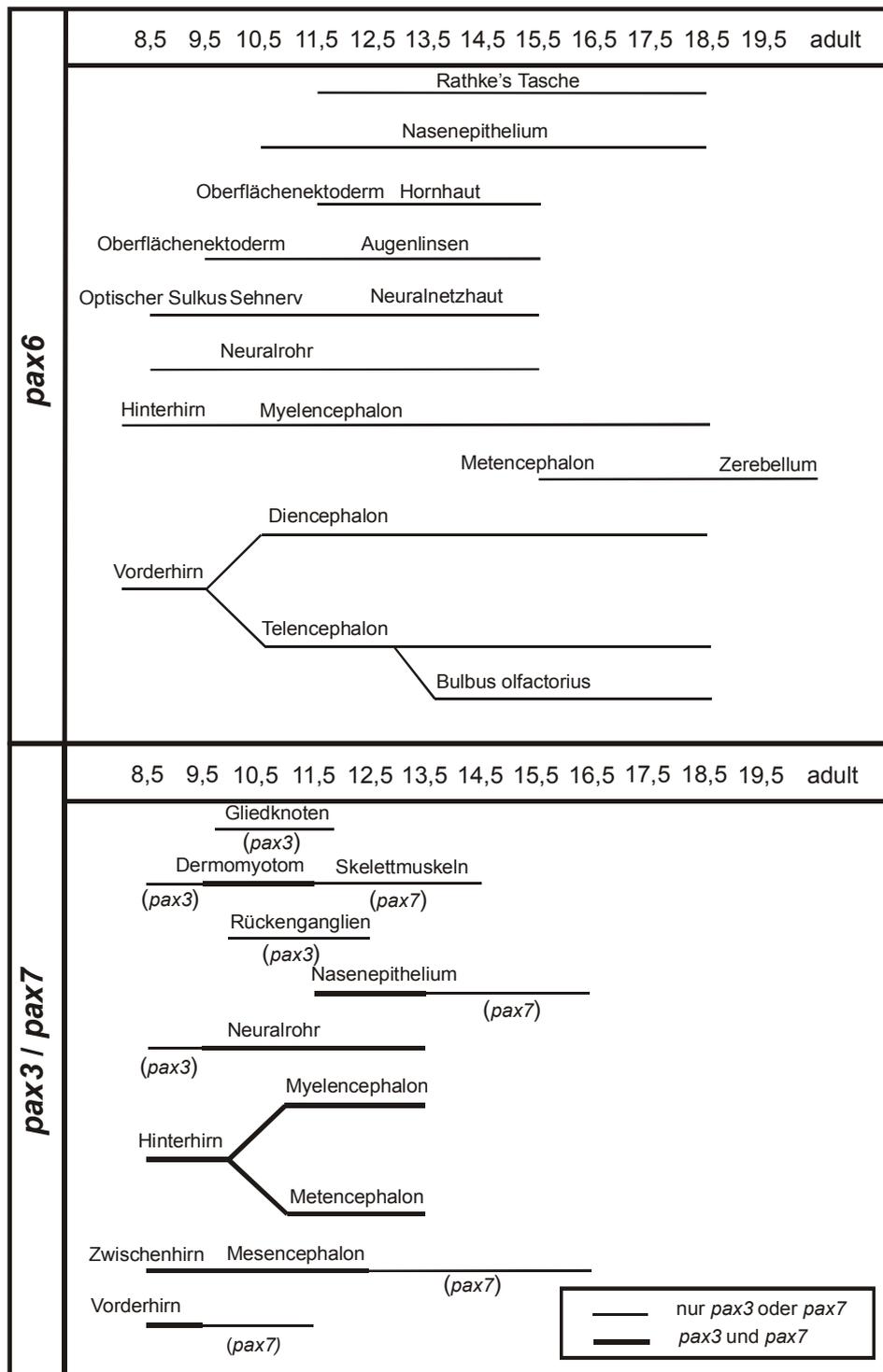


Abb. 1.1. Schematische Darstellung der Expression der *Pax6*-, *Pax3*- und *Pax7*-Gene während der Entwicklung

Die Expression von *Pax6* beschränkt sich auf die basale und intermediäre Platte des Neuralrohrs mit Ausnahme der Bodenplatte (*floor plate*). *Pax3* und *Pax7* werden im dorsalen Teil des Neuralrohrs exprimiert. *Pax3*-mRNA findet sich in der alaren Platte, in der Deckplatte (*roof plate*) und in den Zellen der Neuralkrone. *Pax7* wird nur in der alaren Platte exprimiert. Die Expression der Gene setzt ein, bevor die Zellen bestimmte neuronale Eigenschaften aufweisen. Die dorso-ventrale Expression beeinflusst die Ausbildung des dorso-ventralen Musters des Neuralrohrs, was zur Entstehung unterschiedlicher neuronaler Zelltypen führt. Die Neuroblasten der ventrikulären Zone stellen auf eine präzise zeitliche und räumliche Art und Weise ihre Teilung ein, wandern aus und siedeln sich in der Mantelschicht an. Aus der alaren, intermediären und basalen Platte entwickeln sich entsprechend kommissurale und sensorische Neurone, Interneurone und Motorneurone. Die Bodenplatte und Deckplatte sind die Quelle für die Zellen der Neuroglia.

Pax-Gene sind auch aktiv im entwickelnden Gehirn (Goulding et al., 1991; Jostes et al., 1991; Walther and Gruss, 1991; Stoykova and Gruss, 1994). Am Tag 8 können die Transkripte des *Pax6*-Gens im Vorderhirn und Hinterhirn mit Ausnahme der mesencephalen und metencephalen Regionen detektiert werden. Allerdings startet die Expression im Methencephalon im Stadium 15,5 p.c.. Diese Verteilung der *Pax6*-Transkripte zieht sich durch die gesamte Entwicklung hin. Es ist bemerkenswert, dass seine Expression stimmt zeitlich mit der Etablierung verschiedener anatomischer Grenzen überein. Zum Beispiel dehnt sich seine Expressionsdomäne aus dem Telencephalon durch das Diencephalon bis zur Hinterkommissur aus und grenzt damit das diencephalische Areal vom Mesencephalon ab. Die gleiche Grenze gilt für das orthologe Zebrafischgen *Pax[zf-a]* (Krauss et al., 1991). Innerhalb des Diencephalons beschränkt sich die *Pax6*-Expression auf den ventralen Thalamus entsprechend der Grenze zwischen dorsalem und ventralem Thalamus, der *Zona limitans*.

Am Tag 10 p.c. wird *Pax3* in der ventrikulären Zone des Metencephalons exprimiert, während *Pax7* in beiden ventrikulären und intermediären Zonen vorhanden ist.

Pax3 und *Pax7* werden ab dem Stadium E8-8,5 p.c. bis zum Stadium E10 p.c. im ganzen Prosencephalon und anschliessend in allen seinen Derivaten, im Telencephalon und Diencephalon, im Mesencephalon und im Hinterhirn exprimiert. In späteren Phasen beschränken die beiden Gene ihre Expression auf die rostralen Neuomere des Diencephalons (anatomische Grenze zwischen dem Diencephalon und dem Zwischenhirn) und die rostralen Neuomere des Metencephalons. Während der weiteren Entwicklung (Tag 13,5 p.c.) wird die Expression von allen *Pax*-Genen im Zerebellum beobachtet. *Pax3* wird im dorsalen Teil der

ventrikulären Zone des sich entwickelnden Gehirns exprimiert. Diese Zone differenziert sich in die Körnerzell-, Purkinjezell- und Molekularzellschicht der adulten zerebellären Mantelschicht (*cerebellar mantle layer*).

Die *Pax*-Gene sind nicht nur an der Aufteilung der räumlichen Domänen des sich entwickelnden Gehirns verantwortlich, sondern spielen auch eine grosse Rolle in der Differenzierung und Aufrechterhaltung der spezifischen neuronalen Subtypen im adulten Gehirn (Stoykova and Gruss, 1994). Nur *Pax6* wird in einigen Bereichen des meist rostralen Teils des Vorderhirns exprimiert. *Pax6* wird auch im *Bulbus olfactorius*, im Septum, in den lateralen und septalen Nuclei und in den Nuclei des diagonalen Broca-Streifens. Im Diencephalon wird *Pax6* in der *Zona inserta*, Endependuncular, reticularen Nuclei und in der Amygdala exprimiert. Neurone verschiedener Nuclei des adulten Zwischenhirns exprimieren *Pax3*, *Pax6* und *Pax7* entsprechend dem Mesencephalon der mittleren Entwicklungszeit. *Pax6*-Transkripte wurden in einer Gruppe der neuronalen Zellen im dorso-lateralen Teil der retikulären Substantia nigra und in der zentralen grauen Substanz gefunden. Eine starke Expression von *Pax7* wurde im Sehtectum beobachtet. In den Fovea-Isthmen werden *Pax3*, *Pax6* und *Pax7* in verschiedenen Nuclei exprimiert. Im zerebellären Kortex werden nur *Pax3* und *Pax6* exprimiert. *Pax3* ist das einzige Gen der Familie, welches in Purkinje-Neuronen exprimiert wird. Zusätzlich wird das Gen in granulären Neuronen und in zwei Typen der zerebellären Glia exprimiert: Bergmann-Glia und Astrozyten. *Pax6* ist nur in granulären Neuronen und Astrozyten vorhanden (Kioussi et al., 1999).

Die funktionale Analyse der Gene, die sich an der Regulation der Entwicklung beteiligen, ist durch die Identifizierung der natürlichen Mutanten sehr erleichtert worden. *Pax3*-Mutationen wurden in Mausmutanten *Spotch* (Sp) gefunden (Epstein et al., 1991; Epstein et al., 1993; Goulding et al., 1993a). Die Sp-Mutationen führen zu einem nicht funktionsfähigen Protein (Chalepakakis et al., 1994) und stellen ein Modell für Defekte im Neuralrohr und der Neuralkrone dar. Embryos der homozygoten Sp-Mäuse sterben im Uterus im Stadium E13-14 p.c.. Dabei sind folgende neuronale Strukturen betroffen: 1) Das Neuralrohr, was sich in Form von Exencephalie und *Spina bifida* zeigt (Auerbach, 1954); 2) Die Neuralkrone mit Verlust der dorsalen Kernganglien (*dorsal root ganglia*) (Auerbach, 1954), der sympathischen Ganglien (*sympathetic ganglia*) (Auerbach, 1954; Franz and Kothary, 1993; Tremblay et al., 1995), Melanozyten (Auerbach, 1954), Schwannzellen (Franz, 1990), Strukturen des Herzens und Fehlbildungen der Thymusdrüse, Schilddrüse und Parathyroiddrüse (Franz, 1989). Die Sp-Heterozygoten weisen typische weisse Flecken auf dem Abdomen, Schwanz und Füssen auf. Diese Pigmentierungsanomalie resultiert sich aus einem mit der Neuralkrone assoziierten

Defekt. Pigmentzellen können bestimmte Regionen in der Haut nicht besiedeln (Auerbach, 1954).

Einige Anomalien des ZNS, die in homozygoten $Pax6^{Sey}/Pax6^{Sey}$ -Mäusen beobachtet wurden, schliessen Defekte in der Struktur des Vorderhirns (Grindley et al., 1997; Stoykova et al., 1996; Warren and Price, 1997), der axonalen Wegfindung (*pathfinding*) (Mastick et al., 1997) und Spezifikation einiger Untergruppen von Motorneuronen und Gliazellen (Ericson et al., 1997; Gotz et al., 1998; Osumi et al., 1997; Sun et al., 1998) ein. Murine $Pax7$ -Null-Mutanten zeigen eine Gehirnhemorrhagie und heterotopes Wachstum von Gehirngewebe (Gruss et al., 1995).

1.3. *Pax3, Pax7* und Somitogenese

Mit der Segmentierung des paraxialen Mesoderms, das während der Gastrulation entlang der beiden Seiten des Neuralrohrs angelegt wird, fängt die Somitenbildung an. Die Somiten werden nach einem dorso-ventralen Muster ausgerichtet. Aus der ventralen Schicht der Somiten entstehen unter dem Einfluss des Notochords Sklerotome. Aus der dorsalen Schicht leitet sich das Dermomyotom ab. Zellen des Sklerotoms trennen sich ab, wandern zum Notochord und verdichten sich rund um das Notochord. Aus den Zellen entsteht in späteren Entwicklungsstadien die Wirbelsäule. Vom Dermomyotom stammen die Haut und die Skelettmuskulatur der Glieder und des Körpers ab (Abb. 1.2) (Cooper, 1965; Nicolet, 1970; Nicolet, Balling et al., 1992; Wachter and Christ, 1992).

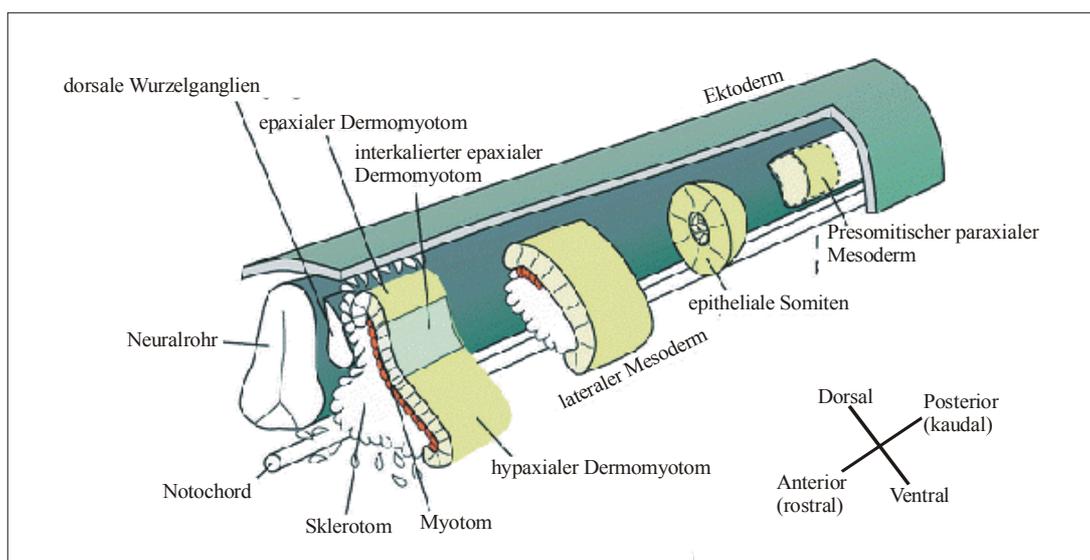


Abb. 1.2. Schematische Darstellung des Myogenese

Der Beginn der *Pax*-Genexpression fällt mit der Ausbildung des dorso-ventralen Somitenmusters zusammen. mRNA der beiden *Pax*-Gene erscheint im Dermomyotom am Tag 9 und 10 p.c. (Jostes et al., 1991; Goulding et al., 1994). *Pax3* wird auch in diesem embryonalen Stadium in dem undifferenzierten Mesenchym der Vorder- und Hinterglieder exprimiert. Die expandierenden Myotome exprimieren im Unterschied zum Dermatome immer noch *Pax7*-mRNA am Tag 12 p.c.. In späteren Phasen der Entwicklung wird *Pax7* noch im Gliedmuskeln und in der vom Myotom abstammenden Muskulatur zwischen den Rippen (*intercostal muscles*) exprimiert. Im Gegensatz dazu wird *Pax3* im Mesoderm oder in seinen Derivaten nicht mehr nach dem Tag 11 p.c. exprimiert.

Im Falle der homozygoten Sp-Mausmutanten beobachtet man eine Reduktion der aus dem Dermomyotom stammenden Skelettmuskulatur, wobei die Extremitätenmuskulatur völlig verlorenght. Dies demonstriert, dass *Pax3* ein wichtiger Regulator in der Migration der myogenen Vorläufer in die sich entwickelnden Gliedknoten ist (Bober et al., 1994; Goulding et al., 1994; Marcelle et al., 1995).

Einige der von *Pax3* regulierten Mechanismen wurden im Falle der Myogenese aufgeklärt. In der Entstehung der Muskelzellen spielen zwei Transkriptionsfaktoren eine Schlüsselrolle beim Übergang von Somitenzellen zu Myoblasten, *MyoD* und *Myf5*, die funktionell gegenseitig ersetzbar sind. Die Analyse von doppelten Mausmutanten Sp/*Myf5*^{-/-} zeigte, dass die Mäuse kein *MyoD* in ihren Somiten exprimieren (Tajbakhsh et al., 1997). Die verstärkte *Pax3* Expression induziert *MyoD*-Expression und nachfolgende Myogenese in Nicht-Muskelgeweben des Vogelembryos (Maroto et al., 1997). Ektopische *Pax3*-Expression in C2C12-Myoblasten hemmt allerdings sehr stark die myogene Differenzierung (Epstein et al., 1995). Zusätzlich wurde eine Ko-Expression der beiden Gene *MyoD* und *Pax3* im murinen Myotome nicht beobachtet (Williams and Ordahl, 1994). Es wurde infolgedessen vorgeschlagen, dass *Pax3* als ein indirekter Faktor funktioniert. Dabei induziert *Pax3* Migration oder andere zelluläre Veränderungen, wodurch die nachfolgende *MyoD*-Expression erleichtert wird (Borycki and Emerson, 1997). Der Phänotyp der Sp-Mutanten ähnelt den *Knockout*-Mäusen für das *c-met*-Gen, das für die Migration der somitischen Gliedmuskelvorläufer erforderlich ist (Bladt et al., 1995; Maina et al., 1996). Einige Ergebnisse deuten darauf hin, dass *Pax3* das *c-met*-Gen direkt aktivieren kann (Epstein et al., 1996; Yang et al., 1996).

Im Gegensatz zu *Pax3*, das eine essentielle Rolle im Entwicklungsprogramm der embryonalen Myoblasten spielt (Maroto et al., 1997; Tajbakhsh et al., 1997), ist *Pax7* für die Spezifizierung der Satellitenzellen der adulten Muskeln verantwortlich (Seale et al., 2000).

Die Satellitenzellen, die zwischen der Basallamina und den Muskelfasern liegen, stellen ein Reservoir für undifferenzierte Muskelvorläuferzellen. Bei einem Muskeltrauma werden diese Zellen aktiviert, was zur Regeneration der adulten Skelettmuskeln führt. Diese Zellen vermitteln auch das postnatale Wachstum der Skelettmuskeln (Seale and Rudnicki, 2000). Die Analyse der postnatalen Skelettmuskeln aus *Pax7^{-/-}*-Mäusen ergab ein komplettes Fehlen der myogenen Satellitenzellen (Seale et al., 2000). Diese *Knockout*-Mäuse sterben innerhalb von zwei Wochen nach der Geburt und zeigen zu diesem Zeitpunkt eine stark verminderte Muskelmasse (bis zu 33% vom Gewicht der Wildtyp-Maus). Es wurde gezeigt, dass unterschiedliche *Pax7*-Spleissvarianten mit verschiedener Effizienz die regenerativen Prozesse in Muskeln auslösen (Kay et al., 1995; Kay et al., 1998).

Damit ist das Pax3-Protein für die Aufstellung, Wanderung, Vermehrung und/oder Differenzierung der Myoblasten-Vorläufer, welche sich zur Skelettmuskulatur entwickeln, erforderlich (Maroto et al., 1997; Tajbakhsh et al., 1997).

1.4. Organogenese und Sinnesorgane

Die Expression der *Pax*-Gene in den früheren Entwicklungsstadien bringt auch die Ausbildung einiger viszeraler und sensorischer Organe mit sich. Eine allgemeine Eigenschaft der murinen *Pax*-Mutanten ist die vollständige Abwesenheit oder Größenreduktion spezifischer Organe, in welchen entsprechende *Pax*-Gene während der Entwicklung exprimiert werden. Die Expression des *Pax6* erstreckt sich auf alle Strukturen in dem sich entwickelnden Auge und der Nase (Walther and Gruss, 1991). Das *Pax6*-Gen wird sehr früh (Tag 8,5 p.c.) in den optischen Vesikeln exprimiert. Das Gen beteiligt sich so an induktiven Prozessen, die zur Entwicklung des Auges führen. In der Nase sind *Pax6*-Transkripte im Geruchsepithelium während der Entwicklung und im *Bulbus olfactoris* in den späteren Stadien vorhanden. *Pax3* und *Pax7* werden auch im Geruchsepithel exprimiert (Jostes et al., 1991). Die bedeutende Rolle des *Pax6*-Gens in Prozessen, die zur Entwicklung des Auges und der Nase führen, wurde durch das Beispiel der *Small eye*-Mutanten bekräftigt. Diese Mutanten zeigen im homozygoten Zustand eine Malformation des Auges und der Nase (Hogan et al., 1986; Glaser et al., 1990).

Die *Pax*-Gene werden auch in anderen viszeralen und sensorischen Organen exprimiert: *Pax3* in Gliedknospen und in bronchialen Ästen (Goulding et al., 1991), *Pax6* im Pankreas (Turque et al., 1994; Sander et al., 1997).

1.5. *Pax3, Pax7* und Oncogenese

Wie auch für mehrere andere Entwicklungsgene bekannt ist, ist die korrekte zeitliche und räumliche Expression der *Pax*-Gene kritisch für eine normale Gewebeentwicklung, wobei diese Gene sonst zur Entstehung und Progression von Tumoren beitragen können. Experimentelle Daten bezüglich *in vivo* und *in vitro* aberranter Regulation der *Pax*-Gene zeigen, dass diese Gene als Proto-Onkogene fungieren können.

Das alveolare Rhabdomyosarkoma ist eine sehr häufige aggressive Krebsart der weichen Gewebe bei Kindern, die sich aus Skelettmuskelzellen herleitet (Newton et al., 1995). Spezifische chromosomale Translokationen, t(2;13) und t(1;13), die in einer Fusion des *Pax3* und *Pax7* mit dem *Fork Head Domain*-Gen (*FKHR*) resultieren, sind für die Genese dieses Tumors verantwortlich (Galili et al., 1993; Barr et al., 1993; Shapiro et al., 1993a; Davis et al., 1994). Das entstandene chimäre Protein besteht aus *Pax3*- oder *Pax7*-DNA-Bindungsdomänen und der die Transkription aktivierende COOH-Endomäne des *FKHR*-Gens. Die Chimären treten als vielfach potentere Transkriptionsfaktoren mit einem breiteren transkriptionellen Aktivierungsspektrum als die Wildtyp-Pax-Proteine auf (Fredericks et al., 1995; Sublett et al., 1995; Bennicelli et al., 1999). *Pax3*/*FKHR* Fusionsprotein aktiviert zum Beispiel *PDGFR α* (*platelet-derived growth factor receptor α*) und den Wachstumsfaktor *Igf*, die normalerweise durch das native *Pax3*-Protein nicht aktiviert werden können. Eine Behandlung von Rhabdomyosarkomazellen mit *Pax3*- oder *Pax7*-*Antisense*-Oligonukleotiden hatte eine Auslösung von Apoptose zur Folge (Bernasconi et al., 1996). Damit treten die Fusionsproteine während der Onkogenese als Inhibitoren des apoptotischen Programms auf, das normalerweise für das Ausschalten der Krebszellen verantwortlich ist. Tumorzellen des embryonalen Rhabdomyosarkomas oder Ewing's Sarkomas exprimieren Wildtyp des *Pax3* und/oder *Pax7* auf höherem Niveau im Vergleich zu primären humanen Myoblasten (Bernasconi et al., 1996; Barr et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass die beiden nativen Gene auch zur krebsartigen Transformation der Zellen beitragen können.

1.6. Neuroentwicklungshypothese der Schizophrenie

Die Schizophrenie ist eine relativ häufige chronische Psychose-Erkrankung. Diese Erkrankung betrifft fast 1% der Weltbevölkerung mit der gleichen Häufigkeit in unterschiedlichen Kulturen und geographischen Regionen (Thaker and Carpenter, 2001). Die Symptomatik der Schizophrenie schliesst sogenannte 'positive' psychotische Merkmale wie

Halluzination, Wahnvorstellungen, Desorganisation des Denkens, bizarres Benehmen und unangemessene Affekte ein (McKenna, 1994; Andreasen, 1995). Hierzu kommen oft sogenannte „negative“ Symptome, die nur einigen Fällen vorhanden sind, wie Willenlosigkeit, Verlust der Motivation, eine begrenzte Palette der emotionalen Äusserungen, Alogia und Adynamie. Kein einziges Symptom ist repräsentativ für die Schizophrenie oder obligat in jedem Fall. Studien über die Vererbungsbasis der Schizophrenie in Familien, Zwillingspaaren und adoptierten Kindern aus von der Erkrankung betroffenen Familien haben gezeigt, dass die Familienaggregation dieser Psychosen zum grössten Teil auf einen genetischen Ursprung zurückgeführt werden kann. Da das Risiko der Schizophrenieentwicklung bei eineiigen Zwillingen 48% und dizygoten Zwillingen nur 17% beträgt, hat diese Erkrankung keinen reinen genetischen Hintergrund, sondern braucht widrige Umwelteinflüsse, um sich zu entwickeln (Gottesman, 1991).

Zahlreiche epidemiologische, genetische und klinische Untersuchungen lassen vermuten, dass Anomalien in der Gehirnentwicklung eine determinierende Rolle in der Pathophysiologie der Schizophrenie spielen (Murray and Lewis, 1987; Weinberger, 1987; Roberts, 1990; Nasrallah, 1993; Waddington, 1993; Weinberger, 1995; Harrison, 1997; Roberts, 1997).

- Die strukturellen zerebralen Anomalien bei Schizophrenen sind sichtbar während der Zeit der Erkrankung und haben keinen progressiven Charakter (Marsh et al., 1994). Sie sind wahrscheinlich weder Artefakt einer Therapie noch Produkt einer chronischen Krankheit. Vielmehr deuten diese Anomalien auf einen pathologischen Prozess hin, der vordatiert ist, und bei Einbruch der Erkrankung schon abgeschlossen ist.
- Zu den beobachteten makroskopischen Veränderungen gehören zwei wichtige histologische Befunde (Arnold and Trojanowski, 1996; Harrison, 1997). Erstens ist die kortikale Zytoarchitektur verändert, wobei die Neurone eine abweichende Grösse haben und desorganisiert sind. Die Natur dieser Veränderungen lässt einen frühembryonalen Ursprung erkennen. Zweitens ist eine typische histologische Eigenschaft bei der Schizophrenie das Fehlen einer Gliose. Da die Gliose-Reaktion meist neuropathologische Prozesse wie Infektion, Entzündung und Neurodegeneration begleitet und offensichtlich bei den zytologischen Anomalien nie stattgefunden hat, ist hier ebenfalls von einem entwicklungsbiologischen Prozess auszugehen.
- Schizophrene Erwachsene haben sehr häufig neuromotorische Anomalien in der Kindheit (Walker, 1994; Walker et al., 1994) und zeigen Verhaltensstörungen und

kognitive Defizite als Kinder (Done et al., 1994; Jones et al., 1994). Ausserdem können Kinder erkrankter Eltern ein Syndrom mit einer verspäteten neurologischen Entwicklung (Cannon et al., 1994) und Gehirnanomalien zeigen.

- Umweltrisikofaktoren für Schizophrenie (z.B. mütterliche Grippe, Unterernährung, Wintergeburt und Komplikationen bei der Geburt) agieren prä- und perinatal.
- Schizophrene haben eine hohe Häufigkeit von geringfügigen physischen Anomalien (Bracha et al., 1992) und zerebralen Anomalien (Lewis, 1996), die auf eine gestörte Entwicklung *in utero* hinweisen.
- Eine aberrante Expression einiger Entwicklungsgene wie *N-CAM* (*neural cell adhesion molecule*) oder *GAP-43* (*growth-associated protein 43*) wurde im Gehirn von Schizophrenen beobachtet (Barbeau et al., 1995; Perrone-Bizzozero et al., 1996).
- Eine defizitäre kognitive Funktion der Schizophrener ist bereits vor dem Krankheitsbeginn vorhanden, was den progressiven Charakter der Erkrankung relativiert (Goldberg et al., 1993).

Die Hypothese der gestörten Gehirnentwicklung bei der Schizophrenie könnte wie folgt aufgestellt werden: es ist eine genetische Erkrankung, in deren Ätiopathogenese Umweltereignisse unterschiedlich ausgeprägte Bedeutung haben. Auf eine noch unbekannte Weise beeinflussen pathogenetische Faktoren die aberrante zerebrale Entwicklung vor und nach der Geburt, die sich in den Veränderungen der kortikalen Zytoarchitektur und ihren anatomischen und funktionellen Schaltkreisen manifestiert. Wahrscheinlich hinterlässt diese Störung der frühen Gehirnentwicklung ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung.

Für schizophrene Erkrankung wurde nur eine begrenzte Anzahl der mit der Erkrankung möglicherweise assoziierten Entwicklungsgene erforscht, insbesondere *N-CAM*, *Reelin*, *GAP-43* und einige Mikrotubuli-assoziierte Gene (Arnold, 1999). *Pax*-Gene beteiligen sich an vielen wichtigen Prozessen im sich entwickelnden und adulten Gehirn wie Gestaltung des Hirnmusters, Differenzierung und Aufrechterhaltung einer bestimmter Teilmenge der Hirnzellen und Spezifikation einiger Nuclei des Hirnstamms und subkortikale Regionen des limbischen Systems des erwachsenen Gehirns. *Pax*-Genexpression im adulten Gehirn überschneidet sich auch mit den Regionen, die bei Schizophrenen besonders betroffen sind, wie Hippocampus, Thalamus und präfrontaler Kortex (Harrison, 1999). *Pax*-Gene sind auch in die molekulare Kaskade der für die Schizophrenie relevanten Gene wie z.B. *N-CAM* (Edelman and Jones, 1995; Holst et al., 1997) involviert. Anhand dessen, und ausgehend vom

Neuroentwicklungsmodell der Schizophrenie gehören diese Gene zu interessanten möglichen Kandidaten für die Schizophrenieentstehung.

1.7. Assoziationsstudien: eine Strategie für die Identifizierung der Kandidatengene bei komplexen Erkrankungen

Trotz der Erkenntnisse über den genetischen Hintergrund der Schizophrenie ist wenig bekannt über die molekulargenetischen und neurobiologischen Mechanismen der Erkrankung. Unterschiedliche analytische Methoden wurden für die Untersuchung der Schizophrenie angewendet, um festzustellen, ob Einzelgenmodelle mit dem empirisch ermittelten relativen Risiko übereinstimmen. Mehrere Studien lassen darauf schliessen, dass polygene (viele Gene) oder oligogene (wenige Gene) Modelle zufriedenstellende Erklärungen für die Vererbung der Schizophrenie bieten (Gottesman and Shields, 1982; McGue and Gottesman, 1989; Risch, 1990; Kendler and Diehl, 1993). Aus dem Einzelgenmodell konnte nicht erschlossen werden, warum das Risiko des Erkrankens von Schizophrenie exponentiell abnimmt, wenn sich der Verwandtschaftsgrad zum Probanden verringert (Tsuang et al., 1982; McGue et al., 1983; Baron, 1986; McGue et al., 1986; Risch, 1990). Dagegen erklärt das Modell, welches sich auf einen oligo- oder polygenen Ursprung bezieht, das Risiko der Schizophrenie im ersten und im zweiten Grad der Verwandtschaft (Rao et al., 1981; Gottesman and Shields, 1982; Kendler and Diehl, 1993).

Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurde diskutiert, ob genetische Kopplungsanalyse ein angemessenes Paradigma für die Identifizierung der Hauptgeneffekte bei psychischen Erkrankungen ist. Der Misserfolg, die ursprünglichen Befunde der Kopplungsanalyse zu reproduzieren, führte zur Annahme, dass es sich um einen genetisch komplexen Vererbungsmechanismus handelt. Eine Verifikation dieser Hypothese mit den zahlreichen genetischen und umweltbedingten Faktoren ist recht kompliziert, da es schwierig ist einen Zusammenhang zwischen der Krankheit und spezifischem genetischem Locus oder Umwelteinflüssen nachzuweisen oder auszuschliessen.

Assoziationsstudien können dagegen im Falle von genetisch komplexen Erkrankungen in Kombination mit plausiblen Kandidatengenomen oder Kandidatenregionen angewendet werden. In einer Assoziationsstudie wird eine Gruppe von nicht verwandten Patienten mit einer Kontrollgruppe aus der ethisch ähnlichen allgemeinen Bevölkerung verglichen, um eine statistisch signifikante Häufung eines Markerallels bei einer Erkrankung aufzuspüren. Es gibt zwei Ursachen einer Allelassoziation: Erstens ist es ein Kopplungsungleichgewicht (LD,

linkage disequilibrium), wodurch der Marker und der Anfälligkeitslokus so eng verbunden sind, dass ihre Verwandtschaft über mehrere Stufen der Rekombination erhalten bleibt. Zweitens ist es möglich, dass der Marker selbst eine Anfälligkeit zur Krankheit überträgt, da er, zum Beispiel, als funktionelle Variante des Gens an der Pathogenese der Krankheit beteiligt ist.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Patienten und gesunde Probanden

Für die Assoziationsstudien wurden 281 schizophrene Patienten, 174 Patienten mit affektiven Erkrankungen und 80 Patienten mit Panikstörungserkrankung entsprechend der Klassifikation nach DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994) untersucht. Die Anzahl der Kontrollprobanden betrug 229. Die DNA-Proben der Patienten stammen aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg und aus dem staatlichen psychiatrischen Krankenhaus in Lohr am Main. Unter den Patienten mit der Schizophrenie (174 Männer und 107 Frauen) war das durchschnittliche Alter bei Krankheitsbeginn $26,8 \pm 9,4$ Jahre. Diagnosen wurden laut OPCRIT-Kriterien auf der Basis eines semi-strukturierten klinischen Interviews und Krankengeschichte festgestellt (Williams et al., 1996). Die Schizophrenie wurde entsprechend der DSM-IV-Kriterien auf folgende Untertypen der Erkrankung aufgeteilt: paranoider Untertyp (295.3; n=84), desorganisierte, katatone und nicht-differenzierte Schizophrenie (295.1, 295.2, 295.6, 295.9; n=142) und schizoaffektiven Psychosen (295.7; n=55). Die Gruppe der Kontrollprobanden (134 Männer und 95 Frauen; Alter $29,9 \pm 10,1$ Jahre) wurde aus dem Blutspenderzentrum der Universität Würzburg rekrutiert. Alle Probanden waren deutscher kaukasischer Herkunft und nicht verwandt. Die Kontrollgruppe repräsentiert eine allgemeine Population in diesem geographischen Areal mit einer Wahrscheinlichkeit von psychischen Erkrankungen von ca. 1%. Für die molekulargenetischen Studien der Schizophrenie lag ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg vor. Alle Probanden erteilten ihre ausdrückliche Zustimmung aktiv an den Studien teil.

2.1.2. Zelllinien

Cos-7	Affennierenzelllinie (afrikanischer grüner Affe)
JAR	menschliches Choriokarzinom
RD	menschliches embryonales Rhabdomyosarkom
SK-N-SH	menschliches Neuroblastom
SH-SY5Y	menschliches Neuroblastom

2.1.3. Bakterienstämme

Zur Vermehrung der Vektoren bzw. der rekombinanten DNA wurden folgende Wirtsstämme eingesetzt:

<i>E. coli</i> JM 109	Promega, Mannheim
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene, Amsterdam, Niederlanden

2.1.4. Bibliotheken

Humane genomische PAC-Bibliothek (Nr.704, RZPD):

Genomische DNA:	männliche Fibroblastenzelllinie
Vektor:	pCYPAC-2

2.1.5. Vektoren

pBluescript SK (+/-)	Stratagene, Amsterdam, Niederlanden
pGEM-T	Promega, Mannheim
pGL3	Promega, Mannheim
pRSV40- <i>lacZ</i>	Promega, Mannheim

2.1.6. Synthetische Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide, die für Experimente verwendet wurden, wurden bei der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bestellt und in der Konzentration von 100 µM gelöst.

P6-1	5'-CTCCGTCCACTGAGCAGAC
P6-2	5'-GGATGACCAATGCTGGGA
P6-3	5'-TCAATAAACAGAGTTCTTCGC
P6-4	5'-AATCTTGGCCAGTATTGAGAC
P3-1	5'-CTCTCCACGCTCCGGATAGTTC
P3-2	5'-GAATGGGCTTCCTGGAAGCAC
P3-3	5'-CATCCTGGGGGCACTTCGCTCGGAAATTATACCAG
P3-4	5'-GTTCTTTTACCCAAAGCTTGGTCAGGAGCCCTGAGC
P3-5	5'-CCCAGATGCCTTCTTA
P3-6	5'-CAGGGAGATGGCAGTT

P7-1 5'-GCTGCAGGAATTCCTCCCTTC
 P7-2 5'-GGAGCGGAGGACCAATAACG
 P7-3 5'-TTGCCGCTACCAGGAGACCG
 P7-4 5'-CCAGGATGCCGTCGATGCTG
 P7-5 5'-AGCCGGCCGCATCATTCTCGGTAC
 P7-6 5'-GACCACACTCGCTTCTCCCTCCTC
 P7-7 5'-GCCTTCTTTCTCCGGACCACACTC
 P7-8 5'-CGTTATTGGTCCTCCGCTC
 P7-9 5'-CGCGAGTGATCAGCTGGGTA
 P7-10 5'-GCGCAAGCAGCGACGCAGTCG
 P7-11 5'-GAGAAGTCAGCCTGTGGCTGCG
 P7-12 5'-GCGAGTGATCAGCTGGGTAAG

β-Aktin spezifische Primer 5'-CCTCGCCTTTGCCGATCC
 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCAGTC

Primer zum Amplifizieren der Promotorregion des *MAOA*-Gens

MAOA-1 5'-ATCTCGAGCTTTGGCTGACACGCTCCTG
 MAOA-2 5'-ATATACGCGTGAACAGCCTGACCGTGGAG

Primer zum Amplifizieren der *MAOA-LPR*

MAOA-3 5'-CCCAGGCTGCTCCAGAAAC
 MAOA-4 5'-GGACCTGGGCAGTTGTGC

2.1.7. Chemikalien und sonstige Reagenzien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt) und Sigma (Deisenhofen) in p.A. Qualität bezogen.

Agar	Difco, Detroit, USA
Aminosäurenlösung (50x)	PAN Systems GmbH, Aidenbach; #P08-30100
Ammoniumacetat	Fluka, Neu Ulm
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extrakt	Difco, Detroit, USA
“Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent”-Konzentrat	Bio-Rad, München; #500-0006
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
<i>Cell Culture Freezing Medium</i>	Gibco BRL, Karlsruhe; #11101
Chloroform	Baker, Deventer, NL
dephosphorylierter	
φX174 <i>Hinf</i> I DNA-Marker	Promega, Mannheim
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt

Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
DNase I (RNase-frei)	Roche, Mannheim
dNTP-Sets (100 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot; Roche, Mannheim
DOSPER Liposomales	
Transfektionsreagenz	Roche, Mannheim; #1781995
Dulbecco's Modifiziertes Eagle	
Medium (DMEM)	PAN Systems GmbH, Aidenbach; #P04-04550
Eagle's Minimum Essential Medium	
(EMEM)	PAN Systems GmbH, Aidenbach; #06-174G
Ethanol	Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
„ExpressHyb“-Hybridisierungslösung	Clontech, Palo Alto, USA
Fötales Kälberserum	Gibco BRL, Karlsruhe; #10500-064
Formaldehyd	Gibco BRL, Karlsruhe
Formamid	Fluka, Neu Ulm
<i>Gel Slick Solution</i>	BMA, Rockland, USA; #50640
GeneRuler™ 100 bp-DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Genetic Analyzer Buffer with EDTA</i> (10x)	PE Applied Biosystem, Foster City, USA
Glycerin	Gibco BRL, Karlsruhe
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Goldstar™ <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Eurogentec, Seraing, Belgium
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Lachsspermien-DNA	Sigma, Deisenhofen
Lambda-DNA	Roche, Mannheim
Lambda-DNA/ <i>Eco</i> 91I (<i>Bst</i> EII) Marker, 15	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
L-Glutamin-Lösung (200 mM)	PAN Systems GmbH, Aidenbach; #P04-80100
Magnesiumsulfat	Pharmacia, Freiburg
β-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natriumpyruvat-Lösung (100 mM)	PAN Systems GmbH, Aidenbach; #P04-43100
o-Nitrophenyl β-D-Galaktopyranosid	
(ONPG)	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Nichtessentielle Aminosäuren (100x)	PAN Systems GmbH, Aidenbach; #P08-32100
NTP (100mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
NuSieve GTG Agarose	Biozym Diagnostik, Olendorf
PBS	Gibco BRL, Karlsruhe; #14190-094
Penizillin/Streptomycin-Lösung	PAN Systems GmbH, Aidenbach; #P06-07100
„PeqGolg RNAPure“-Lösung	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phosphatase, alkalische	Roche, Mannheim
POP-6 Polymer	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Proteinase K	Roche, Mannheim
Protein-Standard I (IgG)	Bio-Rad, München; #500-0005
Protein-Standard II (BSA)	Bio-Rad, München; #500-0007
pUC19 DNA/ <i>Msp</i> I (<i>Hpa</i> II) Marker, 23	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Radioaktiv markierte Reagenzien:	
[α- ³² P]dCTP, [γ- ³² P]ATP, [α- ³² P]UTP,	

[α - ³⁵ S]dATP α S	Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig
Reporter-Gen Assay Lyse-Puffer (5x)	Roche, Mannheim; #1897675
Restriktionsendonukleasen	Biolabs, Roche, Gibco BRL
Rotiphorese DNA-Sequenziersystem	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Super Script™ RNase H ⁻ II Reverse	
Transkriptase	Gibco BRL, Karlsruhe
RNase A	Gibco BRL, Karlsruhe
RNase H	Gibco BRL, Karlsruhe
RNasin RNase Inhibitor	Promega, Heidelberg
Roti-Phenol, pH 4,5	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Roti-Phenol/Chloroform	
(Phenol/Chloroform/IAA; 25:24:1; v/v/v)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium	Gibco BRL, Karlsruhe; #31870-025
SeaKem LE Agarose	Biozym Diagnostik, Olendorf
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim
T4-Polynukleotid-Kinase	Promega, Mannheim
T3-RNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tetracyclin	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
t-RNA (Bäckerhefe)	Roche, Mannheim
Trypsin/EDTA-Lösung	PAN Systems GmbH, Aidenbach; #P10-023100
Tween-20	Sigma, Deisenhofen
Vitaminenlösung (100x)	PAN Systems GmbH, Aidenbach; #P08-41050
Wasser, HPLC-Qualität	Merck KGaA, Darmstadt
X-Gal	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Xylencyanol	Bio-Rad, München

2.1.8. Reagenziensätze („Kits“)

Advantage 2 PCR Kit	Clontech, Palo Alto, USA
„BigDye Terminator Cycle Sequencing	
Ready Reaction“-Kit	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Expand™ Long Template PCR System	Roche, Mannheim
Luciferase-Assay-System	Promega, Mannheim; #E1501
Marathon™ cDNA Amplification Kit	Clontech, Palo Alto, USA
Multiple Tissue Northern (MTN) Blot	Clontech, Palo Alto, USA
Oligotex mRNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
pGEM-T-Vektor-System	Promega, Mannheim
„Prime-a-Gene Labeling System“-Kit	Promega, Mannheim
QIAamp Tissue Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
„ ¹⁷ Sequencing™ Mixes“-Kit	Amersham, Braunschweig

2.1.9. Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte für 60 min bei 120°C und 105 Pascal im Dampfdruckautoklaven (Webeco, Bad Schwartau) oder bei hitzeempfindlichen Lösungen durch Sterilfiltration (Porengrösse: 0,2 µm). Gebrauchswaren wurden entweder autoklaviert oder über Nacht bei 220°C hitzesterilisiert.

2.1.10. Puffer und Stammlösungen

Lösungen für den routinemässigen Gebrauch wurden nach Sambrook et al. (2001) angesetzt. Die benötigten Chemikalien wurden den Erfordernissen gemäss in bidestilliertem oder DEPC behandeltem Wasser gelöst und nach Bedarf autoklaviert oder steril filtriert.

DEPC-Wasser	0,1% (v/v) DEPC (über Nacht bei 37°C schütteln lassen und anschliessend autoklavieren)
HBS-Puffer	20 mM Hepes 150 mM NaCl, pH 7,4
Harnstoff-Acrylamid-Lösung (6%) (Rotiphorese-DNA-Sequenziersystem)	120 ml Konzentrat 330 ml Verdünner 50 ml Puffer Konzentrat
LB-Agar	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar auf 1000 ml H ₂ O
LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl auf 1000 ml H ₂ O

10x Ligationspuffer	600 mM Tris-HCl (pH 7,5) 80 mM MgCl ₂ 100 mM DTT
MgCl ₂ -CaCl ₂ -Lösung	80 mM MgCl ₂ 20 mM CaCl ₂
MgCl ₂ -Puffer für β -Galaktosidase-Assay	0,1 M MgCl ₂ 4,5 M β -Mercaptoethanol
5x MOPS-Puffer	0,1 M MOPS (pH 7,0) 40 mM Natriumacetat 5 mM EDTA (pH 8,0)
6x Probenpuffer	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol 30% Glycerin 50 mM EDTA
RNA-Probenpuffer	50% Glycerin 1 mM EDTA (pH 8,0) 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol
RNase A	10 mg/ml in dH ₂ O (inkubieren 15 min bei 100°C im Wasserbad)
20x SSC	3,0 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat (pH 7,0 wird angestellt mit 14 N HCl)
20x SSPE	3,0 M NaCl 0,2 M NaH ₂ PO ₄ 0,02 M EDTA

(pH 7,4 wird angestellt mit NaOH)

Stoppuffer	97,5% Formamid 10 mM EDTA (pH 8,0) 0,3% Bromphenolblau 0,3% Xylencyanol
1x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA (pH 8,0)
1x TBE-Puffer	90 mM Tris-Borat 2 mM EDTA (pH 8,0)
10x TE-Puffer (pH 8,0)	100 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)
1x TE-Puffer (pH 7,5)	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA (pH 8,0)
10x T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer	500 mM Tris-HCl (pH 7,5) 100 mM MgCl ₂ 50 mM DTT 1 mM Spermidin
Waschlösung I	2x SSC 0,1% SDS
Waschlösung II	0,2x SSC

Hybridisierung radioaktiver Sonden an membrangebundener DNA

Hybridisierungspuffer	10% PEG 7% SDS 1,5x SSPE
-----------------------	--------------------------------

Waschpuffer I	2x SSC
Waschpuffer II	2x SSC 0,1% SDS
Waschpuffer III	0,2x SSC 0,1% SDS
Waschpuffer IV	0,1x SSC

Hybridisierung radioaktiver Sonden an membrangebundener RNA

Waschpuffer I	2x SSC 0,05% SDS
Waschpuffer II	0,1x SSC 0,1% SDS

Minipräparation von Plasmid-DNA

Resuspension-Lösung	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0)
Lysis-Puffer	0,2 M NaOH 1% (w/v) SDS
Neutralisierungspuffer	3 M KOAc (pH 5,5)

Primer-Extension-Analyse

5x HB-Puffer	1125 mM KCl 50 mM Tris-HCl (pH 8,3)
--------------	--

5x RB-Puffer
235 mM Tris-HCl (pH 8,3)
15 mM MgCl₂

Ribonuklease-Protektionsassay

Hybridisierungsbuffer
40 mM PIPES (pH 6,4)
400 mM NaCl
1 mM EDTA
80% deionisiertes Formamid

Verdauungslösung
10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
300 mM NaCl
5 mM EDTA (pH 8,0)
2 mg/ml RNase T
40 mg/ml RNase A1

Aufladenpuffer
10 mM EDTA (pH 8,0)
80% Formamid

Southern-Blotting

Depurinierungslösung
0,2 M HCl

Denaturierungslösung
1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Neutralisierungslösung
1 M Tris-HCl (pH 7,4)
1,5 M NaCl

2.1.11. Medien, Agarplatten und Antibiotika

2.1.11.1. Medien für Bakterien

LB-Medium (pH 7,5):	1% Trypton
	0,5% Hefeextrakt
	0,5% NaCl
	1,5% Agar

Das LB-Medium wurde mit bidestilliertem Wasser angesetzt, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt.

2.1.11.2. Antibiotika

Von den Antibiotika Ampicillin und Kanamycin wurden Stammlösungen angesetzt, die steril filtriert und bei -20°C gelagert wurden. Das jeweils benötigte Antibiotikum wurde erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Wachstumsmedien auf 55°C zugegeben.

	Stammlösung	gelöst in	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml	H ₂ O	50 mg/ml
Kanamycin	25 mg/ml	H ₂ O	50 mg/ml

2.1.11.3. X-Gal-Platten

Zur Herstellung von X-Gal-Platten (Blau-Weiss-Selektion) wurden dem LB-Agar (55°C) Ampicillin, IPTG und X-Gal in entsprechenden Konzentrationen zugegeben und in Petrischalen gegossen. Die Platten wurden bei 4°C gelagert.

	Stammlösung	gelöst in	Endkonzentration
X-Gal	2%	N.N.-Dimethylformamid	0.0004%
IPTG	100 mM	H ₂ O	1 mM

2.1.12. Medien für Zellkultur

Die zur Kultur von eukaryotischen Zellen verwendeten Medien wurden gekauft (PAN Systems GmbH, Aidenbach) und vor Gebrauch je nach Kulturbedingungen für die Zellen mit fötalem Kälberserum (FKS), Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) und zusätzlichen Komponenten versetzt. Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zelllinien und entsprechende Kulturmedien sind unten in der Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1. Zelllinien mit entsprechenden Kulturmedien

Zelllinie	Kulturmedium
Cos-7	DMEM, 10% FKS
JAR	RPMI 1640, 10% FKS
RD	EMEM, 10% FKS, 2 mM Glutamin, 2% NEAA, 2% Vitamine
SK-N-SH	DMEM, 10% FKS
SH-SY5Y	DMEM, 15% FKS

Alle beschriebenen Kulturmedien enthielten folgende Antibiotika: 50 µg/ml Streptavidin und 50 U/ml Penizillin.

2.1.13. Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer
 automatischer Kapillarsequenzier
 (Modell ABI Prism 310)
 Bakterienbrutschrank
 Bakterienrüttler
 Gelrockner
 Elektroporationsapparat „Gene Pulser“
 Hybridisierungssofen
 Luminometer (Autolumat LB953)
 Sorvall-Zentrifuge (Typ RC5C)
 Spektralphotometer (Typ 552S)
 Polaroid-Kamera
 Polyacrylamid-Gelelektrophoresekammer
Speed Vac
 Szintillationsmessgerät (Typ LS5000TD)
 Thermoblock
 Thermocycler
 Tischzentrifuge (Biofuge pico)
 UV-Transilluminator

Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
 PE Applied Biosystem, Foster City, USA
 WT-Binder, Bottmingen, Schweiz
 A. Hartenstein GmbH, Würzburg
 Biometra, Göttingen
 Bio-Rad, München
 MWG Biotech, Ebersberg
 Berthold, Bundoora, Australien
 Kendro, Hamburg
 PE Applied Biosystems, Foster City, USA
 Sigma, Deisenhofen
 Stratagene, Amsterdam, Niederlande
 Schütt Labor Technik, Göttingen
 Beckman
 Renner GmbH, Darmstadt
 Biometra, Göttingen
 Heraeus, Hanau
 MWG Biotech, Ebersberg

Zellkulturbrutschrank (Typ BB16)
Zellkultur-Sterilbank

Heraeus, Hanau
Bio-flow Technik, Meckenheim

2.1.14. Gebrauchswaren

Blottingpapier GB-003
Elektroporationsküvetten
Erlenmeyerkolben (500 ml)
Filme für die Autoradiographie (Kodak,
Typ X-OMAT AR und BioMax MR)
Einfriergefäß für die Zellen (Nalgene)
Hybond-N-Membran
Membranfilter
Sephadex G-50-NICK-Säulen
Petrischalen
Pipettenspitzen
Polaroid-Film (Typ 665 und 667)
Reaktionsgefäße
3MM-Whatman-Papier
Zentrifugengefäße und -röhrchen
Zellkulturflaschen
Zellkulturschalen

Schleicher & Schüll, Dassel
Bio-Rad, München
A. Hartenstein GmbH, Würzburg

Sigma, Deisenhofen
Sigma, Deisenhofen
Amersham, Braunschweig
Millipore, Eschborn
Amersham, Braunschweig
Greiner Nunc, Frickenhausen
Eppendorf, Hamburg
Sigma, Deisenhofen
Eppendorf, Hamburg
Schleicher & Schuell
Beckmann, München
Greiner Nunc, Frickenhausen
Greiner Nunc, Frickenhausen

2.2. Methoden

Folgende Standardmethoden, wenn es nicht anders angegeben ist, wurden nach Sambrook et al. („Molecular Cloning“, 2001) und Ausubel et al. („Current Protocols in Molecular Biology“, 1992) durchgeführt:

- Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen
- Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden mit dem Klenow-Enzym
- Ligation und Subklonierung von DNA-Fragmenten
- Herstellung kompetenter Bakterien
- Transformation von kompetenten Bakterien mit Plasmid-DNA
- Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Massstab (Minipräparation)
- Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren
- Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Reagenzien und Proben für die Durchführung enzymatischer Reaktionen wurden grundsätzlich auf Eis gekühlt und, sofern nicht anders angegeben, mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffersystemen angesetzt.

2.2.1. Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1.1. Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe wurde „QIAamp Tissue“-Kit (Qiagen) verwendet. Das Verfahren beruht auf einer modifizierten Form der alkalischen Lyse der Zellen (Birnboim und Doly, 1979), sowie auf der Aufreinigung genomischer DNA durch Adsorption an Anionentauschersäulen.

25 mg Gewebe wurden in kleine Stücke zerschnitten, in ein 1,5 ml Röhrchen überführt und in 180 µl ATL-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K-Lösung, wurde die Suspension so lange bei 55°C inkubiert, bis die Zellen vollständig lysiert waren. Danach wurden 20 µl RNase A-Lösung (20 mg/ml) zugegeben, gemischt und 2 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer AL und erneutem Mischen wurde den Ansatz 10 min bei 70°C inkubiert. Anschliessend wurden 210 µl 96% Ethanol zugegeben, gemischt, die Lösung auf eine Qiagen-Säule aufgetragen und 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäss gestellt. Die Säule wurde zweimal mit

500 µl AW-Puffer gewaschen. Zum Eluieren der DNA wurden zweimal jeweils 200 µl auf 70°C vorgewärmter Puffer AE oder dH₂O auf die Säule aufgetragen, 1 min inkubiert und 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

2.2.1.2. Isolierung grösserer Mengen von Plasmid-DNA

Zur Isolation grösserer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde der QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet. Die mit dieser Methode isolierte Plasmid-DNA kann u.a. für Restriktionsanalysen, Hybridisierungsexperimente, zur Subklonierung oder Sequenzierung eingesetzt werden. Das Verfahren beinhaltet eine modifizierte Form der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) zur Präparation eines zellfreien Lysates sowie eine affinitätschromatographische Aufreinigung der DNA durch eine Säule.

100 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika im 500 ml-Erlenmeyerkolben wurden mit 50-100 µl einer Bakterienvorkultur beimpft und die Kultur über Nacht bei 37°C (250 U/min) geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde in GS3-Zentrifugenbecher überführt und im GS3-Rotor bei 6000 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge), der Überstand abgegossen und das Bakteriensediment in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml Puffer P2 wurden die Zellen lysiert, sowie Proteine und DNA durch die alkalischen Bedingungen denaturiert. Durch die im Puffer P1 enthaltene RNase wurde bakterielle RNA degradiert. Zur Vermeidung irreversibler Denaturierung der Plasmid-DNA wurde der Ansatz maximal 5 min bei RT inkubiert. Nach erfolgter Neutralisierung durch Zugabe von 4 ml Puffer P3 banden sich Proteine und genomische DNA in Detergenz-Komplexen, während die Plasmid-DNA in der Lösung blieb. Um die Zelltrümmer und die ausgefällten Salzkomplexe zu sedimentieren, wurde der Ansatz für 30 min bei 20000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 10 ml Puffer QBT äquilibrierte „Qiagen“-Säule (Tip 250) gegeben und die Säule zweimal mit jeweils 10 ml Puffer QC gewaschen. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wurde durch Erhöhung der Salzkonzentration und des pH-Wertes mit 5 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde aus dem Eluat durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt, 30 min bei ≥ 15000 x g und 4°C abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen, ca. 10 min luftgetrocknet und anschliessend in 100-200 µl dH₂O oder 1x TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

Um bakterielle Endotoxine, die eine Transfektion stören können, auszuschliessen, wird DNA für die Transfektionen mit dem „EndoFree Plasmid Maxi“-Kit (Qiagen) präpariert.

2.2.1.3. Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Methode nach Sambrook et al. (2001) dient der schnellen Isolierung von kleinen Mengen Plasmid-DNA, wobei die Qualität der DNA für eine Restriktionsanalyse sowie für die radioaktive Sequenzierung ausreichend ist.

5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (250 U/min). Danach wurden 1,5 ml Bakteriensuspension in ein Eppendorfgefäss überführt und bei 12000 x g für 30 sec bei 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl eiskalter Resuspension-Lösung aufgelöst. Durch Zugabe von 200 µl Lysis-Puffer wurden die Zellen aufgebrochen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min auf Eis wurde die Suspension mit 150 µl eiskaltem Neutralisierungspuffer gemischt und für weitere 3-5 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäss überführt und zur Extraktion mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (Roth) gemischt. Durch Zentrifugation bei 12000 x g für 3 min bei 4°C wurden die organische und plasmidhaltige wässrige Phasen getrennt. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in ein frisches Eppendorfgefäss überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 2 Vol. 96% Ethanol für 5 min bei RT. Durch den anschliessenden Zentrifugationsschritt mit 12000 x g für 10 min bei 4°C wurde die DNA pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, in der *Speed Vac* 1-2 min getrocknet und in 50 µl 20 µg/ml DNase-freie RNase A enthaltendes 1x TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

2.2.1.4. Plasmid-Minipräparation nach Qiagen-Protokoll

Diese Methode wurde hauptsächlich bei zu sequenzierenden Plasmid-Proben angewendet, um eine hohe Ausbeute an Plasmid-DNA zu erzielen. Alle Schritte zur Isolierung der Plasmid-DNA wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen). Die Ausbeute betrug 10-15 µg hochreine Plasmid-DNA.

2.2.1.5. Isolierung von PAC-DNA im grossen Massstab

PAC (*PI derived artificial chromosome*) -Vektoren gehören zu einer neuen Familie auf *E. coli* basierten Klonierungssystemen. Bis zu 150 kb der Insert-DNA konnten mit Hilfe dieses Systems kloniert werden. PACs unterscheiden sich von den herkömmlichen Plasmid-Vektoren vor allem durch ihre niedrige Kopienzahl in der Bakterienzelle. Lediglich sind nur ein bis zwei Plasmidkopien pro Zelle vorhanden. Dabei kann die Kopienzahl auf 40-50 pro Zelle gesteigert werden, wenn man die Replikation des Plasmides mit IPTG induziert.

5 ml LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (250 U/min). 200 ml LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin im 500 ml-Erlenmeyerkolben wurden mit 200 µl der Bakterienvorkultur beimpft, die Kultur wurde über Nacht bei 37°C (250 U/min) geschüttelt und danach wurde IPTG bis zu 1 mM Endkonzentration dazugegeben. Die Kultur wurde weiter bei 37°C unter Schütteln (250 U/min) inkubiert, bis die Bakterien eine optische Dichte (OD₆₀₀) von ca. 1,0 erreichten. Die Bakteriensuspension wurde in GSA-Zentrifugenbecher überführt und im GSA-Rotor bei 5000 rpm für 15 min bei 4°C abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge), der Überstand abgegossen und das Bakteriensediment in 5 ml Resuspensionspuffer P1 (Qiagen) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 min auf Eis wurden 10 ml Lysepuffer P2 (Qiagen) zugegeben, die Suspension leicht geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zugabe von 7,5 ml eiskaltem Präzipitationspuffer P3 (Qiagen) wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis gehalten. Anschliessend wurde das Präzipitat durch 30 min Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C in der Sorvall-Zentrifuge RC5C (GSA Rotor) vom DNA-haltigen Überstand abgetrennt. Der Überstand wurde in einen frischen Zentrifugenbecher überführt und erneut 30 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Eine Qiagen-Tip-500-Säule (Qiagen) wurde mit 10 ml Äquilibrationpuffer QBT äquilibriert und anschliessend der DNA-Überstand nach der Zentrifugation auf die Säule aufgebracht. Danach wurde die Säule zweimal mit 50 ml Waschpuffer QC gewaschen. Nach dem Waschen wurde PAC-DNA mit 10 ml auf 65°C vorgewärmtem Elutionspuffer QF eluiert. Dazu wurde jeweils 1 ml Elutionspuffer schrittweise auf die Säule gegeben und das Eluat in einem frischen 50 ml Zentrifugationsröhrchen aufgefangen. Durch Zugabe von 0,7fachem Volumen Isopropanol wurde die DNA präzipitiert und anschliessend bei 4°C und 10000 rpm 30 min pelletiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und der Überstand vollständig mit einer Pipette entfernt. Anschliessend wurde DNA-Sediment an der Luft getrocknet und in 100-300 µl 1x TE-Puffer aufgelöst. Um die getrocknete DNA vollständig lösen zu können, wurde die Lösung 30 min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert.

2.2.1.6. Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Präparation grösserer Mengen Gesamt-RNA aus Gewebe und eukariotischen Zellen wurde eine etwas modifizierte Methode von Chirgwin und Chomczynski verwendet (Chirgwin et al., 1979; Chomczynski and Sacchi, 1987). Das Grundprinzip dieses Verfahrens beruht auf den Eigenschaften von Guanidinisothiocyanat, das nicht nur die Zelllyse hervorruft, sondern gleichzeitig auch RNasen inaktivieren kann. Durch eine anschliessende organische Extraktion werden Proteine von der RNA abgetrennt. Für die Isolation wurde „peqGold RNAPure“-Lösung (Peqlab) verwendet, die eine Mischung aus Guanidinisothiocyanat und Phenol enthält.

50-100 mg vom eingefrorenen Gewebe wurden in ein 15 ml Röhrchen mit 1 ml „peqGOLD RNAPure“-Lösung gegeben und mit einem Glashomogenisator homogenisiert. Das erhaltene Homogenat wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäss überführt.

Die Monolayer-Zellen wurden direkt in der Zellkulturflasche nach dem Waschen mit PBS durch die Zugabe von peqGOLD RNAPure-Lösung (1 ml pro 10 cm²) und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette lysiert. Die lysierten Zellen wurden in einem Volumen von 1 ml in 2 ml Reaktionsgefässe aliquotiert.

Um eine komplette Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe zu gewährleisten, wurden die Proben nach der Lyse für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro eingesetzten Milliliter peqGOLD RNAPure-Lösung wurden die Proben 15 sec kräftig geschüttelt und danach 10 min bei RT inkubiert. Eine anschliessende Zentrifugation (5 min bei 12000 x g und 4°C) führte zur einer Phasentrennung, wobei die obere, wässrige Phase, in der sich die RNA befand, in ein neues Reaktionsgefäss überführt wurde. Um die RNA auszufällen, wurde 0,5 ml Isopropanol dazugegeben, die Proben auf dem Vortex gemischt, 10 min bei RT inkubiert und anschliessend für 10 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in RNase-freiem Wasser gelöst. Die isolierte RNA konnte für die Gewinnung von poly(A)⁺-RNA, RT-PCR-Reaktionen, Primer-Extension-Analyse und RNase-Protection-Assay eingesetzt werden. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde die RNA in 20 µg Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C aufbewahrt.

2.2.1.7. Isolierung von poly(A)⁺-RNA

Die Isolierung von mRNA erfolgte durch Hybridisierung des poly(A)-Schwanzes mit immobilisiertem poly(dT)₃₀. Dazu wurde „Oligotex“-Suspension (Oligotex mRNA Mini Kit, Qiagen) verwendet, die aus Latexkugeln besteht, an die dC₁₀T₃₀-Oligonukleotide gebunden sind.

Bis zu 250 µg Gesamt-RNA wurden in 250 µl RNase-freies Wassers gelöst und 250 µl Bindungspuffer OBB sowie 15 µl „Oligotex“-Suspension dazugegeben. Die Probe wurde für 3 min bei 70°C inkubiert und dann 10 min bei RT stengelassen. In dieser Phase erfolgte die Bindung der mRNA an die Latexpartikel. Anschliessend wurden die Oligotex-mRNA Komplexe durch Zentrifugation (2 min bei 14000 x g) pelletiert und der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde in 400 µl Waschpuffer OW2 resuspendiert und auf eine „Qiagen“-Spin-Säule aufgetragen. Nach einem Zentrifugationschritt (1 min bei 14000 x g) wurde die Säule in ein anderes 1,5 ml Reaktionsgefäss gestellt, noch einmal mit 400 µl Waschpuffer OW2 gewaschen und erneut zentrifugiert. In die Säule in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäss wurde 20 µl 70°C warmer Elutionspuffer OEB zupepitert, das Pellet resuspendiert und 1 min bei 14000 x g zentrifugiert.

2.2.1.8. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Eine exakte Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren ist für die Durchführung der vielen molekularbiologischen Analysen unabdingbar. Die Konzentrationen wurden mit einem Spektralphotometer (Typ 552S, PE Applied Biosystems) bestimmt. Nach einem Abgleichen der Nullwerte konnte das Absorptionsmaximum der gemessenen Nucleinsäuren (bei 260 nm) bestimmt und gleichzeitig Verunreinigungen durch Proteine (bei 280 nm) bzw. Salze (bei 230 nm) festgestellt werden. Die Berechnung der Nucleinsäurekonzentration wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$C = E_{260} \times f \times c$$

C = Konzentration der gemessenen Probe in µg/ml

E_{260} = Extinktion bei 260 nm

f = Verdünnungsfaktor

c = Konzentration_{standard} / Extinktion_{standard}

für doppelsträngige DNA: $c = 50 \text{ µg/ml}$

für einzelsträngige DNA: $c = 33 \mu\text{g/ml}$

für RNA: $c = 40 \mu\text{g/ml}$

E_{230} = Absorptionsmaximum von Salzen

E_{260} = Absorptionsmaximum von DNA/RNA

E_{280} = Absorptionsmaximum vieler Proteine

Der Quotient E_{260}/E_{280} ist ein Mass für die Reinheit der DNA oder der RNA und sollte $2,0 \pm 0,2$ betragen.

2.2.2. Enzymatische Modifikation und Klonierungstechniken von DNA

2.2.2.1. DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Die Hydrolyse von dsDNA-Fragmenten und Plasmid-DNA erfolgte durch Restriktionsendonukleasen des Typs II. Diese Enzyme erkennen und schneiden palindrome Tetra-, Penta- oder Hexanukleotidsequenzen. Dabei entstehen an den 3'-Enden des gespaltenen DNA-Doppelstranges Hydroxylgruppen, während die 5'-Enden Phosphatgruppen tragen. Je nachdem, welches Enzym verwendet wurde, bekommt DNA bei einer Restriktion glatte (*blunt*) oder versetzte (*sticky*) Enden. Die Aktivität der Restriktionsenzyme wird wie folgt definiert: ein Unit eines Enzyms ist diejenige Menge des Enzyms, die ausreicht, um $1 \mu\text{g}$ λ -DNA in 1 h vollständig zu schneiden. Aufgrund dieser Definition konnte die benötigte Menge an Enzym anhand der zu spaltenen DNA-Menge berechnet werden. Für eine hydrolytische Spaltung wurden zwischen 200 ng (analytischer Restriktion) und 4 μg (präparative Restriktion) DNA mit der entsprechenden Menge Enzym und 1/10 Volumen an 10x Reaktionspuffer versetzt und mit dH_2O auf das Endvolumen aufgefüllt. Analytische Restriktionen wurden mindestens 1 h, präparative Restriktionen mehrere Stunden oder über Nacht bei der enzymespezifischen Temperatur durchgeführt. Für Doppelspaltungen wurde entweder ein für beide Enzyme geeigneter Puffer genommen, oder die DNA wurde nach Verdauung mit dem ersten Enzym zuerst ausgefällt, in dH_2O gelöst und danach mit dem zweiten Restriktionsenzym geschnitten. Die vollständige Spaltung der DNA wurde auf dem Agarosegel überprüft.

2.2.2.2. Dephosphorylierung von linearisierten Plasmiden

Nach der Spaltung mit Restriktionsendonukleasen trägt das 5'-Ende der gespaltenen DNA eine Phosphatgruppe. Um eine Religation von linearisierten Plasmiden während der nachfolgenden Ligation zu verhindern, wurde das Plasmid dephosphoryliert. Dazu wurde der Verdauungsansatz direkt nach der Restriktionsspaltung fünffach verdünnt und 1 U alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (Roche) in entsprechendem Reaktionspuffer eingesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wurde anschliessend das Enzym inaktiviert (10 min bei 65°C). Die dephosphorylierte DNA wurde durch eine Phenol/Chloroform-Behandlung aufgereinigt und mit 2,5 Vol. Ethanol und 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5,2) gefällt. Anschliessend wurde das Pellet mit 1x TE Puffer (pH 8,0) bis zur DNA Endkonzentration von 50 ng/µl gelöst.

2.2.2.3. Ligation eines DNA-Inserts in einen Plasmid-Vektor

Die ausgeschnittenen und isolierten DNA-Fragmente konnten direkt in die komplementären Restriktionsschnittstellen des Plasmid-Vektors ligiert werden. Dabei katalysiert die T4-DNA-Ligase in Anwesenheit von ATP eine Bildung der kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen.

Für einen 10 µl Ligationsansatz wurden 50-200 ng Vektor-DNA, DNA-Fragment (im molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:3 zur Vektor-DNA) und 3 U T4-DNA-Ligase (Promega) in entsprechendem Reaktionspuffer eingesetzt. Die Reaktion wurde entweder 4 h bei 20°C oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

2.2.2.4. Klonierung von PCR-Produkten

Die für die PCR häufig benutzte *Taq*-DNA-Polymerase fügt unspezifisch an das 3'-Ende eines neusynthetisierten DNA Stranges ein Desoxyadenosin an. Dieses Prinzip wird in „pGEM-T-Vektor-System“-Kit von Promega für eine relativ einfache Klonierung von PCR-Produkten benutzt. Der in diesem Kit vorhandener pGEM-T-Vektor trägt in einer Klonierungsstelle die komplementäre 3'-Desoxy-Thymidinüberhänge, damit die PCR-Produkte ohne weitere Aufarbeitung kloniert werden können.

Von der PCR wurden 2 µl Produkt entnommen und 1 µl 10x Ligationspuffer, 50 ng Vektor-DNA sowie 3 U T4-DNA-Ligase (Promega) dazugegeben. Das Reaktionsvolumen wurde mit dH₂O auf 10 µl eingestellt und die DNA über Nacht bei 15°C ligiert.

2.2.2.5. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

2.2.2.5.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Hitzetransformation

Kompetente Bakterienzellen besitzen die Fähigkeit, fremde DNA effizient aufzunehmen. Dazu werden die Zellen mit hochkonzentrierten Salzlösungen behandelt, so dass die Plasmamembran der Zellen unter bestimmten Bedingungen für die DNA-Aufnahme durchlässig wird.

Zuerst wurden 5 ml LB-Medium mit einer frischen Kolonie des gewünschten Bakterienstammes inokuliert und über Nacht bei 37°C (250 U/min) geschüttelt. Danach wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml Bakterienvorkultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (250 U/min) inkubiert, bis die Bakterien eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,5 bei 600 nm erreicht hatten. Die Kultur wurde abgekühlt und dann bei 2700 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde vorsichtig in 30 ml eiskalter MgCl₂-CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde das Pellet in 2 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur Transformation gelagert.

2.2.2.5.2 Herstellung kompetenter Bakterien für die Elektroporation

1 l LB-Medium wurde mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu OD₆₀₀ von 0,5-0,7 wachsen gelassen. Die Bakterien wurden 10 min im Eisbad abgekühlt und 15 min bei 4000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Bakterien-Sediment wurde zunächst mit 1 l und anschliessend mit 500 ml eiskaltem 10% Glycerin gewaschen. Danach wird das Sediment in 250 ml eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Schliesslich werden die Bakterien in 2 ml eiskaltem 10% Glycerin aufgenommen, in Aliquoten von 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.2.6. Hitzetransformation von Bakterien

Bei einer Transformation werden Plasmide in die kompetenten Zellen übertragen. Die Plasmide werden auch als Autosomen bezeichnet, da sie sich in einer geeigneten Wirtszelle autonom replizieren können. Bei der Transformation wird die zu den kompetenten Bakterienzellen zugegebene DNA als Doppelstrang an die Zellmembran gebunden. Nachdem einer der beiden Stränge durch die membrangebundenen Nukleasen abgebaut worden ist, wird die DNA während eines Hitzeschocks als Einzelstrang von der Zelle aufgenommen.

Zur Transformation wurden die kompetenten Zellen zunächst auf Eis langsam aufgetaut. Danach wurde maximal 10 µl Plasmid-DNA-Lösung mit 200 µl der kompetenten Bakterien gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 90 sec bei 42°C erhitzt. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 800 µl SOC-Medium versetzt und für 45 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschliessend wurden 50-100 µl transformierter Bakterien auf LB-Agarplatten, die entsprechende Zusätze von Antibiotika, IPTG, X-Gal und etc. enthielten, ausplattiert. Nur die Zellen, die Plasmid-DNA aufgenommen hatten, tragen die Resistenz gegen die in den Agarplatten enthaltenden Antibiotika und können über Nacht im Brutschrank bei 37°C zu einer Einzelkolonie heranwachsen.

2.2.2.7. Elektroporation

Diese Methode hat den Vorteil, dass unabhängig von der Vektorgrösse eine sehr hohe Transformationsrate (bei *E. coli* bis zu 10^{10} Transformanten pro µg DNA in Abhängigkeit vom verwendeten Stamm) erreicht werden kann.

Die elektrokompenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1-2 µl der Plasmid-DNA-Lösung versetzt, 1 min auf dem Eis inkubiert und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten gefüllt. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe eines „Gene Pulser“-Gerätes der Firma BioRad. Die Küvetten wurden in die Apparatur eingesetzt und einem Puls mit einer Zeitkonstante von 4,5 bis 5 msec, bei einer Feldstärke von 12,5 kV/cm (2,5 kV, 25 µF und 200 Ω) ausgesetzt. Anschliessend werden die transfizierten Zellen sofort in 1 ml LB-Medium suspendiert, in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäss 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert und auf Agarplatten ausplattiert.

2.2.3. Gelelektrophorese von DNA und RNA

2.2.3.1. Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde eine analytische oder präparative horizontale Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen in Seakem-Agarose (Biozym) verwendet. Je nach Grösse der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurden Agarose-Konzentrationen von 0,8 bis 2,0% (w/v) gewählt. Für eine feine Auftrennung von PCR-Produkten und kleinen DNA-Fragmenten wurde 3-4%ige NuSieve-Agarose (Biozym) benutzt.

Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose mit der entsprechenden Menge des 1x TAE-Puffers aufgekocht und die Ethidiumbromid-Lösung bis auf eine Endkonzentration von 0,4 µg/ml dazu pipettiert. Die auf unter 60°C abgekühlte Gellösung wurde in die vorgefertigten Gelträger gegossen. Nach einer vollständigen Verfestigung des Gels wurde die Elektrophorese in einer mit 1x TAE-Puffer gefüllten Gelkammer bei konstanter Voltzahl (5-10 V/cm) durchgeführt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1/5 Volumen 6x Probenpuffer gemischt.

Durch die Einlagerung von Ethidiumbromid während des Laufes fluoresziert die DNA unter UV-Licht bei 312 nm. Das Gel mit den fluoreszierenden Banden wurde mit einer Polaroid-Kamera (Sigma) auf Polaroid-Film vom Typ 667 aufgenommen. Bei den DNA-Präparationen, die nach der Gelelektrophorese weiter verwendet werden sollten, wurde zur Vermeidung von durch UV-Licht ausgelösten DNA-Schäden ausschliesslich langwelliges UV-Licht (365 nm) benutzt.

2.2.3.2. Längenstandards

Um die Grösse der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde parallel zu den DNA-Proben 300-600 ng Marker-DNA auf das Elektrophoresegel aufgetragen.

Als Grössenmarker diente mit *Eco91I* (*BstEII*) geschnittene λ -DNA (Marker 15; Fermentas) bzw. zur Abschätzung kleiner Fragmente mit *MspI* (*HpaII*) geschnittene pUC19 Plasmid-DNA (Marker 23; Fermentas). Bei diesen Spaltungen treten folgende Marker-Fragmente auf:

- λ -DNA / *Eco91I* (*BstEII*): 8453 bp, 7242 bp, 6369 bp, 5687 bp, 4822 bp, 4324 bp,

3675 bp, 2323 bp, 1929 bp, 1371 bp, 1264 bp, 702 bp,
224 bp, 117 bp
- pUC19-DNA / *MspI* (*HpaII*): 501 bp, 489 bp, 404 bp, 331 bp, 242 bp, 190 bp, 147 bp,
111 bp, 110 bp, 67 bp, 34 bp, 26 bp

Zusätzlich wurden die 100 bp-Leiter (Fermentas) und die 1 kb-Leiter (Gibco BRL) verwendet. Die DNA-Größenmarker wurden ausser zur Fragmentgrößenabschätzung auch zur DNA-Konzentrationsbestimmung verwendet.

2.2.3.3. Präparation von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde mit einem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) durchgeführt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter UV-Licht von 365 nm aus dem Gel geschnitten, das Gelstück gewogen, mit 3 Vol. QG-Puffer versetzt und bei 50°C bis zur vollständigen Lösen des Gels inkubiert. Dabei wurde alle 2-3 min der Ansatz gemischt. Danach wurde ein Gelvolumen Isopropanol dazugegeben, die Lösung auf eine *Spin*-Säule (Qiagen) aufgetragen und 1 min in einer Microzentrifuge bei 13000 rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde die Säule mit QG- und PE-Puffer gewaschen. Dazu wurden zunächst 0,5 ml QG-Puffer aufgetragen und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurden 0,75 ml PE-Puffer aufgetragen und erneut bei 13000 rpm zentrifugiert. Zur Entfernung noch vorhandener Ethanol-Reste wurde anschliessend noch einmal 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäss platziert und die DNA mit 30-50 µl EB-Puffer oder dH₂O eluiert.

2.2.3.4. Elektrophorese von RNA im Agarosegel

Die Qualität der isolierten RNA wurde zunächst mit Hilfe einer denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Zur Herstellung des Gels wurden 1,5 g Agarose (ein 1%iges Gel) in 94 ml DEPC-behandeltem Wasser aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig auflöste. Nachdem die Gellösung auf etwa 60°C abgekühlt war, wurden 29 ml 5x MOPS-Puffer, 27 ml Formaldehyd (37%; 12,3 M; pH > 4) und 7,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) dazugegeben (Endkonzentrationen: 1x MOPS-Puffer, 2,2 M Formaldehyd, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) und das Gel vorsichtig gegossen. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden 4,5 µl RNA (bis zu 30 µg) mit 2,0 µl 5x MOPS-Puffer, 3,5 µl Formaldehyd und 10 µl

Formamid gemischt (Endvolumen: 20 µl), für 15 min bei 65°C inkubiert und nach 5 min Inkubation auf Eis mit 1/10 Vol. 10x RNA-Probenpuffer gemischt. Nach der vollständigen Verfestigung des Gels wurde die Elektrophorese in dem 1x MOPS-Puffer mit konstanter Voltzahl (3-4 V/cm) durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande das untere Drittel des Gels erreichte.

2.2.3.5. Hochauflösende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der einzelnen Sequenzreaktionen, die Analyse der Primer-Extensinsprodukte, RNase-Protektionsprodukte sowie Genotypisierung erfolgten auf denaturierenden, hochauflösenden, 6%igen Harnstoff-Polyacrylamidgelen. Die zwei Glasplatten (34 x 42 cm² und 34 x 44 cm²) wurden gründlich gesäubert und mit 70% Ethanol nachgereinigt. Auf die kleinere Glasplatte wurden 2 ml *Gel Slick Solution* (BMA) gleichmässig verteilt und poliert. Danach wurden drei 0,2 mm dicke Abstandhalter aufgelegt und die beiden Glasplatten mit Spannklammern zusammengeklammert. 80 ml Harnstoff-Acrylamid-Lösung wurde mit 560 µl 10% (w/v) APS und 80 µl TEMED gemischt und zwischen die Glasplatten gegossen. Anschliessend wurde ein Kamm gesteckt und das Gel mindestens 1 Stunde polymerisiert.

Das verfestigte Gel wurde in die Elektrophoresekammer (Stratagene) eingespannt, der Kamm vorsichtig heraus gezogen, die Kammtaschen gründlich gespült und die Vorelektrophorese für 30 min bei 60 W/35mA in 1x TBE-Puffer durchgeführt. Direkt vor dem Auftragen der Proben wurden die Kammtaschen erneut mit 1x TBE-Puffer gespült. Die Elektrophorese wurde bei 60 W/35 mA je nach Gellauf 1,5-3 Stunden durchgeführt. Nach der Gelelektrophorese wurde die obere, kleinere Platte abgetrennt und das Gel 20 min fixiert. Anschliessend wurde das Gel vorsichtig auf ein 3MM Whatman-Papier übertragen und mit Haushaltsfolie abgedeckt. Das Gel wurde bei 80°C eine Stunde unter Vakuum getrocknet und auf einen Röntgenfilm (Kodak BioMaxMR1) exponiert.

2.2.4. Transfer von DNA-Fragmenten: Southern-Blotting

Mit Hilfe des Southern-Transfers (Southern, 1975) werden DNA-Fragmente aus Agarosegelen auf Nylonmembranen übertragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht (312 nm) fotografiert. So könnten später die Signale auf dem Röntgenfilm den entsprechenden DNA-Banden im Agarosegel zugeordnet werden. Danach wurde das Gel 15

min in 500 ml Depurinierungslösung auf dem Schüttler inkubiert. Anschliessend wurde es für 30 min in Denaturierungslösung überführt und dann zweimal 15 min in Neutralisierungslösung behandelt. Das Gel wurde luftblasenfrei auf ein mit 10x SSC-Lösung befeuchtetes Filterpapier gelegt, welches in ein mit 10x SSC gefülltes Pufferreservoir eintaucht worden war. Die Ränder des Gels wurden mit Haushaltsfolie so abgedeckt, dass der kapillare Transport des Puffers nur durch das Gel erfolgen konnte. Eine auf Gelgrösse zugeschnittene und mit 10x SSC-Lösung befeuchtete Hybond-N-Membran (Amersham) und zwei mit 10x SSC-Lösung befeuchtete Filterpapiere wurden luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Die Kapillardiffusion, mit deren Hilfe die DNA-Fragmente aus dem Gel auf die Membran transferiert werden, wurde durch mehrere Lagen trockener saugfähiger Zellstoffpapiere ermöglicht, die auf die Filterpapiere gelegt wurden. Darauf wurden eine Glasplatte und zum Beschweren ein 500 g schweres Gewicht aufgelegt. Der Transfer erfolgte sechs Stunden bis über Nacht bei RT. Anschliessend wurde die Position der Geltaschen auf der Membran markiert. Die Membran wurde vom Gel abgenommen, in 2x SSC-Lösung kurz gewaschen und auf frischem Filterpapier luftgetrocknet. Zur Immobilisierung der DNA wurde die Membran 30 Sekunden in einem UV-Transilluminator (254 nm) bestrahlt. Die Membran wurde in Haushaltsfolie eingewickelt und bei 4°C gelagert.

2.2.5. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Für radioaktive Markierung von DNA-Sonden wurde der „Prime-a-Gene Labeling System“-Kit (Promega) verwendet, der auf die von Feinberg und Vogelstein, 1983 beschriebene Methode des "*random priming*" basiert. Diese Methode ermöglicht eine hohe Ausbeute an spezifisch radioaktiv markierten DNA-Sonden ($>1 \times 10^9$ cpm/ μ g DNA).

Die Markierung erfolgte mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ durch eine komplementäre Synthese der einzelsträngigen DNA mit Klenow-Polymerase und *Random*-Hexanukleotid-Primern. Der Markierungsansatz (Endvolumen 50 μ l) wurde wie folgt zusammengesetzt:

x μ l	DNA (25-50 ng)
y μ l	dH ₂ O
10 μ l	5x Reaktionspuffer
2 μ l	dNTPs-Mischung (enthält je 1 μ l der drei nicht markierten Nukleotide)
2 μ l	Nuklease-freies BSA
5 μ l	$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l)

2 μ l Klenow-Enzym (5 U)

Die DNA wurde mit der entsprechenden Menge Wasser für 2 min bei 95-100°C denaturiert, schnell auf Eis gestellt und die restlichen Komponenten zugegeben. Die Inkubation erfolgte 60 min bei RT. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Erhitzen bei 95-100°C für 2 min beendet und nicht eingebaute Nucleotide über „Sephadex G-50-NICK“-Säule von der markierten DNA abgetrennt. Die Einbaurrate liegt je nach Sonde zwischen 40 und 80%.

2.2.6. Aufreinigung radioaktiver DNA-Sonden

Die radioaktiven Sonden wurden durch Gelfiltration über eine „Sephadex G-50-NICK“-Säule (Amersham) von nicht eingebauten Nukleotiden und niedermolekularen Substanzen getrennt. Dazu wurde die Säule zuerst mit 3 ml 1x TE-Puffer (pH 7,5) äquilibriert und die Markierungsreaktion in 100 μ l aufgetragen. Danach wurden 400 μ l 1x TE-Puffer (pH 7,5) auf die Säule pipettiert, der Durchlauf wurde gesammelt und verworfen, da er keine radioaktiven Signale enthielt. Nach einem Auftragen von weiteren 400 μ l 1x TE-Puffer (pH 7,5) wurde das Eluat der Säule zu je 3 Tropfen in Reaktionsgefäßen gesammelt. Durch eine Messung mit dem Geigerzähler wurden die markierten Sonden identifiziert und gegebenenfalls in ein Reaktionsgefäß pipettiert.

Die Aktivität und damit Qualität der Probe sowie erforderliche Verdünnung für den Einsatz wurde durch Entnahme von 1 μ l und Messung in einem Szintillationsmessgerät bestimmt.

2.2.7. Endmarkierung von Oligonukleotiden und 5'-dephosphorylierte DNA-Leiter

Die radioaktive 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden und 5'-dephosphorylierte DNA-Leiter wurde mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase (Promega) durchgeführt. Dabei wird in einer durch das Enzym katalysierten Reaktion die γ -Phosphatgruppe des ATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe des Oligonukleotides bzw. der DNA-Leiter übertragen. Der Markierungsansatz (Endvolumen 10 μ l) wurde wie folgt erstellt:

x μ l Oligonukleotid (10 pmol) oder 5'-dephosphorylierte DNA-Leiter (250 ng)
y μ l dH₂O
1 μ l 10x T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer

- 5 μ l $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)
- 1 μ l T4-Polynukleotid-Kinase (8-10 U/ μ l)

Der Einsatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Enzym 2 min bei 90°C inaktiviert. Anschliessend wurde zum Einsatz 90 μ l dH₂O dazugegeben und die Einbaurrate des radioaktiven Nukleotids sowie die spezifische Aktivität der Probe bestimmt. Danach wurde die Probe bei -20°C gelagert.

2.2.8. Synthese radioaktiv markierter RNA-Sonde

Für die Synthese von radioaktiv markierter RNA-Sonden wurde T3-RNA-Polymerase (Fermentas) verwendet. Die Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers in einem Volumen von 20 μ l mit 1 μ g linearisierter Plasmid-DNA als Matritze und 5 μ l $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (800 Ci/mmol) durchgeführt. Um die DNA zu entfernen wurde der Reaktion 1 μ l DNaseI (10U/ μ l, Roche) zugegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Reinigung der hergestellten RNA wurden Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Anschliessend wurde radioaktiv markierte RNA durch Gelfiltration (siehe 2.2.6) von den nicht eingebauten Nukleotiden aufgereinigt. 1 μ l des Gesamtansatzes wurde zur Bestimmung der Aktivität der Sonde abgenommen, der Rest wurde sofort in eine Hybridisierung eingesetzt.

2.2.8.1. Herstellung der radioaktiv markierten *PAX3*-RNA-Sonde für Ribonuklease-Protektionsassay

Die *PAX3*-RNA-Sonde wurde aus dem 559 bp langen *StuI-NaeI* Fragment (von -280 bis +379, Abb. 3.7) gewonnen, das in pBluescript II KS(+) inkloniert wurde. Die radioaktiv markierte RNA-Sonde wurde *in vitro* von mit *EcoRI* linearisierter Plasmid-DNA mittels T3-RNA-Polymerase in Anwesenheit von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (800 Ci/mmol) syntetisiert und im weiteren mit Gesamt-RNA hybridisiert.

2.2.9. Hybridisierung radioaktiver Sonden an membrangebundener RNA

Die Membran wird in eine Hybridisierungsröhre mit 5 ml bei 68°C vorgewärmte „ExpressHyb“-Lösung (Clontech) gegeben und für 30 min bei 68°C im Hybridisierungssofen

präinkubiert. Die radioaktiv markierte DNA-Probe wurde mit 100 µg Lachsspermien-DNA (1 mg/ml) gemischt, 10 min im kochenden Wasser denaturiert und 5 min auf Eis abgekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen. In die Hybridisierungsröhre wurden danach 5 ml frische Hybridisierungslösung mit der radioaktiv markierten Probe ($1-2 \times 10^6$ cpm auf 1 ml Hybridisierungspuffer) gegeben. Die Hybridisierung erfolgte 1 Stunde bei 68°C im Hybridisierungsofen. Nach der Hybridisierung wurde die Membran dreimal für je 15 min bei RT mit Waschpuffer I, dann zweimal für je 40 min bei 50°C mit Waschpuffer II gewaschen. Danach wurde die Membran in eine Frischhaltefolie eingepackt und mit einem Röntgenfilm exponiert.

2.2.10. Hybridisierung radioaktiver Sonden an membrangebundener DNA

50 µl Lachsspermien-DNA (10 mg/ml) wird 3 min im kochenden Wasser denaturiert und 5 min auf Eis abgekühlt. Die Membran wird in eine Hybridisierungsröhre mit 5 ml Hybridisierungspuffer gegeben und mit Lachsspermien-DNA für 1 Stunde bei 65°C im Hybridisierungsofen präinkubiert. Die radioaktiv markierte DNA-Probe wurde 3 min im kochenden Wasser denaturiert und 5 min auf Eis abgekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen. In die Hybridisierungsröhre wurden danach 5 ml frische Hybridisierungslösung mit der radioaktiv markierten Probe (1×10^6 cpm auf 1 ml Hybridisierungspuffer) gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C im Hybridisierungsofen. Nach der Hybridisierung wurde die Membran 10 min bei 65°C mit Waschpuffer I, 25 min bei 65°C mit Waschpuffer II, 15 min bei 65°C mit Waschpuffer III und 4 min bei RT mit Waschpuffer IV gewaschen. Danach wurden die Membran bei 37°C getrocknet, in eine Klarsichtfolie eingepackt und mit einem Röntgenfilm exponiert.

2.2.11. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der durch den Einbau von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) statistisch unterbrochenen DNA-Neusynthese. Die doppelsträngige DNA wird denaturiert und ein Einzelstrang nach Anlagerung eines sequenzspezifischen Primers durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt. Die limitierte Zugabe von ddNTPs bewirkt statistisch verteilte, basenspezifische Kettenabbrüche, die im Vergleich

die Position der vier Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in der Primärsequenz der DNA anzeigen.

2.2.11.1. Radioaktive Sequenzierung mit [α -³⁵S]dATP

Für die radioaktive Sequenzierung wurde ein kommerzieller Sequenzierungskit („³⁵S Sequencing™ Mixes“, Amersham) verwendet und nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Zur Erzeugung einzelsträngiger DNA wurden 1,5-2 µg Plasmid-DNA in 10 µl dH₂O mit 8 µl 1N NaOH versetzt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 3 Vol. 96% Ethanol wurde die DNA für 20 min bei -70°C gefällt. Die Probe wurde 15 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert, das Pellet mit kaltem 70% Ethanol (300 µl) gewaschen und in der *Speed Vac* getrocknet. Das Pellet wurde in 10 µl eiskaltem dH₂O gelöst und mit 2 µl Primer (1 pmol/µl) und 2 µl Annealingpuffer auf Eis gemischt. Zum Anlagern des Primers wurde die Reaktion 20 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 1 µl dH₂O, 3 µl Labelling-Mix-dATP, 1 µl [α -³⁵S]dATP (10 µCi/µl) sowie 2 µl verdünnter T7-DNA-Polymerase (1,5 U/µl) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Je 4,5 µl dieser Lösung wurden zu je 2,5 µl der bei 37°C für 1 min vorgewärmten Stop-Mixe „A“, „C“, „G“ und „T“ pipettiert und vorsichtig gemischt. Nach 5 min bei 37°C wurden 7 µl Stoppuffer hinzugegeben. Die Sequenzierungsreaktionen wurden bis zum Auftragen auf das Gel bei -20°C aufbewahrt. Kurz vor dem Auftragen wurden die Proben bei 95°C 3 min denaturiert, sofort auf Eis gestellt und dann 6 µl auf 6%igem denaturierendem Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.2.11.2. Nicht-radioaktive Sequenzierung

Die nichtradioaktive Sequenzierung wurde mit dem „BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction“-Kit (PE Applied Biosystems) durchgeführt. Dazu wurden 250 ng Plasmid-DNA und 10 pmol des jeweiligen Sequenz-Primers auf ein Volumen von 16 µl mit H₂O aufgefüllt und mit 4 µl „Terminator Ready Reaction“-Mix versetzt. Dieser Mix enthielt Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dTTP, dUTP), mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs, Ampli-Taq-DNA-Polymerase sowie Reaktionspuffer. Die Kettenabbruchreaktion wurde als PCR in einem Thermocycler (Biometra) mit Heizdeckel für 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

96°C	10 sec	Denaturierung
45-60°C	5 sec	Annealing
60°C	4 min	Elongation

Die Amplifikation der Kettenabbruchfragmente durch PCR bietet den Vorteil, dass nur relativ wenig Plasmid-DNA zur Sequenzierung eingesetzt werden kann. Nach der PCR wurden die Proben in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 80 µl dH₂O aufgefüllt. Danach wurden je 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 250 µl absoluter Ethanol zu den Ansätzen pipettiert und die DNA 15 min mit 12000 x g bei RT pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, für 5 min bei 12000 x g zentrifugiert, in der *Speed Vac* getrocknet und in 20 µl dH₂O (Merck) aufgenommen. Die Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Sequenzreaktionen erfolgte mit einem automatischen Kapillarsequenzier (Modell ABI Prism 310, PE Applied Biosystem) unter Verwendung der „ABI Prism 310 Data Collection V2.0“-Steuersoftware. Als Gelmatrix für die Auftrennung wurde ein POP-6 Polymer (PE Applied Biosystem) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 1500 V, 6 µA und 50°C 55 min. Als Laufpuffer wurde 1x *Genetic Analyzer Buffer* (PE Applied Biosystem) verwendet. Nach dem Lauf wurden die Sequenzen mit dem Programm „ABI Prism DNA Sequencing Analysis 3.4“ bearbeitet und ausgewertet.

2.2.12. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können kleinste Mengen genetischen Materials amplifiziert werden, wodurch dessen weitere Untersuchungen ermöglicht werden können (Saiki et al., 1985; Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). Dazu werden zwei synthetische Oligonukleotiden benötigt, die jeweils komplementär zu den 3'- und 5'-Enden des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes sind. Die Elongation dieser Primer wird durch die Taq-DNA-Polymerase in 5'→3'-Richtung katalysiert. Die Taq-DNA-Polymerase ist eine hitzestabile DNA-Polymerase, die aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* (Chien et al., 1976) gewonnen wird und eine optimale Amplifizierungstemperatur von 72°C besitzt. Durch die wiederholende Zyklen, die aus Denaturierung der DNA, nachfolgendes Annealing der Primer und anschließende Synthese des zweiten Stranges bestehen, wird der DNA-Abschnitt, der durch die beiden Primer begrenzt ist, amplifiziert. Dabei dient jeder neu gebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren, wodurch ein exponentieller Anstieg der Menge des gewünschten DNA-Abschnitts erreicht wird. Durch

diese exponentielle Amplifikation werden die spezifischen DNA-Stränge in 30-40 Zyklen in 10^6 -facher Kopienzahl erzeugt.

Ein Reaktionsansatz enthielt 1/10 Volumen 10x Taq-Polymerase-Puffer, 1-1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M jedes dNTP, 0,4 pmol/ μ l jeden Oligonukleotidprimer, 0,5-1,5 U Taq-DNA-Polymerase und 60-250 ng Plasmid-DNA oder genomische DNA als Matrize.

Für die radioaktive PCR wurde Reaktion in 25 μ l angesetzt und in den Reaktionsansatz zusätzlich zu den oben beschriebenen Komponenten 2,0 μ Ci [α - 32 P]-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 μ Ci/ μ l) zugegeben.

Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Biometra) mit Heizdeckel unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

3 min	95°C	Denaturierung		25-35 Wiederholungen des Reaktionszyklus
40 sec	94°C	Denaturierung		
30–60 sec	50–65°C	Annealing		
40–90 sec	72°C	Elongation		
5 min	72°C	Elongation		

Die Annealingtemperatur wurde mit Hilfe des Softwarepaketes MacMolly™Analyse durch Berechnung der Schmelztemperatur der Oligonukleotidprimer bestimmt und anschliessend experimentell ermittelt. Die Extensionszeiten richteten sich nach der Grösse des zu amplifizierenden DNA-Fragments. Im allgemeinen wurde für Reaktionen, in denen die PCR mit Taq-DNA-Polymerase durchgeführt wurde, für 1000 bp eine Elongationszeit von 1 min gewählt. Die für die einzelnen Primerpaare ideale $MgCl_2$ -Konzentration wurde experimentell ermittelt. In den meisten hier durchgeführten PCRs wurden Primerpaare verwendet, deren $MgCl_2$ -Optimum bei 1,5 mM lag. Neben der Taq-DNA-Polymerase (Eurogentec) wurde noch die „Expand™ Long Template PCR System“-Polymerase (Roche) eingesetzt. Die „Expand™ Long Template PCR System“-Polymerase ist besonders für die Amplifizierung langer DNA-Fragmente, sowie für eine hohe Produktausbeute geeignet.

Nach der PCR wurden 1/10 des Ansatzes mit 6x Probenpuffer gemischt und je nach Grösse des PCR-Produkts auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die radioaktive PCR wurde grundsätzlich für die Genotypisierung verwendet. Dafür wurden 2 μ l des PCR-Produktes mit 8 μ l Stoppuffer gemischt, bei 95°C 3 min denaturiert, sofort auf Eis gestellt und dann 5 μ l auf 6%iges denaturierendes Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.2.13. RT-PCR

Mit Hilfe der retroviralen RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) lassen sich mRNA-Moleküle in cDNA-Moleküle umschreiben, die dann in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden können (Kogan et al., 1987).

Für die Erststrangsynthese wurden zunächst 5 µg Gesamt-RNA und 500 ng Poly dT(24)-Primer in 11 µl sterilem Wasser 10 min bei 70°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Alternativ konnten auch direkt 2 pmol des reversen genspezifischen Primers eingesetzt werden. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Der RT-Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

11 µl	Ansatz (RNA und Primer)
4 µl	5x Erststrang-Puffer
2 µl	0,1 M DTT
1 µl	10 mM dNTP-Mix
1 µl	RNasin (Promega) (20 U)
1 µl	SuperScript II Reverse Transkriptase (Gibco BRL) (200 U)
<hr/>	
20 µl	Gesamtvolume

Die Reaktion wurde 50 min bei 42°C inkubiert und anschliessend bei 70°C für 15 min inaktiviert. 3 µl dieser Reaktion wurden dann in eine Standard-PCR-Reaktion mit genspezifischen Primern eingesetzt.

Mit dieser PCR-Technik kann nach dem Design von genspezifischem Primer und der Reversen-Transkriptase-Reaktion die Expression des entsprechenden Gens sehr schnell und auch noch in sehr geringer Konzentration nachgewiesen werden.

2.2.14. Kompetitive PCR

Mit Hilfe der kompetitiven PCR ist es möglich, relative Mengen von DNA zu bestimmen. Die Hauptanwendung dieser Methode ist die Quantifizierung von RNA (cDNA). Das Prinzip der kompetitiven PCR beruht auf dem Vergleich der zu analysierenden RNA mit einem Standard-DNA-Molekül, das der Reaktion beigelegt wird (Ferre, 1992). Während jeder PCR-Reaktion wird dabei als Reverenz die Standard-DNA mit amplifiziert. Für jedes Quantifizierungsexperiment werden mehrere PCR-Reaktionen durchgeführt, die jeweils die

gleiche Menge cDNA enthalten, jedoch unterschiedliche Menge an Standard-DNA. Die Menge der interessierenden DNA wird dann in Relation zur Menge dieser Standard-DNA bestimmt.

Auswahl der Standard-DNA

Als Standard-DNA wird ein DNA-Molekül verwendet, das der zu untersuchenden DNA entspricht, jedoch eine Deletion/Insertion beinhaltet. Die Verwendung eines solchen Standards führt dazu, dass in der PCR nur ein Primerpaar verwendet muss und die beiden Reaktionsprodukte sich trotzdem aufgrund ihrer Grösse gut unterscheiden lassen. Soll ein Standard mit einer Deletion angefertigt werden, so ist die einfache Methode dafür eine Restriktion, die ein entsprechendes Stück aus der DNA ausschneidet (100-250 bp). Oft besitzt jedoch die DNA nicht die erforderlichen Schnittstellen. In diesem Fall ist es möglich, mit Hilfe der PCR eine Deletion einzuführen. Die Oligonukleotide werden in ihrer Orientierung so gewählt, dass das lineare Produkt den gesamten Vektor umfasst, von der cDNA jedoch etwa 100 bp fehlen. Nach Religation und Transformation wird so ein Plasmid erhalten, welches durch die Deletion als interner PCR-Standard verwendet wird.

Die cDNA-Synthese

Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Proben zu gewährleisten, ist es notwendig das Experiment mit allen zu testenden RNA-Populationen gleichzeitig durchzuführen.

Bestimmung des linearen Bereichs der PCR

Für die Durchführung der quantitativen PCR ist es unbedingt notwendig zu beachten, dass mit jedem Zyklus auch tatsächlich eine Verdoppelung der DNA-Moleküle einhergeht. Nur in diesem sogenannten linearen Bereich der PCR ist eine Quantifizierung der Matrizen-DNA möglich. Dieser Vorgang kann mit folgender Formel beschrieben werden:

$$Y_n = (1+R)^n$$

Dabei ist Y_n der Faktor der Amplifikation nach n Zyklen und R die Effizienz der Amplifikation eines jeden Zyklus. Wenn die Effizienz der Amplifikation 100% beträgt, so ist

$R=1$ und die Menge an Amplifikat verdoppelt sich mit jedem Zyklus. In der Praxis wird jedoch nur während einer limitierten Anzahl von Zyklen eine Effizienz von 100% erreicht. Dieser lineare Bereich der PCR ist unter anderem abhängig von der Menge an eingesetzter DNA. Die Anzahl der Zyklen muss demnach so gewählt werden, dass die Amplifikation der Menge an Ausgangs-DNA noch im linearen Bereich erfolgt und eine Detektion des erhaltenen Produktes bereits möglich ist.

Bei der kompetitiven PCR sollte sowohl die Amplifikation des Standards wie auch der cDNA im linearen Bereich stattfinden. Um dies auszutesten, muss eine Verdünnungsreihe mit Standard und cDNA angefertigt werden. Davon werden jeweils definierte Mengen zur PCR verwendet. Erfahrungsgemäss sind dabei 20-25 Zyklen ausreichend.

Die Standard-DNA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde in Zehnerschritten von 1:1000 bis zu 1:10 Mio. in Wasser verdünnt und in PCR (50 μl Endvolumen) eingesetzt. Für die Bestimmung der Menge der einzusetzenden cDNA wurden von 1 bis 10 μl RT-Reaktion in PCR (50 μl Endvolumen) eingesetzt.

PCR

Von jeder cDNA werden verschiedene Reaktionen durchgeführt, die sich bezüglich der Menge an interner Standard-DNA unterscheiden. Dabei sollten die verwendeten Mengen an Standard wie für den linearen Bereich der PCR ermittelt gewählt werden, ebenso die Menge an cDNA. Wird ein Standard verwendet, der mit dem gleichen Primerpaar amplifiziert wird, so ist auch das Verhältnis von Standard zu cDNA von Bedeutung: Wird zu viel Standard verwendet, kommt es hauptsächlich zur Amplifikation des Standards. Ist die cDNA im Überschuss vorhanden, so wird nur cDNA amplifiziert.

2.2.14.1. Kompetitive PCR für die Quantifizierung von *PAX6*-mRNA

Die cDNA-Synthese mit 5 μg Gesamt-RNA aus zerebellären Kortex wurde mit Hilfe der SuperScript II Reverse Transkriptase (Gibco BRL) nach dem Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt. Im weiteren wurde eine PCR mit erhaltener cDNA und einem internen Standard eingesetzt, wobei sich die verwendeten Primer an beide Matrizen binden. Da der interne Standard ein in den T-Vektor inkloniertes *PAX6*-cDNA-Fragment mit einer internen Deletion (100 bp) darstellt, wurden infolgedessen zwei Amplifizierungsprodukte mit unterschiedlichen Längen (800 und 700 bp) erhalten. PCR (30s bei 94°C, 30s bei 57°C, 2 min

bei 72°C für 25 Zyklen) wurde mit den Primern P6-5 und P6-6 durchgeführt. Um die Unterschiede in der Effizienz der RT-Reaktion zu kontrollieren, wurden die cDNA Synthese und die nachfolgende kompetitive PCR dreimal wiederholt. Die Reaktionsprodukte wurden auf dem 2% Agarosegel aufgetrennt und mittels einer densitometrischen Analyse quantifiziert. Unterschiede in der Konzentration der *PAX6*-mRNAs wurden als Mengenverhältnis der amplifizierten Fragmente von cDNA und internem Standard in jeder Reaktion berechnet.

2.2.15. Methoden zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes

2.2.15.1. 5'-RACE (5' *Rapid Amplification of cDNA Ends*)

Die 5'-RACE wurde mit einem „Marathon™ cDNA Amplification“-Kit der Firma Clontech (Palo Alto, USA) durchgeführt. Bei dieser Methode (Siebert et al., 1995; Chenchik et al., 1996) wird nach einer Erst- und Zweitstrangsynthese spezieller Adapter an die doppelsträngige cDNA ligiert. Dieser Adapter ist partiell doppelsträngig mit einem glatten Ende und partiell einzelsträngig, wobei die zurückstehende 3'-OH-Gruppe durch eine Aminogruppe geblockt ist. Der einzelsträngigen Adapteranteil enthielt eine zu einem Adapter-Primer (AP1) komplementäre Sequenz. Der AP1-Primer wird als *Forward*-Primer mit einem genspezifischen *Reverse*-Primer in einer *Screening*-PCR eingesetzt. Dabei findet der AP1-Primer erst dann seine Bindungsstelle, wenn diese durch die Extension von genspezifischem Primer (GSP1) im Zuge des ersten PCR-Zyklus geschaffen wird. Die Amplifikation erfolgte in zwei PCR-Runden. Bei einer Nachamplifikation (*Nested*-PCR) wurden die ausgehend von den Amplifikationsprimer der ersten PCR-Runde intern liegenden Primer (*Nested*-Adapter-Primer (AP2) und ein genspezifischer Primer (GSP2)) verwendet.

cDNA-Erststrang-Synthese

Alle Reaktionen der cDNA-Erststrangsynthese wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Kontrolle wurde aus humanem Placenta isolierte poly(A)⁺-RNA (im Kit enthalten) mitgemacht. Für die Erststrang-Synthese wurden folgende Komponenten gemischt:

1 µg (1-4 µl) poly(A)⁺-RNA
1 µl cDNA-Synthese-Primer (10 µM)

auf 5 μ l mit dH₂O auffüllen

Der Ansatz wurde 2 min bei 70°C inkubiert, danach 5 min auf Eis gesetzt und kurz zentrifugiert. Zum Ansatz wurden weitere unten aufgelistete Komponenten zugegeben:

2 μ l	5x Erststrang-Puffer
1 μ l	dNTP-Mischung (10 mM)
1 μ l	dH ₂ O
1 μ l	AMV-Reverse-Transkriptase (20 U/ μ l)

Die Reaktion (10 μ l) wurde für eine Stunde bei 42°C im Wärmeschrank inkubiert und anschliessend auf Eis gesetzt, um die Erststrang-Synthese zu beenden.

cDNA-Zweitstrang-Synthese

Für die Zweitstrang-Synthese wurden die folgenden Komponenten zusammengemischt:

10 μ l	Erststrang-Synthese-Ansatz
48,4 μ l	dH ₂ O
16 μ l	5x Zweitstrang-Puffer
1,6 μ l	dNTP-Mischung (10 mM)
4 μ l	20x Zweitstrang-Enzym-Mischung (RNase H, <i>E. coli</i> DNA-Polymerase I, <i>E. coli</i> DNA-Ligase)
<hr/>	
80 μ l	Gesamtvolume

Die Reaktion wurde 1,5 Stunden bei 16°C inkubiert. Anschliessend wurden 2 μ l T4-DNA-Polymerase (10 U) zugegeben und weitere 45 min bei 16°C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, wurden 4 μ l EDTA/Glycogen-Mischung zugegeben. Der Ansatz wurde mit 100 μ l Phenol/Chloroform/IAA gemischt, 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert, der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäss überführt und zum Fällen der cDNA 0,5 Vol. 4 M Ammoniumacetat und 2,5 Vol. 95% Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur und maximaler Umdrehungszahl in der Tischzentrifuge zentrifugiert und das Pellet mit 300 μ l 80% Ethanol gewaschen. Nach erneuter 10 minütiger Zentrifugation wurde

der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet 10 min luftgetrocknet. Die cDNA wurde in 10 μ l Wasser gelöst und konnte so bei -20°C gelagert werden.

Adapterligation

Für die Adapterligation wurde folgende Mischung pipettiert:

5 μ l	cDNA-Lösung
2 μ l	cDNA-Adapter (10 μ M)
2 μ l	5x DNA-Ligationspuffer
1 μ l	T4-DNA-Ligase (400 U/ μ l)
<hr/>	
10 μ l	Gesamtvolume

Die Ligation wurde bei 16°C über Nacht inkubiert. Das Enzym wurde dann bei 70°C 5 min deaktiviert und anschliessend 1:50 und 1:250 Verdünnungen mit Tricine-EDTA-Puffer hergestellt. Die Verdünnungen wurden 2 min bei 94°C denaturiert, 2 min auf Eis gesetzt und konnten dann bei -20°C gelagert werden.

RACE-PCR

Für die PCR wurde der Advantage 2 PCR Kit der Firma Clontech (Palo Alto, USA) verwendet. Entsprechend dem Protokoll des Herstellers wurden die folgenden Komponenten zusammengemischt:

36 μ l	dH ₂ O
5 μ l	10x PCR-Reaktionspuffer
1 μ l	dNTPs (10 mM)
1 μ l	Primer AP1 (10 μ M)
1 μ l	Primer GSP1 (10 μ M)
5 μ l	verdünnte mit dem Adapter ligierte cDNA
1 μ l	50x Polymerase-Mix
<hr/>	
50 μ l	Gesamtvolume

Als Kontrolle wurde eine PCR mit im Kit enthaltener, mit dem Adaptor ligierter cDNA von der humanen placentaren mRNA, AP1- und für den Transferrin-Rezeptor spezifischem TFR-Primer durchgeführt.

Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Biometra) mit einem Heizdeckel unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1 min 95°C

5 Wiederholungen des Reaktionszyklus:

30 sec 94°C

4 min 72°C

5 Wiederholungen des Reaktionszyklus:

30 sec 94°C

4 min 70°C

25 Wiederholungen des Reaktionszyklus:

30 sec 94°C

4 min 68°C

1 µl der ersten PCR wurde in einer *Nested*-PCR mit den AP2- und GSP2-Primer eingesetzt. In dieser PCR wurden 38 Zyklen mit den folgenden Parametern durchgeführt:

40 sec 94°C

40 sec 60°C

4 min 68°C

Die RACE-PCR-Produkte wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die spezifischen RACE-Produkte wurden mit einer Southern-Blot-Analyse unter Verwendung einer internen genspezifischen Sonde bestimmt, aus dem Gel isoliert und in einen pGEM-T-Vektor inkloniert. Für jedes spezifische RACE-Produkt wurde die Plasmid-DNA von 10-15 unabhängigen Klonen isoliert und sequenziert.

2.2.15.2. Primer-Extension-Analyse

Bei dieser Methode wird an die mRNA bzw. Gesamt-RNA ein genspezifischer Primer angelagert, der am 5'-Ende radioaktiv markiert ist. Mit Hilfe einer Reversen-Transkriptase

wird dann der Primer zur cDNA verlängert („Primer Extension“). Die Länge der resultierenden cDNA entspricht dem Abstand zwischen dem 5' Ende des Primers und dem 5' Ende der mRNA (oder dem Transkriptionsstart). Die so erhaltene cDNA wird auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel parallel zu einer Sequenzierung des Genabschnittes und radioaktiv markierter DNA-Leiter aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Nach Detektion mit einem Röntgenfilm erscheint das Signal der Markierung des Primers auf der Höhe der Base, bei der die Transkription beginnt.

Der radioaktiv markierte Primer ($1-2 \times 10^5$ cpm) wurde mit 0,1-1 µg mRNA oder 10-50 µg Gesamt-RNA und 5x HB-Puffer auf 20 µl dH₂O gemischt. Der Ansatz wurde für 10 min bei 85°C und dann 30 min bei 60-65°C inkubiert. Nach dem Abkühlen 5 min auf Eis wurden die folgenden Komponenten zu dem Ansatz zugegeben:

- 3 µl 0,1 M DTT
- 12 µl 5x RB-Puffer
- 3 µl dNTPs (10 mM)
- 1 µl RNasin (30 U)
- 20 µl dH₂O
- 1 µl Super Script II Reverse Transkriptase (Gibco BRL) (200 U)

Der Gesamtansatz im Volumen von 60 µl wurde für 50 min bei 42°C und anschliessend 15 min bei 70°C inkubiert. Dann wurden 5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 0,5 µl RNase A (10 mg/ml) zupipettiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Die cDNA wurde durch eine Phenol/Chlorophorm-Extraktion von Proteinen gereinigt, über einer Ethanol-fällung pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Danach wurde die Probe in 5 µl dH₂O gelöst, mit 7 µl Stoppuffer gemischt, bei 95°C 3 min denaturiert und auf ein 6%iges denaturierendes Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nachfolgend wurde die Autoradiographie durchgeführt.

2.2.15.3. Ribonuklease-Protektionsassay

Densitometrisch quantifizierte und ausgeglichene Proben der Gesamt-RNA (40 µg) wurden mit radioaktiv markierter RNA-Probe (2×10^5 cpm) in 10 µl Hybridisierungsbuffer gemischt, bei 85°C 10 min denaturiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. 300 µl kalte Verdauungslösung wurde danach dazugegeben, und die Mischung wurde bei 37°C 60 min

inkubiert. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Prezipitation wurden die Proben in 6 µl Aufladepuffer resuspendiert. Protektionsfragmente wurden bei 95°C 3 min denaturiert und auf dem 6% Sequenzierungsgel aufgetrennt. Nachfolgend wurde die Autoradiographie durchgeführt.

2.2.16. Reportergenassay

2.2.16.1. Kultivieren von Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C im Wasserbad schnell aufgetaut, nach vorsichtigem Verdünnen mit entsprechendem Medium in eine Zellkulturflasche (7,5 cm²) plattiert und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von mehr als 95% aufwiesen, wurden sie in grössere Zellkulturflaschen überführt. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Nachdem die Zellen die ausreichende Konfluenz erreicht hatten, wurden sie weiter passagiert.

Da alle verwendeten Zelllinien adhärent sind, wurden die Zellen für die Abnahme zuerst mit sterilem 1x PBS gewaschen und für 2-3 min mit 1x Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA (w/v)) inkubiert (trypsinisiert). Danach wurden die Zellen mit einer Pipette durch Treturieren von der Zellkulturflasche abgelöst und das Trypsin durch eine Zugabe vom Kulturmedium (im Verhältnis 1:3) neutralisiert.

Zum Konservieren wurden die Zellen bis zu 50% Konfluenz wachsen gelassen und durch Trypsinisierung von der Zellkulturflasche abgelöst. Nach vorsichtigem Zentrifugieren (950 rpm) und Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in einem Einfriermedium (Gibco BRL) resuspendiert (1 Mio. Zellen/ml) und in 1,8 ml-Kryoröhrchen aufgeteilt. Die Röhrchen wurden über Nacht in einem mit Isopropanol gefüllten, bei 4°C vorgekühlten Gefäss (Nalgene) auf -70°C gestellt. Dieses Verfahren gewährleistet einen Temperaturabfall von 1°C pro Minute. Anschliessend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.16.2. Herstellung der Reportergenkonstrukten des *PAX3*-Promotors

Das ~1,6 kb lange *XhoI-NaeI*-Fragment (von -1200 bis +379), das einen Teil des Exons 1 und einen Bereich strangaufwärts vom Exon 1 einschliesst, wurde in den „pGL3 basic“-Vektor (Promega) in die Sense-Orientierung inkloniert. Der Vektor wurde als pXN bezeichnet.

Folgende serielle Deletionsfragmente des pXN wurden auch studiert: *StyI-NaeI* (von -650 bis +379, pStN), *EspI-NaeI* (von -468 bis +379, pEN), *StuI-NaeI* (von -179 bis +379, pSuN), *AccI-NaeI* (von -101 bis +379, pAN) und *HindIII-NaeI* (von -64 bis +379, pHN). Einige Fragmente wie *HindIII-NaeI* (pNH), *AccI-NaeI* (pNA) und *StyI-NaeI* (pNSt) wurden auch an die Luciferasegen in der Antisense-Orientierung fusioniert. Das 1,0 kb lange *StyI-NaeI*-Fragment (von -650 bis +379, pStN) enthielt 27 repetitive CA-Einheiten (Allel 27, (CA)₂₇). Um die Konstrukte mit unterschiedlichen Längen der repetitiven Sequenz und zweitem G/C-Polymorphismus zu produzieren, wurde die genomische DNA mit Allelen, die verschiedene Längevarianten der (CA)_n repetitiven Einheiten enthielten, mit Hilfe der P3-5 und P3-6 Primern amplifiziert. *EspI*- und *BstI*-geschnittene Produkte (Allele 13, 15, 19, 22, 25, 27 und 28) wurden danach mit dem pStN ligiert. Drei Varianten davon (Allele 19, 27 und 28) wurden auch in den pXN-Vektor inkloniert, der das 1,6 kb lange *XhoI-NaeI*-Fragment enthielt. Alle Konstrukte wurden mittels einer Sequenzierung überprüft.

2.2.16.3. Herstellung der Reportergenkonstrukten des *PAX7*-Promotors

Das ~3,0 kb lange *XbaI-NaeI*-Fragment, das einen Teil des Exons 1 und einen Bereich strangaufwärts vom Exon 1 einschliesst, wurde in den „pGL3 basic“-Vektor (Promega) in der Sense-Orientierung inkloniert. Der Vektor wurde als pXN bezeichnet. Folgende serielle Deletionsfragmente des pXN wurden auch studiert: *HindIII-NaeI* (von -1650 bis +373, pHN), *BglII-NaeI* (von -1388 bis +373, pBgN), *PstI-NaeI* (von -1159 bis +373, pPN), *EcoRI-NaeI* (von -633 bis +373, pRIN), *BamHI-NaeI* (von -403 bis +373, pBN), *PvuII-NaeI* (von -70 bis +373, pPvN) und *SmaI-NaeI* (von +42 bis +373, pSN). Um einen Deletionskonstrukt pXNΔ zu erhalten, wurde pXN mit Restriktionsendonuklease *PstI* geschnitten und wieder ligiert. Das resultierende Plasmid enthielt das ~3,0 kb lange *XbaI-NaeI*-Fragment mit einer fehlenden Region von ~1,2 kb. Die Fragmente *BamHI-NaeI* (pNB) und *PvuII-NaeI* (pNPv) wurden auch an Luciferasegen in einer Antisense-Orientierung fusioniert. Das 1,0 kb lange *EcoRI-NaeI*-Fragment (pRIN) enthielt 10 CCT repetitive Einheiten (Allel 10, (CCT)₁₀). Um die Konstrukte mit unterschiedlicher Länge der repetitiven Sequenz zu produzieren, wurde die genomische DNA mit Allelen, die verschiedene Längevarianten der (CCT)_n repetitiven Einheiten enthielten, mit Primern P7-1 und P7-12 amplifiziert. Die mit *EcoRI* und *PvuII* geschnittene Produkte (Allele 8 und 11) wurden danach mit dem pRIN ligiert. Alle Konstrukte wurden mittels einer Sequenzierung überprüft.

2.2.16.4. Herstellung der Reportergenkonstrukten des *MAOA*-Promotors

Für eine Herstellung der Konstrukte, die eine Promotorregion des *MAOA*-Gens mit unterschiedlichen Längen der repetitiven Sequenzen enthalten wurden die genomischen DNA mittels PCR mit den Primern MAOA-1 und MAOA-2 amplifiziert. Die ~1,4 kb langen erhaltenen PCR-Produkte wurden mit *Xho*I- und *Mlu*I-Restriktionsendonukleasen geschnitten und in die *Xho*I- und *Mlu*I-Schnittstellen des promotorlosen „pGL3 basic“-Luciferase-Expressionsvektor (Promega) inkloniert. Alle Konstrukte wurden mittels einer Sequenzierung überprüft.

2.2.16.5. Transfektion

Für eine transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen mit Luciferase-Reportergenkonstrukten wurde ein polykationisches liposomales Transfektionsreagenz „DOSPER“ der Firma Roche verwendet. Dieses Reagenz bildet mit negativ geladenen DNA-Molekülen polykationische Komplexe, die an die mit negativen Ladungen überzogene Oberfläche der zu transfizierenden Zellen unspezifisch adsorbiert werden. Anschliessend wird die DNA durch Endozytose in die Zelle aufgenommen.

Am Vortag der Transfektion wurden Zellen aus einer noch nicht konfluent gewachsenen Kultur in einer Konzentration von 6×10^5 Zellen pro Kulturschale (60 mm) in 5 ml Kulturmedium plattiert. Bei dieser Plattierungsdichte erreichen die Zellen am nächsten Tag eine Konfluenz von 60-80%, die für eine Transfektion geeignet ist. Für die Transfektion wurden in einem Eppendorfgefäss 3 µg Plasmid-DNA (2,5 µg Luciferase-Reportergenkonstrukt und 0,5 µg pRSV40-*lacZ*-Plasmid) mit HBS-Puffer zu einem Endvolumen von 50 µl verdünnt (Lösung A). Für diese Methode verwendete Plasmid-DNA wurde mit dem „Endotoxin Free Plasmid Maxi“-Kit der Firma Qiagen isoliert. In einem anderen Eppendorfgefäss wurden 10 µl (10 µg) „DOSPER“-Reagenz mit 40 µl HBS-Lösung gemischt (Lösung B). Danach wurden für jedes Reportergenkonstrukt Lösung A und B vorsichtig zusammengemischt und 15 min bei RT inkubiert, um die Bildung des DOSPER/DNA-Komplexes zu ermöglichen. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium durch 1,5 ml serumfreies Kulturmedium ersetzt. Die DOSPER/DNA-Mischung (100 µl) wurde tropfenweise zu den Kulturen gegeben. Nach der Zugabe wurden die Kulturschalen vorsichtig geschwenkt, damit die Mischung gleichmässig verteilt wird. Die Zellen wurden 6 Stunden im Brutschrank bei 37°C transfeziert. Nach der Transfektion wurde das

Kulturmedium erneut mit 5 ml frischem FKS-enhaltendem Kulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden bis zur Lysis 40 Stunden im Brutschrank bei Standardbedingungen inkubiert.

2.2.16.6. Lysis von Zellen

Die adhärennten Zellen wurden direkt in der Kulturschale lysiert. Dazu wurde zuerst das Kulturmedium entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit 2 ml auf 4°C vorgekühltem PBS-Puffer gewaschen. Der PBS-Puffer wurde danach sorgfältig entfernt. Zum Lysieren der Zellen wurden 250 µl 1x Reporter-Gen Assay Lyse-Puffer (Roche) pro Ansatz verwendet. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gründlich von der Schale abgelöst. Der Zellextrakt wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 12000 g bei 4°C in der Kühlzentrifuge für 2 min zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und direkt im Reporter-Gen Assay eingesetzt oder bei -70°C eingefroren aufbewahrt. Dabei musste berücksichtigt werden, dass der Zellextrakt zum Zeitpunkt der Messung RT haben sollte, um temperaturbedingte Schwankungen der Enzymaktivität zu vermeiden.

2.2.16.7. Luciferase-Assay

Die Luciferase-Assay wurde mit dem Luciferase-Assay-System (Promega) durchgeführt. Dafür wurden 50-100 µl Zellextrakt in 96-Loch-Platte pipettiert, die dann in der Messkammer des Luminometers (Berthold) plaziert wurde. Durch automatische Injektion des Luciferin-Reagenzes (150 µl) wurde die Reaktion gestartet und für 7-10 Sekunden die Lichtproduktion gemessen. Die Messergebnisse wurden als „relative light units“ (RLU) ausgegeben.

2.2.16.8. β-Galaktosidase-Assay

Die Co-Transfektion mit β-Galaktosidase dient als interner Standard und gibt später Auskunft über die Transfektionseffizienz im direkten Vergleich mit der Luciferase-Aktivität.

10 µl Zellextrakt wurden in einem Eppendorfgefäß mit 1 µl MgCl₂-Puffer, 22 µl ONPG (4 mg/ml in 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,5) und 67 µl 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,5) gemischt. Als Negativkontrolle werden Zellextrakte verwendet, die nicht mit β-Galaktosidase transfiziert wurden. Die Reaktion wurde bei 37°C 30 min inkubiert. Durch die Zugabe von 100 µl 1 M Na₂CO₃ wurde die Reaktion abgestoppt, auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte

pipetiert und die Absorption bei 420 nm in einem Photometer gemessen. Die Intensität der β -Galaktosidase-Enzymreaktion wurde gleich der Effizienz der Transfektion gesetzt. Für jede Probe wurde ein Transfektionseffizienzkoeffizient ausgerechnet und dementsprechend die Luciferase-Werte abgeglichen.

2.2.16.9. Proteinbestimmung

Die Ergebnisse des Luciferase-Assays wurden auch auf Grund des Proteingehaltes in jeder Zellsatprobe normiert. Die Proteinbestimmung wurde mit dem Protein-Assay-Kit der Firma Bio-Rad durchgeführt, der auf einer von Bradford beschriebenen Methode basiert (Bradford, 1976).

1-5 μ l Zellextrakt wurden in einem Eppendorfggefäß bis zu 800 μ l mit dem Wasser verdünnt und mit 200 μ l „Dye Reagent“-Konzentrat gemischt. Als Leerwert wurde die gleiche Menge des Lysepuffers eingesetzt. Nach 5 min wurden die Proben in 1 cm dicken Plastikkuvetten überführt. Die Absorption wurde bei 595 nm in einem Spektrophotometer gemessen. Mit Hilfe einer Standardkurve für BSA konnte der Proteingehalt der Proben bestimmt werden.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung und funktionelle Untersuchung des mit dem *PAX6*-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus

Das menschliche *PAX6*-Gen wurde in früheren Studien dem chromosomalen Bereich 11p13 zugeordnet und seine cDNA-Sequenz und genomische Struktur wurden aufgeklärt (Glaser et al., 1992). Das Gen besteht aus 14 Exons und erstreckt sich über ~22 kb. Zur Beginn dieser Arbeit wurde das 5'-flankierende Ende des menschlichen *PAX6*-Gens von unserer Arbeitsgruppe charakterisiert (Okladnova et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass die Transkription vom *PAX6*-Gen von zwei alternativen Promotoren initiiert wird. Dies resultiert in zwei Transkripten, in denen die nicht-translatierten Exons 1A oder 1B alternativ auf das Exon 2 gespleisst werden (Abb. 3.1A). Hierzu wurde auch demonstriert, dass die Expression des *PAX6*-Gens im adulten menschlichen Gehirn hauptsächlich durch den Promotor B kontrolliert wird, welcher ~6,5 kb distal vom Promotor A lokalisiert ist. Der Promotor B ist durch eine TATA-Box ähnliche Sequenz (in der Nukleotidposition -19) und eine CCAAT-Box (in der Position -62) gekennzeichnet. Die weitere Sequenzanalyse des 5'-flankierenden Bereichs des Exons 1B zeigte das Vorhandensein einer (CA)₂₂(GA)₇-Dinukleotidstruktur in der Position 956 bp proximal vom Transkriptionsstartpunkt. Die Position und die Sequenz dieses repetitiven Elements sind in Abb. 3.1B und C dargestellt.

3.1.1. Bestimmung der Allelverteilung innerhalb einer Kontrollgruppe

Um zu überprüfen, ob diese repetitiven Sequenzen in verschiedenen Allelvarianten vorliegen, wurde die Genotypisierung mittels der radioaktiven PCR an 217 im Hause verfügbaren genomischen DNA-Proben von gesunden kaukasischen Probanden durchgeführt. Durch die Auswahl des die repetitive Sequenz flankierenden Primerpaares (P6-1 und P6-2; Abb. 3.1C) konnte ein Bereich der genomischen DNA (197 bp für Allel mit 29 repetitiven Einheiten) amplifiziert werden. Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte denaturiert und auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Analyse der Reaktionsprodukte zeigte unterschiedlich lange Fragmente (Abb. 3.1D), die kloniert und sequenziert wurden. Das systematische *Screening* auf Variationen in der Länge der Dinukleotidsequenzen zeigte, dass diese Sequenz hoch polymorph in der untersuchten Population ist. Eine Sequenzierung unterschiedlicher Allele bestätigte, dass beide Abschnitte poly(CA) und poly(GA) unabhängig polymorph sind. Das CA-Dinukleotid umfasst 18 bis 31 repetitive Einheiten, wobei das GA-

Dinukleotid nur in 5 bis 7 Wiederholungen detektiert wurde. Für die Bestimmung der Allelgrößen wurden beide CA- und GA-Dinukleotideinheiten zusammengerechnet. Dabei wurden zusätzlich zum bekannten Allel mit 29 repetitiven Einheiten weitere 13 Allele mit von 24 bis 36 repetitiven Einheiten gefunden, die eine in Richtung kürzerer Allele verschobene Allelverteilung zeigten. Die Allelverteilung für die mit dem *PAX6*-Gen verbundene polymorphe Region (PAX6-LPR) in 217 gesunden Probanden ist in Abb. 3.2 dargestellt. Die Häufigkeit der Allele mit von 25 bis 29 repetitiven Einheiten beläuft sich auf 90%, wobei das Allel mit 26 repetitiven Einheiten der am meisten verbreitete Alleltyp ist und mit einer Häufigkeit von 50% vertreten ist. Die Quote der Heterozygoten betrug 65%.

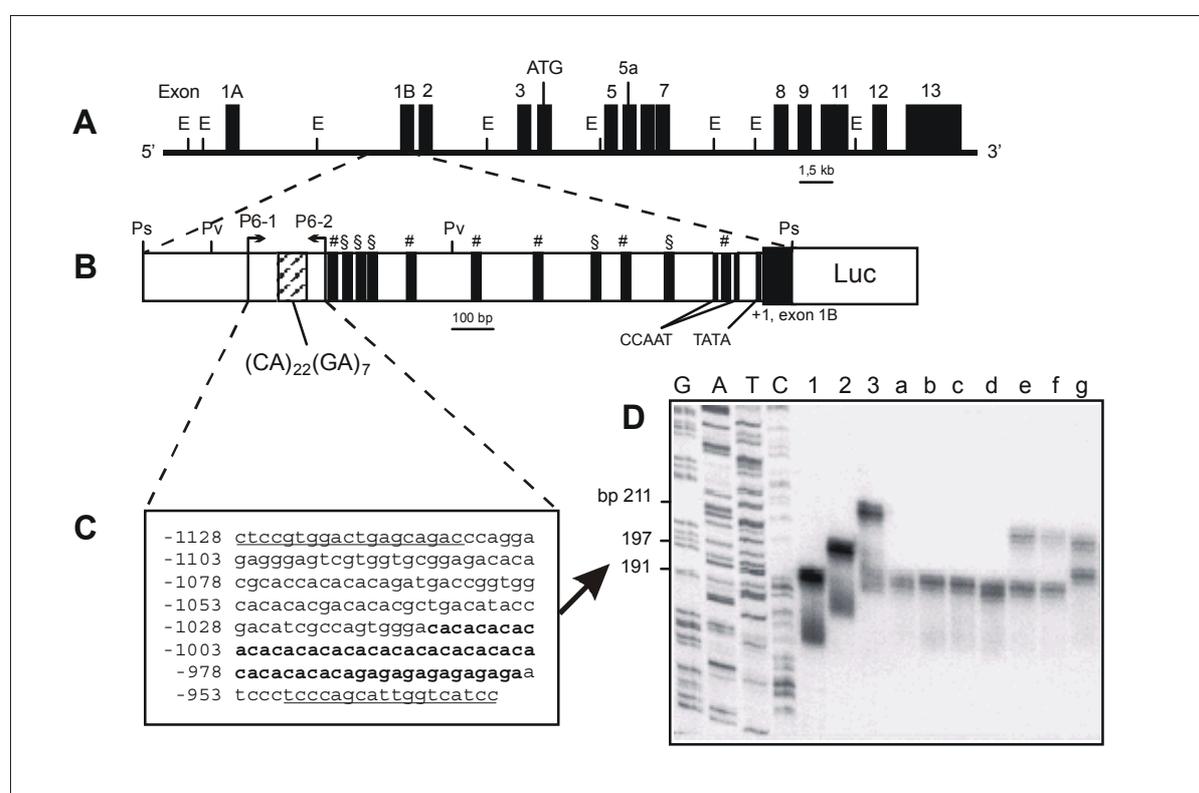


Abb. 3.1. Darstellung des mit dem *PAX6*-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus

(A) Genomische Struktur des menschlichen *PAX6*-Gens. Die Exons sind als schwarze Balken dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen des Enzyms *EcoRI* (E) sind angegeben. (B) Die schematische Darstellung der mit dem Promotor B assoziierten 5'-flankierenden regulatorischen Region. Die Position der repetitiven (CA)₂₂(GA)₇-Sequenz ist als schattierte Box eingezeichnet. Die Restriktionsschnittstellen der Enzyme *PstI* (Ps) und *PvuII* (Pv) sind angegeben. Ein TATA-ähnliches Motiv und zwei CCAAT-Boxen sowie einige potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen wie Sp1 (#) und AP2 (§) sind angezeigt. Die PCR-Primer P6-1 und P6-2 sind als Pfeile dargestellt. (C) Nukleotidsequenz der mit dem *PAX6*-Gen verbundenen polymorphen Region (PAX6-LPR). Die unterstrichene Sequenz repräsentiert PCR-Primer P6-1 und P6-2. Die (CA)_m(GA)_n-repetitive Sequenz ist fettgedruckt. (D) Exemplarische Darstellung der Genotypisierungsergebnisse. Die radioaktive PCR wurde mit 60 ng genomischer DNA unter Verwendung der die repetitive Sequenz flankierenden Primer durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden denaturiert und auf einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamid-Gel gegen die Standardsequenzierungsreaktion des pBluescript KSII (+)-Vektors mit universellem Rückwärtsprimer analysiert. Linien 1-3 stellen die Allele mit bekannter Grösse (26, 29 und 36 repetitiven Einheiten) dar, die als interner Grössestandard benutzt wurden. Linien a-g repräsentieren untersuchte PCR-Proben mit folgenden Allelen/Genotypen: a und d, 25/26; b und c, 26/26; e und f, 26/34; g, 28/33.

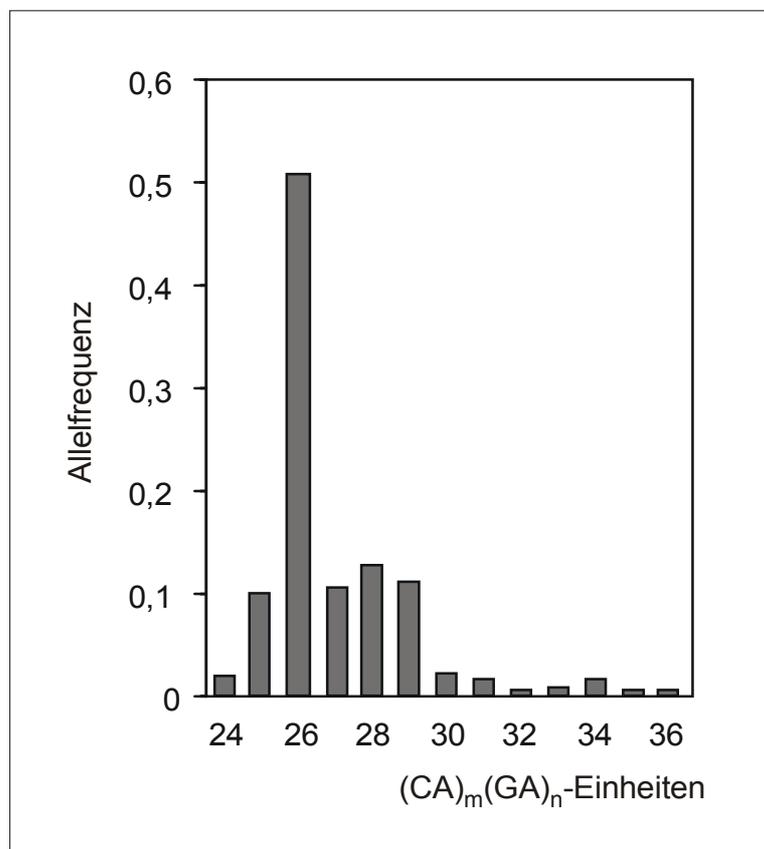


Abb. 3.2. Allelfrequenz für PAX6-LPR in 217 gesunden Probanden

3.1.2. Funktionelle Untersuchung des mit dem *PAX6*-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus

Die funktionelle Charakterisierung des PAX6-LPR wurde mittels Luciferase-Assay von Dr. O. Okladnova durchgeführt. Dafür wurden ~1,5 kb des 5'-flankierenden Bereichs des Exons 1B (*Pst*I-Fragment; siehe Abb. 3.1B) mit unterschiedlichen Repeatvarianten in einen promotorlosen Luciferase-Reportergenvektor inkloniert und darauffolgend wurden die erhaltene Konstrukte in *PAX6*-Gen exprimierende Cos-7-Zellen transfiziert. Wie aus diesen Experimenten folgte, zeigen die Konstrukte mit ≥ 29 repetitiven Einheiten um 4- bis 9-fache höhere Promotoraktivität als das 26 repetitive Einheiten enthaltende Konstrukt. Die in diesem Experiment gewonnenen Daten wurden mir von Dr. O. Okladnova freundlicherweise für die Präsentation in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt und sind in Abb. 3.3A dargestellt.

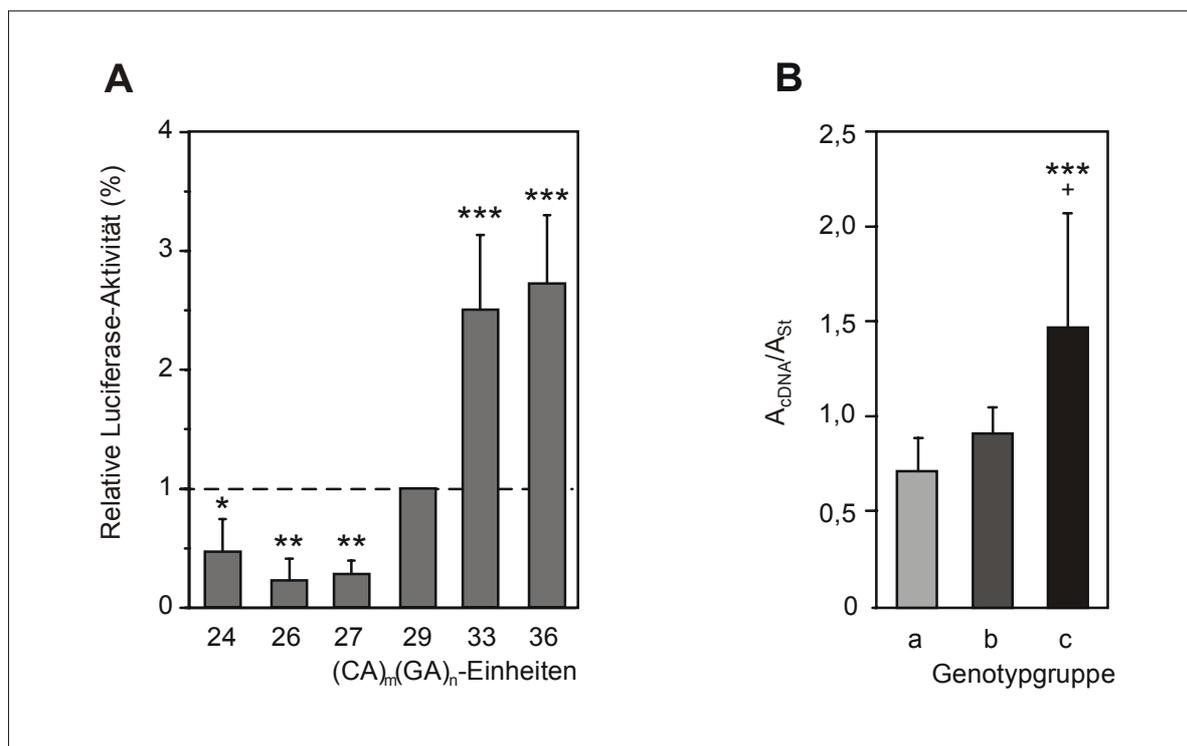


Abb. 3.3. Funktionelle Untersuchung des mit dem *PAX6*-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus

(A) Transiente Transfektion der Cos-7-Zellen mit den Konstrukten, die unterschiedliche Allelvarianten enthalten. Das 1,5 kb lange *PstI*-Fragment des Promotors B (Allel 29) wurde in den promotorlosen Expressionsvektor pGL3 basic inkloniert und auf seiner Basis weitere Konstrukte für Allele mit 24, 26, 27, 33 und 36 repetitiven Einheiten hergestellt. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Doppelexperimenten sind als Promotor-induzierte Luciferase-Aktivitäten (jeweils Mittelwert und Standardabweichung) im Vergleich zu dem Wert dargestellt, der mit dem Reportergenkonstrukt für Allel 29 erzielt wurde. Ein statistischer Vergleich der Promotoraktivitäten für die untersuchten Konstrukte zeigt folgende signifikante Unterschiede: Allel 29 gegen Allele 24-27, * $P < 0,05$; Allel 29 gegen Allel 33, * $P < 0,01$; Allele 29 gegen Allel 36, * $P < 0,001$ (nach dem χ^2 -Test nach Fischer). (B) mRNA-Konzentrationen für das *PAX6*-Gen in *postmortem* Gewebe des Zerebellums der 36 Individuen mit unterschiedlichen Genotypen für *PAX6*-LPR. Die Gruppen A, B und C stellen entsprechend 27 Individuen mit Genotypen 24/26, 24/27, 25/25 und 25/26, 5 Individuen mit den Genotypen 25/27 und 26/27, und 4 Individuen mit den Genotypen 26/29 und 27/29 dar. Die mRNA-Konzentrationen wurden mittels kompetitiver PCR unter Verwendung eines internen Standards analysiert. Die Unterschiede in der Konzentration der *PAX6*-mRNAs wurden als Mengenverhältnis der amplifizierten Fragmente von cDNA und internem Standard (A_{cDNA}/A_{St}) in jeder Reaktion berechnet. Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten sind als Mittelwert und Standardabweichung für jede Genotypengruppe dargestellt. Ein statistischer Vergleich der gewonnenen Daten gibt folgende signifikante Unterschiede für die untersuchten Genotypengruppen: Gruppen A gegen C, *** $P < 0,001$; Gruppen B gegen C, + $P < 0,05$ (nach dem χ^2 -Test nach Fischer).

Zugleich wurde auch ein Einfluss der *PAX6*-LPR auf native *PAX6*-Expression untersucht. Für diese Untersuchung wurde adulter zerebellärer Kortex ausgesucht, in welchem eine relative starke *PAX6*-Expression nachgewiesen wurde (Okladnova et al., 1998). Die genomische DNA und Gesamt-RNA wurden aus 36 *postmortem* Gewebeproben isoliert. Als erstes wurden die vorhandenen Genotypen bestimmt, aufgrund deren die Proben in drei verschiedene Gruppen aufgeteilt wurden: Gruppe A mit kürzeren Allelen (27 Proben; Genotypen 24/26, 24/27, 25/25, 25/26), Gruppe B mit mittelgrossen Allelen (5 Proben; Genotypen 25/27, 26/27) und Gruppe C mit den längsten Allelen (4 Proben; Genotypen 26/29 und 27/29). Danach wurde die mRNA-Menge für das *PAX6*-Gen in jeder Probe mittels kompetitiver RT-PCR

quantifiziert. Dafür wurden 5 µg der Gesamt-RNA reverse transkribiert und im weiteren eine PCR mit erhaltener cDNA und einem internen Standard durchgeführt, wobei die verwendeten Primer P6-5 und P6-6 an beide Matrizen binden. Da der interne Standard ein in den T-Vektor einkloniertes *PAX6*-cDNA-Fragment mit einer internen Deletion darstellt, werden infolgedessen zwei Amplifizierungsprodukte mit unterschiedlichen Längen erhalten. Die gleiche Menge des für jede Reaktion verwendeten internen Standards erlaubt einen quantitativen Vergleich der *PAX6*-mRNA aus verschiedenen Proben. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt, auf einen Negativfilm aufgenommen und die Produktmengen densitometrisch gemessen. Unterschiede in der Konzentration der *PAX6*-mRNAs wurden als Mengenverhältnis der amplifizierten Fragmente von cDNA und internem Standard in jeder Reaktion berechnet. Danach wurden Mittelwerte für jede Allelgruppe gebildet, die in Abb. 3.3B dargestellt sind. Wie aus diesem Experiment folgt, ist die mRNA-Konzentration für das *PAX6*-Gen in der Allelgruppe C ungefähr zweifach höher im Vergleich zu den Allelgruppen A und B ($p < 0,05$ und $p < 0,01$; *One-way*-ANOVA gefolgt durch Fischers PLSD-Test). Die Ergebnisse des Experiments stimmen mit den aus dem Luciferase-Reportergenassay erhaltenen Daten überein, wobei die Allele mit längeren repetitiven Einheiten eine verstärkte transkriptionelle Effizienz vom Promotor B des *PAX6*-Gens bewirken.

3.2. Assoziationsanalyse der *PAX6*-LPR und der Schizophrenie

Für die Assoziationsanalyse der *PAX6*-LPR und der Schizophrenie wurden die im Hause verfügbaren genomischen DNA-Proben von 281 erkrankten Probanden untersucht. Zuerst wurden die Genotypen bestimmt, wie es unter 3.1.1 beschrieben ist, und mit den vorhandenen Genotypen für die gesunden Probanden verglichen. Dabei wurden keine anomale Expansion der Dinukleotidsequenz sowie keine neuen Allele festgestellt. Die durchschnittliche Repeatlänge bei schizophrenen Patienten betrug $26,9 \pm 1,6$ (Mittelwert 26, Reihe von 23 bis 34). Unter Kontrollprobanden betrug die durchschnittliche Länge $26,9 \pm 1,7$. Die Genotypenverteilungen für die schizophrenen Patienten und Kontrollprobanden sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Aufgrund der von uns durchgeführten funktionellen Charakterisierung wurden alle Allele in zwei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe beinhaltete die Allele mit ≤ 28 repetitiven Einheiten, die eine relativ niedrige Promotoraktivität aufgewiesen haben. Die zweite Gruppe bestand aus Allelen mit ≥ 29 repetitiven Einheiten, die zur Verstärkung der Aktivität des Promotors führen. Die computergestützte statistische Vergleichsanalyse der Genotypen- und

Allelverteilungen in Patienten- und Kontrollgruppen wurde mittels χ^2 -Test durchgeführt. Eine Fehlerrate von 5% wurde für die Analyse ausgewählt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in den Tabellen 3.2 und 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.1. Genotypenverteilung für PAX6-LPR in Patienten mit Schizophrenie und gesunden Probanden

Genotyp	Patienten mit Schizophrenie	Gesunde Probande
25/25	4	9
25/26	26	20
25/27	5	5
25/28	6	4
25/29	2	0
25/30	3	1
26/26	68	58
26/27	35	26
26/28	38	26
26/29	35	23
26/30	15	8
27/27	1	2
27/28	7	4
27/29	1	3
27/30	5	2
28/28	4	4
28/29	18	5
28/30	3	7
29/29	1	5
29/30	4	5
N	281	217

Die Allele mit <25 und >30 repetitiven Einheiten wurden entsprechend mit dem Allel 25 und Allel 30 zusammengerechnet.

Tabelle 3.2. Genotypenverteilung für PAX6-LPR nach der Aufteilung der Allele auf Gruppen mit hohen und niedrigen Aktivitäten in Patienten mit Schizophrenie und Kontrollen

Diagnose	Genotypen			statistische Analyse		
	≤28/≤28	≤28/≥29	≥29/≥29	χ^2	df	P
Kontrolle (n=217)	158 (73)	49 (22)	10 (5)			
Schizophrenie (n=281)	194 (69)	82 (29)	5 (2)	5,53	2	0,06
Paranoide (n=84)	55 (65)	29 (35)	0	7,67	2	0,02
Nicht-paranoide (n=142)	102 (71)	36 (27)	4 (2)	1,00	2	0,61
Schizoaffective (n=55)	37 (67)	17 (31)	1 (2)	2,29	2	0,32

In Klammern sind Genotyphäufigkeiten in % angegeben. Die Ergebnisse des χ^2 -Testes sind für die diagnostizierten Gruppen gegen die Kontrollgruppe dargestellt.

Tabelle 3.3. Allelverteilung für PAX6-LPR nach der Aufteilung auf Gruppen mit hohen und niedrigen Aktivitäten in Patienten mit Schizophrenie und Kontrollen

Diagnose	Allele		Statistische Analyse		
	≤28	≥29	χ^2	df	P
Kontrolle (n=217)	365 (84)	69 (16)			
Schizophrenie (n=281)	470 (84)	92 (16)	0,04	1	0,84
Paranoide (n=84)	139 (83)	29 (17)	0,17	1	0,68
Nicht-paranoide (n=142)	240 (85)	44 (15)	0,02	1	0,88
Schizoaffective (n=55)	91 (83)	19 (17)	0,12	1	0,73

In Klammern sind die Allelhäufigkeiten in % angegeben. Die Ergebnisse des χ^2 -Testes sind für die diagnostizierten Gruppen gegen die Kontrollgruppe dargestellt.

Ein Vergleich der Genotypen- und Allelverteilungen in Patienten mit Schizophrenie und in der Kontrollgruppe zeigte keine Unterschiede in Allel- und Genotyphäufigkeiten. Des Weiteren wurden die untersuchten Patienten in Untergruppen entsprechend unterschiedlicher Schizophreniesubtypen wie paranoide, nicht-paranoide Schizophrenie und schizoaffective Psychosen aufgeteilt. Patienten mit einer nicht-paranoiden Schizophrenie und schizoaffectiven Psychosen zeigten auch keine Unterschiede in Allel- und Genotypfrequenzen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dagegen wurde eine moderate Assoziation der Variante mit der hohen Aktivität mit der paranoiden Untergruppe der Schizophrenie festgestellt. Die Genotypenverteilung unter den Patienten mit der paranoiden Schizophrenie unterschied sich statistisch signifikant von der Genotypenverteilung in der Kontrollgruppe. 35% der paranoiden Schizophrenen hatten einen heterozygoten Genotyp im Vergleich zu 22% der gesunden Probanden. Allerdings wiesen die Allelhäufigkeiten unter diesen zwei Gruppen keine signifikante Unterschiede auf. Paranoide Schizophrenie (n=26), in deren Familien auch andere Fälle der Schizophrenie beobachtet wurden (positive Familiengeschichte), unterschieden sich von Patienten mit einer negativen Familiengeschichte (n=58) nicht (für die Allelverteilung: $\chi^2=1,73$; df=1; $P=0,19$; für die Genotypenverteilung: $\chi^2=2,18$; df=2; $P=0,014$).

3.3. Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Promotorregion des menschlichen *PAX3*-Gens

Die genomische Struktur des menschlichen *PAX3*-Gens und seine cDNA-Sequenz wurden in früheren Studien beschrieben (Burri et al., 1989; Hoth et al., 1993; Lalwani et al., 1995; Vogan et al., 1996; Tsukamoto et al., 1994; Macina et al., 1995; Barber et al., 1999). Das Gen liegt in der chromosomalen Region 2q35 und besteht aus 10 Exons, die sich über 100 kb erstrecken. Für den Fall des murinen *Pax3*-Gens wurde sowohl das vollständige 5'-Ende der mRNA bestimmt als auch die Zusammensetzung der regulatorischen Elemente des Genpromotors definiert (Natoli et al., 1997). Beim Vergleich der beiden murinen und humanen Sequenzen des Exons 1 des Gens stellte es sich heraus, dass das 5'-Ende der menschlichen *PAX3*-mRNA wesentlich kürzer als die entsprechende murine Sequenz und möglicherweise unvollständig ist. Es war auch wenig bekannt über die transkriptionelle Kontrolle des *PAX3*-Gens. Um die tatsächliche Sequenz der *PAX3*-mRNA zu ermitteln, wurden im folgenden Primer-Extension und RNase-Protektion durchgeführt. Ausserdem wurde die 5'-flankierende regulatorische Region des *PAX3* isoliert und funktionell charakterisiert.

3.3.1. Isolierung der 5'-flankierenden regulatorischen Region des humanen *PAX3*-Gens

Für die Isolierung der genomischen Klone, die die 5'-flankierende regulatorische Region des humanen *PAX3*-Gens enthalten, wurde eine humane PAC-Bibliothek (Nr. 704) durchsucht. Diese Bibliothek stammt aus der genomischen DNA einer männlichen Fibroblastenzelllinie, die in den pCYPAC-2-Vektor inkloniert ist. Für das *Screening* wurden eine mit ³²P markierte Sonde verwendet, die die von Macina et al. (1995) beschriebene Sequenz des ersten Exons des *PAX3*-Gens enthält und mit den Primern P3-1 und P3-2 generiert wurde (in Abb. 3.4C eingezeichnet). Durch das *Screening* wurde ein spezifischer Klon (LLNLP704P08224Q13) isoliert und aufgereinigt. Die DNA dieses Klons wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten und im Southernblot analysiert. So konnte festgestellt werden, dass die Grösse des inklonierten genomischen Fragmentes etwa 60 kb betrug. Mit Hilfe der oben beschriebenen Hybridisierungssonde wurde weiter nach kürzeren, die Promotorregion enthaltenden DNA-Fragmenten gesucht. Anhand der Southern-Blot-Analyse

Sequenz repräsentiert PCR-Primers P3-5 und P3-6). Die $(CA)_n$ -Repeat ist fettgedruckt; die G/C-Substitution ist mit einer fetten und kursiven Grossbuchstabe eingezeichnet.

3.3.2. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *PAX3*-Gens

3.3.2.1. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *PAX3*-Gens mittels Primer-Extension

Für die Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes des *PAX3*-Gens wurde eine Primer-Extension durchgeführt. Aufgrund der für *PAX3*-Gen publizierte cDNA-Sequenz wurden dafür die zwei Primer P3-3 und P3-4 (Abb. 3.4 und Abb. 3.7) ausgesucht, die sich zwischen den Nukleotidpositionen +333 und +368 beziehungsweise -46 und -81 anlagerten. Als Matrize dienten die Gesamt-RNAs aus dem humanen zerebellären Kortex, SK-N-SH-Zellen und Cos-7-Zellen. Die Primer-Extension-Analyse mit dem Primer P3-3 (Abb. 3.5A) zeigte klar definierte Verlängerungsprodukte von 368 bp im zerebellären Kortex, SK-N-SH-Zellen und Cos-7-Zellen, während kein Verlängerungsprodukt in *E. coli*-tRNA als negative Kontrolle beobachtet wurde. Bezogen auf die Sequenzdaten entspricht diese Produktgröße einem Transkriptionsstartpunkt 366 bp stromaufwärts des Translationsstarts. In den Primer-Extension-Reaktionen, die mit dem Primer P3-4 und ähnlichen RNAs durchgeführt wurden, wurden keine Extensionsprodukte nachgewiesen (die Daten sind nicht gezeigt). Infolgedessen wurde das Nukleotid an der Position 366 bp stromaufwärts von der Translationstartstelle als Transkriptionsstartpunkt festgelegt und als +1 Nukleotid bezeichnet (Abb. 3.7).

Um die gewebespezifische Regulation der *PAX3*-Genexpression zu untersuchen, die vom gefundenen Promotorbereich initiiert werden könnte, wurde auch eine Primer-Extension mit dem Primer P3-3 und mit der RNA aus folgenden adulten menschlichen Geweben durchgeführt: zerebellärem Kortex, frontalem Kortex, okzipitalem Kortex, temporalem Kortex, Hippocampus, Putamen, Thalamus, Locus parientalis, Uterus, Nieren, Lungen, Skelettmuskeln und Schilddrüse. Bei der Untersuchung wurde auch ein 368 bp-langes Verlängerungsfragment detektiert, das spezifisch in verschiedenen Gehirnbereichen und einigen adulten Geweben auftrat. Ein intensives Signal wurde sowohl in frontalem, temporalem, zerebellärem Kortex und Thalamus als auch in einigen anderen menschlichen Geweben wie Nieren, Skelettmuskeln und Schilddrüse beobachtet (Abb. 3.6). Ein relativ schwaches Signal wurde in anderen untersuchten Gehirnregionen festgestellt. Im Uterus wurde kein spezifisches Verlängerungsprodukt nachgewiesen. In *E. coli*-tRNA als negativer Kontrolle wurde kein spezifisches Signal beobachtet.

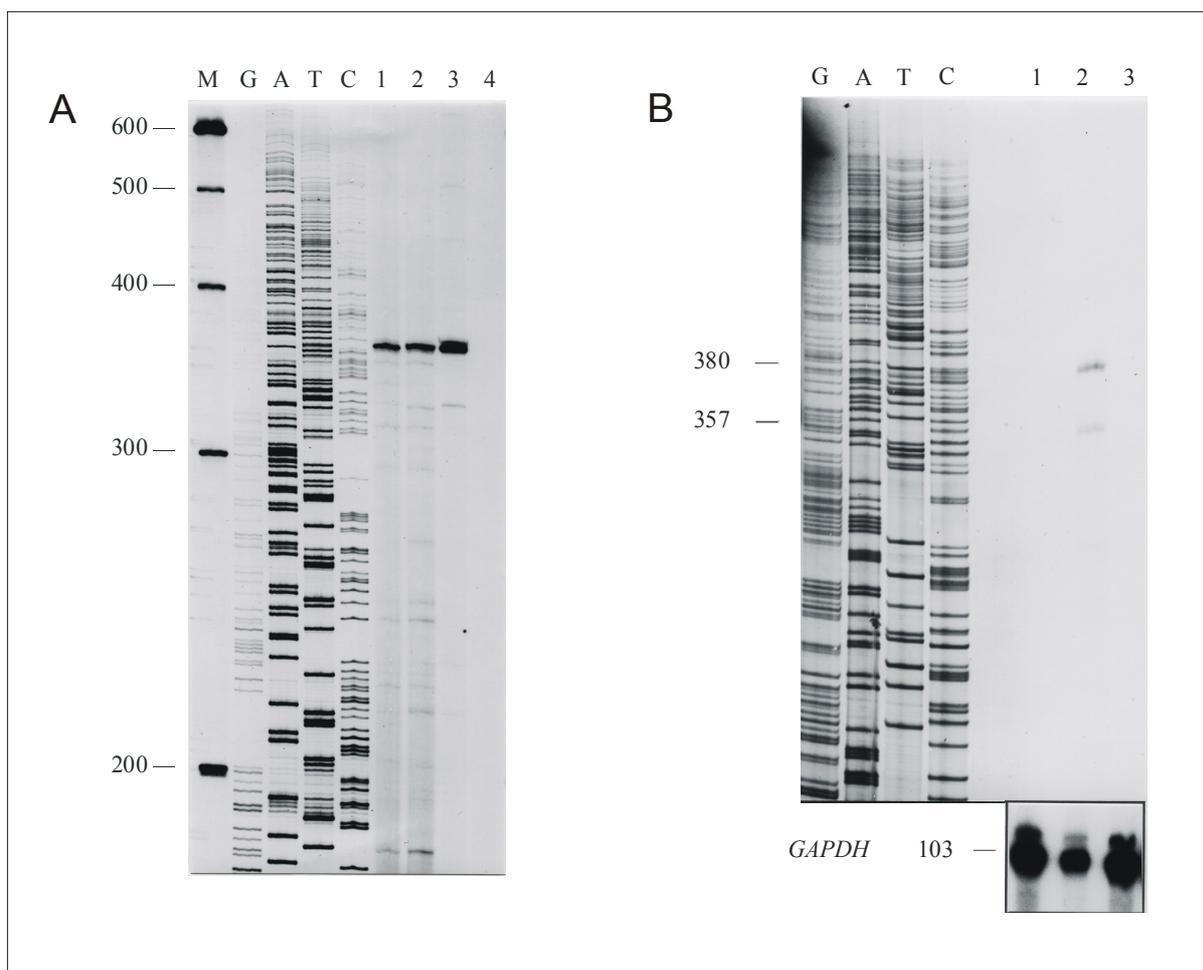


Abb. 3.5. Ermittlung der Transkriptionsstartpunkte des *PAX3*-Gens

(A) Primer-Extension-Analyse. Primer-Extension wurde mit 40 µg Gesamt-RNA aus humanen zerebellären Kortex (1), SK-N-SH-Zellen (2), Cos-7-Zellen (3) und *E.coli*-tRNA (4) als negative Kontrolle unter Verwendung des radioaktiv markierten Primer P3-3 durchgeführt. Die Extension-Produkte wurden auf dem denaturierenden Polyacrylamid-Gel analysiert. Als Grössenmarker dienten die standardisierte Sequenzierungsreaktion des pBluescript KSII (+)-Vektors mit universellem M13-Primer und mit ^{32}P markierte 100 bp-Leiter (M). Der kartierte Transkriptionsstart ist mit dem Pfeil und fetten Buchstaben in der Sequenz eingezeichnet. (B) Ribonuklease-Protektion-Analyse. Die Ribonuklease-Protektion wurde mit 40 µg Gesamt-RNA aus humanem zerebellärem Kortex (2), Uterus (3) und *E.coli*-tRNA (1) als negative Kontrolle unter Verwendung der von *StuI*-*NaeI*-Fragmente stammenden Riboprobe durchgeführt. Die Protektionsprodukte wurden auf dem denaturierenden Polyacrylamid-Gel gegen die Sequenzierungsstandardreaktion des pBluescript KSII (+)-Vektors mit universellem M13-Primer analysiert. Die Integrität der verwendeten RNAs wurde durch die Ribonuklease-Protektion mit für das *GAPDH*-Gen spezifischer Riboprobe durchgeführt (nur entsprechender Teil des Autoradiogramm ist dargestellt).

3.3.2.2. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *PAX3*-Gens mittels Ribonuklease-Protektion-Analyse

Um die erhaltenen Ergebnisse zur Identifizierung der Transkriptionsstartstelle zu bestätigen, wurde im folgenden eine Ribonuklease-Protektion-Analyse mit RNA aus humanen zerebellären Kortex, Uterus und *E. coli*-tRNA als negativer Kontrolle durchgeführt. Nach der

Hybridisierung der Gesamt-RNA mit der von dem *StuI-NaeI*-Fragment stammenden Riboprobe und nachfolgender Verdauung mit der Ribonuklease wurden zwei Protektionsprodukte mit Grössen von 380 und 357 Nukleotiden im zerebellären Kortex detektiert (Abb. 3.5B). Das 380 bp-lange Protektionsprodukt endet am 5'-Ende nach dem Vergleich mit genomischer Sequenz des *PAX3*-Gens auf dem gleichen Nukleotid wie das durch Primer-Extension-Analyse erhaltene 368 bp-lange Fragment. Das kleinere 357 bp-lange Protektionsfragment könnte eine zusätzliche schwächere Transkriptionstartstelle repräsentieren oder auf eine sekundäre Struktur/ Degradierung der mRNA hindeuten. Im Uterus und in *E. coli*-tRNA (negative Kontrolle) konnten keine spezifischen Protektionsprodukte nachgewiesen werden. Zur Quantifizierung der RNA-Menge in allen drei Proben wurde parallel Protektion-Reaktionen mit *GAPDH*-spezifischer Riboprobe durchgeführt (Abb. 3.5B).

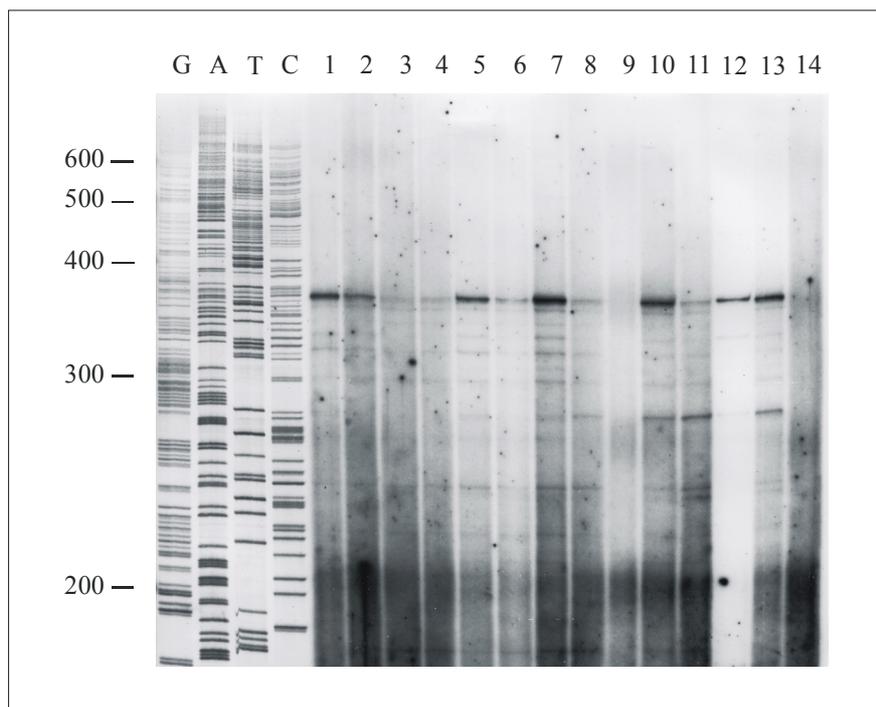


Abb. 3.6. Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte des *PAX3*-Gens in unterschiedlichen menschlichen Gehirnregionen und einigen adulten Geweben

Primer-Extension wurde mit 40 µg Gesamt-RNA aus zerebellärem Kortex (1), frontalem Kortex (2), okzipitalem Kortex (4), temporalem Kortex (5), Hippocampus (3), Putamen (6), Thalamus (7), Locus parientalis (8), Uterus (9), Nieren (10), Lungen (11), Skelettmuskeln (12) und Schilddrüse (13) unter Verwendung des radioaktiv markierten Primer P3-3 durchgeführt. Als negative Kontrolle wurde *E.coli*-tRNA (14) verwendet. Die Extension-Produkte wurden auf dem denaturierenden Polyacrylamid-Gel analysiert. Als Grössenmarker diente die Sequenzierungsstandardreaktion des pBluescript KSII (+)-Vektors mit universellem M13-Primer. Der kartierte Transkriptionsstart ist mit dem Pfeil eingezeichnet.

ähnliches Motiv, CCAAT-Boxen und einige potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sind fettgedruckt und unterstrichen angegeben. Die Restriktionsschnittstellen, die für die Präparation der Reporter-gen-Konstrukte verwendet wurden, sind auch dargestellt. Das (CA)_n-repetitive Element ist fettgedruckt.

3.3.3. Promotoraktivität und Analyse der regulatorischen Elemente in Promotorregion des *PAX3*-Gens

3.3.3.1. Computergestützte Analyse potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in der Promotorregion des *PAX3*-Gens

Nach Ermittlung des 5'-Endes der mRNA des *PAX3*-Gens über Primer-Extension und Ribonuklease-Protektion und Kartierung dieser Position auf genetischer Ebene wurde der stromaufwärtsliegende Bereich einer computergestützten Analyse potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen unterzogen. Die Anordnung und Akkumulation derartiger Bindungsmotive erlauben einen Rückschluss auf eine evtl. vorhandene Promotoraktivität, die in weitergehenden Studien mit den Reporter-genkonstrukten detaillierter analysiert wird.

Etwa 1,6 kb des Bereichs zwischen *XhoI*- und *NaeI*- Restriktionsschnittstellen (Abb. 3.7) wurden mit dem Programm „MatInspector V2.2“ (Quandt et al., 1995; <http://transfac.gbf.de/TRANSFAC/index.html>) untersucht. Dieses Programm basiert auf der TRANSFAC-Datenbank der Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren (Version 4.0; Heinemeyer et al., 1999). Als Parameter für die Abfrage wurde ein Ähnlichkeitskoeffizient für die Kernsequenz („core similarity“) von 1,0 und für die Matrix von 0,85 verwendet.

Eine detailliertere Untersuchung des Bereiches bis zu –250 bp, im allgemeinen Abschnitt der basalen Promotorelemente der Transkriptionsinitiation, zeigte ein TATA-ähnliches Motiv 37 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes und zwei CCAAT-Boxen in Position –86 und –131 nt, die vom Transkriptionsfaktor CP1 gebunden werden.

Bei der weiteren Analyse der 5'-flankierenden Sequenz wurden innerhalb der 1700 bp stromaufwärts vom Startpunkt der Transkription potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, AP1, AP2, CP2, NF1, PEA3 und MEF-2 festgestellt. Die gefundenen potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren sind in Abb. 3.7 und Abb. 3.9 gezeigt.

3.3.3.2. Analyse der Promotoraktivität des *PAX3*-Gens

Um die für die basale Promotoraktivität und spezifische Regulation der Genexpression wichtige Promotorregionen zu untersuchen, wurden verschiedene Fragmente des 5'-flankierenden Bereichs des *PAX3*-Gens in den promotorlosen Luziferase-Expressionsvektor

(pGL3 basic) kloniert und in einem Luziferase-Assay analysiert. Bei dieser Methode misst man den Einfluss einer DNA-Sequenz in einem Reporter-Gen-Plasmid auf die Expression des Enzyms Luziferase durch die Fähigkeit des Zellextraktes, Leuchtkäfer-Luziferin durch ATP-abhängige Oxydation in Oxyluziferin mit der zu messenden Lumineszenz zu überführen. Die Konstrukte wurden in die Zelllinien RD und Cos-7 transfiziert, die eine stabile konstitutive Expression für das *PAX3*-Gen aufweisen (die Daten sind nicht gezeigt). Die seriellen Deletierungskonstrukte und ihre Promotoraktivitäten sind in Abb. 3.8 dargestellt. Die absoluten Aktivitäten der Promotorkonstrukte waren bis zu 8 Mal niedriger in Cos-7-Zellen im Vergleich zu RD-Zellen. Die Konstrukte pStN, dessen Insert sich von -650 bis +379 nt erstreckt und ein Teil vom Exon 1 und seinen 5'-flankierenden Bereich enthält, und auch pStNΔ (mit einer internen Deletion) zeigten die höchste Aktivität. Eine signifikant reduzierte Aktivität der Luciferase (bis zu 38%) wurde mit dem Konstrukt pEN (von -468 bis +379) gemessen. Dies deutet darauf hin, dass der Bereich zwischen -650 und -468 Nukleotiden wahrscheinlich positive regulatorische Elemente enthält. Weitere Deletierung zwischen den Nukleotiden von -468 bis -267 hat keine grösseren Auswirkungen auf die Luciferase-Expression gezeigt. Während die Promotoraktivität des pSuN Konstrukts (von -179 bis +379) weniger als 20% betrug, ging die Luciferase-Expression mit den Konstrukten pAN und pHN bis zu 40% zurück. Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass die DNA-Region zwischen Nukleotid -179 und -64 einen negativen Effekt auf die Promotoraktivität ausübt. Das gleiche Fragment ergab ein niedrigeres Niveau der Luciferase-Expression (<30%) in antisense Orientierung. Das Fragment, welches das TATA-ähnliche Motiv und die erste CCAAT-Box enthält (-101 to +379; pAN), regulierte die Reporter-Gen-Expression unabhängig von seiner Orientierung (Abb. 3.8; pNA). Dagegen zeigte das Fragment, das nur das TATA-ähnliche Motiv (-64 to +379; pHN) enthält, eine reduzierte Promotoraktivität in der antisense Orientierung (Abb. 3.8; pNH). Eine signifikant verminderte Promotoraktivität wurde auch mit dem Konstrukt, welches zusätzlich 549 bp am 5'-Ende trägt (von -1200 bis +379; pXN), erzielt. Ein computerunterstützter Vergleich der humanen und murinen Sequenzen liefert ein hohes Mass an Identität (~90%) in der Region, die stromaufwärts liegt. Dies untermauert die Ansicht, dass dieses Segment wahrscheinlich ein negativ wirkendes regulatorisches Element verbirgt (Abb. 3.9). Eine konservierte TA-reiche Sequenz (TTATAAATAAAA), die in der Position -1118 der humanen Sequenz lokalisiert ist, könnte als Bindungsstelle für mehrere Transkriptionsfaktoren dienen. Zusammenfassend deutet der oben beschriebene Befund darauf hin, dass die 5'-flankierende Region des *PAX3*-Gens mehrere positiv und negativ wirkende, *cis*-regulatorische Elemente enthält.

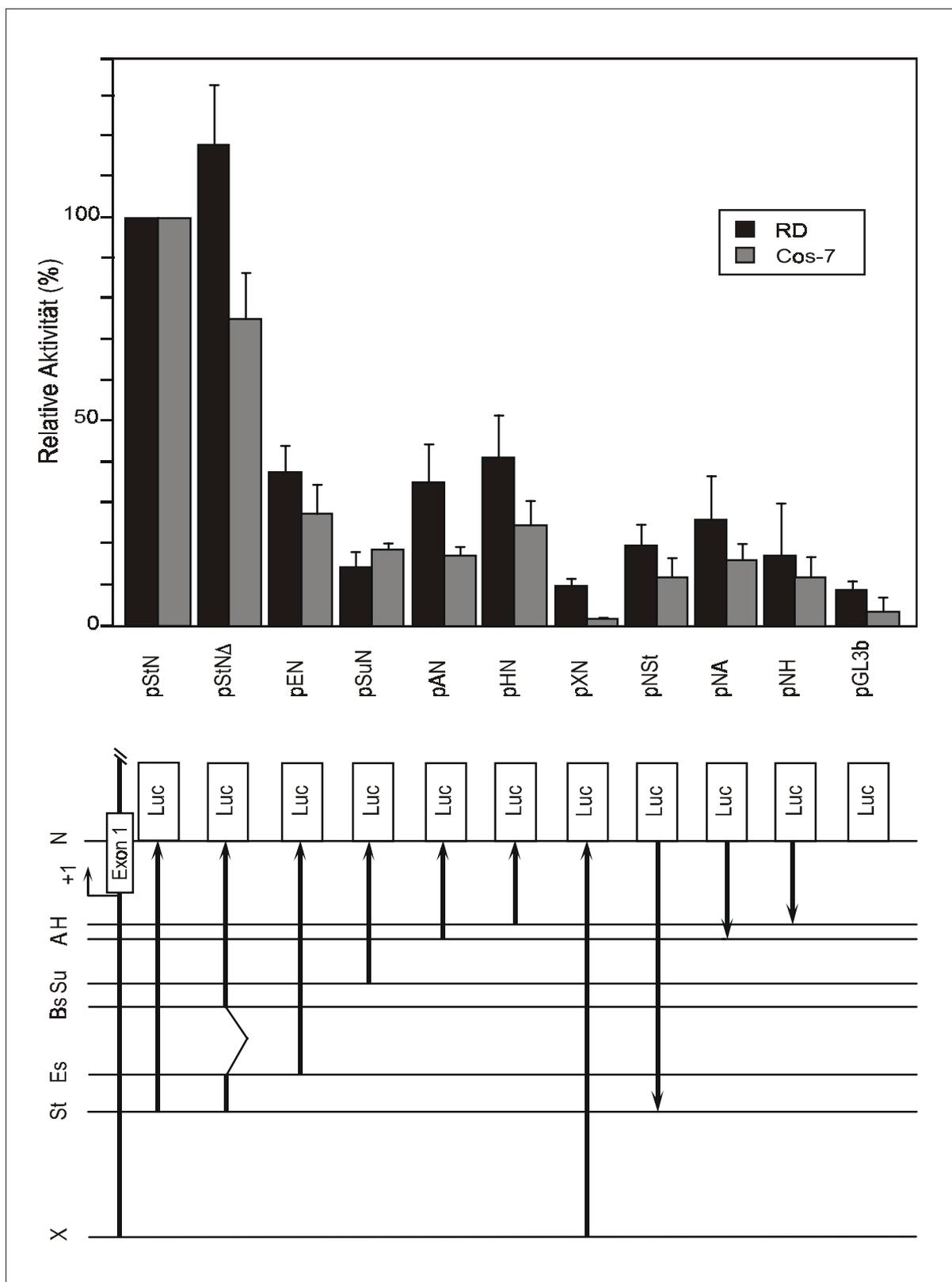


Abb. 3.8. Funktionelle Untersuchung der Promoterregion des *PAX3*-Gens

(A) Transiente Transfektionen der in (B) gezeigten Konstrukte in RD- und Cos-7-Zellen. Die Ergebnisse von drei bzw. vier unabhängigen Doppelerperimenten sind als relative Promotor-induzierte Luciferase-Aktivitäten (jeweils Mittelwert und Standardabweichung) im Vergleich zu dem Wert gezeigt, der mit dem Reporterkonstrukt pStN erzielt wurde. Die Luciferase-Transkription wurde im Vergleich zu dem promotorlosen Expressionsvektor pGL3 basic untersucht. (B) Schematische Darstellung der untersuchten Luciferase-Reporter-Gen-Konstrukte. Das 1,6 kb-lange *XhoI-NaeI* Fragment, das einen Teil vom Exon 1 und dem 5'-flankierenden Bereich enthält, und

von ihm stammende 5'-Deletionsfragmente wurden in sense und teilweise in antisense Orientierung in den promotorlosen Luciferase-Expressionsvektor pGL3 basic (pGL3b) kloniert. Die Restriktionsschnittstellen der verwendeten Enzyme *XhoI* (X); *StyI* (St); *EspI* (Es); *BstXI* (Bs); *StuI* (Su); *AccI* (A); *HindIII* (H); *NaeI* (N) sind angegeben.

```

hPAX3      -1706 ...catttaatgtaaaaccagggttaacaaggcacatgcctccttcatgggtccagacattt.ctggga
mpax3      -1578 ...g-gc-c-aa-gct-t-cca-tgt---t-ggat-ggggg-gg-t-----t-.-.-
-1641 gtctcctgagacctgtctccgtggctctgagggtaaccaagccttctggcatcaggcaggctgaaagcttgctggttt
-1513 ---c--a--g--c---agcct----cc-----g-ta-gc---t-ga-t----gg-agca--gagc-a--ca-c--
-1561 ccccaatggtgagtgggtttttaagggccaaacttgtggactgctgagcggctataccccacacccccctacatcttgcc
-1433 t-t-cact-g-----aactc-----g--cag-----tgaacaactac-cg-a-gc-c-----cgg.....
-1481 ttctgagtttgcttaattaggaatgggaagtaggggtggggggcccgagttcacgtcaaaactgtcaaggaggtggg
-1361 .....-----gg-----c-----a-----t-----a-----
-1401 ggaggg.gacagagagagaggagtggagaactccctccaggggcaggaataatcaaaaatcataaaaggaaaaggggga
-1284 --g--ag---tg-----g-----g-t.....-----t-----a.-
-1322 ctggaagcccagaagtcattgtttcctttatttcaaaggg.aaaaacctgcccgattctcatccttttgattgattaagg
-1210 -----g-----t-----
-1243 ccctgaatacctcgcgcccccgagtgacagtcctgaataggctcgagcgaataaagcgcagtgacagagcggggctg
-1130 -----t-----a--t---g-----a---c-----t-----
-1163 gcactc...gggggtgtaaaggaggc..gagttcgctggcacttaccaagttataataaaaggctatgcacaatggtac
-1050 ---gggag-----g-----agt.....g-----
-1088 cttctctaaggacagacagtcctttacaacactcctggcgtcatatcctgctggggacacttcagctcctagccaagac.t
-973 -----g-
-1009 tcgctccttttattttccagcagtttagtctgaatgccataataaattcctgagaacaaacgctgaaccgggcaaac
-893 -----t-.-----c-----
-929 tttaacatacagacacatctctgtcgacgcatcggggatctatatgtag...agatttagaacgcagcttgccagagc
-815 c-c-----t---tg--ag-g.....-----ga--g---cgtgg-----aagt-c-c---ct---ag
-853 ggtttttacaccaagaagaggagccagggttttttctgcacctccccatccccagccttcaactaacga...
-743 -----a-----a-----tg-c-ccccat-t--g-t-g-aa-t-ggag--caggggagg-ct-acc...

```

Abb. 3.9. Computerunterstützter Vergleich des *Repressor*-Segments in Promotorbereichen der humanen und murinen *pax3*-Genen

Die Abschnitte sind zwischen nt –1720 und –773 für humane und von nt –1578 bis –663 für murine Sequenzen dargestellt. Die Nukleotidlücken sind als Punkte angegeben. Einige potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sind unterstrichen. Die identischen Positionen sind durch Striche symbolisiert.

3.3.4. Charakterisierung und funktionelle Untersuchung des mit dem *PAX3*-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus

Eine Sequenzanalyse der 5'-flankierenden Region des *PAX3*-Gens zeigte ein repetitives Element mit einer (CA)₂₇-Dinukleotidstruktur in der Position 337 bp proximal des Transkriptionsstartpunktes. Die Position und die Sequenz dieser repetitiven Region sind in Abb. 3.4D und 3.7 dargestellt.

3.3.4.1. Bestimmung der Allelverteilung innerhalb der Kontrollgruppe

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem $(CA)_{27}$ -Element um einen Polymorphismus handelt, wurde eine Genotypisierung mittels radioaktiver PCR an 225 im Hause verfügbaren genomischen DNA-Proben gesunder kaukasischer Probanden durchgeführt. Durch ein die repetitive Sequenz flankierendes Primerpaar (Abb. 3.4D) konnte der Bereich der genomischen DNA (335 bp für Allel mit 27 repetitiven Einheiten) amplifiziert werden. Die Analyse der Reaktionsprodukte zeigte unterschiedlich lange Fragmente (Abb. 3.10), die kloniert und sequenziert wurden.

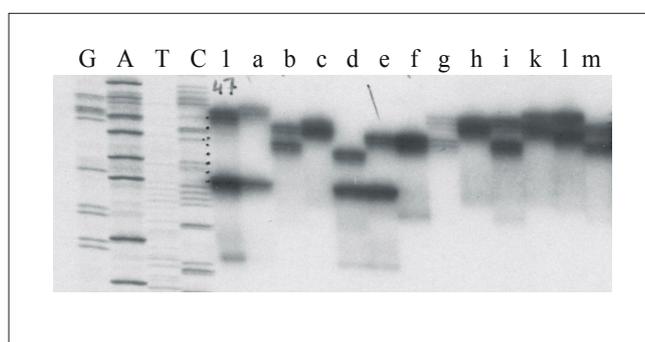


Abb. 3.10. Exemplarische Darstellung der Genotypisierungsergebnisse

Die radioaktive PCR wurde mit 60 ng genomischer DNA unter Verwendung der die repetitive Sequenz flankierenden Primer P3-5 und P3-6 durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden denaturiert und auf dem 6%igen denaturierenden Polyacrylamid-Gel gegen die Standard-Sequenz des mit dem universellen M13-Primer sequenzierten pBluescript KSII (+)-Vektors analysiert. Linie 1 stellt einen bekannten Genotyp (13/25) dar. Linien a-m repräsentieren folgende Allele/Genotypen: a, 13/26; b, 20/24; c, 24/24; d, 13/19; e, 13/23; f, 23/23; g und i, 23/25; h, 24/24; k, 24/26; l, 23/26 und m, 21/24.

Dabei wurden ausser dem bereits bekannten $(CA)_{27}$ -Allel weitere 14 Allele mit 13 bis 30 repetitiven Einheiten entdeckt, die eine bimodale Allelverteilung zeigten. Die Allelverteilung für die mit dem *PAX3*-Gen verbundene polymorphe Region (*PAX3*-LPR) in 225 gesunden Probanden ist in Abb. 3.11 dargestellt. Das systematische *Screening* der *PAX3*-LPR in unserer Population ergab 15 unterschiedliche Allele mit einer beobachteten Quote der Heterozygoten von 90%. Die Häufigkeit des Alleles mit 13 repetitiven Einheiten beträgt 20% der gesamten Anzahl aller Allele, während restliche $(CA)_{18}$ - $(CA)_{30}$ -Allele eine normale Allelverteilung zeigten. Ein zweiter Polymorphismus, ein einzelner G/C-Nukleotidaustausch mit einer Allelfrequenz von ca. 50%, wurde auch in Position -328 stromabwärts des $(CA)_n$ repetitiven Elements gefunden.

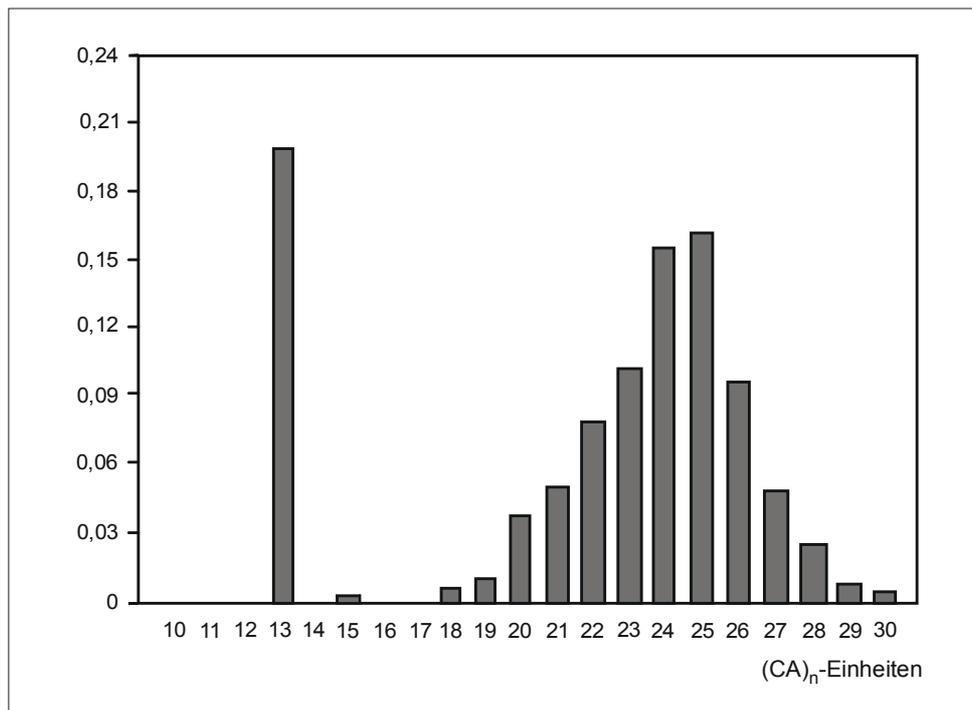


Abb. 3.11. Allelfrequenz für PAX3-LPR in 225 gesunden Probanden

3.3.4.2. Funktionelle Untersuchung des mit dem *PAX3*-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus

Um zu überprüfen, ob die oben beschriebenen Polymorphismen eine Auswirkung auf die Promotoreffizienz haben, wurden die Luciferase-Reportergen-Konstrukte mit dem G/C-Polymorphismus und ausgewählten Repeatvarianten auf Basis der pStN- und pXN-Konstrukte hergestellt und in RD- und Cos-7-Zellen transfiziert. Die Experimente zeigten, dass das die 25 (CA)-Einheiten enthaltende Konstrukt eine signifikant niedrigere Promotoraktivität ($P < 0.05-0.001$) in RD-Zellen aufweist im Vergleich zu den Konstrukten, die andere Allelvarianten enthalten (Abb. 3.12). Der G/C-Polymorphismus zeigte keine Einwirkung auf die Promotoraktivität (die Daten sind nicht gezeigt). Die Konstruktlänge (pStN-Konstrukt gegen pXN-Konstrukt) übt keinen Einfluss auf die von den Allelvariationen abhängige Promotoraktivität aus (die Daten sind nicht gezeigt).

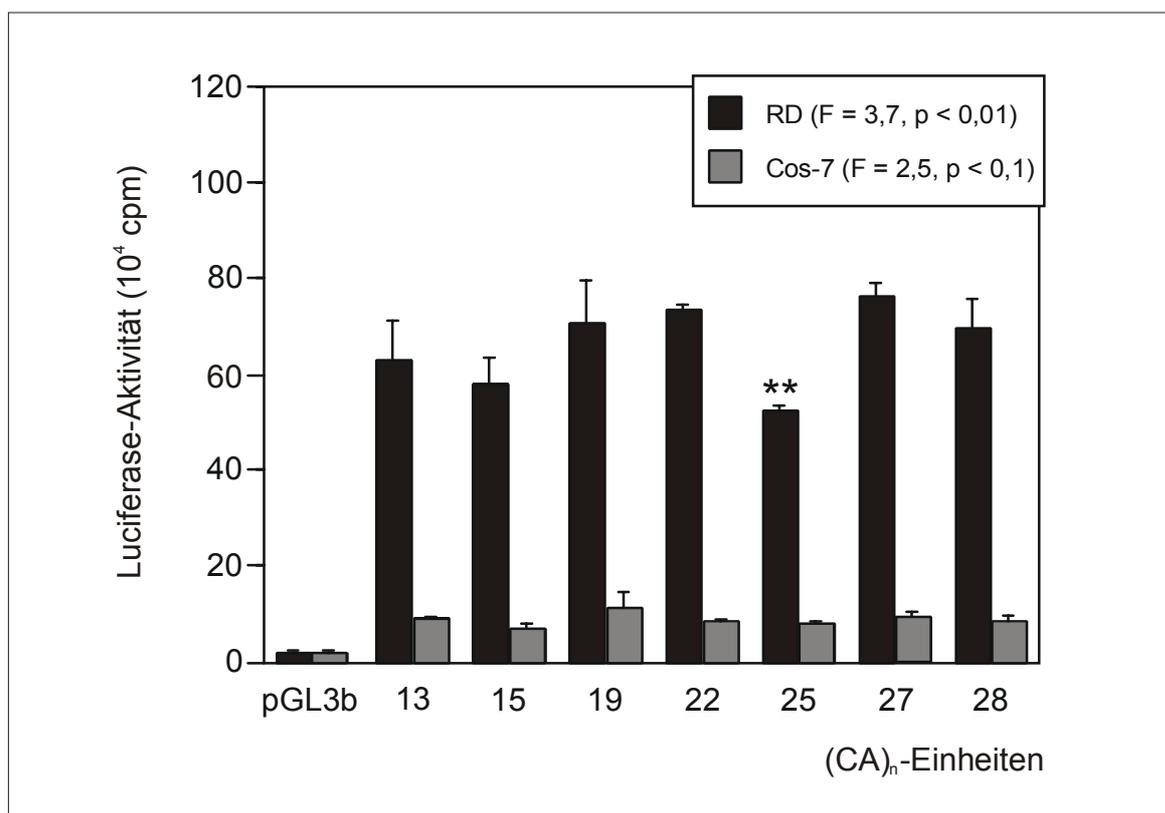


Abb. 3.12. Funktionelle Untersuchung des mit dem PAX3-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus pStN-Konstrukt (Allel 27) und auf seiner Basis hergestellte Konstrukte für die ausgewählten Allele 13, 15, 19, 22, 25 und 28 wurden in RD- und Cos-7-Zellen transfiziert. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Doppelexperimenten sind als Promotor-induzierte Luciferase-Aktivitäten (jeweils Mittelwert und Standardabweichung) dargestellt. Die Luziferase-Transkription wurde im Vergleich zu dem promotorlosen Expressionsvektor pGL3 *basic* (pGL3b) untersucht. Das Konstrukt mit 25 (CA)-Einheiten zeigte im Vergleich zu anderen untersuchten Konstrukten signifikant niedrigere Promotoraktivität in RD-Zellen (**P<0,05-0,001 nach dem χ^2 -Test nach Fischer).

3.4. Assoziationsanalyse der PAX3-LPR und der Schizophrenie

Für die Assoziationsanalyse der PAX3-LPR und der Schizophrenie wurden die im Hause verfügbaren genomischen DNA-Proben von 273 erkrankten Probanden untersucht. Für die Untersuchung wurden zuerst die Proben, wie es unter 3.3.4.1 beschrieben ist, genotypisiert. Dabei wurde keine anomale Expansion der Dinukleotidsequenz sowie keine neuen Allele zusätzlich zu den unter 3.3.4.1 beschriebenen Allelvarianten der Kontrollprobanden festgestellt. Die Allelverteilungen für die schizophrenen Patienten im Vergleich zu den Kontrollprobanden sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4. Allelverteilung für PAX3-LPR in Patienten mit Schizophrenie und gesunden Probanden

Allele	Kontrolle (n=222)	Schizophrenie (n=273)	paranoide Schizophrenie (n=82)	nicht-paranoide Schizophrenie (n=138)	schizoaffektive Psychosen (n=53)
12	0	0	0	0	0
13	85 (0,191)	124 (0,227)	38 (0,231)	57 (0,207)	29 (0,273)
15	1 (0,002)	0	0	0	0
18	2 (0,004)	5 (0,009)	1 (0,006)	4 (0,014)	0
19	7 (0,016)	14 (0,026)	4 (0,024)	7 (0,025)	3 (0,028)
20	17 (0,038)	23 (0,042)	8 (0,048)	12 (0,043)	3 (0,028)
21	25 (0,056)	34 (0,062)	15 (0,091)	14 (0,051)	5 (0,047)
22	38 (0,086)	44 (0,080)	15 (0,091)	20 (0,072)	9 (0,085)
23	54 (0,122)	63 (0,115)	17 (0,104)	35 (0,127)	11 (0,104)
24	69 (0,155)	88 (0,161)	29 (0,177)	44 (0,159)	15 (0,141)
25	71 (0,160)	61 (0,112)	16 (0,098)	35 (0,127)	10 (0,094)
26	44 (0,099)	50 (0,092)	12 (0,073)	23 (0,083)	15 (0,141)
27	20 (0,045)	28 (0,051)	7 (0,043)	17 (0,061)	4 (0,038)
28	8 (0,018)	11 (0,020)	2 (0,012)	7 (0,025)	2 (0,019)
29	2 (0,004)	0	0	0	0
30	1 (0,002)	1 (0,002)	0	1 (0,004)	0
31	0	0	0	0	0
statistische Analyse					
χ^2		3,136	5,258	0,415	1,441
df		1	1	1	1
<i>P</i>		0,077	0,022	0,519	0,230

Die Allelhäufigkeiten sind in Klammern angegeben. Die Ergebnisse des χ^2 -Testes sind für die diagnostizierten Gruppen gegen die Kontrollgruppe dargestellt.

Für die statistische Vergleichsanalyse der Allelverteilungen in Patienten- und Kontrollgruppen wurden die untersuchten Allele mit Ausnahme des Allels mit 25 repetitiven Einheiten, das signifikant niedrigere Promotoraktivität aufwies, gruppiert und ihre Häufigkeiten errechnet. Die computergestützte Vergleichsanalyse mit einer ausgewählten Fehlerrate von 5% wurde mittels χ^2 -Test durchgeführt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der Tabelle 3.4 dargestellt.

Ein Vergleich der Allelverteilungen in Patienten mit Schizophrenie und in der Kontrollgruppe zeigte keinen Unterschied in den Allelhäufigkeiten. Nach der Aufteilung der untersuchten Patienten in Untergruppen mit paranoiden und nicht-paranoiden Schizophrenien und schizoaffektiven Psychosen wurde keine Assoziation der niedrigeren Promotoraktivität

aufweisenden Allelvariante mit den Schizophreniesubtypen festgestellt.

3.5. Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Promotorregion des menschlichen *PAX7*-Gens

Das menschliche *PAX7*-Gen wurde in früheren Studien dem chromosomalen Bereich 1p35-1p36.2 zugeordnet (Schafer and Mattei, 1993; Shapiro et al., 1993b) und die cDNA-Sequenz und genomische Struktur der ersten 9 Exons des Gens (Schafer et al., 1994; Vorobyov et al., 1997; Barr et al., 1999), die sich über ca. 100 kb erstrecken, wurden aufgeklärt. Da es nicht bekannt war, welche regulatorische Mechanismen des 5'-Bereichs die *PAX7*-Expression kontrollieren, wurde in unserer Arbeit das vollständige 5'-Ende der *PAX7*-mRNA mittels Primer-Extension und RACE-Analyse ermittelt, sowie die primäre Identifizierung und Charakterisierung des *PAX7*-Promotors durchgeführt.

3.5.1. Isolierung der 5'-flankierenden regulatorischen Region des humanen *PAX7*-Gens

Für die Isolierung der genomischen Klone, die die Promotorregion des humanen *PAX7*-Gens enthalten, wurde genauso wie im Falle des *PAX3*-Gens eine humane PAC-Bibliothek (Nr. 704) durchsucht. Hierzu wurde ein mit ^{32}P markiertes *EcoRI-SspI*-DNA-Fragment verwendet, das die von Vorobjev et al. (1997) beschriebene 5'-flankierende Sequenz des ersten Exons des *PAX7*-Gens (*Accession*-Nr. X96744) einschliesst und mit den Primer P7-1 und P7-2 (Abb. 3.13B) generiert wurde. Durch das *Screening* der PAC-Bibliothek wurde ein spezifischer Klon (RPCIP704B248Q25) isoliert und aufgereinigt. Die DNA dieses Klons wurde mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten und im Southernblot analysiert. Die gefundene Grösse des inklonierten genomischen Fragmentes betrug etwa 70 kb. Mit Hilfe der oben beschriebenen Hybridisierungssonde wurde weiter nach kürzeren, die Promotorregion enthaltenden DNA-Fragmenten gesucht. Anhand der Southern-Blot-Analyse wurden zwei DNA-Fragmente *XhoI-BamHI* (ca. 4 kb) und *EcoRI-XhoI* (ca. 2,7 kb) ausgesucht und in weiterem in den Klonierungsvektor pBluescript II KS(+) inkloniert und sequenziert. Die ermittelten Sequenzen wurden mit den entsprechenden bekannten Sequenzeinträgen für den *PAX7*-Gen in GeneBank verglichen und auf ihre Korrektheit überprüft. Um das 3'-Ende des PAC-Klons zu charakterisieren, wurde dieser Klon mittels weiteren Southern-Blot-Analysen mit Hybridisierungsproben, die die cDNA-Sequenzen von Exon 2 bzw. Exon 3 und 4 enthalten, analysiert. Die Southern-Blot-Analyse mit der cDNA-

Sonde von Exon 4 zeigte keine Hybridisierung. Aufgrund dieser Experimente konnte festgestellt werden, dass das genomische Insert des *PAX7*-Klons erste drei Exons des Gens einschliesslich seines 5'-flankierenden regulatorischen Bereichs enthält. Die partielle genomische Karte des beschriebenen Klons ist in Abb. 3.13 dargestellt.

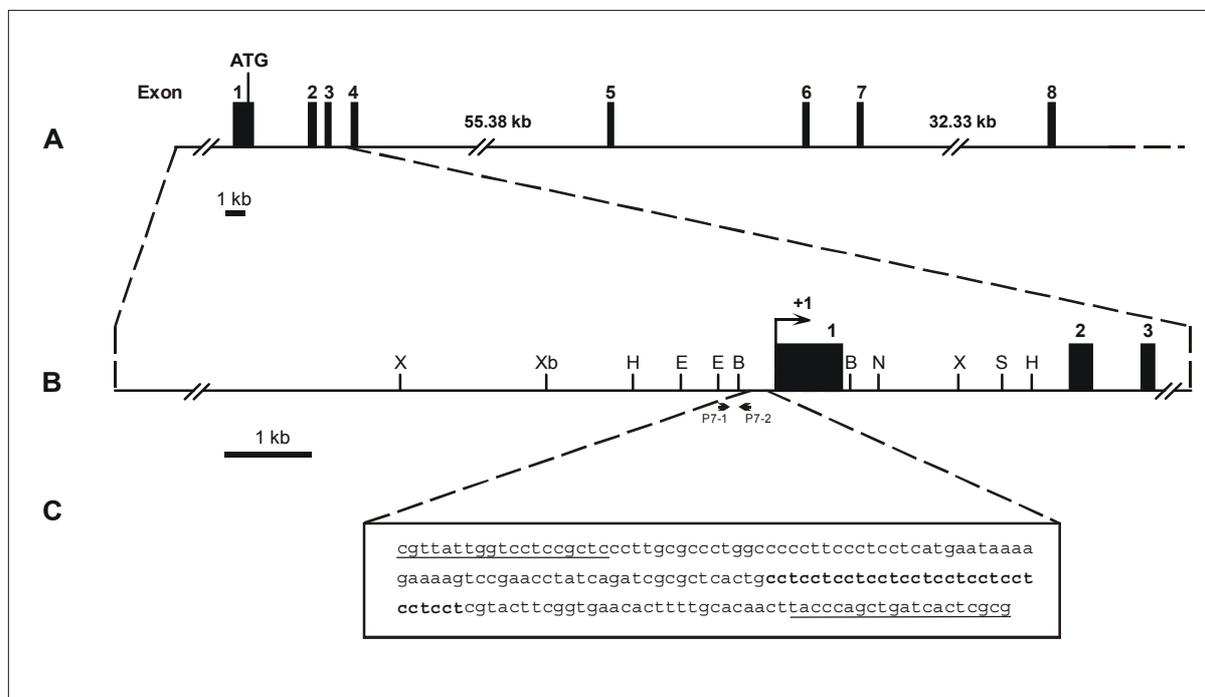


Abb. 3.13. Genomische Struktur der 5'-flankierenden regulatorischen Region des humanen *PAX7*-Gens
(A) Schematische Darstellung der genomischen Struktur des *PAX7*-Gens, die auf Grund von Genomprojekt veröffentlichter Sequenz des PAC-Klons 394P21 (*Accession*-Nr. AL021528) hergestellt wurde. Die Exons sind als schwarze Balken eingezeichnet. **(B)** Partielle genomische Karte des PAC-Klons (RPCIP704B248Q25). Die ersten vier Exons sind als schwarze Balken eingezeichnet. Die Restriktionsschnittstellen der Enzyme *Xho*I (X); *Xba*I (Xb); *Hind*III (H); *Eco*RI (E); *Bam*HI (B); *Not*I (N); *Sal*I (S) sind angegeben. Der Transkriptionsstart ist eingezeichnet. Die Lokalisierung und Orientierung der synthetischen Oligonukleotiden P7-1 und P7-2, die für die Herstellung *Eco*RI-*Ssp*I-Fragmentes verwendet wurden, sind als Pfeile dargestellt. **(C)** Nukleotidsequenz der mit dem *PAX7*-Gen verbundenen polymorphen Region (*PAX7*LPR; unterstrichene Sequenz repräsentiert PCR-Primer P7-8 und P7-9). Die (CCT)_n-Repeat ist fettgedruckt.

3.5.2. Expressionsanalyse des *PAX7*-Gens

Um das Expressionsmuster des *PAX7*-Gens in verschiedenen humanen adulten Geweben zu untersuchen und die Grösse des *PAX7*-Transcripts zu bestimmen, wurde die Northern-Blot-Analyse mit humanem MTN-Blot (Clontech) durchgeführt. Als Sonde für die Hybridisierung diente das radioaktiv markierte cDNA-Fragment P7-5-8-Exons, das sich von Exon 5 bis Exon 8 erstreckt. Um die Kreuzhybridisierung mit dem hochhomologen *PAX3*-Gen zu vermeiden, wurden die hoch konservierten Sequenzen der beiden Gene ausgeschlossen. Die cDNA-Sonde

spürte ein Transkript von etwa 6,3 kb ausschliesslich in adulten Skelettmuskeln auf (Abb. 3.14). Keine Expression wurde in adultem Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Nieren und Pankreas beobachtet.

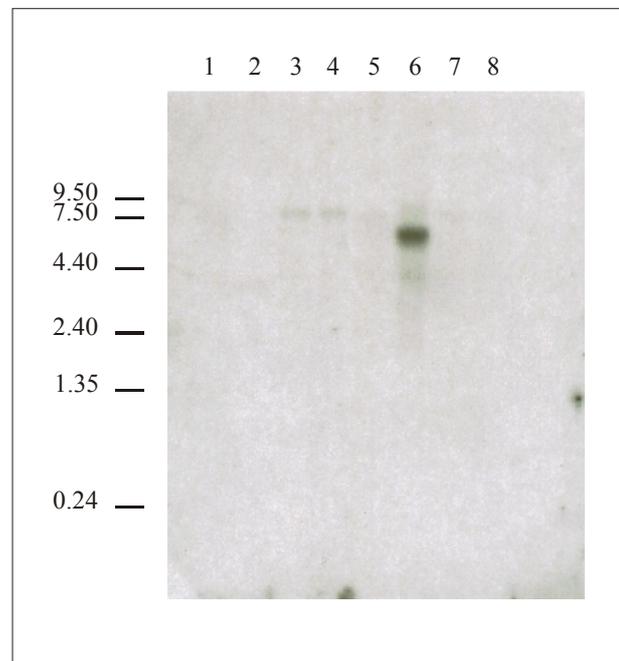


Abb. 3.14. Gewebespezifische Expression des *PAX7*-Gens

Das *Multiple-Tissue-Northern-Blot* von Firma Clontech wurde mit der radioaktiv markierten cDNA-Sonde P7-5-8-Exons hybridisiert. Die Spuren enthielten poly(A)⁺-RNA (etwa 2 µg pro Spur) aus folgenden adulten Gewebe: Herz (1), Gehirn (2), Plazenta (3), Lunge (4), Leber (5), Skelettmuskeln (6), Nieren (7) und Pankreas (8). Die Expositionszeit betrug 48 Stunden. Ein ungefähr 6,3 kb grosses Transkript (mit dem Pfeil markiert) wurde nur in adulten Skelettmuskeln detektiert.

Das Vorhandensein der alternativen oder kürzeren Spleissformen hingegen kann in anderen als Skelettmuskeln Geweben nicht ausgeschlossen werden. So lässt die RT-PCR-Analyse von unterschiedlichen Regionen des humanen adulten Gehirns unter Verwendung der für die Paired-Box spezifischen Primer P7-3 und P7-4, deren Sequenzen in Exon 2 und 4 lokalisiert sind, die Transkripte des *PAX7*-Gens im Zerebellum und subthalamischen Nuclein nachweisen. Auch wurden die schwachen Signale in temporalem und frontalem Kortex, Thalamus, Amygdala und Putamen detektiert (Abb. 3.15). Die Integrität der verwendeten Gesamt-RNAs wurde nachfolgend durch die Amplifikation der erhaltenden cDNA mit den für das β -Aktin-Gen spezifischen Primern überprüft. Eine weitere RT-PCR-Analyse mit den Primern aus ersten und zweiten Exons zeigte ein ähnliches Expressionsmuster (Daten sind nicht gezeigt).

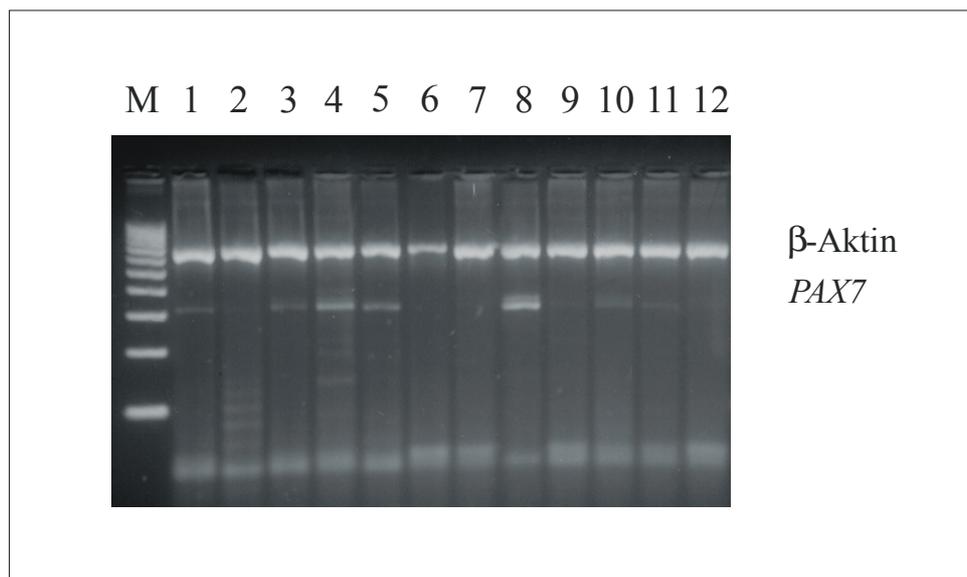


Abb. 3.15. Expression des *PAX7*-Gens in verschiedenen Regionen des humanen adulten Gehirns

Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte, die durch RT-PCR unter Verwendung der für die Paired-Box spezifischen Primer P7-3 und P7-4 amplifiziert wurden. Für die Analyse wurde Gesamt-RNA aus temporalem (1), okzipitalem (9), frontalem (11), entorhinalen (12) Kortex, Hypokampus (2), Thalamus (3), Zerebellum (4), Amygdala (5), Substantia nigra (6), kaudatischen Nuclei (7), subthalamischen Nuclei (8) und Putamen (10) verwendet. Die Auftrennung erfolgte in einem 2%igen Agarosegel. Als Grössenmarker diente die DNA-Leiter (M) von Firma Fermentas, die die mit der *MspI*-Restriktionsendonuklease geschnittene pUC19-Plasmid-DNA enthält. Die Integrität der verwendeten RNAs wurde nachfolgend durch die Amplifikation mit den für das β -Aktin-Gen spezifischen Primern überprüft.

3.5.3. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *PAX7*-Gens

3.5.3.1. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *PAX7*-Gens mittels Primer-Extension

Für die Identifizierung des Transkriptionsstartpunktes des *PAX7*-Gens wurde eine Primer-Extension durchgeführt. Aufgrund der für *PAX7*-Gen publizierten cDNA-Sequenz (Vorobyov et al., 1997) wurden dafür zwei Primer P7-5 und P7-6 (Abb. 3.17) ausgesucht, die sich zwischen den Nukleotidpositionen +686 und +709 beziehungsweise +77 und +100 anlagerten. Für die Analyse wurde die mRNA aus adulten Skelettmuskeln verwendet, wo eine starke *PAX7*-Gen-Expression mit der Northern-Blot-Hybridisierung nachgewiesen worden war. Die Primer-Extension-Analyse mit dem distalen Primer P7-5 zeigte ein Verlängerungsprodukt mit einem höheren Molekulargewicht, das ausserhalb der Reichweite des Sequenzierungsmarkers lag (die Daten sind nicht gezeigt). Die weitere Primer-Extension-Analyse mit dem Primer P7-6 aus der proximalen Region resultierte in zwei

Verlängerungsprodukten, die einer Grösse von 76 bp und 100 bp entsprechen (Abb. 3.16, Spur 1). Bezogen auf die Sequenzdaten sind diese Startpunkte der Transkription 640 bp und 664 bp stromaufwärts des Translationsstarts gelegen. In der Primer-Extension mit Hefe-tRNA als negative Kontrolle wurden keine spezifischen Signale beobachtet (Abb. 3.16, Spur 2).

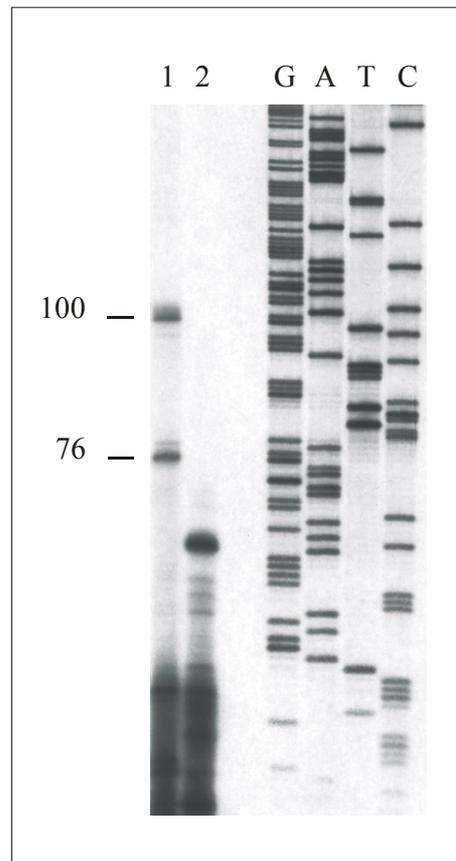


Abb. 3.16. Ermittlung der Transkriptionsstartpunkte des PAX7-Gens durch Primer-Extension

Primer-Extension wurde mit 0,5 µg mRNA aus humanen adulten Skelettmuskeln (1) und 30 µg Hefe-tRNA (2) als negative Kontrolle unter Verwendung des radioaktiv markierten Primer P7-6 durchgeführt. Die Extension-Produkten wurden auf dem denaturierenden Polyacrylamid-Gel analysiert. Als Grössenmarkern diente die Sequenzierungsreaktion des pBN-Plasmid mit dem P7-6 Primer. Die kartierten Transkriptionsstarts sind mit den Pfeilen und fetten Buchstaben in der Sequenz eingezeichnet. Die Primer-Extension mit Hefe-tRNA zeigte ein unspezifisches Verlängerungsprodukt.

3.5.3.2. 5'-RACE (5'-Rapid Amplifikation of c-DNA Ends)

Um die oben beschriebenen Ergebnisse aus der Primerextensionanalyse zu bestätigen, wurde eine 5'-RACE-Analyse durchgeführt. Dafür wurde auch wie für die Primer-Extension-Analyse mRNA aus menschlichen adulten Skelettmuskeln als Matrize ausgewählt. Unter Verwendung des Marathon-RACE-Kits (Clontech) wurde im weiterem cDNA aus der mRNA mit Hilfe der reversen Transcription synthetisiert, die cDNA zum Doppelstrang ergänzt und mit

dem partiell einzelsträngigen Linker (Adapter) an die Enden ligiert. Die Amplifikation des 5'-Endes der *PAX7*-cDNA erfolgte in zwei PCR-Runden. Bei der ersten Reaktion wurde der vom Hersteller mitgelieferte Anker-Primer (AP1) und der für *PAX7*-Gen spezifischen Primer P7-7 (Abb. 3.17) verwendet. Das verdünnte Amplifikationsprodukt der ersten Reaktion wurde als Matrize für eine *Nested*-PCR genommen, wo ein zweiter für *PAX7*-Gen spezifischer intern gelegener Primer P7-6 (Abb. 3.17) und ein im Kit enthaltener Anker-Primer (AP2) eingesetzt worden waren. Als positive Reaktionskontrolle diente ein vom Hersteller mitgeliefertes Primerpaar, mit dem das 5'-Ende der cDNA des menschlichen Transferinrezeptors (TFR) amplifiziert wird. Die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden auf dem Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten, gereinigt, kloniert und sequenziert. Die 5'-RACE-Analyse produzierte beständig ein 91 bp langes Fragment in zwei unabhängigen Experimenten. Das 5'-Ende dieses Fragmentes, das bei Sequenzierung von zwanzig Klonen gewonnen wurde, ist in Abb. 3.17 dargestellt. Das entspricht dem Transkriptionsstartpunkt 655 bp stromaufwärts des Translationsstarts und bestätigt die in der Primer-Extension-Analyse erhaltenen Ergebnisse.

3.5.4. Promotoraktivität und Analyse der regulatorischen Elemente in Promotorregion des *PAX7*-Gens

Eine computergestützte Analyse (siehe 3.3.3.1) der 5'-flankierenden Sequenz zeigte die Anwesenheit eines TATA-ähnliches Motivs in der Position -177 nt stromaufwärts von der Haupttranskriptionstartstelle. Innerhalb von 100 bp stromaufwärts von der Startstelle wurden keine CCAAT-Konsensusmotive gefunden. Dagegen wurde ein CCAAT-Box in einer reversen komplementären Ausrichtung in der Position -222 bp festgestellt. Die weitere Analyse der 5'-flankierenden Sequenz lieferte Konsensusstellen für einige allgemeine Transkriptionsfaktoren wie Oct-1 (NNGAATATKCANNNN), NF1 (TGGC-Kernsequenz), AP2 (MKCCSCNGGCG), AP4 (WGARYCAGCTGYGGNCNK), CREB (NNGNTGACGYNN), Sp1 (KRGCGKRRY), Nkx2.5 (TYAAGTG) und MyoD (NNCANTGNY) (Quandt et al., 1995). Die Transkriptionsfaktoren sind in der Abb. 3.17 angezeigt. Eine zweite Konsensusstelle für die TATA-Box (ataTATAaataaata) wurde in der Position +153 von der Startstelle gefunden.

Um die für die Kontrolle der *PAX7*-Gentranskription verantwortliche Promotorbereiche zu identifizieren, wurden die vom 5'-Ende des *PAX7* seriell geschnittene Fragmente auf ihre Fähigkeit, Luciferase-Reportergen zu aktivieren, überprüft. Die Rhabdomyosarcoma Zelllinie (RD) wurde als ein *in vitro* Model für Reportergenexperimente ausgesucht, da sie eine robuste

konstitutive *PAX7*-Expression laut einiger vorher publizierter Daten (Schäfer et al., 1994) ausgewiesen hat. Zusätzlich wurden JAR-Zellen, die frei vom endogenen *PAX7* sind, und Cos-7-Zellen, die auf einem niedrigen Niveau *PAX7*-mRNA exprimieren, für die transienten Transfektionsassays ausgewählt.

Absolute Aktivitäten der Promotorkonstrukte waren bis zu 6 Mal niedriger in JAR-Zellen und bis zu 3 Mal niedriger in Cos-7-Zellen im Vergleich zu RD-Zellen. Die Deletionskonstrukte und ihre Promotoraktivitäten sind in Abb. 3.18 dargestellt. Der pGL3-Kontrollvektor wurde als Referenzkonstrukt genommen. Der *Bam*HI-*Nae*I-Fragment (pBN, Basen von -403 bis +373) zeigte die höchste Luciferase-Aktivität in RD-Zellen, die ungefähr 6% von der Aktivität des pGL3-Kontrollvektors war. Dagegen betrug die Aktivität von pBN in JAR- und Cos-7-Zellen im Vergleich zur Aktivität des pGL3-Kontrollvektors nur ~1% bzw. ~2% entsprechend. Eine Insertion des *Bam*HI-*Nae*I Fragments in einer reversen Orientierung in den Luciferase-Vektor (pNB) ergab etwa 50% von dessen Aktivität in der Sense-Orientierung. Von der Orientierung unabhängige Aktivitäten der basalen Promotoren wurden auch im Falle anderer Gene berichtet (Giger et al., 1995; Kozlov et al., 1995; Okladnova et al., 1999). Weitere Deletion des Fragments bis zur *Pvu*II-Schnittstelle (-70), wodurch das TATA-ähnliche Motiv in der Position -177 ausgeschnitten wurde, demonstrierte jedoch ein relativ hohes Niveau der Promotoraktivität. Dieser Befund deutet darauf hin, dass das TATA-ähnliche Motiv und die Sequenz im Bereich von -177 bis -70 für die die *in vitro* *PAX7*-Promotoraktivität nicht entscheidend sind. Allerdings führte eine Deletion von weiteren 111 Nukleotiden bis zur *Sma*I-Schnittstelle (+42) zu einer beachtlichen Verminderung der Promotoraktivität in RD-Zellen. Deshalb ist die Sequenz rund um die Starstelle unentbehrlich für die normale *PAX7*-Promotoraktivität. Einfügung der weiteren Sequenzen (bis zu ~3,0 kb, pXbN-Konstrukt) hatte keinen signifikanten Effekt auf die transkriptionelle Aktivität in RD Zellen (Abb. 3.18). In Cos-7-Zellen konnten keine Unterschiede in der *PAX7*-Promotoraktivität zwischen den Konstrukten nachgewiesen werden. In JAR-Zellen zeigte der Konstrukt pBgN (von -1388 bis +373) eine höhere Aktivität im Vergleich zu den kleineren Deletionsfragmenten. Zusätzlich zeigte das Fragment zwischen *Bgl*II- und *Hind*III- (Position -1605) Stellen einen geringfügigen negativen Effekt auf die Luciferase-Aktivität.

	<i>EcoRI</i>	Nkx2.5		<i>SmaI</i>		
-632	<u>gaattcctcc</u>	<u>cttcaagtca</u>	ccctaggccg	<u>gttcccgggg</u>	agcctcactg	gaggaatttc
				Sp1		
-572	agaggggtgta	agacgaggga	gaagatgaga	<u>aatagggcgg</u>	<u>actctggccc</u>	tccgaggcca
					AP4	
-512	gagaaaaggc	gagaactccag	agaggcgccg	gacccgaggg	agacattccc	<u>atacagccgg</u>
		AP4	MyoD		BamHI	
-452	<u>gactccgaga</u>	<u>gcagccgtgg</u>	<u>gcacctgggg</u>	<u>gccggggact</u>	<u>cggcggatcc</u>	gccccattca
			NF-1		AP2	
-392	tcaaaggaag	gcaactgggac	<u>aaagttggcc</u>	<u>ccctcccctt</u>	<u>ctccccagc</u>	<u>ccccaaactcg</u>
-332	ccgggatcgt	ccctctcttt	tcaaggcggg	tcaaattctc	ccccaaaacg	aggtcgagcc
				<i>SspI</i> / <i>Oct1</i> ; NF-1	CCAAT (-)	
-272	ggggattaga	aaagagggaa	<u>aaaaatattc</u>	<u>gttggcgatt</u>	<u>tcttttcgtt</u>	<u>attggctctc</u>
		NF-1		TATA-like motif		
-212	cgctcccttg	<u>cgccctggcc</u>	<u>cccttccttc</u>	ctcatgaata	<u>aaagaaaagt</u>	ccgaacctat
					RsaI	
-152	cagatcgcgc	tcaactgcctc	ctcctcctcc	tctcctcctc	cctcctcgta	<u>cttcgggtgaa</u>
			<i>PvuII</i> / <i>MyoD</i> ; AP4	AP2		
-92	cacttttgca	caacttacc	<u>agctgatcac</u>	<u>tccggccccc</u>	<u>tccgcttttc</u>	atttctcttt
				↓ Pe (+1)	↓ Race	↓ Pe
-32	ccccaaaccc	gtcacccct	gtctctctcg	tccagccctg	aaaccggagg	aggctccttc
		<i>SmaI</i>				
+29	ttccgtctgt	<u>ccccgggtct</u>	cctaggggac	gggctgtGA	AAGCTGGTGT	GGAGGGAGAA
		P7-6	P7-7			
+89	<u>GCGAGTGTGG</u>	<u>TCCGGAGAAA</u>	<u>GAAGGCGTGG</u>	<u>AGAAGAGGGA</u>	<u>GGGAGCGAGA</u>	<u>AGCGGAGAAT</u>
+149	AAATATATAA	ATAAATACGA	GAACGAAATC	CACTCCGCAG	TCTCCGGGCT	CGGAAACTTT
	NF-1; AP2					
+209	<u>GGCCCCGAGC</u>	GCCAGAGCGC	CAGAGCGCGA	GAGCGCGGCG	CTCGCCACTC	TGAGGCTGGC
			AP2	<i>SacII</i>		
+269	GGCCTCGATT	CCGGCCGCGT	<u>TCCCCCGGCC</u>	<u>CCCCTCCGCC</u>	<u>GCGGGGCTG</u>	GTCTCCGGGT
		AP4			<i>NaeI</i>	
+329	TCTGCCAGGC	<u>GCATCAGCCC</u>	<u>GCACAAC TTC</u>	TGGCCGAGGC	<u>CAGCCGGCAG</u>	AGGCGGACTT
+389	GGGGTTGGAG	TGTTTGTTTG	TTTGAAC TTC	CTCGTCGTCG	CCACCTTCCC	TCCCCCAAC
					<i>PstI</i>	
+449	CTCCACCCCA	CCTCACCCCC	CTCCCCAGCT	TCTGGACGCG	TTTGACTGCA	<u>GCCAGGGGTG</u>
+509	GGGGGTGGGG	GTAGGGAGTG	TGTGTGGAGG	GGAGGGAGAA	GAGGTTAAAA	AAAAGAAGAC
+569	GAAGAAGACG	GAAAGAAAGA	GATCGCAGCA	GGGGTGAAGG	GAGCGGACGG	GAAGCGATTT
+629	TTGCCGACTT	TGGATTTCGTC	CCCGGCGTGC	GCAAGAATGG	CGGCCCTTCC	CGGCACGGTA
			P7-5	M A A L P G T V		
+689	<u>CCGAGAAATGA</u>	TGCGGCCGGC	TCCGGGGCAG	<u>AACTACCCCC</u>	<u>GCACGGGATT</u>	<u>CCCTTTGGAA</u>
	P R M M	R P A	P G Q	N Y P R	T G F	P L E

Abb. 3.17. Die Nukleotidsequenz des ersten Exons und die partielle 5'-flankierende Region des menschlichen *PAX7*-Gens (eingereicht bei GenBank unter *Accession*-Nr. AJ130875)

Die früher für Exon 1 bekannte Sequenz (Vorobyov et al., 1997) und der Kodierungsbereich sind in Grossbuchstaben angegeben. Die in Primer-Extension und 5'-RACE-Analyse verwendeten Primer sind eingezeichnet. Die Transkriptionsstartpunkte, die mittels Primer-Extension (Pe) und (Race) bestimmt wurden, sind mit den Pfeilen eingezeichnet. Die Numerierung der Sequenz ist relativ zum stromaufwärts liegenden Haupttranskriptionstartpunkt (+1) angegeben. Die Restriktionsschnittstellen, die für die Präparation der Reportergen-Konstrukten verwendet wurden, sind dargestellt. Einige potentielle Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen sind unterstrichen. Das (CTT)_n-repetitive Element ist fettgedruckt.

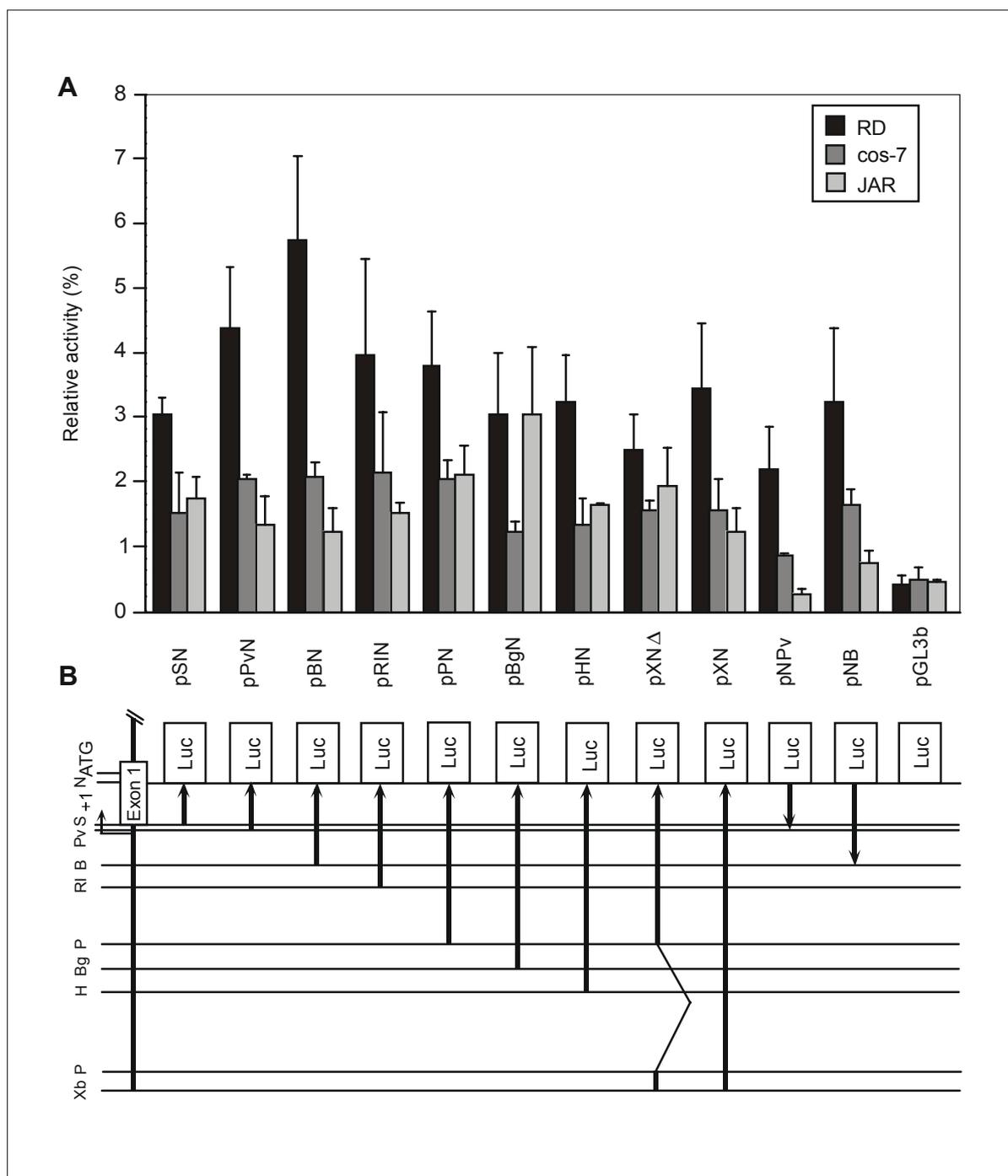


Abb. 3.18. Funktionelle Untersuchung der Promoterregion des *PAX7*-Gens

(A) Transiente Transfektionen der in (B) gezeigten Konstrukte in RD-, Cos-7- und JAR-Zellen. Die Ergebnisse von drei bzw. vier unabhängigen Doppelexperimenten sind als relative Promotor-induzierte Luciferase-Aktivitäten (jeweils Mittelwert und Standardabweichung) im Vergleich zu dem Wert gezeigt, der mit dem SV40-Promotor enthaltenden Expressionsvektor pGL3 control (100%, nicht angezeigt) erzielt wurde. Die Luciferase-Transkription wurde im Vergleich zu dem promotorlosen Expressionsvektor pGL3 basic (pGL3b) untersucht. (B) Schematische Darstellung der untersuchten Luziferase-Reporter-Konstrukte. Das ~3,0-lange *XbaI-NaeI*-Fragment, das einen Teil vom Exon 1 und dem 5'-flankierenden Bereich enthält, und die von ihm stammenden 5'-Deletionsfragmente wurden in sense und teilweise in antisense Orientierung in den promotorlosen Luciferase-Expressionsvektor pGL3 basic kloniert. Die Restriktionsschnittstellen der verwendeten Enzyme *XbaI* (Xb); *PstI* (P); *HindIII* (H); *BglII* (Bg); *EcoRI* (RI); *BamHI* (B); *PvuII* (Pv); *SmaI* (S); *NaeI* (N) sind angegeben.

3.5.5. Charakterisierung und funktionelle Untersuchung des mit dem *PAX7*-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus

Eine Sequenzanalyse der 5'-flankierenden Region des *PAX7*-Gens zeigte ein repetitives (CCT)₁₀-Element in der Position zwischen -136 und -107 bp proximal von der Transkriptionsstartstelle. Die Position und die Sequenz dieser repetitiven Region sind in Abb. 3.12C und 3.17 dargestellt.

3.5.5.1. Bestimmung der Allelverteilung innerhalb einer Kontrollgruppe

Um festzustellen, ob die gefundene repetitive Trinukleotidsequenz polymorph ist, wurde eine Genotypisierung mittels radioaktiver PCR an den 227 im Hause verfügbaren genomischen DNA-Proben von gesunden kaukasischen Probanden durchgeführt. Mittels zwei Primern P7-8 und P7-9, die die repetitive Sequenz flankieren (Abb. 3.13C), wurde der repetitive Bereich der genomischen DNA (169 bp für Allel mit 10 repetitiven Einheiten) amplifiziert. Die exemplarische Darstellung eines Genotypisierungsexperiments ist in Abb. 3.19 dargestellt.

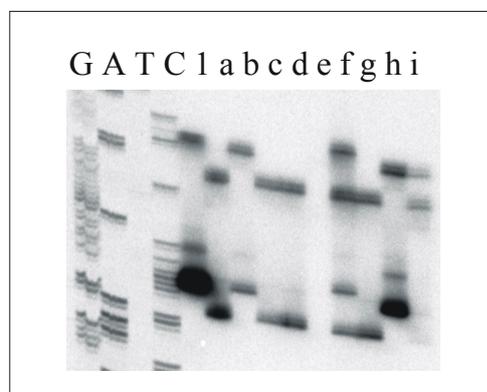


Abb. 3.19. Exemplarische Darstellung eines Genotypisierungsexperiments

Die radioaktive PCR wurde mit 60 ng genomischer DNA unter Verwendung der die repetitive Sequenz flankierenden Primer P7-8 und P7-9 durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden denaturiert und auf dem 6%igen denaturierenden Polyacrylamid-Gel gegen die Standard-Sequenz des mit dem universellen M13-Primer sequenzierten pBluescript KSII (+)-Vektors analysiert. Linie 1 stellt ein Allel mit bekannter Grösse (10 repetitiven Einheiten) dar, das als interner Grössenstandard benutzt wurde. Linien a-i repräsentieren folgende Allele/Genotypen: a, c, d und g, 8/8; b und h, 10/10; f, 8/11 und i, 8/10.

Eine Analyse der Reaktionsprodukte zeigte drei unterschiedlich lange Fragmente, die im weiteren kloniert und sequenziert wurden. Dabei wurden ausser dem bereits bekannten Allel zwei weitere Allele mit 8 und 11 repetitiven Einheiten entdeckt. Im folgenden werden die

Allele mit 8, 10 und 11 repetitiven Einheiten entsprechend als Allel 8, Allel 10 und Allel 11 bezeichnet. Das Allel 8 mit einer Häufigkeit von 0,38 und das Allel 10 (Häufigkeit ist 0,59) waren die meist verbreitetsten Allelformen, während das Allel 11 relativ selten in der von uns untersuchten Population vorkam. Der Anteil der heterozygotischen Genotypen in unserer Studie betrug 54%. Die Häufigkeitsverteilung der Genotypen und die Allelverteilung für die mit dem *PAX7*-Gen verbundene polymorphe Region (PAX7-LPR) in 227 gesunden Probanden sind in Abb. 3.20 dargestellt.

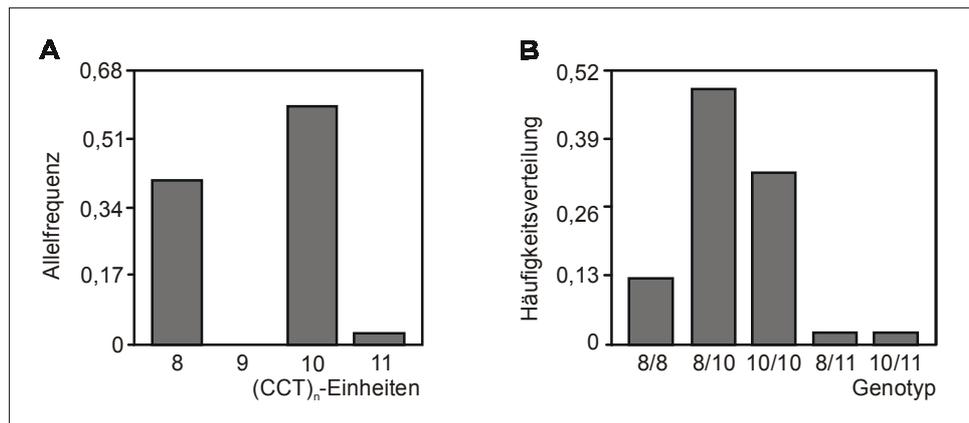


Abb. 3.20. (A) Allelfrequenz für die PAX7-LPR in 227 gesunden Probanden. (B) Genotypenverteilung für die PAX7-LPR

3.5.5.2. Funktionelle Untersuchung des mit dem *PAX7*-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus

Die Lage des PAX7-LPRs, der sich direkt im basalem Promotor befindet, deutet auf seine potentielle Relevanz für die transkriptionelle Regulierung des *PAX7*-Gens hin. Um mögliche Auswirkungen des PAX7-LPR auf die Promotoreffizienz zu bewerten, wurden die Luciferase-Reportergen-Konstrukte mit drei unterschiedlichen Repeatvarianten auf Basis des pRIN-Konstrukts hergestellt und in RD-Zellen transfiziert. Diese Experimente zeigten, dass das 11 (CCT)-Einheiten enthaltende Konstrukt eine signifikant höhere Promotoraktivität ($P < 0,05$) im Vergleich zu den zwei anderen Konstrukten aufweist (Abb. 3.21).

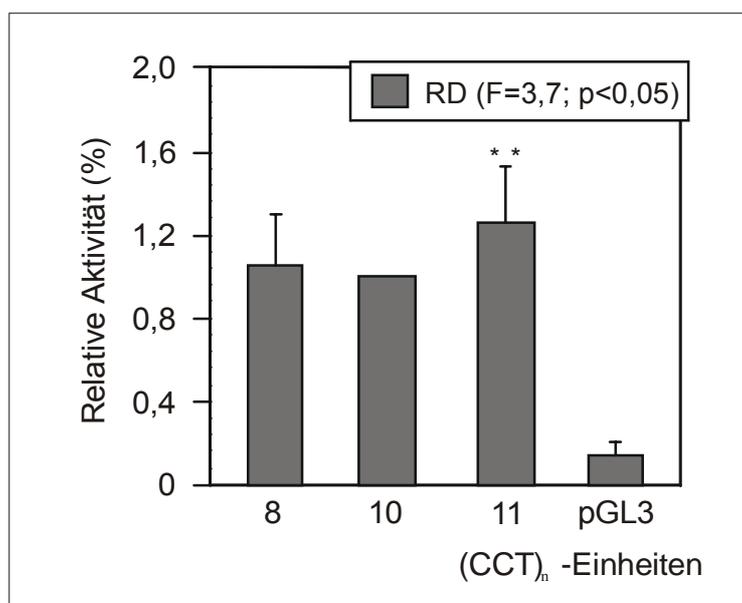


Abb. 3.21. Funktionelle Untersuchung des mit dem PAX7-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus pRIN-Konstrukt (Allel 10) und auf seiner Basis hergestellte Konstrukte für die Allele 8 und 11 wurden in RD-Zellen transfiziert. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Doppelexperimenten sind als relative Promotor-induzierte Luciferase-Aktivitäten (jeweils Mittelwert und Standardabweichung) im Vergleich zu dem Wert gezeigt, der mit dem Reporterkonstrukt pRIN erzielt wurde. Die Luziferase-Transkription wurde im Vergleich zu dem promotorlosen Expressionsvektor pGL3 *basic* (pGL3b) untersucht. Das Konstrukt mit 11 (CCT)-Einheiten zeigte im Vergleich zu zwei anderen untersuchten Konstrukten signifikant höhere Promotoraktivität (**P<0,05 nach dem χ^2 -Test nach Fischer).

3.6. Assoziationsanalyse der PAX7-LPR und der Schizophrenie

Für die Assoziationsanalyse zwischen der PAX7-LPR und der Schizophrenie wurden die im Hause verfügbaren genomischen DNA-Proben von 280 erkrankten Probanden untersucht. Für die Analyse wurden zuerst die Genotypen bestimmt, wie es im Kapitel 3.5.5.1 beschrieben ist, und mit vorhandenen Genotypen für die gesunden Probanden verglichen. Dabei wurde keine anomale Expansion der Trinukleotidsequenz sowie keine neuen Allele festgestellt. Die Genotypen- und Allelverteilungen für die schizophrenen Patienten und Kontrollprobanden sind in Tabellen 3.5 und 3.6 dargestellt.

Die computergestützte statistische Vergleichsanalyse der Genotypen- und Allelverteilungen in Patienten- und Kontrollgruppen wurde mittels χ^2 -Test durchgeführt. Eine Fehlerrate von 5% wurde für diese Analyse ausgewählt. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Tabellen 3.5 und 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.5. Genotypenverteilung für PAX7-LPR in Patienten mit Schizophrenie und gesunden Probanden

Diagnose	Genotypenhäufigkeiten					statistische Analyse		
	8/8	8/10	8/11	10/10	10/11	χ^2	df	P
Kontrolle (n=229)	28 (0,12)	110 (0,48)	7 (0,03)	78 (0,34)	6 (0,03)			
Schizophrenie (n=280)	45 (0,16)	110 (0,39)	10 (0,03)	100 (0,36)	15 (0,05)	6,015	4	0,198
Paranoide (n=86)	14 (0,16)	37 (0,43)	2 (0,02)	26 (0,30)	7 (0,08)	6,116	4	0,191
Nicht-paranoide (n=141)	19 (0,13)	53 (0,38)	8 (0,06)	54 (0,38)	7 (0,05)	5,547	4	0,236
Schizoaffektive (n=53)	12 (0,23)	29 (0,38)	0	20 (0,38)	1 (0,02)	6,162	4	0,187

Die Genotypenhäufigkeiten sind in Klammern angegeben. Die Ergebnisse des χ^2 -Testes sind für die diagnostizierten Gruppen gegen Kontrollgruppe dargestellt.

Tabelle 3.6. Allelverteilungen für PAX7-LPR in Patienten mit Schizophrenie und gesunden Probanden

Diagnose	Allelfrequenzen			statistische Analyse		
	8	10	11	χ^2	df	P
Kontrolle (n=229)	173 (0,38)	272 (0,59)	13 (0,03)			
Schizophrenie (n=280)	210 (0,38)	325 (0,58)	25 (0,04)	1,868	2	0,393
Paranoide (n=86)	67 (0,39)	96 (0,56)	9 (0,05)	2,372	2	0,305
Nicht-paranoide (n=141)	99 (0,35)	168 (0,60)	15 (0,05)	3,177	2	0,204
Schizoaffektive (n=53)	44 (0,41)	61 (0,58)	1 (0,01)	1,607	2	0,448

Die Allelhäufigkeiten sind in Klammern angegeben. Die Ergebnisse des χ^2 -Testes sind für die diagnostizierten Gruppen gegen Kontrollgruppe dargestellt.

Ein Vergleich der Genotypen- und Allelverteilungen in Patienten mit der Schizophrenie und in der Kontrollgruppe zeigte keine Unterschiede in den Allel- und Genotypenhäufigkeiten. Nach einer Aufteilung der untersuchten Patienten in diagnostische Untergruppen mit paranoiden und nicht-paranoiden Schizophrenien und schizoaffektiven Psychosen wurden auch keine Unterschiede zwischen Allel- und Genotypenfrequenzen in den schizophrenen Untergruppen und in der Kontrollgruppe festgestellt.

4. Anhang: Assoziationsanalyse des mit dem *MAOA*-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus und psychischer Erkrankungen

Monoaminoxidase A (MAOA) ist ein mitochondriales Enzym, das in der degradierenden Desaminierung von einer Reihe unterschiedlicher biologischen Aminen einschliesslich Neurotransmitter wie Serotonin, Norepinephrin und Dopamin eine wichtige Rolle spielt. Ein kompletter MAOA-Mangel, der auf Grund einer *Nonsense*-Mutation im kodierenden Bereich des Gens zustandekommt, steht im Zusammenhang mit einem gestörten Metabolismus der Amine, einer geistigen Retardation und einem impulsiven aggressiven Benehmen bei den betroffenen Männern einer niederländischen Familie (Brunner et al., 1993a; Brunner et al., 1993b). Die ähnlichen Veränderungen auf dem neurochemischen Niveau und aggressives Verhalten wurden in den *maoA-Knockout*-Mäusen festgestellt (Cases et al., 1995). Die an „Norrie“-Erkrankung leidenden Patienten, die submikroskopische Deletionen der *MAOA*-Region im Genom aufweisen, zeigen zusätzlich zu den Hauptsymptomen dieser Erkrankung sowohl tiefgreifende mentale Störungen, die oft mit psychotischen Eigenschaften und Schlafstörungen assoziiert sind (Sims et al., 1989), als auch Veränderungen des Aminemetabolismus (Murphy et al., 1990; Murphy et al., 1991). Damit scheint das *MAOA*-Gen ein interessanter Kandidat in der genetischen Analyse der psychischen Erkrankungen zu sein.

Das MAOA kodierende Gen ist auf dem Chromosom Xp11.23-p11.4 lokalisiert (Ozelius et al., 1988; Levy et al., 1989) und enthält eine mit ihm verbundene polymorphe Region (MAOA-LPR), die sich im Promotorbereich ungefähr 1,2 kb stromaufwärts von der kodierenden Sequenz befindet (Sabol et al., 1998). Vier Allele mit 3, 3,5, 4 und 5 30-bp langen repetitiven Einheiten wurden bei unserer Untersuchung der deutschen Population festgestellt. Die funktionelle Charakterisierung der Allele in der Luciferase-Assay mit den menschlichen SH-SY5Y-Neuroblastomazellen demonstrierte eine signifikant höhere Aktivität der Konstrukte ($p < 0,0001$, nach dem χ^2 -Test nach Fischer), die die längere Allele mit 3,5, 4 und 5 repetitiven Einheiten enthielten, im Vergleich zum Konstrukt mit nur 3 repetitiven Einheiten (Abb. 4.1). Unsere Ergebnisse stimmen mit einer niedrigeren MAOA-Enzymaktivität in der Kultur der männlichen Hautfibroblasten, die einen dreifachen repetitiven Element enthalten, im Vergleich zu deren mit vier repetitiven Einheiten (Denney et al., 1999) überein.

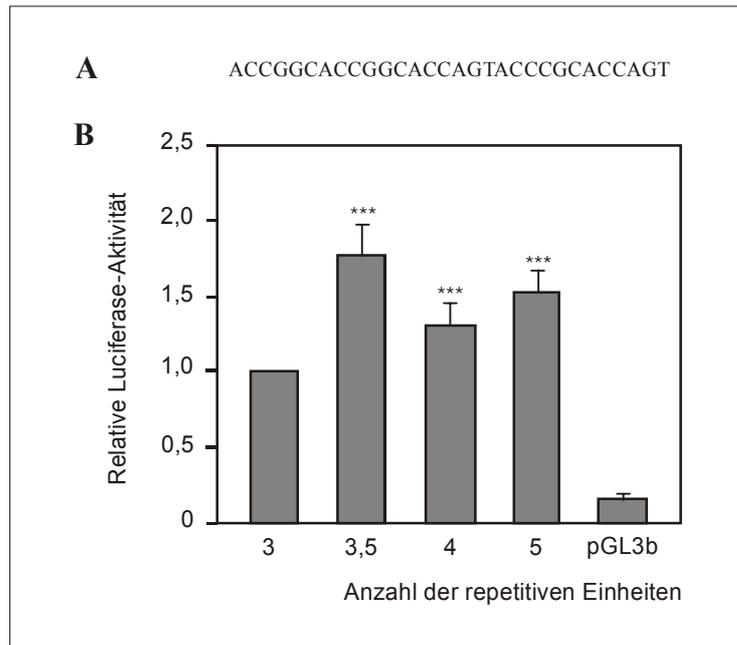


Abb. 4.1. Funktionelle Untersuchung des mit dem *MAOA*-Gen assoziierten Promotorpolymorphismus (A) Sequenz der repetitiven Einheit. (B) Transiente Transfektion der SH-SY5Y-Zellen mit den Konstrukten, die unterschiedliche Allelvarianten enthalten. Die Promotorfragmente des *MAOA*-Gens (~1,4 kb) in den vier beschriebenen Allelvarianten wurden mit den Primer MAOA-1 und MAOA-2 amplifiziert und in den promotorlosen „pGL3 basic“-Expressionsvektor inkloniert. Die Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten in dreifacher Ausfertigung sind als Promotor-induzierte Luciferase-Aktivitäten (jeweils Mittelwert und Standardabweichung) im Vergleich zu dem Wert dargestellt, der mit dem Reporter-genkonstrukt für Allel mit 3 repetitiven Einheiten erzielt wurde. Die Luziferase-Transkription wurde im Vergleich zu dem promotorlosen „pGL3 basic“-Expressionsvektor (pGL3b) untersucht. Das Konstrukt mit 3 repetitiven Einheiten zeigte im Vergleich zu anderen untersuchten Konstrukten signifikant niedrigere Promotoraktivität (*** $P < 0,0001$ nach dem χ^2 -Test nach Fischer).

Ausgehend von einer wahrscheinlichen Relevanz des *MAOA*-Gens für die psychischen Erkrankungen wurden im weiteren mittels einer Assoziationsstudie die Genotyp- und Allelverteilungen der MAOA-LPR in den Patienten mit den affektiven Erkrankungen, der Schizophrenie und der Kontrollprobanden untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in der Tabelle 4.1 zusammengefasst. Die Häufigkeiten für die verbreitetsten Allele mit 3 oder 4 repetitiven Einheiten in Kontrollprobanden waren entsprechend 0,35 und 0,63, was ähnlich der für die nordamerikanische Population gefundene Allelverteilung ist (Sabol et al., 1998). Ausgehend von der funktionellen Charakterisierung wurden die MAOA-LPR-Allele in zwei Gruppen unterteilt: die erste Gruppe enthielt das Allel mit 3 repetitiven Einheiten, das eine niedrigere Promotoraktivität aufwies; die zweite Gruppe mit hoch aktiven Allelen bestand aus den restlichen Allelen mit 3,5, 4 und 5 repetitiven Einheiten. Der Vergleich der Genotypen- und Allelverteilungen zwischen den Patienten mit den affektiven Erkrankungen oder der Schizophrenie und der Kontrollsubjekte liess keine mit dem Geschlecht verbundene Unterschiede erkennen. Die Genotyp- und Allelverteilungen in allen diagnostischen

Tabelle 4.1. Genotyp- und Allelverteilungen für MAOA-LPR nach der Aufteilung der Allele auf Gruppen mit hohen und niedrigen Aktivitäten in Patienten mit affektiven Erkrankungen und der Schizophrenie und Kontrollprobanden

Diagnose	Genotypen					Allele			
	1/1	1/2	2/2	χ^2	p	1	2	χ^2	p
Kontrolle (n=229)									
Männer						47 (0,35)	87 (0,65)		
Frauen	18 (0,19)	30 (0,32)	47 (0,49)			66 (0,35)	124 (0,65)		
Insgesamt						113 (0,35)	211 (0,65)		
Affektive Erkrankungen (n=174)									
Männer						30 (0,40)	44 (0,60)	0,611	0,456
Frauen	16 (0,16)	31 (0,31)	53 (0,53)	0,366	0,833	63 (0,31)	137 (0,69)	0,461	0,520
Insgesamt						93 (0,34)	181 (0,66)	0,057	0,863
Bipolare Erkrankungen (n=100)									
Männer						15 (0,38)	25 (0,62)	0,079	0,851
Frauen	11 (0,18)	19 (0,32)	30 (0,50)	0,010	0,995	41 (0,34)	79 (0,66)	0,011	1,000
Insgesamt						56 (0,35)	104 (0,65)	0,001	1,000
Schwere Depressionen (n=74)									
Männer						15 (0,44)	19 (0,56)	0,952	0,329
Frauen	5 (0,12)	12 (0,30)	23 (0,58)	1,059	0,589	22 (0,28)	58 (0,72)	1,342	0,259
Insgesamt						37 (0,32)	77 (0,68)	0,219	0,731
Schizophrenie (n=258)									
Männer						70 (0,42)	96 (0,58)	1,569	0,235
Frauen	17 (0,19)	26 (0,28)	49 (0,53)	0,308	0,857	60 (0,33)	124 (0,67)	0,190	0,743
Insgesamt						130 (0,37)	220 (0,63)	0,375	0,574
Paranoide (n=70)									
Männer						19 (0,40)	28 (0,60)	0,430	0,598
Frauen	5 (0,22)	7 (0,30)	11 (0,48)	0,092	0,955	17 (0,37)	29 (0,63)	0,080	0,864
Insgesamt						36 (0,39)	57 (0,61)	0,462	0,540
Nicht-paranoide (n=130)									
Männer						36 (0,43)	47 (0,57)	1,495	0,251
Frauen	8 (0,17)	14 (0,30)	25 (0,53)	0,182	0,913	30 (0,329)	64 (0,68)	0,224	0,690
Insgesamt						66 (0,37)	111 (0,63)	0,290	0,626
Schizoaffective (n=58)									
Männer						15 (0,42)	21 (0,58)	0,532	0,559
Frauen	4 (0,18)	5 (0,23)	13 (0,59)	0,796	0,672	13 (0,30)	31 (0,70)	0,431	0,597
Insgesamt						28 (0,35)	52 (0,65)	0,000	1,000

Die Genotyp- und Allelhäufigkeiten sind in Klammern angegeben. Die Ergebnisse des χ^2 -Testes sind für die diagnostizierten Gruppen gegen Kontrollgruppe dargestellt. Die Allele wurden in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe (Allel 1) repräsentiert die Allele mit einer niedrigen Promotoraktivität (Allele mit 3 repetitiven Einheiten). Die zweite Gruppe (Allel 2) beinhaltet die Allele mit einer hohen Promotoraktivität (Allele mit 3,5, 4 und 5 repetitiven Einheiten).

Untergruppen zeigten keinen Unterschied im Vergleich zu denen in den Kontrollprobanden in Männern und in Frauen.

Obwohl das menschliche *MAOA*-Gen einen wichtigen Kandidaten für die Beteiligung an der genetischen Prädisposition für Verhaltenseigenschaften und psychische Erkrankungen darstellt, fanden wir keine Beweise für die kritische Rolle der *MAOA*-LPR in der Pathogenese der unipolaren schweren Depressionen, der bipolaren Erkrankungen und der Schizophrenie in der deutschen Population. Unser Befund ist vereinbar mit den kurz zuvor publizierten, an englischen (Furlong et al., 1999) und japanischen Patienten durchgeführten Assoziationsstudien (Kunugi et al., 1999) und mit der auf Familien basierten Analyse britischer Patienten (Kirov et al., 1999). Davon ausgehend stellen unsere Ergebnisse keinen falschen negativen Befund aufgrund einer möglichen Populationsschichtung dar. Keine Assoziationen wurden auch für die anderen polymorphen Regionen des *MAOA*-Gens wie ein VNTR im ersten Intron, ein repetitives (CA)_n-Element im zweiten Intron, *Fnu4HI*-RFLP im Exon 8 und *EcoRV*-Polymorphismus im Exon 14 in Patienten mit den affektiven Erkrankungen (Craddock et al., 1995; Nothen et al., 1995; Muramatsu et al., 1997; Parsian and Todd, 1997) und der Schizophrenie (Coron et al., 1996) gefunden.

Die weitere Analyse der Genotyp- und Allelverteilungen der *MAOA*-LPR in den Patienten mit der Panikstörungserkrankung im Vergleich zu den Kontrollprobanden zeigte, dass signifikant mehr Individuen unter an der Erkrankung leidenden weiblichen Patienten ($p=0,03$) im Vergleich zu den weiblichen Kontrollprobanden in der deutschen Population die längere Allelvariante haben (siehe Tabelle 4.2). Ähnlich zeigten auch die Genotypen mit nur langen Allelvarianten einen Trend, unter den Frauen mit der Panikstörungen häufiger vorzukommen ($p=0,05$). Keine signifikanten Unterschiede wurden unter den an der Panikstörung erkrankten männlichen Patienten und den männlichen Kontrollprobanden beobachtet.

Die beobachteten Unterschiede zwischen den untersuchten Männern und Frauen könnten provisorisch auf zwei Wegen erklärt werden. Die männliche Probandengruppe war deutlich kleiner im Vergleich zur Anzahl der Frauen, wodurch die statistische Aussagekraft zu signifikanten Unterschieden in der Gruppe fehlschlägt. Als Alternative könnten Geschlechtsunterschiede in dem genetischen Hintergrund der Panikstörung nicht ausgeschlossen werden. In einer klinischen Untersuchung, die mittels künstlichen neuronalen Netzwerken ausgeführt wurde, reagierten Frauen mit Symptomen der auffälligen Ängstlichkeit besser auf die Behandlung mit Moclobemid, ein reversibler *MAOA*-Hemmstoff, im Vergleich zu männlichen Patienten (Politi et al., 1999).

Tabelle 4.2. Genotyp- und Allelverteilungen für MAOA-LPR in Patienten mit Panikstörungserkrankung und Kontrollprobanden

Diagnose	Allele				Genotypen			
	3	3,5	4	5	1	2	1/1+1/2	2/2
Panikstörung (n=80)								
Männer	11	0	18	0	11 (0,38)	18 (0,62); p>0,99		
Frauen	22	2	77	1	22 (0,22)	80 (0,78); p=0,03	17 (0,33)	34 (0,67); p=0,07
Insgesamt	33	2	95	1	33 (0,25)	98 (0,75); p=0,06	28 (0,35)	52 (0,65); p=0,15
Kontrolle (n=80)								
Männer	11	1	17	0	11 (0,38)	18 (0,62)		
Frauen	36	0	63	3	36 (0,35)	66 (0,65)	26 (0,51)	25 (0,49)
Insgesamt	47	1	80	3	47 (0,36)	84 (0,64)	37 (0,46)	43 (0,54)

Die Genotyp- und Allelhäufigkeiten sind in Klammern angegeben. Die Ergebnisse des χ^2 -Testes sind für die diagnostizierten Gruppen gegen Kontrollgruppe dargestellt. Die Allele wurden in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe (Allel 1) repräsentiert die Allele mit einer niedrigen Promotoraktivität (Allele mit 3 repetitiven Einheiten). Die zweite Gruppe (Allel 2) beinhaltet die Allele mit einer hohen Promotoraktivität (Allele mit 3,5, 4 und 5 repetitiven Einheiten).

Inhibitoren der MAOA lassen die Panikstörungen effektiv behandeln (Tyrer et al., 1988). Konsequenterweise ist es vom funktionellen Gesichtspunkt verständlich, dass die gestiegene MAOA-Aktivität, wie für die langen Allele gezeigt wurde, zur der Pathogenese der Panikstörung beiträgt. Laut unserer Studie ist das Risiko des Erkrankens bei den für die langen Allele homozygoten Frauen um Faktor von 1,4 (95% CI=1,06-1,89) bis 1,8 (95% CI=1,12-2,81) höher als bei den heterozygoten oder für die kurzen Allele homozygoten Frauen. Dieser kleine aber signifikante Effekt lässt sich mit dem Konzept der Panikstörungserkrankung als eine oligo- oder sogar polygene Erkrankung vereinbaren (Knowles et al, 1998).

Zusammenfassend lassen die erhaltenen Daten vermuten, dass die MAOA-Genvariationen keinen bedeutenden Einfluss auf die Anfälligkeit zu affektiven Erkrankungen oder der Schizophrenie ausüben, wobei ihre signifikante modifizierende Rolle der Symptomatik der anderen psychiatrischen Erkrankungen wie Panikstörungen von Bedeutung ist. Die Variabilität des MAOA-Gens könnte auch zu den unterschiedlichen Typen der psychopathologischen Symptome und der Verhaltenseigenschaften beitragen. Eine reduzierte MAOA-Genaktivität, wie in einigen Studien an Mäusen und Menschen gezeigt wurde, steht in Zusammenhang mit erhöhter Erregbarkeit und Aggressivität (Brunner et al., 1993a; Cases et al., 1995; Samochowiec et al., 1999a). Angesichts unserer Ergebnisse sind die zukünftige Studien an die Fragestellung zu adressieren, ob und wie die anderen MAOA-Genvariationen und Polymorphismen in einer Interaktion mit dem beschriebenen Promotorpolymorphismus die Komplexität des menschlichen Verhaltens und der psychischen Erkrankungen modulieren.

5. Diskussion

Nach dem vollständigen Sequenzieren des menschlichen Genoms ist das Verständnis, wie ein Säugetierorganismus die Transkription von ungefähr 30 000 Genen in Form eines zweckmässigen räumlichen und zeitlichen Musters reguliert, eines der zentralen Ziele auf dem Gebiet der funktionellen Genforschung. Erforschung der Prinzipien der transkriptionellen zellspezifischen Kontrolle und daraus folgende phenotypische Auswirkungen liefern die ersten Erkenntnisse über die Funktionsweise und die physiologische Signifikanz der Gene. Als ein Teil unserer Bestrebungen zur Aufklärung der phenotypischen Konsequenzen der strukturellen Variationen in den Gen-regulatorischen Regionen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Promotorregionen der menschlichen *PAX3*-, *PAX6*- und *PAX7*-Gene charakterisiert, sowie funktionelle Effekte mit deren Promotoren assoziierten Polymorphismen auf die Expression dieser Gene untersucht. Analyse der transkriptionellen regulatorischen Prinzipien der *Pax*-Gene, Mitglieder einer Familie der Transkriptionsfaktoren, ist von grossem Interesse, da sie sowohl mehrere Schritte in der Embryogenese als auch Aufrechterhaltung des Differenzierungszustandes der Zellen einiger adulten Geweben kontrollieren.

5.1. Promotorregion des menschlichen *PAX3*-Gens

Zur Untersuchung der Promotorregion des menschlichen *PAX3*-Gens wurde als erstes ein genomischer Klon isoliert, der den 5'-flankierenden regulatorischen Bereich sowie die ersten vier Exons des *PAX3*-Gens enthielt. Mit Hilfe einer für das erste Exon spezifischen Sonde wurde im weiteren ein kürzeres Promotor-enthaltendes DNA-Fragment dieses Klons ausgesucht und sequenziert. Die veröffentlichte Sequenz für die menschliche *PAX3*-mRNA (Hoth et al., 1993; Tsukamoto et al., 1994) erwies sich beim Vergleich mit der homologen murinen Sequenz (Natoli et al., 1997) als unvollständig im 5'-Bereich. Um eine vollständige Sequenz des ersten Exons des *PAX3*-Gens und dementsprechend einen Ausgangspunkt der Promotorregion zu definieren, wurde als nächstes ein Transkriptionsstartpunkt identifiziert. Für die Bestimmung des Startpunktes der mRNA wurden bestimmte Gewebearten ausgesucht, wo die Expression des *PAX3*-Gens in früheren Studien nachgewiesen wurde (Tsukamoto et al., 1994). Die Primer-Extension-Analyse mit der Gesamt-RNA aus humanem zerebellärem Kortex, SK-N-SH- und Cos-7-Zellen zeigte einen Transkriptionsstartpunkt 366 bp

stromaufwärts vom Translationsstart. Die gleiche Lokalisation des Transkriptionsstartpunktes wurde auch mittels Ribonuklease-Protektion-Analyse mit Gesamt-RNA aus humanem zerebellärem Kortex festgestellt. Das von uns identifizierte 5'-Ende der *PAX3*-mRNA und die beschriebene murine Transkriptionsstartstelle (Natoli et al., 1997) befanden sich auf dem gleichen Abschnitt der *Pax3*-Gensequenz (Abb. 5.1).

Wie es mittels *In situ*-Hybridisierungsanalyse am Mausmodell in früheren Studien gezeigt wurde (Goulding et al., 1991; Stoykova and Gruss, 1994), kann die Expression des murinen *Pax3*-Gens sowohl vor dem Beginn der Zelldifferenzierung an E8,5 als auch während der embryonalen Entwicklung des Gehirns in der teilungsaktiven ventriculären Zone des Mesencephalons, Hirnstamms und Zerebellum verfolgt werden, was auf eine kritische Rolle des Gens in der früheren Regionalisierung des embryonalen Gehirns hinweist. Die *PAX3*-Transkripte wurden auch im adulten Gehirn in Bergmann-Glia, in einer Teilmenge der Korbzellen, die nahe der Purkinje-Nervenzellen des Kleinhirns liegen, und im dorsalen tegmental Nukleus von Gudden detektiert.

Unsere Analyse der gewebespezifischen Regulation der *PAX3*-Genexpression wurde mittels Primer-Extension in einigen Bereichen des menschlichen adulten Gehirns wie zerebellärem Kortex, frontalem Kortex, okzipitalem Kortex, temporalem Kortex, Hippocampus, Putamen und Thalamus durchgeführt. Bei dieser Untersuchung wurde festgestellt, dass *PAX3*-Genexpression in verschiedenen Gehirnbereichen vom gefundenen Promotor spezifisch initiiert wird. Dabei befand sich ein relativ hohes Niveau der Transkripte im frontalen, temporalen, parietalen, und zerebellären Kortex und im Thalamus. Damit weist unserer Befund darauf hin, dass das *PAX3*-Gen ein wesentlich breiteres Expressionsspektrum im adulten menschlichen Gehirn, als es zuvor angenommen wurde, besitzt. Die *PAX3*-Transkription in mehreren Regionen des adulten Gehirns bestätigt zusätzlich eine möglicherweise bedeutende Rolle dieses wichtigen Transkriptionsfaktors, das hauptsächlich im Bezug auf die frühe Neurogenese erforscht wurde, in der Differenzierung, Aufrechterhaltung und dem funktionellen Aufbau der spezifischen Zellarten des adulten Gehirns.

Die *PAX3*-Expression, die mit dem experimentell ermittelten Promotorbereich assoziiert ist, wurde mittels Primer-Extension auch in einigen anderen adulten Geweben wie Nieren, Skelettmuskeln und Schilddrüse festgestellt. Diese Expressionsdaten stimmen mit zuvor publizierten gewebespezifischen Expressionsmuster des *PAX3*-Gens überein (Tsukamoto et al., 1994).

Die Analyse der 5'-flankierenden Sequenz zeigte, dass die identifizierte Transkriptionsstartstelle mit einer TA-reichen Sequenz (TAATAAAT) und zwei kanonischen CCAAT-Boxen assoziiert ist. Die gefundene TA-reiche Sequenz entspricht nicht der klassischen Konsensussequenz für TATA-Box. Jedoch, im Falle der anderen Promotoren von vielen in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen exprimierenden Genen wurde auch über bedeutende funktionelle Variationen in den klassischen TATA/ATA-Motiven einschliesslich Varianten wie AATTAA, TTAA, TTTAAA, ACATAA, TTAAT, AAATAT, und TACAAA berichtet (Evans et al., 1988; Sibley et al., 1989; Hobson et al., 1990; Bloem et al., 1993; Heils et al., 1998). Die Promotorregion und die regulatorischen Elemente, die für die Etablierung des murinen *Pax3*-Expressionsmusters erforderlich sind, wurden vor kurzem beschrieben (Natoli et al., 1997). Ein Vergleich der murinen und humanen *Pax3* 5'-flankierenden Regionen zeigte eine 80%ige Identität der beiden Sequenzen unter den ersten 300 Nukleotiden des basalen Promotors (Abb. 5.1). Der Promotor des murinen *Pax3*-Gens steht genauso wie im Falle des menschlichen Homologen unter Regulation von TATA-Box und zwei CCAAT-Boxen, die sich in der gleichen Position in den Promotoren befinden. Die Sequenzen der beiden TATA-Boxen stimmen in beiden Promotoren auch überein.

```

hPAX3          -182 ...aggcctcggcaccaccagagatgggaagagaaagtgggtcg
                |||||  ||  |||  |||  |||||  |||||  |||  ||
mpax3          -164 ...aggcctggggaccgtcagggatgggaagagaa.gtagctt

-142  ctggttgcccaatcagcgcgtgtctccgccaccgggacgggtctaccctcggccaatcgc
        ||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||  |||||  |||||  |||||
-125  ctgtcgcccaatcagcgcgtgtctttgccaccgggacgggtctcctcctcggccaatcgc

-82   agctcagggctcctgaccaagctttgggtaaaagaactaataaatgctcccagagcccgga
        |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
-65   agctcagggctcctgatcaagctttgggtgaaagaactaataaatgctccctagtccgga

-22   tccccgcactcgggtgtcaccacAGGAGGAGACT...
        ||||  |||||  |||||  |||||  ||  |||||  |||||  |||||
-5    tcctGCACTCGGTGTCACGACGGGAGGAGACT...

```

Abb. 5.1. Computerunterstützter Vergleich der basalen Promotorbereiche der humanen und murinen *pax3*-Gene

Die Abschnitte sind zwischen nt -182 und +11 für humane und von nt -164 bis +28 für murine Sequenzen dargestellt. Die Nukleotidlücken sind als Punkte angegeben. Die identischen Positionen sind durch vertikale Striche symbolisiert. Eine TATA-Box und zwei CCAAT-Boxen sind fettgedruckt und unterstrichen angezeigt.

Erste Erkenntnisse über funktionelle Charakteristika eines Promotors und Lokalisierung seiner wichtigen regulatorischen Bereiche, die für eine genspezifische Expression Verantwortung tragen, können mittels Reporterassays mit Deletionskonstrukten dieser

Promotorregion gewonnen werden. Funktionelle Kartierung der regulatorischen Regionen des *PAX3*-Gens in RD- und Cos-7-Zellen mittels Luciferase-Reporterassay mit Deletionskonstrukten deckte eine bedeutende Rolle sowohl Enhancer- als auch Repressor-Elemente in der transkriptionellen Regulierung des Gens. Die Reporterassay zeigte, dass die innerhalb von ~650 bp der 5'-flankierenden Sequenz enthaltene Information ausreichend war (pStN-Konstrukt), um die konstitutive Promotoraktivität in RD- und Cos-7-Zellen zu unterstützen. Dagegen wiesen Konstrukten mit seriellen 5'-Deletionen von pStN-Konstrukt, einschliesslich des minimalen basalen Promotors, das durch das TATA-ähnliche Motiv (Konstrukt, pHN) definiert wurde, eine zwar variierende aber wesentlich niedrigere Luciferaseaktivität auf. Dies deutet auf Anwesenheit eines stark aktivierenden regulatorischen Elements innerhalb von -650 bis -470 nt hin. Bei der Sequenzanalyse dieses Bereichs wurden potentielle Bindungsstellen für einige Transkriptionsfaktoren wie AP1, CP2, NF1 ermittelt. Konstrukte mit einer Rückwärtsorientierung wie pNA und pNH zeigen etwas niedrigere Promotoraktivität im Vergleich zu den gleichen Konstrukten in einer normalen Orientierung. Derartige orientierungsunabhängige Aktivität der basalen Promotoren wurde auch früher für den Fall des *Axonin-1*-Hühnergens (Giger et al., 1995) und des menschlichen *TAX1*-Gens (Kozlov et al., 1995) berichtet.

Eine weitere Untersuchung des stromaufwärts liegenden Promotorbereichs deutete auf das Vorhandensein eines transkriptionellen Repressorelements hin, das zwischen Nukleotiden -1200 und -650 liegt. Die Anwesenheit dieses Elements beeinflusste die Promotoraktivität negativ um mehr als fünffache. Bei einer Sequenzanalyse wurden die potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren Sp1, AP-1, AP-2, PEA3 und MEF-2 in diesem Promotorbereich festgestellt. Eine kurze TA-reiche Sequenz TTATAAATAA ist ein potentielles Motiv für die Bindung von MEF-2, ein Enhancerbindungsfaktor, der ein konserviertes Element mit der Konsensussequenz YTWAAATAR erkennt und der mit vielen Muskeln-spezifischen Genen assoziiert ist (Gossett et al., 1989; Cserjesi and Olson, 1991). Beim Vergleich der murinen und humanen Sequenzen zeigte sich eine bemerkenswerte Übereinstimmung von 90%iger Identität in dieser Region (Abb. 3.9). Der homologe Bereich dehnte sich von mehr als 500 bp aus. Ähnliche Ergebnisse aus einer funktionellen Kartierung der 5'-flankierenden Region des murinen Gens in mit *retinoic acid* oder DMSO behandelten Zellen des embryonalen Karzinoms P19 bekräftigen zusätzlich die regulatorische Relevanz dieses Segments (Natoli et al., 1997). Aufgrund des hohen Grads der Sequenzidentität, das Vorhandensein von mehreren Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und ihre negative regulatorische Auswirkung auf die Promotoraktivität, ist es sehr wahrscheinlich, dass

zumindest ein wichtiges transkriptionelles Repressorelement in dieser stromaufwärts liegenden Region lokalisiert ist.

5.2. Promotorregion des menschlichen *PAX7*-Gens

Der regulatorische Mechanismus der *PAX7*-Genexpression wurde durch Isolierung und funktionelle Charakterisierung der Promotorregion, die die Transkription der *PAX7*-mRNA in adulten Skelettmuskeln initialisiert, untersucht. Ein ~6.3 kb langes Transkript wurde mittels Northern-Blot-Analyse menschlicher peripherer Gewebe in adulten Skelettmuskeln ermittelt. Die menschliche *PAX7*-mRNA ist grösser als das 4,9 kb lange Transkript des murinen *Pax7*-Gens, das im gesamten embryonalen Gewebe detektiert wurde (Jostes et al., 1991). Ein 6,3 kb-langes Transkript von der *PAX7*-Wildtyp-RNA wurde auch in den RD- (embryonales Rhabdomyosarcom) und A673- (Ewings Sarkom) Zelllinien von Barr et al. beschrieben (Barr et al., 1999). Jedoch ist die längste bekannte cDNA-Sequenz des *PAX7*-Gens (2,2 kb), die die komplette Kodierungsregion und die 5'-Sequenz enthält, beträchtlich kürzer (Vorobyov et al., 1997). Um die vollständige Länge des 5'-UTR zu ermitteln, führten wir Primer-Extension und 5'-RACE-Analysen mit mRNA aus menschlichen adulten Skelettmuskeln durch. Mittels Primer-Extensionsanalyse wurden zwei Transkriptionsstartstellen bei 640 bp und bei 664 bp stromaufwärts von dem ATG-Kodon in der mRNA der adulten Skelettmuskeln identifiziert. Das kleinere Primer-Extensionprodukt könnte eine zusätzliche Startstelle darstellen oder auf eine sekundäre Struktur bzw. Degradierung hindeuten. Eine Transkriptionstartstelle bei 655 bp stromaufwärts von dem Translationsstartkodon wurde durch 5'-RACE mit einer geringfügigen Diskrepanz (9 bp) im Vergleich zur Ergebnissen der Primer-Extension kartiert. Das Vorhandensein der GC-reichen Bereiche in der mRNA-Sequenzen könnte zum vorzeitigen Abbruch bei der reversen Transkription einer langen mRNA von poly(dT)-Primer durch die 5'-RACE-Prozedur führen. Also enthält *PAX7*-mRNA eine lange 5'-UTR, die 664 Nukleotide einschliesst, welche um 200 Nukleotide länger als die zuvor beschriebene 5'-UTR von Vorobiv et al. (1997) ist. Die zellulären mRNAs, die einen komplexen 5'-UTR-Bereich enthalten, könnten einer post-transkriptionellen Regulation unterliegen und kodieren häufig regulatorische Proteine, Proto-Onkogene, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren und Homeodomain-enhaltende Transkriptionsfaktoren (van der Velden and Thomas, 1999). Weitere RACE-Analyse mit den Primern aus dem zweiten Exon erbrachte keinen Nachweis für eine alternative Promotorregion bei der Expression des *PAX7*-Gens in menschlichen adulten Skelettmuskeln.

Unsere Arbeit erbrachte den erstmaligen Nachweis einer Expression des *PAX7*-Gens in mehreren Regionen des adulten menschlichen Gehirns. Das *PAX7*-Gen ist an der Neurogenese während der embryonalen Entwicklung beteiligt und seine Expression wurde sowohl in spezifischen Regionen des embryonalen Gehirns (Jostes et al., 1991; Stoykova and Gruss, 1994) als auch im adulten Gehirn der Maus (Ziman et al., 1997) nachgewiesen. Obwohl die Northern-Blot-Analyse mit der 3'-genspezifischen Sonde keine Expression des *PAX7*-Gens in anderen Gewebetypen als Skelettmuskeln gezeigt hat, könnte das Vorhandensein kürzerer oder alternativ gespleisster Varianten in den untersuchten Geweben nicht vollständig ausgeschlossen werden. Bekanntlich wird ein Grossteil der Transkriptionsfaktoren und erwartungsgemäss auch die Mitglieder der *Pax*-Genfamilie abhängig vom Entwicklungsstadium oder Gewebespezifität alternativ gespleisst (Walther et al., 1991; Dressler and Douglass, 1992; Poleev et al., 1995; Kozmik et al., 1997; Barber et al., 1999). Die von uns durchgeführte RT-PCR-Analyse mit den Paired-Box-spezifischen Primern zeigte eine Expression des *PAX7*-Gens in einigen Regionen des adulten Gehirnes wie zerebellärer Kortex, temporaler Kortex, frontaler Kortex, subthalamischen Nuklei, Thalamus, Amygdala und Putamen. Eine weitere RT-PCR-Analyse mit den Primern aus ersten und zweiten Exonen zeigte ein ähnliches Expressionsmuster. Anwesenheit verschiedener Spleissvarianten wurde in einer Untersuchung der *Pax7*-Genexpression in murinen adulten Geweben bestätigt (Ziman et al., 1997). Während in murinen Skelettmuskeln, Gehirn und Milz die Paired- und Homeo-Box-Domäne enthaltende *Pax7*-Transkripte gefunden wurden, wurden in Nieren, Herz und Lungen kürzere Transkripte, die nur den Paired-Box hatten, festgestellt. Hierzu ist interessanterweise anzumerken, dass auch die *PAX3*-Transkripte, die nur die den Paired-Box kodierende Sequenz enthalten, in mehreren menschlichen adulten Geweben einschliesslich unterschiedlichen Gehirnbereichen detektiert wurden (Tsukamoto et al., 1994).

Zur Untersuchung der *PAX7*-Promotorregion, die aufgrund der gefundenen Transkriptionsstartstelle definiert worden ist, wurde als erstes ein genomischer Klon isoliert, der sowohl diesen Promotorbereich als auch die ersten drei Exons des *PAX7*-Gens enthielt. Mit Hilfe einer für die Promotorregion spezifischen Sonde wurde im weiteren ein kürzeres Promotor-enthaltendes DNA-Fragment dieses Klons sequenziert und die erhaltene Promotorsequenz wurde mit Hilfe einer Datenbank auf mögliche funktionelle Promotorelemente durchgesucht.

In den meisten eukaryontischen Genen befindet eine sogenannte TATA-Box sich etwa 25-30 bp stromaufwärts von der Initiationsstelle der mRNA (Johnson and McKnight, 1989). Diese

TATA-Box erlaubt die genaue Initiation der Transkription mittels eines Mechanismus, der von einer spezifischen Interaktion der TATA-Box mit einem Multiprotein-Komplex, sogenanntem TFIID, abhängt (Kaufmann and Smale, 1994; Ghosh and Van Duyne, 1996). Die A/T-reiche kurze TATA-ähnliche Sequenz (gaATAAAAgaaaa), die in der *PAX7* 5'-flankierenden Region gefunden wurde und 177 bp stromaufwärts von der Transkriptionstartstelle lokalisiert ist, stimmt nicht vollständig mit Konsensussequenz einer typischen TATA-Box (STATAAAWRNNNNNNN) überein und ist für Genexpression des *PAX7* *in vitro* nicht von Bedeutung, wie durch funktionelle Analyse gezeigt wurde. Im Gegensatz zu dem Promotor des *PAX3*-Gens, das TATA und zwei CCAAT-Boxen stromaufwärts von der Startstelle in passenden Positionen für klassische Promotorstruktur enthält, fehlt dem *PAX7*-Promotor eine kanonische TATA-Box und er ähnelt den vorher beschriebenen TATA-losen regulatorischen Regionen der menschlichen *PAX2*- und murinen *Pax4*-Genen (Stayner et al., 1998; Brink et al., 2001). Einige mögliche Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren Sp1, AP-2, AP-4, NF-1, MyoD, Oct1, Nkx2.5, CREB und CCAAT-Bindung (in der negativen Orientierung) wurden stromaufwärts und stromabwärts von Transkriptionstartstelle identifiziert.

Die funktionelle Kartierung der regulatorischen Region des Gens deckte die Sequenz zwischen -70 und +373 bp als eine essentielle Region für minimale basale Aktivität des *PAX7*-Promotors auf. Die maximale Promotoraktivität wurde für pBN-Konstrukt ermittelt (von -403 bis +373 bp). Die progressive Zugabe der weiteren Sequenzen (bis zu ~3,0 kb, pXN-Konstrukt) hat keine signifikanten Auswirkungen auf die transkriptionelle Aktivität gezeigt, die mit diesem Konstrukt detektiert wurde. Nur das Fragment zwischen *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstellen hat offensichtlich einige regulatorische Elemente, die einen schwachen negativen Effekt auf die Promotoraktivität in RD-Zellen ausüben. Unsere Resultate deuten darauf hin, dass die grosse Region des menschlichen *PAX7*-Promotors zwischen *Xba*I und *Bam*HI keine starken positiven oder negativen regulatorischen Elemente enthält, die die *PAX7*-Transkriptionkontrolle beeinflussen. Es ist jedoch nicht ungewöhnlich für gewebespezifische regulatorische Elementen, auf einer langen Distanz von Transkriptionstartstelle lokalisiert zu sein (Hardison et al., 1997; Jaakkola et al., 1997; Maul et al., 1998). Weitere Studien sind notwendig, um die Faktoren zu definieren, die für die Aktivierung und Regulation des *PAX7*-Genexpression von Bedeutung sind.

5.3. Polymorphe repetitive Elemente in den Promotorregionen der *PAX3*-, *PAX6*- und *PAX7*-Genen

Eine charakteristische Eigenschaft eukaryontischer genomischer DNA ist ein hoher Gehalt von repetitiven Elementen, die bis zu 30% des gesamten Genoms ausmachen können (Moyzis et al., 1989; Stallings et al., 1990). Einer früher allgemein verbreiteten Ansicht nach stellen die repetitive Sequenzen nur biologisch bedeutungslose „Abfall“-DNA (*junk DNA*) dar, die durch eine sogenannte „egoistische“ Replikation von einer zu der nächsten Generation vererbt werden (Orgel et al., 1980). Zahlreiche Befunde des letzten Jahrzehnts deuten jedoch darauf hin, dass die repetitiven Elemente in nichtkodierenden Regionen der Gene einschliesslich 5'- und 3'-nicht translatierte, intronische und 5'-regulatorische Bereiche einen Einfluss auf die transkriptionelle Effizienz der Gene haben könnten (Kashi et al., 1997; Comings, 1998). Abhängig von ihrer Länge werden die repetitiven Elemente in Mikro- und Minisatelliten unterteilt. Die Mikrosatelliten werden durch eine Tandemwiederholung ganz einfacher monomerer, aus einem bis 8 Nukleotiden bestehender Einheiten gebildet (Caskey et al., 1992), während sich die Minisatelliten aus von 10 bis 100 bp langen Einheiten zusammensetzen (Krontiris et al., 1995). Neue Erkenntnisse legen dar, dass instabile Mikrosatelliten auf den Organismus schädigende biologische Effekte hervorrufen können. Eine extensive Expansion von repetitiven Trinukleotidelementen wie CGG, CTG und GAA, verursacht Entstehung mehrerer genetisch verursachten neurologischen Erkrankungen (Mitas, 1997). Eine Kontraktion des sich in 5'-UTR des menschlichen Insulingens befindenden Minisatellits ist mit der Insulin abhängigen Diabetes mellitus vom Typ I assoziiert (Kennedy et al., 1995). Diese Expansionen oder Kontraktionen der regulatorischen Mikro- oder Minisatelliten führen zu einer veränderten Expression der entsprechenden Gene. Mehrere dieser repetitiven Sequenzen verfügen über eine Vielzahl von polymorphen Formen in Menschen und anderen Säugern, die durch Variationen in der Anzahl repetitiver Einheiten zustande kommt. Infolge der wichtigen regulatorischen Rolle der repetitiven Sequenzen können auch deren polymorphe Formen in unterschiedlichem Masse die Funktionalität der Gene und ihrer Produkte mit entsprechender Relevanz für die komplexen Eigenschaften und Erkrankungen beeinflussen. Beispielsweise hat Vorhandensein einer polymorphen repetitiven Sequenz in der regulatorischen Region des Serotonintransportergens (*SLC6A4*) unterschiedliche transkriptionelle Effizienz für die Promotorregion des entsprechenden Gens zur Folge und beeinflusst Angst-assoziierte Merkmale und das Risiko an einer affektiven Störung (z.B. Depression) zu erkranken (Heils et al., 1996; Lesch et al., 1996).

In den oben beschriebenen Promotorregionen der *PAX3*- und *PAX7*-Gene sowie im von uns charakterisierten alternativen Promotor B des *PAX6*-Gens (Okladnova et al., 1998) wurden ebenfalls repetitive Sequenzen entdeckt. Die weitere Analyse zeigte, dass diese repetitiven Elemente über mehrere polymorphe Formen verfügen, wobei diese Längevarianten die transkriptionelle Effizienz der entsprechenden Promotoren in unterschiedlichem Masse modulieren können. Eine Dinukleotidsequenz $(CA)_m(GA)_n$ wurde ~ 1 kb stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes im Promotor B des *PAX6*-Gens lokalisiert. Die Länge des gefundenen Elements variierte von 24 bis 36 repetitiven Einheiten und kann dadurch als eine hoch polymorphe Sequenz bezeichnet werden. Dabei lag das GA-Anteil mit nur von 5 bis 7 Einheiten vor, während CA-Dinukleotid mit einem Dutzend der Längevarianten extrem polymorph war. Ein anderes repetitives $(CA)_n$ -Element mit zahlreichen Allelen, die von 13 bis 30 repetitive Einheiten enthalten, wurde 337 bp stromaufwärts von der Transkriptionsstartstelle des *PAX3*-Gens identifiziert.

Einigen Hybridisierungsstudien zufolge birgt das menschliche Genom bis zu 100 000 Regionen mit poly- $(CA)_n$ -Sequenzen, wobei derartige Sequenzen auch im Genom anderer Eukaryoten einschliesslich *Drosophila* und Hefen allgemein verbreitet sind (Hamada and Kakunaga, 1982). Ein wichtiger Aspekt der $(CA)_n$ -Mikrosatelliten, die abwechselnd Purine und Pyrimidine enthalten, ist, dass diese Sequenzen linksgängige Doppelhelix oder Z-DNA annehmen können (Haniford and Pulleyblank, 1983; Nordheim and Rich, 1983b). Diese DNA-Form ist durch einen Zickzackverlauf der Phosphatgruppen im Rückgrat gekennzeichnet und besitzt nur eine tiefe Furche in der Helix im Gegensatz zur klassischen B-DNA-Form mit einer grossen und einer kleinen Furche (Wang et al., 1979) (Abb. 5.2).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Z-DNA-Bildung ein dynamischer Prozess, der weitgehend durch die negative Superspiralisierung kontrolliert wird. *In vivo*-Untersuchungen der potentiellen Z-DNA bildenden Sequenzen in Promotorregionen einiger Gene demonstrierten die Z-DNA-Bildung während der Transkription der entsprechenden Gene (Wittig et al., 1992; Wolf et al., 1996; Muller et al., 1996). Physiologischer Abfall in der Transkription dieser Gene wurde gleichzeitig durch den Verlust der Z-DNA-Struktur begleitet. Ein ausgestellttes Modell zur Klärung dieser engen Korrelation besagt, dass die Z-DNA durch eine negative Superspiralisierung stabilisiert wird (Rich et al., 1984), die infolge des RNA-Polymerasegleitens entlang des DNA-Stranges hervorgerufen wurde (Liu and Wang, 1987). Wenn die RNA-Polymerase anhält, können die Topoisomerasen die Superspiralisierung entspannen und dadurch den Übergang von Z-DNA zu B-DNA

erleichtern. Tatsächlich nahm die Menge an detektierten Z-DNA durch eine Behandlung mit Topoisomeraseinhibitoren stark zu (Wittig et al., 1992).

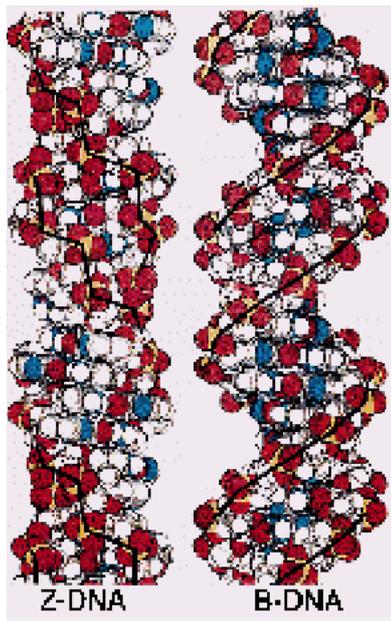


Abb. 5.2. Konformation der Z- und B-DNA

Z-DNA zeigt den linksgängigen Zickzackverlauf des Phosphatenrückgrats (schwarze Linie). Im Unterschied zu B-DNA besitzt Z-DNA nur eine tiefe Furche, in welche die Basenpaare exponiert sind.

Die aus den oben beschriebenen Untersuchungen abzuleitende Annahme zur biologischen Bedeutung der Z-DNA werde von einer weiteren Studie über die Verteilung dieser Sequenzen im Genom, die an 137 menschlichen Genen durchgeführt wurde, bestätigt (Schroth et al., 1992). 35% der untersuchten repetitiven Sequenzen kamen an 5'-Enden und oft in Promotorregionen vor, wobei nur 3% am 3'-Ende der Gene zu finden waren. Die restlichen Sequenzen fanden sich zu 47% in Intronen versus 15% in Exonen. Nähere Untersuchungen an der α - und β -Globingenen zeigten eine Tendenz der Z-DNA-Domänen, sich um die Transkriptionsstartstellen anzusammeln, wobei sie in Bereichen zwischen den Genen und in den Pseudogenen der Globinen praktisch vollständig abwesend waren.

Solche ungleichmässige Verbreitung der Z-DNA bildenden repetitiven Sequenzen lässt eine mögliche transkriptionelle Rolle der Z-DNA vermuten, die durch eine Vielzahl von Beobachtungen bestätigt wird. Der DNaseI-Hypersensitivitätstest ist bekanntlich mit dem transkriptionell aktiven Chromatin assoziiert. Strukturelle Kartierung einer Enhancerregion in SV40 Minichromosom zeigte DNaseI-Spaltung in Bereichen, die ungefähr 25 bp von beiden Seiten der Z-DNA-Segmenten liegen (Nordheim and Rich, 1983a). Eine Vielzahl von Studien berichtet über gegensätzlichen Effekte der repetitiven $(CA)_n$ -Elemente auf die

Promotoraktivität. Beispielsweise hemmt repetitives $(CA)_n$ -Element stromaufwärts des Prolaktin-Gens der Ratte die Transkription (Naylor and Clark, 1990). Dagegen zeigt eine Deletion der $(CA)_n$ -Region im Gen der menschlichen zytosolischen Phospholipase A2 einen negativen Einfluss auf die Promotoraktivität (Wu et al., 1994).

Unsere *In vitro*-Untersuchungen zur möglichen Auswirkung des PAX-6LPR auf die transkriptionelle Effizienz des *PAX6*-Promotors zeigten eine starke Abhängigkeit der Promotoraktivität von der Länge des repetitiven $(CA)_n$ -Elements, wobei Varianten mit mehr als 28 repetitiven Einheiten eine 4 bis 9-fach höhere Promotoraktivität im Vergleich zu kürzeren Varianten aufwiesen. Dieser Zusammenhang zwischen der Promotoraktivität und PAX6-LPR-Längenvarianten wurde auch in einer Untersuchung von nativer Expression des *PAX6*-Gens in zerebellärem Kortex bestätigt. Abhängig von der individuellen Länge des repetitiven Elements wurden signifikant höhere Konzentrationen von PAX-6 Transkripten im menschlichen *postmortem* Hirngewebe festgestellt. Die ähnliche Korrelation wurde auch für den Fall des Matrix Metalloproteinase 9-Gens beobachtet (Shimajiri et al., 1999). Eine Verkürzung eines polymorphen repetitiven $(CA)_n$ -Elements führte zur starken Verminderung der Promotoraktivität dieses Gens. Hierzu wiesen auch Zelllinien mit kürzeren Allelvarianten des Gens eine niedrigere enzymatische Aktivität des Proteins auf. Diese Assoziation zwischen Allelen mit den variierenden Längen der polymorphen Mikrosatelliten mit den Veränderungen im Expressionsniveau der spezifischen Gene wäre mit einer längenabhängigen Fähigkeit dieser Sequenzen zur Z-DNA-Bildung vereinbar (Schroth et al., 1992). Diese Fähigkeit der $(CA)_n$ -Sequenzen, die mit einer mittels eines Computeralgorithmus berechneter Punktzahl für das Potential zur Z-DNA-Bildung dargestellt wurde, stieg stark mit jedem Nukleotidpaar an und war 0,6 für $(CA)_6$, 1,3 für $(CA)_7$ und 2,4 für $(CA)_8$.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass das hoch polymorphe repetitive $(CA)_n$ -Element in Promotorregion des *PAX3*-Gens auch einen Einfluss auf die transkriptionelle Effizienz dieses Promotors ausübt. Die Allelvariante mit den $(CA)_{25}$ repetitiven Einheiten führt bei dem *PAX3*-Promotor zu einer signifikant niedrigeren transkriptionelle Effizienz in RD-Zellen im Vergleich zu den anderen Varianten.

Ein molekularer Mechanismus für die Regulation der Genexpression durch $(CA)_n$ -Mikrosatelliten und die Rolle der Z-DNA in diesem Prozess ist bisher nicht bekannt. Einen Ansatz zur Aufklärung dieses Mechanismus könnten Studien über an die Sequenzen bindenden Kernproteinen liefern. Bei diesen Studien wurde beobachtet, dass Bindungsaffinität dieser Proteine mit Verlängerung der repetitiven Elementen stark verstärkt

wird. Beispielsweise zeigten Epplen et al. (Epplen et al., 1996) in ihrer Untersuchung, dass an (CA)₆-Mikrosatellit keine Kernproteine sich binden, dagegen aber eine moderate Bindungsintensität zur (CA)₁₃ und die höchste Intensität zur (CA)₂₅ auswiesen. Auch wurde eine Reihe von Kernproteinen beschrieben, die sich ausschliesslich an Z-DNA und nicht an B-DNA binden (Nordheim et al., 1982). Dies könnte an unterschiedlichen Konformationen der beiden DNA-Formen liegen, wobei die Proteine mit den nach aussen exponierten Basenpaaren der Z-DNA, jedoch nicht mit dicht gepackter B-DNA, in eine Wechselwirkung treten können. Auf die Weise kann ein polymorphes repetitives (CA)_n-Element über seine unterschiedliche Affinität zur Proteinbindung und/oder die Fähigkeit zur Z-DNA-Bildung einen direkten Einfluss auf die Genexpression ausüben.

Im basalen Promotor des *PAX7*-Gens wurde ein (CCT)₈₋₁₁-Trinukleotidelement nachgewiesen, das in unmittelbare Nähe von der Transkriptionstartstelle (107 bp stromaufwärts) innerhalb des basalen Promotorbereiches lokalisiert ist. Das Vorhandensein der Polypyrimidin-/ Polypurinsequenzen (Pyr:Pur) in den proximalen Bereichen der TATA-losen Promotorregionen wurde ebenfalls bei mehreren wachstums-assoziierten Genen wie *EGF-R* (Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor) (Johnson et al., 1988), *c-myc* (Kinniburgh, 1989), *IR* (Insulinrezeptor) (Tewari et al., 1989), *AR* (Androgenrezeptor) (Chen et al., 1997), *c-src* (Ritchie et al., 2000), *c-Ki-ras* (Pestov et al., 1991), *TGFβ3* (transformierender Wachstumsfaktor β3) (Lafyatis et al., 1991), *PDGFA* (*plateled derived growth factor A chain*) (Wang et al., 1992) und *Hmga2* (*high mobility group A2*) (Rustighi et al., 2002) berichtet. Untersuchungen an diesen Genen zeigen, dass diese Pyr:Pur-Sequenzen eine wichtige funktionelle Rolle in der Promotoraktivität spielen, da Deletionen von diesen Regionen in transienten Transfektionsexperimenten zu dramatischen Änderungen der Promotoraktivitäten führen. Diese Studien zeigten, dass die Pyr:Pur-Segmente in allen betroffenen Genen ungewöhnliche DNA-Strukturen wie H-DNA zu bilden fähig sind. Die Hauptelemente der H-DNA sind eine dreifache Helixstruktur und eine nicht gepaarte Hälfte des Purin- oder Pyrimidinstranges (Abb. 5.3). Diese H-DNA wird durch eine lokale Entwindung einer Hälfte der Pyr:Pur-Sequenz und nachfolgende Faltung der Purin- oder Pyrimidineinzelstranges in die grosse Furche des Doppelhelixes von der zweiten Hälfte der Sequenz gebildet, wodurch ein PyrPurPyr- oder PyrPurPur-Triplethelix mit sogenannten Hoogsteen-Basenpaare und ein Pyr- oder Pur-Einzelstrang entstehen. Eine Vielzahl verschiedener Tripletstrangisomere kann entlang der langen Pyr:Pur-Sequenz gebildet werden, während man grundsätzlich zwischen mit einem Pyrimidinstrang gebildeten H-DNA (Hy-Isomere) und mit einem Purinstrang

gebildeten H*-DNA (Hr-Isomere) unterscheidet (Sinden, 1994; Mirkin and Frank-Kamenetskii, 1994; Soyfer and Potaman, 1996).

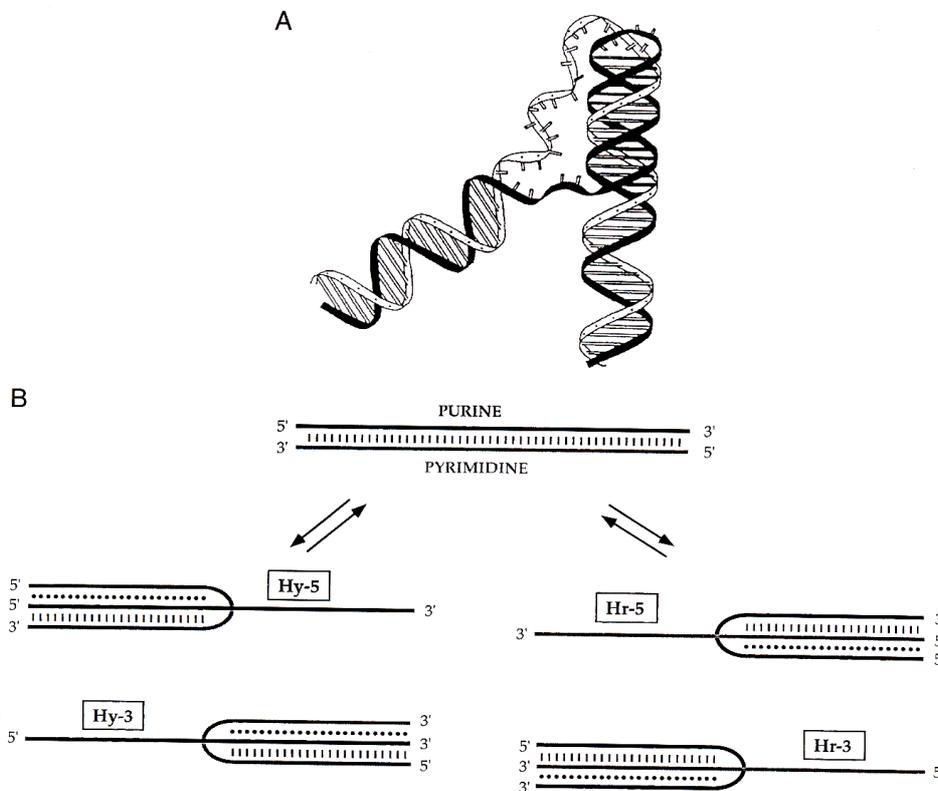


Abb. 5.3. H-DNA

(A) Schematische Darstellung eines intramolekularen Tripletthelix. (B) Vier unterschiedliche Isomere, welche für eine Pyr:Pur-Sequenz gewonnen wurden, zeigen eine Spiegelsymmetrie. Hy-3 und Hy-5 haben ein Polypyrimidinmotiv in dem dritten Strang, während bei Hr-5 und Hr-3 (auch genannt H*-DNA) ein Polypurinmotiv die Rolle des dritten Stranges übernimmt.

Der detaillierte molekulare Mechanismus, der für die Promotoraktivierung durch diese Pyr:Pur-Segmente verantwortlich ist, ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Während die klassische Charakterisierung der *cis*- oder *trans*-regulatorischen Elemente fast ausschliesslich auf Doppelstrangeigenschaften der DNA fokussiert wurde, kann einzelsträngige DNA im Unterschied zu DNA-Doppelhelix, die eine relativ einheitliche Struktur aufweist, eine Vielfalt unterschiedlicher Konformationen, abhängig von der Nukleotidsequenz und anderen Faktoren, annehmen. Derartige Regionen könnten für eine hoch spezifische Interaktion mit Gentranskription regulierenden Proteinen geeignet sein (Crick, 1971). Eine Reihe von spezifischen an den Polypyrimidin- oder Polypurineinzelstrang-bindenden Proteinen wie hnRNP K (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*) (Tomonaga and Levens, 1996; Michelotti et al., 1996), PTB

(*polypyrimidine tract binding protein*) (Lou et al., 1999), SPy (*Src pyrimidine binding factor*) (Ritchie et al., 2000), CNBP (Michelotti et al., 1995; Flink and Morkin, 1995), GAGA-Bindungsprotein (Young et al., 1989; Ibaraki et al., 1993) wurde in der letzten Zeit beschrieben. Mehrere Studien berichteten, dass Einzelstrang-DNA-Bindungsproteine in einer Interaktion mit anderen, an den Doppelstrang bindenden Transkriptionsfaktoren entweder als Aktivatoren oder Repressoren der zellspezifischen (Bai et al., 1998; Matteo et al., 1998), basalen und medikamentös regulierten Gentranskription (Matteo et al., 1998; Kelm et al., 1999; Phillips et al., 1999) treten können. Ein Aktivierungsmechanismus für den Fall des *c-Src*-Genpromotors wurde kürzlich dargestellt (Ritchie et al., 2000). Ein in dieser Studie charakterisiertes Spy-Protein (*Src pyrimidine binding factor*) verfügt über zwei Bindungsaktivitäten an Doppelstrang mit CTTCC-Motiv und an Pyrimidineinzelstrang ohne spezifischen Sequenzanforderungen. Die Bindung dieses Faktors an seine doppelsträngige spezifische Sequenz könnte die lokale Entwindung der doppelsträngigen DNA und nachfolgende Stabilisierung entstandener „Blase“ durch seine vorteilhaften Bindungseigenschaften an den Einzelstrang begünstigen. Anschliessende Aktivierung des Promotors könnte schliesslich durch direkte Bindung des Spy oder eines anderen Faktors an RNA-Polymerase erfolgen. Der *PAX7*-Promotor enthält eine CTTCC-Sequenz 49 bp stromaufwärts von dem repetitiven CCT-Element, was der lokalen Promotorstruktur des *c-Src*-Gens sehr ähnlich ist. Dies könnte eine Grundlage für die weiteren Untersuchungen der regulatorischen Mechanismen des *PAX7*-Promotors sein. Im Falle einer Bestätigung dieses Mechanismus könnte kosequenterweise unser weiterer Befund erklärt werden. Unsere Untersuchungen über einen Einfluss der Längenvariationen des (CCT)_n-Elements auf die basale Promotoraktivität des *PAX7*-Gens zeigten einen mässigen Anstieg der Promotoraktivität um etwa 30% im Falle des repetitiven Elements mit 11 CCT-Einheiten im Unterschied zu kürzeren Varianten. Derartige Steigerung der Promotoraktivität könnte durch einen stabilisierenden Einfluss der längeren Pyr:Pur-Segmente auf die Bildung des Triplehelix zustande kommen.

5.4. Assoziationsanalysen von Polymorphismen der *PAX3*-, *PAX6*- und *PAX7*-Promotorregionen mit der Schizophrenieerkrankung

Seit der Wiederentdeckung der mendelischen Vererbungsgesetze am Anfang des 20. Jahrhunderts war die humangenetische Forschung hauptsächlich auf rezessiv oder dominant vererbte Einzelgenerkrankungen akzentuiert. Während in den letzten zwei Jahrzehnten ein Grossteil der Krankheitsgene lokalisiert und sequenziert wurde, steigt heutzutage das Interesse an genetisch komplexen Erkrankungen, deren oligo- oder polygener Ursprung sich wesentlich schwieriger identifizieren lässt. Diese Schwierigkeiten lassen sich insbesondere am Beispiel der psychischen Erkrankungen illustrieren. Trotz einer Vielzahl von Kopplungsstudien an manisch-depressiven Psychosen, Schizophrenie, Tourette-Syndrom und anderen psychischen Erkrankungen gibt es nur eine begrenzte Anzahl von Befunden, die in der wissenschaftlichen Literatur konsistent bestätigt wurden. Das methodologische Grundprinzip der Kopplungsanalyse basiert im wesentlichen auf dem „ein Gen - eine Erkrankung“-Model. Andererseits kommt eine komplexe Erkrankung zustande, wenn eine Person eine kritische Anzahl der einen Phenotyp beeinflussenden Genvarianten ererbt, während die gesunde Personen nur als Träger einiger Krankheitsallele auftreten können (Risch and Merikangas, 1996; Weeks and Lathrop, 1995). Eine der methodologischen Alternativen stellen daher Assoziationsstudien dar, die eine Detektion der der Kopplungsanalyse entgangenen Kandidatengene einer komplexen Erkrankung ermöglicht (Weeks and Lathrop, 1995; Comings, 1996; Owen and McGuffin, 1993).

Da die Identifikation der Kandidatengene polygenetischer Erkrankungen mit Hilfe von konventionellen Methoden auf erhebliche Schwierigkeiten stösst, könnten die Vererbungsprinzipien, die im letzten Jahrhundert am Beispiel des „ein Gen - eine Erkrankung“-Models studiert wurden, für die polygene Vererbung von untergeordneter Bedeutung sein. Konsequenterweise besteht ein Bedarf an einem neuen Paradigma, das bei der Identifizierung von an polygener Erkrankung beteiligten Gene zu helfen vermag (Comings, 1998). Wie es sowohl in dieser Arbeit als auch in anderen Publikationen (für Überblick siehe (Comings, 1998) demonstriert wurde, nehmen Mini-/Mikrosatelliten einen Einfluss auf die Expression von Genen, was in einer Vielzahl dieser funktionellen Genvarianten in der menschlichen Population resultiert. Hierzu besagt eine Hypothese zur polygenen Krankheitsvererbung, dass eine Kombination mehrerer durch Mini-/Mikrosatelliten bedingten hypo- oder hyperfunktionellen Genvarianten einen Krankheitszustand induziert, wobei die Rolle der klassischen Genmutationen aufgrund deren niedrigen Frequenz in einer

Population unbedeutend erscheint. Infolge dessen ist eine Vorauswahl der Kandidatengene und nachfolgende Erforschung deren Mini-/Mikrosatelliten-Polymorphismen in Zusammenhang zur relevanten quantitativen Krankheitsmerkmalen ein plausibler Ansatz zur Untersuchung einer polygenen Erkrankung.

Die Neuroentwicklungshypothese der Schizophrenie in ihrer heutigen Formulierung geht aus neuropathologischen Befunden einer gestörten zytoarchitektonischen Zusammenstellungen und Missbildungen von Nervenzellen hervor (Beckmann and Jakob, 1991; Akbarian et al., 1996; Weinberger, 1996; Arnold et al., 1997; Akil and Lewis, 1997). Diese Defekte scheinen während der Entwicklung des fötalen Gehirns einzusetzen und Migration, Positionierung, Orientierung und Verbindung der neuronalen Zellen einzubeziehen. Dieser Hypothese zufolge könnten die funktionellen Allelvarianten der Gene, die für die embryonale Gehirnentwicklung verantwortlich sind, das Risiko an einer Schizophrenie zu erkranken, beeinflussen. In diesem Zusammenhang haben wir in einer Assoziationsstudie mit 281 an Schizophrenie erkrankten Patienten und 229 Kontrollprobanden eine mögliche pathologische Relevanz der von uns beschriebenen Allelvarianten der wichtigen neuronalen Entwicklungsgene, *PAX3*, *PAX6* und *PAX7*, für die Schizophrenie untersucht. Da es einige Anhaltspunkte für die ätiologische und genetische Heterogenität der Schizophrenie zu geben scheint (Tsuang and Faraone, 1995), erfolgte die Aufteilung der Schizophrenie in unserer Studie in Untergruppen nach DSM-IV-Kategorien (American Psychiatric Association, 1994) in paranoide, nicht-paranoide Schizophrenie und schizoaffektive Psychosen.

Während die Länge der repetitiven Elemente innerhalb der drei oben genannten Polymorphismen breit variierte, wurden keine abnormalen kürzeren oder längeren Allele in erkrankten Patienten festgestellt. Für das $(CA)_m(GA)_n$ -Dinukleotidelement in Promotorregion des *PAX6*-Gens wurde eine breite Variation der Allele mit von 23 bis 36 repetitiven Einheiten in untersuchten Probanden gefunden. Da unsere funktionelle Untersuchung zeigte, dass die längeren Allelvarianten mit über 28 repetitiven Einheiten die Expression des *PAX6*-Gens im Vergleich zur kürzeren Allelen verstärken, wurden alle Allele für die Assoziationsstudie in zwei Gruppen mit hoher (≥ 29 Einheiten) und niedriger Aktivität (≤ 28 Einheiten) unterteilt. Datenanalyse zeigte eine Assoziation der hoch-aktiven Genotypen bei Probanden mit paranoider Schizophrenie. Bei den Patienten mit diesem Schizophrenieuntertyp wurde im Vergleich zu Kontrollprobanden eine statistisch signifikante höhere Frequenz der heterozygoten Träger des mit *PAX6*-Gen assoziierten Polymorphismus beobachtet. Keine statistisch signifikante Assoziation wurde für nicht-paranoide Form der Schizophrenie sowie schizoaffektive Psychosen festgestellt. Sowohl Patienten mit

Schizophrenie als auch diejenigen mit paranoidem Untertyp waren im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Dagegen zeigten Kontrollprobanden kein Gleichgewicht. In einer unabhängigen Stichprobe einer Populationskontrolle erhielt Samochowiec und Kollegen (Samochowiec et al., 1999b) äquivalente Allel- ($\chi^2=2,0$; $df=1$; $P=0,16$) und Genotyp-Häufigkeiten ($\chi^2=2,0$; $df=2$; $P=0,37$), was beinhaltet, dass unser Befund kein Ergebnis einer möglichen Stratifikation der Population zu sein scheint.

Unter dem genetischen Gesichtspunkt kommt insbesondere der paranoide Untertyp innerhalb der Familien von Erkrankten in einem moderaten Ausmass geläufig vor (Kendler and Davis, 1981). Eine Vielfalt der Variablen, unter anderem Alter bei Krankheitseinbruch, Häufigkeit der perinatalen Schlaganfälle und neuropsychologische Performanz scheint die paranoide Schizophrenie von den anderen DSM-IV-Schizophrenieuntertypen zu unterscheiden (McGlashan and Fenton, 1991; Zalewski et al., 1998). Während Deletionen und Punktmutationen in der kodierenden Region des *PAX6*-Gens bekanntlich in einem Verlust des Proteinfunktionen resultieren (Glaser et al., 1992; Read, 1995), könnte der beschriebene Promotorpolymorphismus Auswirkungen auf die Expression von ungefähr 2500 nachgeordnet regulierten Gene haben. Zu dieser Gruppe der Genen gehört auch neurale Zelladhensionsmolekül (*N-CAM*), dessen Expression während der neuronalen Entwicklung und im adulten Gehirn durch das *PAX6*-Gen reguliert wird (Edelman and Jones, 1995; Holst et al., 1997).

Der Vergleich der Allelhäufigkeiten zwischen den Patienten mit paranoider Schizophrenie und Kontrollprobanden zeigte dagegen keine signifikanten Unterschiede. Diese Diskrepanz in unseren Daten könnte auf der zu geringen Stichprobengrösse und der damit zu geringen Power der statistischen Analyse derartiger Assoziationsstudien beruhen. Es ist allerdings auch schwierig in Anbetracht einer hohen Heterogenität in der Ethnologie der Schizophrenie (Tsuang and Faraone, 1995) eine grössere homogene Patientengruppe zu gewinnen. Dennoch liefert unsere Arbeit die ersten Anhaltspunkte für die Beteiligung der Entwicklungsgene an der Entstehung der Schizophrenieerkrankung. Gleichwohl sollen unsere Befunde mit einer gewissen Zurückstellung interpretiert und in einer unabhängigen Assoziations- und/oder Familienstudie über den paranoiden Untertypen der Schizophrenie zusätzlich bestätigt werden. Im Unterschied zum untersuchten Polymorphismus im *PAX6*-Gen wurde keine Assoziation von *PAX3*- und *PAX7*-Polymorphismen mit der Schizophrenieerkrankung in der untersuchten Population festgestellt.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Klärung der phänotypischen Konsequenzen struktureller Variationen in den regulatorischen Regionen einiger für psychische Erkrankungen potentiell relevanter Entwicklungsgene. Die *Pax*-Gene sind Mitglieder einer Familie der Transkriptionsfaktoren, die sowohl mehrere Schritte in der Embryogenese als auch Aufrechterhaltung des Differenzierungszustandes der Zellen einiger adulten Gewebe kontrollieren. Im Rahmen dieser Fragestellung wurden die Promotorregionen der menschlichen *PAX3*-, *PAX6*- und *PAX7*-Gene charakterisiert. Weiterhin wurden funktionelle Folgen der mit diesen Promotoren assoziierten Repeat-Polymorphismen auf die Expression dieser Gene untersucht. Schliesslich wurde die Relevanz für die psychischen Erkrankungen wie die Schizophrenie getestet.

Zur Untersuchung der Promotorregion des menschlichen *PAX3*-Gens wurde mittels der Primer-Extension und der Ribonuklease-Protektion ein Transkriptionsstartpunkt 365 bp stromaufwärts vom Translationinitiationskodon festgelegt. Der Beginn der Transkription innerhalb der untersuchten Promotorregion wurde sowohl in vielen verschiedenen Gehirnbereichen als auch in einigen anderen adulten Geweben detektiert. Das im adulten menschlichen Gehirn gefundene breite Expressionsspektrum des *PAX3*-Gens, das hauptsächlich im Bezug auf die frühe Neurogenese erforscht wurde, deutet auf seine wichtige Rolle in der Differenzierung und der Aufrechterhaltung der spezifischen Zellenarten des adulten Gehirns hin. Das menschliche *PAX3*-Gen, dessen hier charakterisierte Promotorregion eine starke Homologie dem entsprechenden murinen Promotor aufweist, steht unter Regulation von einer TATA-Box und zwei CCAAT-Boxen und wird zusätzlich, wie es mittels Luciferase-Reporterassay mit Deletionskonstrukten in RD- und Cos-7-Zellen gezeigt wurde, sowohl durch ein aktivierendes Element als auch durch ein starkes Repressor-Element transkriptionell reguliert.

Mittels der Primer-Extension und der 5'-RACE-Analyse mit mRNA aus den menschlichen adulten Skelettmuskeln wurde der Transkriptionsstartpunkt der menschlichen *PAX7*-mRNA 664 bp stromaufwärts von dem ATG-Kodon ermittelt. Während die Beteiligung des *PAX7*-Gens in der frühen Neurogenese und seine Expression sowohl in spezifischen Regionen des embryonalen Gehirns als auch im adulten Gehirn der Maus beschrieben wurde, erbrachte diese Arbeit den ersten Nachweis zur Expression des *PAX7*-Gens in mehreren Regionen des adulten menschlichen Gehirns. Die computergestützte Sequenzanalyse eines genomischen Klons, das den definierten Promotorbereich enthielt, zeigte im Gegensatz zum *PAX3*-

Promotor das Fehlen einer kanonischen TATA-Box. Mehrere potenzielle Bindungsstellen für eine Reihe der Transkriptionsfaktoren wurden identifiziert.

In den oben beschriebenen Promotorregionen der *PAX3*- und *PAX7*-Gene sowie in dem bereits charakterisierten alternativen Promotor B des *PAX6*-Gens wurden repetitive Sequenzen oder sogenannte Mikrosatelliten entdeckt. Die weitere Analyse zeigte, dass diese repetitiven Elemente über mehrere polymorphe Formen verfügen, wobei diese Längevarianten die transkriptionelle Effizienz der entsprechenden Promotoren in unterschiedlichem Masse modulieren können. Hoch-polymorphe repetitive Dinukleotidsequenzen $(CA)_m(GA)_n$ und $(CA)_n$ wurden sowohl im *PAX6*-Gen als auch im *PAX3*-Gen beschrieben. Diese im menschlichen Genom weit verbreiteten poly- $(CA)_n$ -Sequenzen verfügen über die Fähigkeit eine linksgängige Doppelhelix oder sogenannte Z-DNA zu bilden. Die Bedeutung der Z-DNA bildenden repetitiven Sequenzen für die Transkription wurde durch eine Vielzahl von Beobachtungen bestätigt. Sowohl unsere *in vitro*-Untersuchungen als auch die Analyse der nativen Expression des *PAX6*-Gens im *postmortem* Gewebe des zerebellären Kortexes zeigten eine ausgeprägte Abhängigkeit der *PAX6*-Promotoraktivität von der Länge des repetitiven $(CA)_n$ -Elements, wobei die längeren Varianten eine von 4 bis 9-fach höhere Promotoraktivität und zweifach höhere mRNA-Konzentration im Vergleich zu den kürzeren Varianten aufwiesen. Das polymorphe repetitive $(CA)_n$ -Element in der Promotorregion des *PAX3*-Gens übte ebenfalls einen Einfluss auf die transkriptionelle Effizienz dieses Promotors aus.

Im basalen *PAX7*-Promotor wurde ein $(CCT)_{8-11}$ -Trinukleotidelement gefunden. Mehrere Studien zeigten, dass die Polypyrimidin-/ Polypurinsequenzen (Pyr:Pur) unorthodoxale DNA-Struktur wie H-DNA zu bilden in der Lage sind und Deletionen dieser Sequenzen in Promotorregionen verschiedener Gene zu dramatischen Änderungen der Promotoraktivitäten führen können. Unsere Untersuchungen der Längevarianten des $(CCT)_n$ -Elements zeigten einen Anstieg der Promotoraktivität um etwa 30% im Falle des repetitiven Elements mit 11 CCT-Einheiten im Vergleich zu kürzeren Varianten, was durch einen stabilisierenden Einfluss der längeren Pyr:Pur-Segmente auf die Bildung der H-DNA zustande kommen könnte.

Ausgehend von der Neuroentwicklungshypothese der Schizophrenie haben wir in einer Assoziationsstudie mit 281 an der Schizophrenie erkrankten Patienten und 229 Kontrollprobanden eine mögliche etiopathogenetische Bedeutung der hier beschriebenen Allelvarianten der wichtigen neuronalen Entwicklungsgene, *PAX3*, *PAX6* und *PAX7*, für die Schizophrenie untersucht. Für den Fall des polymorphen repetitiven CA/GA-

Dinukleotidelemente in der Promotorregion des *PAX6*-Gens wurde eine Assoziation der hoch-aktiven Genotypen mit den an der paranoiden Schizophrenie erkrankten Patienten festgestellt. Damit liefert diese Arbeit die ersten Anhaltspunkte für die Beteiligung der *PAX*-Entwicklungsgene an der Entstehung der Schizophrenieerkrankung.

7. Summary

The aim of this study was the elucidation of phenotypical consequences of structural variations in regulatory regions of developmental genes that are potentially relevant for mental disease. The *Pax* genes are members of a family of evolutionary conserved transcription factors, which control several steps in the embryogenesis as well as maintain the differentiation status of cells in adult tissues. In this context the promoter regions of the human *PAX3*, *PAX6* and *PAX7* genes were characterized. Therefore, functional effects of the polymorphic repetitive elements in the gene promoter regions on the expression of these genes were examined. Finally, the relevance for the psychiatric diseases like schizophrenia was tested.

Primer extension and ribonuclease protection assays revealed that transcription of the human *PAX3* gene is initiated from a single start site located 365 bp upstream of the translation initiation codon. The start of transcription within the examined promoter region was detected in many different brain regions as well as in some other adult tissues. The detected ubiquitous presence of *PAX3* gene transcripts in the adult human brain, expression of which was mostly investigated in the early neurogenesis, points to its important role in the differentiation and the maintenance of the specific cell types of the adult brain. The characterized promoter region of the human *PAX3* gene demonstrates a strong identity with orthologous murine *Pax3* gene promoter. Both promoters are driven by a TATA box and two CCAAT boxes and are additionally regulated by both an enhancer element and a strong silencer element, as shown by luciferase reporter gene assay in RD and Cos-7 cells using deletion constructs.

The transcription start site of the human *PAX7* gene was determined 664 bp upstream of the ATG codon using primer extension and 5'-RACE with mRNA from the human adult skeletal muscles. While the role of the *PAX7* gene in the early neurogenesis and its expression profile in some specific regions of the embryonic as well as adult murine brain were previously described, this work provides the first evidence of the expression of *PAX7* gene in several regions of adult human brain. In contrast to the *PAX3* gene promoter, a sequence analysis of the defined promoter region of *PAX7* gene showed the absence of a canonical TATA box. However, several potential binding sites for a number of the transcription factors were identified within this sequence.

Repetitive sequences or so-called microsatellites were discovered in the promoter regions of the *PAX3* and *PAX7* genes described above as well as in the previously characterized alternative promoter B of the *PAX6* gene. Further analysis showed that these repetitive

elements are length polymorphic, whereby variants of different length alleles may differentially modulate the transcriptional efficiency of the associated promoter. Highly polymorphic repetitive dinucleotide sequences $(CA)_m(GA)_n$ and $(CA)_n$ were described in the *PAX6* and *PAX3* genes. These poly $(CA)_n$ sequences, which are common in the human genome, are able to form a left-handed duplex or so-called Z-DNA. The significance of these repetitive sequences forming Z-DNA for the regulation of transcription have been consistently confirmed in a multiplicity of previous studies. Our *in vitro* investigations and the analysis of the native expression of the *PAX6* gene in the *postmortem* cerebellar cortex demonstrated a pronounced dependency of the *PAX6* promoter activity on the length of the repetitive $(CA)_n$ element. The longest variants showed a 4 to 9-fold higher promoter activity and twofold mRNA concentration in comparison to the shorter variants. Likewise, the polymorphic repetitive $(CA)_n$ element in the promoter region of the *PAX3* gene exerted an influence on the transcriptional efficiency of this promoter.

A $(CCT)_{8-11}$ trinucleotide element was found in the basal *PAX7* promoter. A number of studies showed that the polypyrimidine/polypurine sequences (Pyr:Pur) are in a position to form untypical DNA structure such as H-DNA. Deletions of these sequences in promoter regions of several genes lead to significant changes of the promoter activities. Our investigation of the length variants of $(CCT)_n$ element showed a 30 % increased promoter activity for the repetitive element with 11 CCT units compared with shorter alleles. A possible explanation for this effect may be a stabilizing influence of the longer Pyr:Pur segments on the formation of H-DNA.

On the basis of the neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia we have investigated a possible etiopathogenic significance of allelic variations expression of the neurodevelopmental genes *PAX3*, *PAX6*, and *PAX7* for schizophrenia in an association study with 281 schizophrenic patients and 229 control subjects. An association of the high-activity genotypes with the paranoid schizophrenia was revealed for the polymorphic repetitive CA/GA dinucleotide element located in the promoter region of the *PAX6* gene. Therefore, this work provides preliminary evidence for a participation of *PAX* developmental genes in the emergence of schizophrenia.

8. Literaturverzeichnis

- Akbarian, S., Kim, J.J., Potkin, S.G., Hetrick, W.P., Bunney, W.E., Jr., Jones, E.G., 1996. Maldistribution of interstitial neurons in prefrontal white matter of the brains of schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 53, 425-36.
- Akil, M., Lewis, D.A., 1997. Cytoarchitecture of the entorhinal cortex in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 154, 1010-2.
- American Psychiatric association, 1994. *Diagnosis and statistical manual of mental disorders*, 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Press.
- Andreasen, N.C., 1995. Symptoms, signs, and diagnosis of schizophrenia. *Lancet* 346.
- Arnold, S.E., 1999. Neurodevelopmental abnormalities in schizophrenia: Insights from neuropathology. *Development and Psychopathology* 11, 439-456.
- Arnold, S.E., Ruschinsky, D.D., Han, L.Y., 1997. Further evidence of abnormal cytoarchitecture of the entorhinal cortex in schizophrenia using spatial point pattern analyses. *Biol Psychiatry* 42, 639-47.
- Arnold, S.E., Trojanowski, J.Q., 1996. Recent advances in defining the neuropathology of schizophrenia. *Acta Neuropathol (Berl)* 92, 217-31.
- Auerbach, R., 1954. Analysis of the developmental effects of a lethal mutation in the house mouse. *J Exp Zool* 127, 305-29.
- Ausubel, F. M., 1992. *Current protocols in molecular biology*. Wiley & Sons Inc., New York, USA.
- Bai, G., Norton, D.D., Prenger, M.S., Kusiak, J.W., 1998. Single-stranded DNA-binding proteins and neuron-restrictive silencer factor participate in cell-specific transcriptional control of the NMDAR1 gene. *J Biol Chem* 273, 1086-91.
- Balling, R., Lau, C.F., Dietrich, S., Wallin, J., Gruss, P.: *Development of the skeletal system., Postimplantation Development in the Mouse*, Ciba Foundation Symposium. Wiley, Chichester, 1992, pp. 132-43.
- Barbeau, D., Liang, J.J., Robitaille, Y., Quirion, R., Srivastava, L.K., 1995. Decreased expression of the embryonic form of the neural cell adhesion molecule in schizophrenic brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2785-9.
- Barber, T.D., Barber, M.C., Cloutier, T.E., Friedman, T.B., 1999. PAX3 gene structure, alternative splicing and evolution. *Gene* 237, 311-9.
- Baron, M., 1986. Genetics of schizophrenia, I: familial patterns and mode of inheritance. *Biol Psychiatry* 21, 1051-1056.
- Barr, F.G., Fitzgerald, J.C., Ginsberg, J.P., Vanella, M.L., Davis, R.J., Bennicelli, J.L., 1999. Predominant expression of alternative PAX3 and PAX7 forms in myogenic and neural tumor cell lines. *Cancer Res* 59, 5443-8.
- Barr, F.G., Galili, N., Holick, J., Biegel, J.A., Rovera, G., Emanuel, B.S., 1993. Rearrangement of the PAX3 paired box gene in the paediatric solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet* 3, 113-7.
- Beckmann, H., Jakob, H., 1991. Prenatal disturbances of nerve cell migration in the entorhinal region: a common vulnerability factor in functional psychoses? *J Neural Transm Gen Sect* 84, 155-64.
- Bennicelli, J.L., Advani, S., Schafer, B.W., Barr, F.G., 1999. PAX3 and PAX7 exhibit conserved cis-acting transcription repression domains and utilize a common gain of function mechanism in alveolar

- rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 18, 4348-56.
- Bernasconi, M., Remppis, A., Fredericks, W.J., Rauscher, F.J.Schafer, B.W., 1996. Induction of apoptosis in rhabdomyosarcoma cells through down-regulation of PAX proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13164-9.
- Birnboim, F., Doly, J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc Acids Res* 7, 1512-23.
- Bladt, F., Riethmacher, D., Isenmann, S., Aguzzi, A.Birchmeier, C., 1995. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. *Nature* 376, 768-71.
- Bloem, L.J., Chen, Y., Liu, J., Bye, L.S.Yu, L., 1993. Analysis of the promoter sequence and the transcription initiation site of the mouse 5-HT1C serotonin receptor gene. *Brain Res Mol Brain Res* 17, 194-200.
- Bober, E., Franz, T., Arnold, H.H., Gruss, P.Tremblay, P., 1994. Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development* 120, 603-12.
- Bopp, D., Burri, M., Baumgartner, S., Frigerio, G.Noll, M., 1986. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* 47, 1033-40.
- Borycki, A.G.Emerson, C.P., 1997. Muscle determination: another key player in myogenesis? *Curr Biol* 7, R620-3.
- Bracha, H.S., Torrey, E.F., Gottesman, II, Bigelow, L.B.Cunniff, C., 1992. Second-trimester markers of fetal size in schizophrenia: a study of monozygotic twins. *Am J Psychiatry* 149, 1355-61.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Brink, C., Chowdhury, K.Gruss, P., 2001. Pax4 regulatory elements mediate beta cell specific expression in the pancreas. *Mech Dev* 100, 37-43.
- Brunner, H.G., Nelen, M., Breakefield, X.O., Ropers, H.H.van Oost, B.A., 1993a. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 262, 578-80.
- Brunner, H.G., Nelen, M.R., van Zandvoort, P., Abeling, N.G., van Gennip, A.H., Wolters, E.C., Kuiper, M.A., Ropers, H.H.van Oost, B.A., 1993b. X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. *Am J Hum Genet* 52, 1032-9.
- Burri, M., Tromvoukis, Y., Bopp, D., Frigerio, G.Noll, M., 1989. Conservation of the paired domain in metazoans and its structure in three isolated human genes. *Embo J* 8, 1183-90.
- Cannon, T.D., Mednick, S.A., Parnas, J., Schulsinger, F., Praestholm, J.Vestergaard, A., 1994. Developmental brain abnormalities in the offspring of schizophrenic mothers. II. Structural brain characteristics of schizophrenia and schizotypal personality disorder. *Arch Gen Psychiatry* 51, 955-62.
- Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Muller, U., Aguet, M., Babinet, C., Shih, J.C.et al., 1995. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 268, 1763-6.
- Caskey, C.T., Pizzuti, A., Fu, Y.H., Fenwick, R.G.Nelson, D.L., 1992. Triplet repeat mutations in human disease. *Science* 256, 784-9.
- Chalepakis, G., Goulding, M., Read, A., Strachan, T.Gruss, P., 1994. Molecular basis of splotch and Waardenburg Pax-3 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3685-9.

- Chen, S., Supakar, P.C., Vellanoweth, R.L., Song, C.S., Chatterjee, B.Roy, A.K., 1997. Functional role of a conformationally flexible homopurine/homopyrimidine domain of the androgen receptor gene promoter interacting with Sp1 and a pyrimidine single strand DNA-binding protein. *Mol Endocrinol* 11, 3-15.
- Chenchik, A., Diachenko, L., Moqadam, F., Tarabykin, V., Lukyanov, S.Siebert, P.D., 1996. Full-length cDNA cloning and determination of mRNA 5' and 3' ends by amplification of adaptor-ligated cDNA. *Biotechniques* 21, 526-34.
- Chien, A., Edgar, D.B.Trela, J.M., 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127, 1550-7.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J.Rutter, W.J., 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-9.
- Chomczynski, P.Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-9.
- Comings, D.E.: Polygenetic inheritance of psychiatric disorders. In: Blum, K., Noble, E.P., Sparks, R.S. and Sheridan, P.J. (Eds.), *Handbook of psychiatric genetics*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1996, pp. 235-60.
- Comings, D.E., 1998. Polygenic inheritance and micro/minisatellites. *Mol Psychiatry* 3, 21-31.
- Cooper, G.W., 1965. Induction of somite chondrogenesis by cartilage and notochord: a correlation between induction activity and specific stages of cytodifferentiation. *Dev Biol* 12, 185-212.
- Coron, B., Campion, D., Thibaut, F., Dollfus, S., Preterre, P., Langlois, S., Vasse, T., Moreau, V., Martin, C., Charbonnier, F., Laurent, C., Mallet, J., Petit, M.Frebourg, T., 1996. Association study between schizophrenia and monoamine oxidase A and B DNA polymorphisms. *Psychiatry Res* 62, 221-6.
- Craddock, N., Daniels, J., Roberts, E., Rees, M., McGuffin, P.Owen, M.J., 1995. No evidence for allelic association between bipolar disorder and monoamine oxidase A gene polymorphisms. *Am J Med Genet* 60, 322-4.
- Crick, F., 1971. General model for the chromosomes of higher organisms. *Nature* 234, 25-7.
- Cserjesi, P.Olson, E.N., 1991. Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Mol Cell Biol* 11, 4854-62.
- Davis, R.J., D'Cruz, C.M., Lovell, M.A., Biegel, J.A.Barr, F.G., 1994. Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 54, 2869-72.
- Denney, R.M., Koch, H.Craig, I.W., 1999. Association between monoamine oxidase A activity in human male skin fibroblasts and genotype of the MAOA promoter-associated variable number tandem repeat. *Hum Genet* 105, 542-51.
- Deutsch, U., Dressler, G.R.Gruss, P., 1988. Pax1, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. *Cell* 53, 617-25.
- Deutsch, U.Gruss, P., 1991. Murine paired domain protein as regulatory factors of embryonic development. *Semin Dev Biol* 2, 413-24.
- Done, D.J., Crow, T.J., Johnstone, E.C.Sacker, A., 1994. Childhood antecedents of schizophrenia and affective illness: social adjustment at ages 7 and 11. *Bmj* 309, 699-703.
- Dressler, G.R.Douglass, E.C., 1992. Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1179-83.
- Edelman, G.M.Jones, F.S., 1995. Developmental control of N-CAM expression by Hox and Pax gene products. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 349, 305-12.

- Epplen, J.T., Kyas, A., Maueler, W., 1996. Genomic simple repetitive DNAs are targets for differential binding of nuclear proteins. *FEBS Lett* 389, 92-5.
- Epstein, D.J., Vekemans, M., Gros, P., 1991. Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell* 67, 767-74.
- Epstein, D.J., Vogan, K.J., Trasler, D.G., Gros, P., 1993. A mutation within intron 3 of the Pax-3 gene produces aberrantly spliced mRNA transcripts in the splotch (Sp) mouse mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 532-6.
- Epstein, J.A., Lam, P., Jepeal, L., Maas, R.L., Shapiro, D.N., 1995. Pax3 inhibits myogenic differentiation of cultured myoblast cells. *J Biol Chem* 270, 11719-22.
- Epstein, J.A., Shapiro, D.N., Cheng, J., Lam, P.Y., Maas, R.L., 1996. Pax3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4213-8.
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., Jessell, T.M., Briscoe, J., 1997. Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell* 90, 169-80.
- Evans, T., DeChiara, T., Efstratiadis, A., 1988. A promoter of the rat insulin-like growth factor II gene consists of minimal control elements. *J Mol Biol* 199, 61-81.
- Ferre, F., 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR methods and applications* 2, 1-9.
- Flink, I.L., Morkin, E., 1995. Alternatively processed isoforms of cellular nucleic acid-binding protein interact with a suppressor region of the human beta-myosin heavy chain gene. *J Biol Chem* 270, 6959-65.
- Franz, T., 1989. Persistent truncus arteriosus in the splotch mutant mouse. *Anat Embryol* 180, 457-64.
- Franz, T., 1990. Defective ensheathment of motoric nerves in the splotch mutant mouse. *Acta Anat* 138, 246-53.
- Franz, T., Kothary, R., 1993. Characterization of the neural crest defect in Splotch (Sp1H) mutant mice using a lacZ transgene. *Brain Res Dev Brain Res* 72, 99-105.
- Fredericks, W.J., Galili, N., Mukhopadhyay, S., Rovera, G., Bennicelli, J., Barr, F.G., Rauscher, F.J., 3rd, 1995. The PAX3-FKHR fusion protein created by the t(2;13) translocation in alveolar rhabdomyosarcomas is a more potent transcriptional activator than PAX3. *Mol Cell Biol* 15, 1522-35.
- Frigerio, G., Burri, M., Bopp, D., Baumgartner, S., Noll, M., 1986. Structure of the segmentation gene paired and the Drosophila PRD gene set as part of a gene network. *Cell* 47, 735-46.
- Furlong, R.A., Ho, L., Rubinsztein, J.S., Walsh, C., Paykel, E.S., Rubinsztein, D.C., 1999. Analysis of the monoamine oxidase A (MAOA) gene in bipolar affective disorder by association studies, meta-analyses, and sequencing of the promoter. *Am J Med Genet* 88, 398-406.
- Galili, N., Davis, R.J., Fredericks, W.J., Mukhopadhyay, S., Rauscher, F.J., 3rd, Emanuel, B.S., Rovera, G., Barr, F.G., 1993. Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet* 5, 230-5.
- Gerard, M., Abitbol, M., Delezoide, A.L., Dufier, J.L., Mallet, J., Vekemans, M., 1995. PAX-genes expression during human embryonic development, a preliminary report. *C R Acad Sci III* 318, 57-66.
- Ghosh, G., Van Duyne, G.D., 1996. Pieces of the puzzle: assembling the preinitiation complex of Pol II. *Structure* 4, 891-5.
- Giger, R.J., Vogt, L., Zuellig, R.A., Rader, C., Henehan-Beatty, A., Wolfer, D.P., Sonderegger, P., 1995. The gene of chicken axonin-1. Complete structure and analysis of the promoter. *Eur J Biochem* 227, 617-28.

- Glaser, T., Lane, J.Housman, D., 1990. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nat Genet* 2, 232-9.
- Glaser, T., Walton, D.S.Maas, R., 1992. Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *nature Genet* 2, 232-8.
- Goldberg, T.E., Hyde, T.M., Kleinman, J.E.Weinberger, D.R., 1993. Course of schizophrenia: neuropsychological evidence for a static encephalopathy. *Schizophr Bull* 19, 797-804.
- Gossett, L.A., Kelvin, D.J., Sternberg, E.A.Olson, E.N., 1989. A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* 9, 5022-33.
- Gottesman, I., 1991. Schizophrenia genetics. New York: W.H. Freeman.
- Gottesman, I.Schilders, J., 1982. Schizophrenia: The epigenetic puzzle. New York, Cambridge University Press.
- Gotz, M., Stoykova, A.Gruss, P., 1998. Pax6 controls radial glia differentiation in the cerebral cortex. *Neuron* 21, 1031-44.
- Goulding, M., Lumsden, A.Paquette, A.J., 1994. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development* 120, 957-71.
- Goulding, M., Sterrer, S., Fleming, J., Balling, R., Nadeau, J., Moore, K.J., Brown, S.D., Steel, K.P.Gruss, P., 1993a. Analysis of the Pax-3 gene in the mouse mutant *spotch*. *Genomics* 17, 355-63.
- Goulding, M.D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J.R.Gruss, P., 1991. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *Embo J* 10, 1135-47.
- Goulding, M.D., Lumsden, A.Gruss, P., 1993b. Signals from the notochord and floor plate regulate the region-specific expression of two Pax genes in the developing spinal cord. *Development* 117, 1001-16.
- Grindley, J.C., Hargett, L.K., Hill, R.E., Ross, A.Hogan, B.L., 1997. Disruption of PAX6 function in mice homozygous for the Pax6^{Sey-1Neu} mutation produces abnormalities in the early development and regionalization of the diencephalon. *Mech Dev* 64, 111-26.
- Gruss, P., Tremblay, P., Stoykova, A., Stuart, E.Mansouri, A., 1995. Pax genes in development and oncogenesis (abstract). *Med Genetik* 2, 113-4.
- Gruss, P.Walther, C., 1992. Pax in development. *Cell* 69, 719-22.
- Hamada, H.Kakunaga, T., 1982. Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* 298, 396-8.
- Haniford, D.B.Pulleyblank, D.E., 1983. Facile transition of poly[d(TG) x d(CA)] into a left-handed helix in physiological conditions. *Nature* 302, 632-4.
- Hardison, R., Slightom, J.L., Gumucio, D.L., Goodman, M., Stojanovic, N.Miller, W., 1997. Locus control regions of mammalian beta-globin gene clusters: combining phylogenetic analyses and experimental results to gain functional insights. *Gene* 205, 73-94.
- Harrison, P.J., 1997. Schizophrenia and its dementia. In *The Neuropathology of Dementia* Edited by Esiri MM, Moris JH, 383-395.
- Harrison, P.J., 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122, 593-624.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stöber, G., Riederer, P., Bengel, D., Lesch, K.P., 1996. Allelic Variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 66, 2621-4.
- Heils, A., Wichems, C., Mossner, R., Petri, S., Glatz, K., Bengel, D., Murphy, D.L.Lesch, K.P., 1998. Functional

- characterization of the murine serotonin transporter gene promoter in serotonergic raphe neurons. *J Neurochem* 70, 932-9.
- Heinemeyer, T., Chen, X., Karas, H., Kel, A.E., Kel, O.V., Liebich, I., Meinhardt, T., Reuter, I., Schacherer, F., Wingender, E., 1999. Expanding the TRANSFAC database towards an expert system of regulatory molecular mechanisms. *Nucleic Acids Res* 27, 318-22.
- Hobson, G.M., Molloy, G.R., Benfield, P.A., 1990. Identification of cis-acting regulatory elements in the promoter region of the rat brain creatine kinase gene. *Mol Cell Biol* 10, 6533-43.
- Hogan, B.L.M., Horsburgh, G., Cohen, J., Hetherington, C.M., Fischer, G., Lyon, M.F., 1986. Small eyes (Sey): a homozygous lethal mutation on chromosome 2 which affects the differentiation of both lens and nasal placodes in the mouse. *J Embryol Exp Morph* 97, 95-110.
- Holst, B.D., Wang, Y., Jones, F.S., Edelman, G.M., 1997. A binding site for Pax proteins regulates expression of the gene for the neural cell adhesion molecule in the embryonic spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1465-70.
- Hoth, C.F., Milunsky, A., Lipsky, N., Sheffer, R., Clarren, S.K., Baldwin, C.T., 1993. Mutations in the paired domain of the human PAX3 gene cause Klein-Waardenburg syndrome (WS-III) as well as Waardenburg syndrome type I (WS-I). *Am J Hum Genet* 52, 455-62.
- Ibaraki, K., Robey, P.G., Young, M.F., 1993. Partial characterization of a novel 'GGA' factor which binds to the osteonectin promoter in bovine bone cells. *Gene* 130, 225-32.
- Jaakkola, P., Vihinen, T., Maatta, A., Jalkanen, M., 1997. Activation of an enhancer on the syndecan-1 gene is restricted to fibroblast growth factor family members in mesenchymal cells. *Mol Cell Biol* 17, 3210-9.
- Johnson, A.C., Jinno, Y., Merlino, G.T., 1988. Modulation of epidermal growth factor receptor proto-oncogene transcription by a promoter site sensitive to S1 nuclease. *Mol Cell Biol* 8, 4174-84.
- Johnson, P.F., McKnight, S.L., 1989. Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem* 58, 799-839.
- Jones, P., Rodgers, B., Murray, R., Marmot, M., 1994. Child development risk factors for adult schizophrenia in the British 1946 birth cohort. *Lancet* 344, 1398-402.
- Jostes, B., Walther, C., Gruss, P., 1991. The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech Dev* 33, 27-37.
- Kashi, Y., King, D., Soller, M., 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet* 13, 74-8.
- Kaufmann, J., Smale, S.T., 1994. Direct recognition of initiator elements by a component of the transcription factor IID complex. *Genes Dev* 8, 821-9.
- Kay, P.H., Harmon, D., Fletcher, S., Robertson, T., Ziman, M., Papadimitriou, J.M., 1998. Pax7 includes two polymorphic homeoboxes which contain rearrangements associated with differences in the ability to regenerate damaged skeletal muscle in adult mice. *Int J Biochem Cell Biol* 30, 261-9.
- Kay, P.H., Mitchell, C.A., Akkari, A., Papadimitriou, J.M., 1995. Association of an unusual form of a Pax7-like gene with increased efficiency of skeletal muscle regeneration. *Gene* 163, 171-7.
- Kelm, R.J., Jr., Cogan, J.G., Elder, P.K., Strauch, A.R., Getz, M.J., 1999. Molecular interactions between single-stranded DNA-binding proteins associated with an essential MCAT element in the mouse smooth muscle alpha-actin promoter. *J Biol Chem* 274, 14238-45.
- Kendler, K.S., Davis, K.L., 1981. The genetics and biochemistry of paranoid schizophrenia and other paranoid

- psychoses. *Schizophr Bull* 7, 689-709.
- Kendler, K.S., Diehl, S.R., 1993. The genetics of schizophrenia: a current genetic-epidemiologic perspective. *Schizophr Bull* 19, 261-285.
- Kennedy, G.C., German, M.S., Rutter, W.J., 1995. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription. *Nature Genet* 9, 293-8.
- Kessel, M., Gruss, P., 1990. Murine developmental control genes. *Science* 249, 374-9.
- Kinniburgh, A.J., 1989. A cis-acting transcription element of the c-myc gene can assume an H-DNA conformation. *Nucleic Acids Res* 17, 7771-8.
- Kioussi, C., O'Connell, S., St-Onge, L., Treier, M., Gleiberman, A.S., Gruss, P., Rosenfeld, M.G., 1999. Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14378-82.
- Kirov, G., Norton, N., Jones, I., McCandless, F., Craddock, N., Owen, M.J., 1999. A functional polymorphism in the promoter of monoamine oxidase A gene and bipolar affective disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2, 293-298.
- Knowles, J.A., Fyer, A.J., Vieland, V.J., Weissman, M.M., Hodge, S.E., Heimann, G.A., Haghghi, F., deJesus, G.M., Rassnick, H., Preud'homme-Rivelli, X., Austin, T., Cunjak, J., Mick, S., Fine, L.D., Woodley, K.A., Das, K.A., Maier, W., Adams, P.B., Freimer, N.B., Klein, D.F., Gilliam, T.C., 1998. Results of a genome-wide genetic screen for panic disorder. *Am J Med Genet* 81, 139-47.
- Kogan, S.C., Doherty, M., Gitschier, J., 1987. An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. Application to hemophilia A. *N Engl J Med* 317, 985-90.
- Kozlov, S.V., Giger, R.J., Hasler, T., Korvatska, E., Schorderet, D.F., Sonderegger, P., 1995. The human TAX1 gene encoding the axon-associated cell adhesion molecule TAG-1/axonin-1: genomic structure and basic promoter. *Genomics* 30, 141-8.
- Kozmik, Z., Czerny, T., Busslinger, M., 1997. Alternatively spliced insertions in the paired domain restrict the DNA sequence specificity of Pax6 and Pax8. *Embo J* 16, 6793-803.
- Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V., Moens, U., Ericson, J., Ulfjose, A., 1991. Zebrafish pax[zf-a]: a paired box-containing gene expressed in the neural tube. *Embo J* 10, 3609-19.
- Krontiris, T.G., 1995. Minisatellites and human disease. *Science* 269, 1682-3.
- Kunugi, H., Ishida, S., Kato, T., Tatsumi, M., Sakai, T., Hattori, M., Hirose, T., Nanko, S., 1999. A functional polymorphism in the promoter region of monoamine oxidase-A gene and mood disorders. *Mol Psychiatry* 4, 393-5.
- Lafyatis, R., Denhez, F., Williams, T., Sporn, M., Roberts, A., 1991. Sequence specific protein binding to and activation of the TGF-beta 3 promoter through a repeated TCCC motif. *Nucleic Acids Res* 19, 6419-25.
- Lalwani, A.K., Brister, J.R., Fex, J., Grundfast, K.M., Ploplis, B., San Agustin, T.B., Wilcox, E.R., 1995. Further elucidation of the genomic structure of PAX3, and identification of two different point mutations within the PAX3 homeobox that cause Waardenburg syndrome type 1 in two families. *Am J Hum Genet* 56, 75-83.
- Lesch, K.P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S.Z., Greenberg, B.D., Petri, S., Benjamin, J., Muller, C.R., Hamer, D.H., Murphy, D.L., 1996. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274, 1527-31.
- Levy, E.R., Powell, J.F., Buckle, V.J., Hsu, Y.P., Breakefield, X.O., Craig, I.W., 1989. Localization of human

- monoamine oxidase-A gene to Xp11.23-11.4 by in situ hybridization: implications for Norrie disease. *Genomics* 5, 368-70.
- Lewis, S., 1996. Structural brain imaging in biological psychiatry. *Br Med Bull* 52, 465-73.
- Liu, L.F.Wang, J.C., 1987. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7024-7.
- Lou, H., Helfman, D.M., Gagel, R.F.Berget, S.M., 1999. Polypyrimidine tract-binding protein positively regulates inclusion of an alternative 3'-terminal exon. *Mol Cell Biol* 19, 78-85.
- Macina, R.A., Barr, F.G., Galili, N.Riethman, H.C., 1995. Genomic organization of the human PAX3 gene: DNA sequence analysis of the region disrupted in alveolar rhabdomyosarcoma. *Genomics* 26, 1-8.
- Maina, F., Casagrande, F., audero, E., Simeone, A., Comoglio, P.M., Klein, R.Ponzetto, C., 1996. Uncoupling of Grb2 from the Met receptor in vivo reveals complex roles in muscle development. *Cell* 87, 531-42.
- Marcelle, C., Wolf, J.Bronner-Fraser, M., 1995. The in vivo expression of the FGF receptor FREK mRNA in avian myoblasts suggests a role in muscle growth and differentiation. *Dev Biol* 172, 100-14.
- Maroto, M., Reshef, R., Munsterberg, A.E., Koester, S., Goulding, M.Lassar, A.B., 1997. Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell* 89, 139-48.
- Marsh, L., Suddath, R.L., Higgins, N.Weinberger, D.R., 1994. Medial temporal lobe structures in schizophrenia: relationship of size to duration of illness. *Schizophr Res* 11, 225-38.
- Mastick, G.S., Davis, N.M., Andrew, G.L.Easter, S.S., Jr., 1997. Pax-6 functions in boundary formation and axon guidance in the embryonic mouse forebrain. *Development* 124, 1985-97.
- Maul, R.S., Zhang, H., Reid, J.D.t., Pedigo, N.G.Kaetzel, D.M., 1998. Identification of a cell type-specific enhancer in the distal 5'-region of the platelet-derived growth factor A-chain gene. *J Biol Chem* 273, 33239-46.
- McGlashan, T.H.Fenton, W.S., 1991. Classical subtypes for schizophrenia: literature review for DSM-IV. *Schizophr Bull* 17, 609-32.
- McGue, M.Gottesman, I., 1989. Genetic linkage in schizophrenia: perspectives from genetic epidemiology. *Schizophr Bull* 15, 453-464.
- McGue, M., Gottesman, I.Rao, D.C., 1983. The transmission of schizophrenia under a multilocus threshold mode. *Am J Hum Genet* 35, 1161-1178.
- McGue, M., Gottesman, I.Rao, D.C., 1986. The analysis of schizophrenia family data. *Behav Genet* 16, 75-87.
- McKenna, P.J., 1994. Schizophrenia and related syndromes. Oxford: Oxford University Press.
- Michelotti, E.F., Tomonaga, T., Krutzsch, H.Levens, D., 1995. Cellular nucleic acid binding protein regulates the CT element of the human c-myc protooncogene. *J Biol Chem* 270, 9494-9.
- Michelotti, G.A., Michelotti, E.F., Pullner, A., Duncan, R.C., Eick, D.Levens, D., 1996. Multiple single-stranded cis elements are associated with activated chromatin of the human c-myc gene in vivo. *Mol Cell Biol* 16, 2656-69.
- Mirkin, S.M.Frank-Kamenetskii, M.D., 1994. H-DNA and related structures. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 23, 541-76.
- Mitas, M., 1997. Trinucleotide repeats associated with human disease. *Nucleic Acids Res* 25, 2245-54.
- Moyzis, R.K., Torney, D.C., Meyne, J., Buckingham, J.M., Wu, J.R., Burks, C., Sirotkin, K.M.Goad, W.B., 1989. The distribution of interspersed repetitive DNA sequences in the human genome. *Genomics* 4, 273-89.

- Muller, V., Takeya, M., Brendel, S., Wittig, B.Rich, A., 1996. Z-DNA-forming sites within the human beta-globin gene cluster. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 780-4.
- Mullis, K.B.Faloona, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-50.
- Muramatsu, T., Matsushita, S., Kanba, S., Higuchi, S., Manki, H., Suzuki, E.Asai, M., 1997. Monoamine oxidase genes polymorphisms and mood disorder. *Am J Med Genet* 74, 494-6.
- Murphy, D.L., Sims, K.B., Karoum, F., de la Chapelle, A., Norio, R., Sankila, E.M.Breakefield, X.O., 1990. Marked amine and amine metabolite changes in Norrie disease patients with an X-chromosomal deletion affecting monoamine oxidase. *J Neurochem* 54, 242-7.
- Murphy, D.L., Sims, K.B., Karoum, F., Garrick, N.A., de la Chapelle, A., Sankila, E.M., Norio, R.Breakefield, X.O., 1991. Plasma amine oxidase activities in Norrie disease patients with an X- chromosomal deletion affecting monoamine oxidase. *J Neural Transm Gen Sect* 83, 1-12.
- Murray, R.M.Lewis, S.W., 1987. Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder? *Br Med J (Clin Res Ed)* 295, 681-2.
- Nasrallah, H.A., 1993. Neurodevelopmental pathogenesis of schizophrenia. *Psychiatr Clin North America* 16, 269-280.
- Natoli, T.A., Ellsworth, M.K., Wu, C., Gross, K.W.Pruitt, S.C., 1997. Positive and negative DNA sequence elements are required to establish the pattern of Pax3 expression. *Development* 124, 617-26.
- Naylor, L.H.Clark, E.M., 1990. d(TG)n.d(CA)n sequences upstream of the rat prolactin gene form Z-DNA and inhibit gene transcription. *Nucleic Acids Res* 18, 1595-601.
- Newton, W.A., Gehan, E.A., Webber, B.L., Marsden, H.B., van Unnik, A.J., Hamoudi, A.B., Tsokos, M.G., Shimada, H., Harms, D., Schmidt, D., Ninfo, V., Cavazzana, A.O., Gomzales-Crussi, F.Parham, D.M., 1995. Classification of rhabdomyosarcoma and related sarcomas: pathologic aspects and proposal for a new classification - an Intergroup Rhabdomyosarcomas Study. *Cancer* 76, 1073-85.
- Nicolet, G., The young notochord can induce somite genesis by means of diffusible substances in the chick. *Experientia* 27, 938-9.
- Nicolet, G., 1970. Is the presumptive notochord responsible for somite genesis in the chick? *J Embryol Exp Morph* 24, 467-478.
- Noll, M., 1993. Evolution and role of Pax genes. *Curr Opin Genet Dev* 3, 595-605.
- Nordheim, A., Tesser, P., Azorin, F., Kwon, Y.H., Möler, A.Rich, A., 1982. Isolation of Drosophila proteins that bind selectively to left-handed Z-DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7729-33.
- Nordheim, A.Rich, A., 1983a. Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z-DNA segments within transcriptional enhancer sequences. *Nature* 303, 674-9.
- Nordheim, A.Rich, A., 1983b. The sequence (dC-dA)n X (dG-dT)n forms left-handed Z-DNA in negatively supercoiled plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 1821-5.
- Nothen, M.M., Eggermann, K., Albus, M., Borrmann, M., Rietschel, M., Korner, J., Maier, W., Minges, J., Lichtermann, D., Franzek, E.et al., 1995. Association analysis of the monoamine oxidase A gene in bipolar affective disorder by using family-based internal controls. *Am J Hum Genet* 57, 975-8.
- Okladnova, O., Syagailo, Y.V., Mossner, R., Riederer, P.Lesch, K.P., 1998. Regulation of PAX-6 gene transcription: alternate promoter usage in human brain. *Brain Res Mol Brain Res* 60, 177-92.
- Okladnova, O., Syagailo, Y.V., Tranitz, M., Riederer, P., Stober, G., Mossner, R.Lesch, K.P., 1999. Functional

- characterization of the human PAX3 gene regulatory region. *Genomics* 57, 110-9.
- Orgel, L.E., Crick, F.H.Sapientza, C., 1980. Selfish DNA. *Nature* 288, 645-6.
- Osumi, N., Hirota, A., Ohuchi, H., Nakafuku, M., Iimura, T., Kuratani, S., Fujiwara, M., Noji, S.Eto, K., 1997. Pax-6 is involved in the specification of hindbrain motor neuron subtype. *Development* 124, 2961-72.
- Owen, M.J.McGuffin, P., 1993. Association and linkage: complementary strategies for complex disorders. *J Med Genet* 30, 638-9.
- Ozelius, L., Hsu, Y.P., Bruns, G., Powell, J.F., Chen, S., Weyler, W., Utterback, M., Zucker, D., Haines, J., Trofatter, J.A. et al., 1988. Human monoamine oxidase gene (MAOA): chromosome position (Xp21-p11) and DNA polymorphism. *Genomics* 3, 53-8.
- Parsian, A.Todd, R.D., 1997. Genetic association between monoamine oxidase and manic-depressive illness: comparison of relative risk and haplotype relative risk data. *Am J Med Genet* 74, 475-9.
- Perrone-Bizzozero, N.I., Sower, A.C., Bird, E.D., Benowitz, L.I., Ivins, K.J.Neve, R.L., 1996. Levels of the growth-associated protein GAP-43 are selectively increased in association cortices in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14182-7.
- Pestov, D.G., Dayn, A., Siyanova, E., George, D.L.Mirkin, S.M., 1991. H-DNA and Z-DNA in the mouse c-Ki-ras promoter. *Nucleic Acids Res* 19, 6527-32.
- Poleev, A., Wendler, F., Fickenscher, H., Zannini, M.S., Yaginuma, K., Abbott, C.Plachov, D., 1995. Distinct functional properties of three human paired-box-protein, PAX8, isoforms generated by alternative splicing in thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Eur J Biochem* 228, 899-911.
- Politi, E., Balduzzi, C., Bussi, R.Bellodi, L., 1999. Artificial neural networks: a study in clinical psychopharmacology. *Psychiatry Res* 87, 203-15.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E.Werner, T., 1995. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23, 4878-84.
- Rao, D.C., Morton, N.E., Gottesman, I.Lew, R., 1981. Path analysis of qualitative data on pairs of relatives: application to schizophrenia. *Hum Hered* 31, 325-333.
- Read, A., 1995. Pax genes-paired feet in three camps. *Nature Genet* 9.
- Rich, A., Nordheim, A.Wang, A.H., 1984. The chemistry and biology of left-handed Z-DNA. *Annu Rev Biochem* 53, 791-846.
- Risch, N., 1990. Genetic linkage and complex diseases, with special reference to psychiatric disorders. *Genet Epidemiol* 7, 3-16.
- Risch, N.Merikangas, K., 1996. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273, 1516-7.
- Ritchie, S., Boyd, F.M., Wong, J.Bonham, K., 2000. Transcription of the human c-Src promoter is dependent on Sp1, a novel pyrimidine binding factor SPy, and can be inhibited by triplex-forming oligonucleotides. *J Biol Chem* 275, 847-54.
- Roberts, G.W., 1990. Schizophrenia: the cellular biology of a functional psychosis. *Trends Neurosci* 13, 207-11.
- Roberts, G.W., 1997. Schizophrenia. In *Greenfields Neuropathology* Edited by Graham D., Lantos P., 897-930.
- Rustighi, A., Tessari, M.A., Vascotto, F., Sgarra, R., Giancotti, V.Manfioletti, G., 2002. A polypyrimidine/polypurine tract within the Hmga2 minimal promoter: a common feature of many growth-related genes. *Biochem* 41, 1229-40.
- Sabol, S.Z., Hu, S.Hamer, D., 1998. A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter.

- Hum Genet 103, 273-9.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-4.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Samochowicz, J., Lesch, K.P., Rottmann, M., Smolka, M., Syagailo, Y.V., Okladnova, O., Rommelspacher, H., Winterer, G., Schmidt, L.G., Sander, T., 1999a. Association of a regulatory polymorphism in the promoter region of the monoamine oxidase A gene with antisocial alcoholism. *Psychiatry Res* 86, 67-72.
- Samochowicz, J., Rottmann, M., Okladnova, O., Syagailo, Y., Stöber, G., Sander, T., Mühlbauer, E., Smolka, M., Tranitz, M., Winterer, G., Rommelspacher, H., Schmidt, L.G., Lesch, K.P., 1999b. Association analysis of PAX-6 gene promoter-associated polymorphic repeat with alcohol dependence. *Addiction Biology* 4, 323-8.
- Sander, M., Neubuser, A., Kalamaras, J., Ee, H.C., Martin, G.R., German, M.S., 1997. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev* 11, 1662-73.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.
- Schafer, B.W., Czerny, T., Bernasconi, M., Genini, M., Busslinger, M., 1994. Molecular cloning and characterization of a human PAX-7 cDNA expressed in normal and neoplastic myocytes. *Nucleic Acids Res* 22, 4574-82.
- Schafer, B.W., Mattei, M.G., 1993. The human paired domain gene PAX7 (Hup1) maps to chromosome 1p35-1p36.2. *Genomics* 17, 249-51.
- Schroth, G.P., Chou, P.J., Ho, P.S., 1992. Mapping Z-DNA in the human genome. Computer-aided mapping reveals a nonrandom distribution of potential Z-DNA-forming sequences in human genes. *J Biol Chem* 267, 11846-55.
- Schubert, F.R., Nieselt-struwe, K., Gruss, P., 1993. The Antennapedia-type homeobox genes have evolved from three precursors separated early in metazoan evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 143-7.
- Seale, P., Rudnicki, M.A., 2000. A new look at the origin, function and 'stem cell' status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218, 115-124.
- Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., Rudnicki, M.A., 2000. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell* 102, 777-86.
- Shapiro, D.N., Sublett, J.E., Li, B., Downing, J.R., Naeve, C.W., 1993a. Fusion of PAX3 to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 53, 5108-12.
- Shapiro, D.N., Sublett, J.E., Li, B., Valentine, M.B., Morris, S.W., Noll, M., 1993b. The gene for PAX7, a member of the paired-box-containing genes, is localized on human chromosome arm 1p36. *Genomics* 17, 767-9.

- Shimajiri, S., Arima, N., Tanimoto, A., Murata, Y., Hamada, T., Wang, K.Y., Sasaguri, Y., 1999. Shortened microsatellite d(CA)₂₁ sequence down-regulates promoter activity of matrix metalloproteinase 9 gene. *FEBS Lett* 455, 70-4.
- Sibley, E., Kastelic, T., Kelly, T.J., Lane, M.D., 1989. Characterization of the mouse insulin receptor gene promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9732-6.
- Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A., 1995. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 23, 1087-8.
- Sims, K.B., Ozelius, L., Corey, T., Rinehart, W.B., Liberfarb, R., Haines, J., Chen, W.J., Norio, R., Sankila, E., de la Chapelle, A. et al., 1989. Norrie disease gene is distinct from the monoamine oxidase genes. *Am J Hum Genet* 45, 424-34.
- Sinden, R.R.: *Dna structure and function*. Academic Press, San Diego, 1994.
- Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-17.
- Soyfer, V.N., Potaman, V.N.: *Triple-helical nucleic acids*. Springer, New York, 1996.
- Stallings, R.L., Torney, D.C., Hildebrand, C.E., Longmire, J.L., Deaven, L.L., Jett, J.H., Doggett, N.A., Moyzis, R.K., 1990. Physical mapping of human chromosomes by repetitive sequence fingerprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6218-22.
- Stayner, C.K., Cunliffe, H.E., Ward, T.A., Eccles, M.R., 1998. Cloning and characterization of the human PAX2 promoter. *J Biol Chem* 273, 25472-9.
- Stoykova, A., Fritsch, R., Walther, C., Gruss, P., 1996. Forebrain patterning defects in Small eye mutant mice. *Development* 122, 3453-65.
- Stoykova, A., Gruss, P., 1994. Roles of Pax-genes in developing and adult brain as suggested by expression patterns. *J Neurosci* 14, 1395-412.
- Sublett, J.E., Jeon, I.S., Shapiro, D.N., 1995. The alveolar rhabdomyosarcoma PAX3/FKHR fusion protein is a transcriptional activator. *Oncogene* 11, 545-52.
- Sun, T., Pringle, N.P., Hardy, A.P., Richardson, W.D., Smith, H.K., 1998. Pax6 influences the time and site of origin of glial precursors in the ventral neural tube. *Mol Cell Neurosci* 12, 228-39.
- Tajbakhsh, S., Rocancourt, D., Cossu, G., Buckingham, M., 1997. Redefining the genetic hierarchies controlling skeletal myogenesis: Pax-3 and Myf-5 act upstream of MyoD. *Cell* 89, 127-38.
- Terzic, J., Saraga-Babic, M., 1999. Expression pattern of PAX3 and PAX6 genes during human embryogenesis. *Int J Dev Biol* 43, 501-8.
- Tewari, D.S., Cook, D.M., Taub, R., 1989. Characterization of the promoter region and 3' end of the human insulin receptor gene. *J Biol Chem* 264, 16238-45.
- Thaker, G.K., Carpenter, W.T., 2001. Advances in schizophrenia. *Nature Medicine* 7, 667-671.
- Tomonaga, T., Levens, D., 1996. Activating transcription from single stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5830-5.
- Treisman, J., Harris, E., Desplan, C., 1991. The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes Dev* 5, 594-604.
- Tremblay, P., Gruss, P., 1994. Pax: genes for mice and men. *Pharmacol Ther* 61, 205-26.
- Tremblay, P., Kessel, M., Gruss, P., 1995. A transgenic neuroanatomical marker identifies cranial neural crest deficiencies associated with the Pax3 mutant Splotch. *Dev Biol* 171, 317-29.

- Tsuang, M.T., Bucher, K.D.Fleming, J.A., 1982. Testing the monogenetic theory of schizophrenia: an application of segregation analysis to blind family study data. *Br J Psychiatry* 140, 595-599.
- Tsuang, M.T.Faraone, S.V., 1995. The case for heterogeneity in the etiology of schizophrenia. *Schizophr Res* 17, 161-75.
- Tsukamoto, K., Nakamura, Y.Niikawa, N., 1994. Isolation of two isoforms of the PAX3 gene transcripts and their tissue- specific alternative expression in human adult tissues. *Hum Genet* 93, 270-4.
- Turque, N., Plaza, S., Radvanyi, F., Carriere, C.Saule, S., 1994. Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol Endocrinol* 8, 929-38.
- Tyrer, P.Shawcross, C., 1988. Monoamine oxidase inhibitors in anxiety disorders. *J Psychiatr Res* 22, 87-98.
- van der Velden, A.W.Thomas, A.A., 1999. The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol* 31, 87-106.
- Vogan, K.J., Underhill, D.A.Gros, P., 1996. An alternative splicing event in the Pax-3 paired domain identifies the linker region as a key determinant of paired domain DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* 16, 6677-86.
- Vorobyov, E., Mertsalov, I., Dockhorn-Dworniczak, B., Dworniczak, B.Horst, J., 1997. The genomic organization and the full coding region of the human PAX7 gene. *Genomics* 45, 168-74.
- Wachter, F.Christ, B., 1992. The basic embryology of skeletal muscle formation in vertebrates: the avian model. *Semin Dev Biol* 3, 217-27.
- Waddington, J.L., 1993. Schizophrenia: developmental neuroscience and pathobiology. *Lancet* 341, 531-6.
- Walker, E.F., 1994. Developmentally moderated expressions of the neuropathology underlying schizophrenia. *Schizophr Bull* 20, 453-80.
- Walker, E.F., Savoie, T.Davis, D., 1994. Neuromotor precursors of schizophrenia. *Schizophr Bull* 20, 441-51.
- Walther, C.Gruss, P., 1991. Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113, 1435-49.
- Walther, C., Guenet, J.L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M.D., Plachov, D., Balling, R.Gruss, P., 1991. Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics* 11, 424-34.
- Wang, A.H., Quigley, G.J., Kolpak, F.J., Crawford, J.L., van Boom, J.H., van der Marel, G.Rich, A., 1979. Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature* 282, 680-6.
- Wang, Z., Lin, X.H., Qiu, Q.Q.Deuel, T.F., 1992. Modulation of transcription of the platelet-derived growth factor A-chain gene by a promoter region sensitive to S1 nuclease. *J Biol Chem* 267, 17022-31.
- Warren, N.Price, D.J., 1997. Roles of Pax-6 in murine diencephalic development. *Development* 124, 1573-82.
- Weeks, D.E.Lathrop, M., 1995. Polygenic disease: methods for mapping complex disease traits. *Trends Genet* 11, 513-19.
- Weinberger, D.R., 1987. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 44, 660-9.
- Weinberger, D.R., 1995. From neuropathology to neurodevelopment. *Lancet* 346, 552-7.
- Weinberger, D.R., 1996. On the plausibility of "the neurodevelopmental hypothesis" of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 14, 1S-11S.
- Williams, B.A.Ordahl, C.P., 1994. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell

- specification. *Development* 120, 785-96.
- Williams, J., Farmer, A.E., Ackenheil, M., Kaufmann, C.A.McGuffin, P., 1996. A multicentre inter-rater reliability study using the OPCRIT computerized diagnostic system. *Psychol Med* 26, 775-83.
- Wittig, B., Wolfl, S., Dorbic, T., Vahrson, W.Rich, A., 1992. Transcription of human c-myc in permeabilized nuclei is associated with formation of Z-DNA in three discrete regions of the gene. *Embo J* 11, 4653-63.
- Wolfl, S., Martinez, C., Rich, A.Majzoub, J.A., 1996. Transcription of the human corticotropin-releasing hormone gene in NPLC cells is correlated with Z-DNA formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3664-8.
- Wu, T., Ikezono, T., Angus, C.W.Shelhamer, J.H., 1994. Characterization of the promoter for the human 85 kDa cytosolic phospholipase A2 gene. *Nucleic Acids Res* 22, 5093-8.
- Yang, X.M., Vogan, K., Gros, P.Park, M., 1996. Expression of the met receptor tyrosine kinase in muscle progenitor cells in somites and limbs is absent in Splotch mice. *Development* 122, 2163-71.
- Young, M.F., Findlay, D.M., Dominguez, P., Burbelo, P.D., McQuillan, C., Kopp, J.B., Robey, P.G.Termin, J.D., 1989. Osteonectin promoter. DNA sequence analysis and S1 endonuclease site potentially associated with transcriptional control in bone cells. *J Biol Chem* 264, 450-6.
- Zalewski, C., Johnson-Selfridge, M.T., Ohriner, S., Zarrella, K.Seltzer, J.C., 1998. A review of neuropsychological differences between paranoid and nonparanoid schizophrenia patients. *Schizophr Bull* 24, 127-45.
- Ziman, M.R., Fletcher, S.Kay, P.H., 1997. Alternate Pax7 transcripts are expressed specifically in skeletal muscle, brain and other organs of adult mice. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1029-36.

Eigene Veröffentlichungen

1. Syagailo, Y.V., Okladnova, O., Reimer, E., Grässle, M., Gattenlöhner, S., Marx, A., Meyer, J., Lesch, K.P. (2002). **Structural and functional characterisation of the human *PAX7* 5'-flanking regulatory region.** *Gene* 294, 259-68.
2. Müller, D.J., Schulze, T.G., Macciardi, F., Ohlraun, S., Gross, M.M., Scherk, H., Neidt, H., Syagailo, Y.V., Grässle, M., Nothen, M.M., Maier, W., Lesch, K.P., Rietschel, M. (2002). **Moclobemide response in depressed patients: association study with a functional polymorphism in the monoamine oxidase A promoter.** *Pharmacopsychiatry* 35, 157-8.
3. Syagailo, Y.V., Stöber, G., Grässle, M., Reimer, E., Knapp, M., Jungkunz, G., Okladnova, O., Meyer, J., Lesch, K.P. (2001). **Association analysis of the functional monoamine oxidase A gene promoter polymorphism in psychiatric disorders.** *Am J Med Genet* 105, 168-71.
4. Meyer, J., Huberth, A., Ortega, G., Syagailo, Y.V., Jatzke, S., Mössner, R., Strom, T.M., Ulzheimer-Teuber, I., Stöber, G., Schmitt, A., Lesch, K.P. (2001). **A missense mutation in a novel gene encoding a putative cation channel is associated with catatonic schizophrenia in a large pedigree.** *Mol Psychiatry* 6, 302-6.
5. Mössner, R., Henneberg, A., Schmitt, A., Syagailo, Y.V., Grässle, M., Hennig, T., Simantov, R., Gerlach, M., Riederer, P., Lesch, K.P. (2001). **Allelic variation of serotonin transporter expression is associated with depression in Parkinson's disease.** *Mol Psychiatry* 6, 350-2.
6. Mössner, R., Schmitt, A., Syagailo, Y., Gerlach, M., Riederer, P., Lesch, K.P. (2000). **The serotonin transporter in Alzheimer's and Parkinson's disease.** *J Neural Transm Suppl* 60, 345-50.
7. Sand, P., Lesch, K.P., Catalano, M., Bosi, M., Syagailo, Y.V., Okladnova, O., Di Bella, D., Maffei, P., Heils, A., Friess, F., Politi, E., Nöthen, M.M., Franke, P., Stöber, G., Fritze, J., Maier, W., Propping, P., Beckmann, H., Bellodi, L., Riederer, P., Deckert, J. (2000). **Polymorphic MAO-A and 5-HT-transporter genes: analysis of interactions in panic disorder.** *World J Biol Psychiatry* 1, 147-50.
8. Schulze, T.G., Müller, D.J., Krauss, H., Scherk, H., Ohlraun, S., Syagailo, Y.V., Windemuth, C., Neidt, H., Grässle, M., Papassotiropoulos, A., Heun, R., Nothen, M.M., Maier, W., Lesch, K.P., Rietschel, M. (2000). **Association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter and major depressive disorder.** *Am J Med Genet* 96, 801-3.
9. Okladnova, O., Syagailo, Y.V., Tranitz, M., Riederer, P., Stöber, G., Mössner, R., Lesch, K.P. (1999). **Functional characterization of the human *PAX3* gene regulatory region.** *Genomics* 57, 110-9.

10. Stöber, G., Syagailo, Y.V., Okladnova, O., Jungkunz, G., Knapp, M., Beckmann, H., Lesch, K.P. (1999). **Functional PAX-6 gene-linked polymorphic region: potential association with paranoid schizophrenia.** Biol Psychiatry 45, 1585-91.
11. Deckert, J., Catalano, M., Syagailo, Y.V., Bosi, M., Okladnova, O., Di Bella, D., Nothen, M.M., Maffei, P., Franke, P., Fritze, J., Maier, W., Propping, P., Beckmann, H., Bellodi, L., Lesch, K.P. (1999). **Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder.** Hum Mol Genet 8, 621-4.
12. Sander, T., Syagailo, Y., Samochowiec, J., Okladnova, O., Lesch, K.P., Janz, D. (1999). **Association analysis of a regulatory promoter polymorphism of the PAX-6 gene with idiopathic generalized epilepsy.** Epilepsy Res 36, 61-7.
13. Samochowiec, J., Lesch, K.P., Rottmann, M., Smolka, M., Syagailo, Y.V., Okladnova, O., Rommelspacher, H., Winterer, G., Schmidt, L.G., Sander, T. (1999). **Association of a regulatory polymorphism in the promoter region of the monoamine oxidase A gene with antisocial alcoholism.** Psychiatry Res 86, 67-72.
14. Samochowiec, J., Rottmann, M., Okladnova, O., Syagailo, Y.V., Stöber, G., Sander, T., Mühlbauer, E., Smolka, M., Tranitz, M., Winterer, G., Rommelspacher, H., Schmidt, L.G., Lesch, K.P. (1999). **Association analysis of PAX-6 gene promoter-associated polymorphic repeat with alcohol dependence.** Addiction Biology 4, 323-328.
15. Flatz, G., Wilke, K., Syagailo, Y.V., Eigel, A., Horst, J. (1999). **Beta-thalassemia in the German population: mediterranean, Asian and novel mutations.** Mutations in brief no.228. Online. Hum Mutat 13, 258.
16. Okladnova, O., Syagailo, Y.V., Tranitz, M., Stöber, G., Riederer, P., Mossner, R., Lesch, K.P. (1998). **A promoter-associated polymorphic repeat modulates PAX-6 expression in human brain.** Biochem Biophys Res Commun 248, 402-5.
17. Okladnova, O., Syagailo, Y.V., Mössner, R., Riederer, P., Lesch, K.P. (1998). **Regulation of PAX-6 gene transcription: alternate promoter usage in human brain.** Mol Brain Res 60, 177-92.
18. Syagailo, Y., Wilke, K., Okladnova, O., Eigel, A., Lemmens, M., Kramarov, V., Horst, J. (1998). **Different ocular abnormalities in individuals of a three-generation family caused by a new nonsense mutation in the PST domain of the PAX6 gene.** Mutations in brief no. 189. Online. Hum Mutat 12, 288.
19. Klyushnichenko, V.E., Syagailo, Y.V. (1997). **Chromatographic and membrane purification of polypeptide compounds from honey bee venom.** J of Nat Toxins 6, 111-19.
20. Klyushnichenko, V.E., Yakimov, S.A., Tuzova, T.P., Syagailo, Y.V., Kuzovkina, I.N., Wulfson, A.N., Miroshnikov, A.I. (1995). **Determination of indole alkaloids from R.serpentina and R.vomitoria by High-Performance Liquid Chromatography and High-Performance Thin-Layer Chromatography.** J Chromatogr A 704, 357-62.

21. Klyushnichenko, V.E., Yakimov, S.A., Bychkova, T.P., Syagailo, Y.V., Kuzovkina, I.N., Wulfson, A.N., Miroshnikov, A.I. (1994). **Separation of indole alkaloids from *R.serpentina* and *R.vomitoria* by High-Performance Liquid Chromatography and High-Performance Thin-Layer Chromatography.** Khim-Pharm J 28, 58-61.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten	<ul style="list-style-type: none"> • Name: Yana Syagaylo • Geburtsdatum: 07.08.1971 • Geburtsort: Elektrostal, Russland • Familienstand: ledig
Schulausbildung	<p>1978 - 1981 Grundschule, Nr. 2, Elektrostal, Russland 1981 - 1986 Mittelschule, Nr. 59, Moskau, Russland 1986 - 1988 Mittelschule, Nr. 999, Moskau, Russland</p> <p>Allgemeine Hochschulreife</p>
Diplomstudium	<p>09 / 1988 - 02 / 1994 Moskauer Institut für feinchemische Technologie namens M.W. Lomonosow, Russland</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fakultät für Biotechnologie und organische Synthese <p>07 / 1993 - 02 / 1994 Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Dr. A.N. Wulfson am Schemjakin und Owtschinnikow Institut für Bioorganische Chemie der Russischen Akademie der Wissenschaften in der Abteilung für Biotechnologie mit experimenteller Pilotanlage, Moskau, Russland</p> <p>Diplom</p> <p>08 / 02 /1994 Diplomprüfung im Studiengang Biotechnologie</p>
berufliche Tätigkeiten	<p>02 / 1994 - 06 / 1996 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Schemjakin und Owtschinnikow Institut für Bioorganische Chemie der Russischen Akademie der Wissenschaften in der Abteilung für Biotechnologie mit experimenteller Pilotanlage, Moskau, Russland</p> <p>07 / 1996 - 06 / 1997 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Humangenetik der Westfälische Wilhelms-Universität Münster</p> <p>09 / 1997 - 10 / 2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Klinik und Polyklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg</p>

10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1997 bis November 2001 unter der Anleitung von Prof. Dr. K.-P. Lesch an der Klinik und Polyklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt. Die Arbeit wurde von Prof. Dr. F. Grummt im Sinne der Promotionsordnung der Fakultät für Chemie und Pharmazie betreut und vor der Fakultät vertreten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch für die Überlassung des Themas, seine Betreuung und die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten in seiner Arbeitsgruppe.

Bei Herrn Prof. Dr. Friedrich Grummt möchte ich mich für die Begutachtung meiner Dissertation bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ing. Peter Riederer danke ich für die gegebene Möglichkeit, in seinem Labor meine Arbeit durchzuführen, und seine Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Frau Dr. Olga Okladnova danke ich sehr herzlich für die Unterstützung in der Anfangsphase meiner Zeit in Würzburg sowie für die vielen Tips und Tricks im Laboralltag. Ihr Engagement in methodischen und fachlichen Fragestellungen hat mir viele Experimente erleichtert.

Bei Herrn Dr. Jobst Meyer möchte ich mich herzlich für seine ständige Diskussionsbereitschaft, für die kritische Durchsicht der Manuskripte sowie für die Rechtschreibkorrektur dieser Arbeit bedanken.

Frau Gabriela Ortega und Matthias Schad danke ich für ihre Unterstützung bei routinemässigen Prozeduren.

Herrn Dr. Rainald Mössner und Frau Dr. Angelika Schmitt danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und die fachlichen Diskussionen.

Bei Herrn Dr. Gerald Stöber und Herrn Dr. Jürgen Deckert möchte ich mich für die genomischen DNA-Stichproben, die sie für die Durchführung dieser Arbeit zu Verfügung gestellt haben, und produktive Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Dr. Michael Knapp danke ich für die Durchführung von statistischen Analysen.

Herrn Dr. Stefan Gattenlöhner danke ich für die Vorbereitung der Gewebeproben von Skelettmuskeln.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ing. Peter Riederer, deren Hilfsbereitschaft, Unterstützung und auch privates Engagement die Arbeit in Würzburg stets zu einem Vergnügen machten.

Abschliessend gilt mein Respekt und Dank meiner Mutter, die mir das Studium und Promotion im Ausland ermöglicht hat und immer an mich glaubte, sowie meinem Freund Wlad, der mit seiner liebevollen Unterstützung und kompetentem Engagement in der Zeit meiner Doktorarbeit immer für mich da war.