

Fachbereich I - Psychobiologie

Untersuchung potentieller Kandidatengene für Periodische  
Katatonie und Schizophrenie:  
Strukturelle und funktionelle Promotoranalyse von *Mlc1*,  
Mutationsanalyse von *BUB1B* und Assoziationsstudien zu  
*CHRNA7*, *DAOA* und *BRD1*

Dissertation zur Erlangung der naturwissenschaftlichen Doktorwürde durch den  
Fachbereich I der Universität Trier

vorgelegt von Darja Henseler

Betreuer:

Prof. Dr. J. Meyer

Prof. Dr. C. Müller

Trier, im Juni 2010

**I. Inhaltsverzeichnis:**

**I. Inhaltsverzeichnis: .....I**

**II. Abbildungsverzeichnis:.....IV**

**III. Tabellenverzeichnis: ..... V**

**IV. Abkürzungsverzeichnis ..... VI**

**1 Einleitung ..... 1**

1.1 Schizophrenie ..... 1

1.1.1 Historie der Schizophrenie ..... 1

1.1.2 Diagnose..... 2

1.1.3 Ursachen der Schizophrenie..... 4

1.1.3.1 Vererbungsmodus..... 4

1.1.3.2 Dopaminhypothese..... 4

1.1.3.3 Glutathypothese..... 5

1.1.3.4 Gehirnmorphologische Ursachen..... 6

1.2 *MLC1* als Kandidatengen für Periodische Katatonie ..... 7

1.3 Das humane *MLC1*-Gen..... 9

1.4 Das murine *Mlc1*-Gen ..... 10

1.5 Megalenzephalie Leukoenzephalopathie ..... 12

1.6 Genregulation ..... 13

1.6.1 Der Kernpromotor ..... 13

1.6.2 Der proximale Promotor..... 14

1.6.3 Der distale Promotor ..... 14

1.6.4 Regulatorische Modifikationen ..... 14

1.7 *BUB1B* als Kandidatengen für die Periodische Katatonie ..... 15

1.8 Fall-Kontroll-Assoziationsstudie ..... 16

1.8.1 Kandidatengene für die Schizophrenie-Assoziationsstudie ..... 16

1.8.1.1 *Bromodomain containing protein 1 (BRD1)*..... 16

1.8.1.2 *Nikotinerger Acetylcholinrezeptor, alpha 7 (CHRNA7)* ..... 17

1.8.1.3 *D-amino acid oxidase activator (DAOA)*..... 17

1.9 Zielsetzung der Arbeit..... 19

<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
2.1	Material .....	20
2.1.1	Studienteilnehmer für die Assoziationsstudie .....	20
2.1.2	Studienteilnehmer zur Untersuchung von <i>BUBIB</i> .....	21
2.1.3	Gewebe .....	22
2.1.4	Zelllinien .....	22
2.1.5	Bakterienstämme .....	22
2.1.6	Vektoren .....	22
2.1.7	Oligonukleotide .....	23
2.1.8	Enzyme .....	27
2.1.9	Medien und Puffer .....	27
2.1.10	Reagenzien .....	30
2.1.11	Stimulantien .....	31
2.1.12	kommerzielle Kits .....	32
2.1.13	Geräte .....	32
2.1.14	Datenbanken .....	33
2.2	Methoden .....	34
2.2.1	Fall-Kontroll-Studie .....	34
2.2.2	Erstellung der <i>MlcI</i> -Promotorkonstrukte .....	34
2.2.3	DNA Isolation aus Leukozyten .....	35
2.2.4	RNA Isolation .....	36
2.2.5	Reverse Transkription .....	36
2.2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	37
2.2.6.1	Qualitative PCR .....	37
2.2.6.2	Colony-PCR .....	38
2.2.6.3	Quantitative PCR (Real Time PCR) .....	38
2.2.7	Gelelektrophorese .....	39
2.2.7.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	40
2.2.7.2	Formaldehyd-Agarosegel .....	40
2.2.8	Aufreinigung von DNA Fragmenten .....	41
2.2.9	Sequenzierung .....	41
2.2.10	Klonierung .....	42
2.2.10.1	Herstellung kompetenter Bakterien .....	42
2.2.10.2	Restriktionsschnitt .....	42
2.2.10.3	Ligation .....	43
2.2.10.4	Transformation .....	43

2.2.10.5	Hochziehen von Bakterien .....	43
2.2.10.6	Plasmidisolierung .....	44
2.2.10.7	Lagerung von Bakterien .....	44
2.2.11	Zellkulturexperimente .....	44
2.2.11.1	Kultivieren von Zellen .....	44
2.2.11.2	Auftauen und Lagerung.....	45
2.2.11.3	Transfektion und Stimulation.....	45
2.2.12	Luciferase Assay .....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>50</b>
3.1	Identifikation und Charakterisierung der <i>Mlc1</i> -Promotorregion .....	50
3.1.1	Charakterisierung der 5'-Region des murinen <i>Mlc1</i> -Gens .....	50
3.1.2	Reportergenstudie I: Untersuchung der Promotorregion von <i>Mlc1</i> .....	54
3.1.3	Identifizierung weiterer Transkriptionsstartpunkte für <i>Mlc1</i> .....	56
3.1.4	Reportergenstudie II: Untersuchung der Promotors von <i>Mlc1</i> und <i>MLC1</i> .....	60
3.1.5	Hinweise auf unterschiedliche <i>Mlc1</i> Exon 1B-Expression im Gehirn.....	66
3.1.6	Stimulation der Astrozytenzellen zeigt keinen Effekt auf die <i>Mlc1</i> -Expression .....	68
3.1.7	<i>In silico</i> Sequenzanalyse .....	71
3.2	Ausschluss von <i>BUB1B</i> als Ursache für die Periodische Katatonie .....	74
3.3	Ergebnis der Schizophrenie-Assoziationsstudie .....	75
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>78</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>110</b>
7.1	Anhang zu den Ergebnissen aus 3.1 .....	110
7.2	Anhang zu den Ergebnissen aus 3.2.....	118

**II. Abbildungsverzeichnis:**

Abbildung 2.1.1: Familienstammbäume mit Periodischer Katatonie .....	21
Abbildung 2.2.1: Primerdesign für die Promotorkonstrukte.....	35
Abbildung 2.2.2: Luciferasevektoren.....	47
Abbildung 2.2.3: Biolumineszenzreaktionen .....	48
Abbildung 3.1.1: Schematische Darstellung der 5'-Region vor <i>Mlc1</i> .....	51
Abbildung 3.1.2: Nachweis der Expression des <i>Pomp</i> -Pseudogens in <i>Mus musculus</i> .....	52
Abbildung 3.1.3: Nachweis der Expression des <i>Pomp</i> -Pseudogens in murinen Astrozytenzellen / Gewebe.....	53
Abbildung 3.1.4: Ausgewählte Bereiche für die Promotorsuche.....	55
Abbildung 3.1.5: Relative Luciferaseaktivität .....	55
Abbildung 3.1.6: Alternative Transkriptionsstartpunkte für <i>MLC1</i> in <i>Homo sapiens</i> .....	56
Abbildung 3.1.7: Orthologe Bereiche der alternativen Transkriptionsstartpunkte in <i>Mus musculus</i> .....	57
Abbildung 3.1.8: Expression der alternativen Exons 1 in der murinen Astrozytenzelllinie ....	59
Abbildung 3.1.9: Expression der alternativen Exons 1 in <i>Mus musculus</i> .....	59
Abbildung 3.1.10: Position der untersuchten Promotorbereiche .....	61
Abbildung 3.1.11: Basale Promotoraktivität der <i>Mlc1</i> - bzw. <i>MLC1</i> -Konstrukte .....	63
Abbildung 3.1.12: Promotoraktivität der <i>Mlc1</i> - bzw. <i>MLC1</i> -Konstrukte in Astrozyten .....	64
Abbildung 3.1.13: Promotoraktivität der <i>Mlc1</i> - bzw. <i>MLC1</i> -Konstrukte in U373 .....	65
Abbildung 3.1.14: Expression von <i>Mlc1</i> Exon 1B in verschiedenen Gehirngeweben .....	67
Abbildung 3.1.16: Relative <i>Mlc1</i> -Expression.....	70
Abbildung 3.1.17: Expressionsstärke von <i>Mlc1</i> Exon 1B .....	70
Abbildung 3.3.1: Graphische Darstellung der prozentualen Allelverteilung.....	76
Abbildung 7.1.1: Sequenzvergleich zwischen AV253704 und <i>Pomp</i> .....	110
Abbildung 7.1.2 Spleißvarianten des <i>Pomp</i> -Pseudogens.....	112
Abbildung 7.1.3: Sequenz des <i>Mlc1</i> Exon 1B-Amplikons .....	113
Abbildung 7.1.4: Sequenz des <i>Mlc1</i> Exon 1E-Amplikons.....	114
Abbildung 7.1.5: A) Quantifizierung und B) Schmelzkurvenanalyse von <i>Mlc1</i> Exon 1B....	116
Abbildung 7.1.6: A) Quantifizierung und B) Schmelzkurvenanalyse von <i>Mlc1</i> Exon 1E ....	117

**III. Tabellenverzeichnis:**

Tabelle 2.2.1: Untersuchte Polymorphismen .....	34
Tabelle 2.2.2: Optimierte Bedingungen für die Real Time PCR .....	39
Tabelle 3.1.1: Verwendete Primer zum Nachweis der alternativen Exons 1 .....	58
Tabelle 3.1.2: pGL3-Promotorkonstrukte .....	62
Tabelle 3.1.3: Analyse auf allgemeine Promotorelemente .....	71
Tabelle 3.1.4: GC- und CpG-Gehalt der <i>MLC1</i> Promotorregion.....	72
Tabelle 3.1.5: TRANSFAC-Analyse .....	73
Tabelle 3.3.1: Untersuchte Polymorphismen .....	76
Tabelle 3.3.2: Verteilung der Genotypen und Allele in der Schizophrenie (SZ) - und der Kontrollgruppe .....	77
Tabelle 7.1.1: Ct-, $\Delta$ Ct und $2^{-\Delta Ct}$ -Werte für <i>Mlc1</i> und <i>Gapdh</i> .....	115
Tabelle 7.1.2: Ct-Werte der Astrozytenstimulation .....	115
Tabelle 7.2.1: Allelvarianten der Polymorphismen in <i>BUB1B</i> .....	138

#### IV. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bd	doppelt destilliert
bp	Basenpaar
<i>BUB1B</i>	<i>budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta-Gen</i>
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat ( <i>Cyclic adenosine monophosphate</i> )
Dex	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DSM	Diagnostisches und Statistisches Handbuch Psychischer Störungen ( <i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i> )
E	Embryonaltag
EEG	Elektroenzephalografie
EOG	Elektrookulographie
For	Forskolin
G	Guanin
GRE	<i>Glucocorticoid response element</i>
GR	Glucocorticoidrezeptor
FKS	fötales Kälberserum
h	Stunde
HHNA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
kb	Kilobasenpaare
LOD	<i>logarithm of odds</i>
LPS	Lipopolysaccharide
M	Mittelwert
MDD	<i>Major depressive disorder</i>
min	Minute
MLC1	megalenzepmale Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten

<i>MLC1</i>	menschliches <i>MLC1</i> -Gen
<i>Mlc1</i>	murines <i>Mlc1</i> -Gen
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
RB	<i>RNA Buffer</i>
PLB	<i>Passive Lysis Buffer</i>
RLU	<i>Relative light units</i>
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RPM	Rotationen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
P	Postnataltag
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Azetat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
P/S	Penicillin/Streptomycin
RT	Raumtemperatur
PVN	paraventriculärer Nukleus
s	Sekunde
SFM	serumfreies Medium
SGD	<i>sensory gating deficit</i>
SM	serumhaltiges Medium
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
T	Thymin
TF	Transkriptionsfaktor
TSS	Transkriptionsstartstelle; Transkriptionsstartpunkt
U	Einheiten ( <i>Units</i> )
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
ZNS	zentrales Nervensystem



Unsere Erfahrungen bestimmen was wir sehen  
(T. Havener)

# 1 Einleitung

## 1.1 Schizophrenie

### 1.1.1 Historie der Schizophrenie

Das älteste bekannte Dokument über psychische Erkrankungen, das Eber Papyrus, stammt aus dem alten Ägypten (15. Jh. vor Christus). Es beschreibt detailliert die Symptome von Depression, Demenz und Denkstörungen, wie sie auch in der Schizophrenie vorkommen. Dabei werden die psychischen Erkrankungen als Symptome des Herzens angesehen, das im alten Ägypten als Sitz der Seele und des Verstandes galt (Kyziridis, 2005). Im 2. Jh. n. Chr. beschrieb der griechische Arzt Galen psychische Erkrankungen als wahrscheinliches Ergebnis einer Erkrankung des Gehirns. Andere Ärzte wie Alexander von Tralles (6. Jh. n. Chr.) und Ibn Rabban at-Tabari (9. Jh. n. Chr.) sahen ebenfalls eine Beteiligung des Gehirns an den psychischen Symptomen. Die Erkenntnis der physischen Ursache von psychischen Erkrankungen wurde durch den Einfluss des Christentums zeitweilig verdrängt. Erst im 17./18. Jh. wurde sich wieder verstärkt auf eine detailgenaue Beschreibung psychischer Symptome und Erkrankungen konzentriert. 1871 beschrieb Ewald Hecker erstmals die Hebefrenie, eine charakteristischerweise im Jugendalter eintretende Psychose mit läppischem Verhalten. 1874 beschrieb Karl Ludwig Kahlbaum die paranoiden Störungen, sowie die Katatonie. Letzteres beschreibt eine psychomotorische Störung, die zu ungewöhnlichen, stark verkrampften Körperhaltungen führt und mit starken Angstgefühlen einhergehen kann (Kyziridis, 2005). Zuerst übernahm Emil Kraepelin 1893 das von Hecker beschriebene Krankheitsbild der Hebefrenien unter dem Namen „*dementia praecox*“ und grenzte es damit von der Katatonie und der *Dementia paranoides* ab. 1899 entschied er sich *Dementia praecox* als Oberbegriff für einer ganzen Gruppe an Krankheitsbildern zu verwenden, die er in drei Hauptgruppen einteilte: die hebephrenische, die katatonische und die paranoide Form der *Dementia praecox* (Kraepelin, 1899). Eugen Bleuler führte für „*Dementia praecox*“ 1911 den Begriff der „Schizophrenie“ ein. Dieser Begriff setzt sich aus den griechischen Worten „schizo“ (spalten) und „phrene“ (Verstand) zusammen und umschreibt damit die „*Spaltungen im Ideengang*“, die laut Bleuler typisch für die Betroffenen der „*jugendlichen Verblödung*“ ist.

### 1.1.2 Diagnose

Schizophrenie ist eine komplexe Erkrankung, die ca. 1 % der Gesamtbevölkerung betrifft. Die Symptome werden dabei in Positiv- und Negativsymptomatik eingeteilt. Erstere ist die auffälligere Symptomatik, die unter anderem grob desorganisiertes Verhalten, Wahnvorstellungen, Halluzinationen und katatone Symptome umfasst. Letztere zeichnet sich durch Affektverflachung, Antriebsstörung, Sprachverarmung und Schwierigkeiten beim abstrakten Denken aus.

Zur Diagnosestellung wird die „Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme“ (ICD) zugrunde gelegt.

Neben dem ICD, der von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) herausgegeben wird und derzeit die aktuelle Version des ICD-10 beinhaltet, gibt es noch ein weiteres Klassifikationssystem, namens „Diagnostisches und Statistisches Handbuch Psychischer Störungen“ (DSM-IV), welches als Ergänzung des ICD-10 angesehen werden kann.

Nach dem DSM-IV müssen folgende Kriterien erfüllt sein, um eine Schizophrenie zu diagnostizieren:

- Es liegen für mindestens einen Monat zwei charakteristische Symptome für Schizophrenie vor. Charakteristische Symptome sind: Wahn, Halluzination, desorganisiertes Verhalten im Sprechen und Denken, katatonisches Verhalten und Negativsymptome wie Affektverflachung.
- Es liegen für mindestens sechs Monate Leistungseinbußen in beruflichen und/oder in zwischenmenschlichen Beziehungen vor.
- Schizoaffective und Affektive Störungen können ausgeschlossen werden.
- Das Krankheitsbild geht nicht auf den direkten Einfluss von Drogen-/Medikamenten zurück.

Weiterhin gibt es noch eine genauere Einteilung in verschiedene Kategorien:

1. den paranoiden Typus (charakterisiert durch Wahnvorstellungen und Halluzinationen)
2. den desorganisierten Typus (zeigt desorganisiertes Verhalten und Zerfahrenheit der Sprache und der Gedanken)
3. den katatonen Typus (charakterisiert durch Störungen der Psychomotorik: Willkürbewegungen, Stupor, Katalepsie, Negativismus, Mutismus)

4. den undifferenzierten Typus (Kriterien für Schizophrenie sind erfüllt, lässt sich jedoch nicht den ersten drei Typen zuordnen)
5. den residualen Typus (Schizophreniephase hat vorgelegen, Symptome fallen aber nur noch in den Bereich der Negativsymptomatik)

Neben international anerkannten Klassifikationssystemen, wie dem ICD-10 und DSM-IV, gibt es auch weitere Klassifikationen der Schizophrenie.

Eine geht auf Karl Leonhard zurück, der in seiner Klassifikation vier Hauptgruppen endogener Psychosen beschreibt: Die phasischen Psychosen (Manie, Depression und manische Depression), die zyklischen Psychosen (Angst-Glücks-Psychosen, erregt-gehemmte Verwirrtheitspsychosen), die unsystematische Schizophrenie (affektvolle Paraphrenie, Periodische Katatonie etc.) und die systematische Schizophrenie (Katatonie, Hebephrenien und Paraphrenien) (Leonhard, 2003). Der Vorteil der Klassifikation nach Leonhard ist der, dass eine nosologische Einteilung der jeweiligen Krankheitsbilder ihrer Ursache nach, und nicht ihrer bloßen Symptomatik nach angestrebt wird.

Auch wenn diese Klassifikation sich nicht international durchsetzen konnte, wird sie hier erwähnt, da die untersuchten Probanden aus den Großfamilien mit der Diagnosestellung „Periodische Katatonie“ nach Leonhard klassifiziert wurden.

Eine weitere interessante Unterteilung der Schizophrenie in Typ I und Typ II wurde von Tim Crow vorgenommen. Er versucht ebenfalls die Schizophrenieformen ihrer Ursache nach einzuteilen. Dabei beruft er sich auf die Beobachtung, dass Typ I Schizophrenie, die durch eine Positivsymptomatik charakterisiert ist und sehr gut mit Dopaminantagonisten (Neuroleptika) zu behandeln ist. Die Typ II Schizophrenie, die durch die Negativsymptomatik charakterisiert wird, spricht nicht auf eine Behandlung mit Neuroleptika an. Er vermutet hier die Ursache in strukturellen Veränderungen des Gehirns (Crow, 1980).

### 1.1.3 Ursachen der Schizophrenie

#### 1.1.3.1 Vererbungsmodus

Schizophrenie gehört zu den komplexen Erkrankungen, deren Ursache sowohl von genetischen als auch von Umweltfaktoren abhängig ist. Gezeigt werden konnte dies durch Zwillingsstudien. Während zweieiige Zwillinge nur einen gewissen Anteil ihrer Gene gemeinsam haben, zeigen eineiige Zwillinge eine genetische Übereinstimmung von nahezu 100 %. Wäre ein vorhandenes Merkmal allein durch bestimmte Gene verursacht, müsste die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen 100 % betragen. Als Konkordanz bezeichnet man das Vorhandensein eines gemeinsamen Merkmals bei zwei Individuen. Würden alleine die Umweltfaktoren eine Rolle spielen, so dürfte kein Unterschied in der Konkordanzrate beim Vergleich von eineiigen und zweieiigen Zwillingen auftreten, vorausgesetzt beide wachsen in derselben Umgebung auf. Tatsächlich zeigten Studien bei an Schizophrenie erkrankten eineiigen Zwillingen eine Konkordanzrate von 48% bis 80%, während diese bei zweieiigen Zwillingen nur bei bis zu 17% lag (APA, 2000; Sullivan et al., 2003; Tsuang, 2000). Demnach liegt ein starker genetischer Einfluss, aber auch ein deutlicher Umweltanteil bei der Entstehung der Schizophrenie vor. Auf der Suche nach den verantwortlichen Genen wurden weltweit Kopplungsstudien durchgeführt und Gendefizite bzw. Polymorphismen auf den Chromosomen 1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 18, 19, 20 und 22 (Arinami et al., 2005; Kendler et al., 2000; Lewis et al., 2003; Maziade et al., 2009; Meyer et al., 2001; Meyer et al., 2003; Vazza et al., 2007; Wang et al., 1995) gefunden, die zur Entwicklung der Schizophrenie beitragen könnten. Diese hohe Anzahl an Genloki, die mit Schizophrenie in Zusammenhang gebracht werden, sprechen für eine heterogene und polygene Erkrankung.

#### 1.1.3.2 Dopaminhypothese

Auf biochemischer Ebene ist seit den 60er Jahren bekannt, dass Dopamin eine entscheidende Rolle bei der Schizophreniesymptomatik spielt. Die Dopaminhypothese, die das erste Mal von J. M. van Rossum formuliert wurde, steht bis heute in der Diskussion. Die Vermutung war, dass die Schizophrenie durch eine Überaktivität bestimmter dopaminerger Bereiche im Gehirn verursacht sein könnte (van Rossum, 1966). Gestützt wurde dies durch Studien, die einen stark antipsychotischen Effekt durch Dopaminantagonisten zeigten (Horn and Snyder, 1971). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Amphetamin, welches die Ausschüttung von Dopamin bewirkt, bei Schizophreniepatienten schon in kleinen Mengen

Schizophreniesymptome auslösen bzw. verstärken können (Janowsky and Davis, 1976; Lieberman et al., 1987). Eine erhöhte Dichte an verschiedenen Dopaminrezeptoren (D2, D3, D4) im Gehirn von Schizophrenen wird als Mögliche Ursache der Erkrankung gesehen (Seeman, 1992; Seeman et al., 1993).

Die Hypothese wurde oftmals kritisiert, da die klassischen Neuroleptika nur gegen die Positivsymptomatik halfen und die Negativsymptomatik nicht verbesserten, sondern teilweise sogar verstärkten. Mittlerweile gibt es auch atypische Neuroleptika, die zur Behandlung der Negativsymptomatik eingesetzt werden. Diese Wirkstoffgruppe bindet neben dem Dopaminrezeptor D1 auch an Rezeptoren für andere Neurotransmitter.

### ***1.1.3.3 Glutamathypothese***

Eine neuere Hypothese bezieht sich auf die Rolle von Glutamat in der Schizophrenie. Ein erster Hinweis, dass Glutamatrezeptoren für die Entstehung der Schizophrenie relevant sein können, war die Beobachtung, dass die Gabe von Phencyclidin (PCP) oder Ketamin, beides Glutamatantagonisten, eine schizophrene Positiv- wie auch Negativsymptomatik hervorrufen konnte (Itil et al., 1967; Krystal et al., 1994; Luby et al., 1959). Die Substanzen binden dabei an den N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor), eine Untergruppe der Glutamatrezeptoren. Weiterhin wurde im Hippocampus von Patienten eine verringerte Menge an NR<sub>1</sub>, einer Untereinheit des NMDA-Rezeptors, nachgewiesen (Gao et al., 2000). Eine Studie mit transgenen Mäusen, die nur noch 5 % der normalen NR<sub>1</sub>-Menge produzierten, spiegelte die Bedeutung einer dadurch verminderten NMDA-Funktionsfähigkeit wider. Die Mäuse zeigten ein stereotypes Bewegungsmuster, Hyperaktivität und sozialen Rückzug, alle Symptome konnten mit einem atypischen Neuroleptikum behoben werden (Mohn et al., 1999). Weitere Patientenstudien zeigten für bestimmte Hirnregionen auch eine verminderte Expression von Untereinheiten anderer Glutamatrezeptor-Gruppen (Eastwood et al., 1995; Ibrahim et al., 2000; Meador-Woodruff and Healy, 2000). Diese Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen der verminderten Aktivität von Glutamatrezeptoren und der Schizophreniesymptomatik in Betroffenen vermuten.

Die Glutamathypothese ist nicht im Widerspruch zur Dopaminhypothese zu sehen, da gezeigt werden konnte, dass NMDA-Rezeptor-Antagonisten auch zu einer erhöhten Ausschüttung von Dopamin im präfrontalen Cortex und subcorticalen Strukturen führt (Bowers et al., 1987;

Deutch et al., 1987; Verma and Moghaddam, 1996). Eine verringerte NMDA-Rezeptoraktivität könnte demnach erhöhte Dopaminlevel in bestimmten Gehirnregionen verursachen.

Jentsch und Kollegen konnten in ihrer Studie nachweisen, dass Ratten unter PCP-Gabe eine verstärkte Reaktion auf Amphetamine als auch auf Stress zeigen (Jentsch et al., 1998). Dieses Ergebnis ist besonders deswegen interessant, da bei Betroffenen oftmals durch Drogen (wie z.B. Amphetamine) oder Stresssituationen eine akute Schizophreniephase ausgelöst wird.

#### ***1.1.3.4 Gehirnmorphologische Ursachen***

Ein weiterer Punkt, der für die Beteiligung an Symptomen der Typ-II-Schizophrenie diskutiert wird, sind strukturelle Veränderungen im Gehirn der Patienten. Verschiedene morphologische Veränderungen im Gehirn von Schizophrenen konnten in den letzten Jahren durch bildgebende Verfahren, wie z.B. der Magnetresonanztomographie (MRT) nachgewiesen werden. Wright und Mitarbeiter verglichen im Rahmen einer Metaanalyse 58 MRT-Studien mit insgesamt 1588 Schizophreniepatienten (Wright et al., 2000). Das Ergebnis der Studie ergab ein im Schnitt um 2 % verringertes Gehirnvolumen der Schizophreniepatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem lagen verminderte Volumina in frontalen, temporalen, limbischen und thalamischen Strukturen vor. Es ist denkbar, dass die Volumenreduktion in erster Linie durch eine Verringerungen der grauen Hirnsubstanz verursacht ist (Miyata et al., 2009). Am auffälligsten war eine Vergrößerung der Hirnventrikel im Vergleich zu gesunden Probanden um 26 % (Corey-Bloom et al., 1995; Wright et al., 2000), wobei die Größe der Ventrikel mit dem Grad der Negativsymptomatik zu korrelieren scheint (Klausner et al., 1992).

Neben den strukturellen Auffälligkeiten wurde in manchen Fällen auch eine verminderte Durchblutung des Gehirns festgestellt (Sagawa et al., 1990; Zemishlany et al., 1996). Zudem berichten Andreasen und Kollegen von einem verminderten Blutfluss in Teilen des Frontalkortex, Thalamus und Cerebellum schizophrener Patienten, die sie komplexe Gedächtnisaufgaben lösen ließen (Andreasen et al., 1996).

## 1.2 *MLC1* als Kandidatengen für Periodische Katatonie

Nach Karl Leonhard gehört die Periodische Katatonie zu den unsystematischen Schizophrenien. Patienten entwickeln psychomotorische Störungen, deren Ausprägung sehr variabel sein kann. So können hyperkinetische Anfälle mit stereotypen Bewegungen oder eine totale Bewegungsstarre zusammen mit erhöhter Ängstlichkeit, Impulsivität und Aggression auftreten. Typisch sind auch Iterationen, die sich durch ständiges wiederholen einer Phrase oder eines Wortes bemerkbar machen. In vielen Fällen treten phasenweise akute Psychosen mit Halluzination und Wahnvorstellung auf (Leonhardt, 2003).

Taylor und Fink unterscheiden zwei Varianten der Katatonie: Variante A zeichnet sich hauptsächlich durch Symptome wie Katalepsie, Mutismus und Reglosigkeit aus, Variante B ist hauptsächlich durch ein stereotypes Bewegungsmuster, Echolalie und Negativismus gekennzeichnet. Katatone Symptome können im Zusammenhang mit psychotischen, affektiven und neurologischen Störungen, sowie unter medikamentöser Behandlung auftreten. Daher ist nach Taylor und Fink die Katatonie eher als Syndrom zu verstehen, das oft in Verbindung mit psychiatrischen Erkrankung, meist Schizophrenie und Bipolarer Störung, einhergeht (Taylor and Fink, 2003).

Auf der Suche nach Kandidatengen für die Periodische Katatonie wurde 2000 eine genomweite Kopplungsstudie mit zwölf Großfamilien durchgeführt. Insgesamt wurden 135 Individuen, von den 57 betroffen waren, untersucht. Es konnte eine Kopplung der Erkrankung mit Bereichen auf den Chromosomen 15q15 (LOD-Score = 3,57) und 22q13 (LOD-Score = 1,85) gefunden werden (Stöber et al., 2001; Stöber et al., 2000). Der LOD-Score (*logarithm of the odds-Score*) ist ein Indikator für die Genkopplung und gibt an, wie wahrscheinlich zwei Genorte aufgrund von Kopplungsereignissen statt aufgrund zufälliger Ereignisse gemeinsam vererbt werden. Ein LOD-Score = 3 entspricht demnach einer  $10^3$ fachen Wahrscheinlichkeit, dass eine Kopplung vorliegt (Lander and Kruglyak, 1995). Meyer und Kollegen grenzten den Bereich auf Chromosom 22q13 auf eine Region zwischen dem Marker D22S1160 und dem telomeren Chromosomenende ein. Für zwei der Gene in diesem Bereich gab es Hinweise, dass sie nur im Gehirn exprimiert werden (J. Meyer, mündliche Mitteilung). Es handelte sich dabei um das *cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1*-Gen (*CELSRI*) und das *megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts*-Gen (*MLC1*). Beide Gene wurden in Betroffenen aus der Großfamilie und gesunden Kontrollen sequenziert, um mögliche Mutationen, die ursächlich für das Auftreten der



Periodischen Katatonie sein könnten, zu identifizieren. Die Sequenzierung des *CELSRI* zeigte, dass es mehrere Allelvarianten des Gens gibt, die zu insgesamt fünf verschiedenen Proteinen führen. Keine dieser Varianten zeigte eine Segregation mit der Erkrankung, weswegen *CELSRI* als Ursache für die Periodische Katatonie ausgeschlossen wurde (Gross et al., 2001). Die Sequenzierung des *MLCI*-Gens zeigte eine Mutation in Exon 11, die zu einer veränderten Aminosäuresequenz im Protein führt. An Position 309 wird dabei statt Leucin Methionin eingebaut (Leu309Met). Die gefundene Leu309Met-Variante segregierte in der Familie mit dem Auftreten der Periodischen Katatonie (Meyer et al., 2001).

Verma und Kollegen führten 2005 familienbasierte Assoziationsstudien und Fall-Kontroll-Assoziationsstudien durch um festzustellen, ob Veränderungen im *MLCI*-Gen die Anfälligkeit für Schizophrenie und Bipolare Störung erhöhen. In der Studie wurden 30 Polymorphismen und drei Neumutationen gefunden. Eine der Neumutationen, bei einem von Bipolarer Störung betroffenen Patienten, führte an Position 308 zu einem Aminosäureaustausch von Leucin durch Glutamin (Leu308Gln). Weiterhin konnte eine Assoziation zwischen je zwei der untersuchten Polymorphismen mit Schizophrenie und mit bipolarer Störung nachgewiesen werden (Verma et al., 2005). Dies spricht für eine Rolle des *MLCI* in psychiatrischen Erkrankungen.

2003 fanden Rubie und Kollegen eine weitere Familie mit Periodischer Katatonie, in der ebenfalls Träger der seltenen Leu309Met-Variante auftraten. In dieser Familie zeigte sich jedoch keine Segregation der Leu309Met-Variante mit dem Krankheitsbild der Periodischen Katatonie. Die als erkrankt beschriebenen Familienmitglieder waren keine Träger der Leu309Met-Variante, mit Ausnahme des betroffenen Sohns. Dieser hatte das Leu309Met-Allel von seinem phänotypisch gesunden Vater geerbt. Aufgrund der fehlenden Segregation betrachteten Rubie und Kollegen die *MLCI*-Variante als eine mögliche, aber sehr unwahrscheinliche Ursache von Periodischer Katatonie (Rubie et al., 2003). Allerdings sind für diese Familie bedeutsame Unklarheiten im Bezug auf die Diagnosestellung bekannt (Ekawardhani, 2009). So wurde beschrieben, dass weder die Mutter des Betroffenen, noch ihre Brüder, die als erkrankt galten, jemals eine psychiatrische Einrichtung besucht hätten. Hingegen wurde für den Vater, der Überträger der Leu309Met-Variante war und von Rubie und Kollegen als „gesund“ beschrieben wurde, ein klinischer Aufenthalt genannt. Zudem wies er in früheren Jahren ähnliche Symptome auf wie der betroffene Sohn (Ekawardhani, 2009). Ausgehend von der Annahme, dass der betroffene Sohn das krankheitsverursachende Allel

von seinem Vater geerbt hatte, konnte anhand der von Rubie und Kollegen beschriebenen Familie der verantwortliche Genbereich auf Chromosom 22q13 weiter auf den Bereich zwischen den Markern rs137919 und TR8 eingegrenzt werden (Ekawardhani, 2009).

### 1.3 Das humane *MLC1*-Gen

*MLC1*, auch als *WKL1* bekannt, wurde erstmals von Nomura und Kollegen unter dem Namen *KIAA0027* als Gen beschrieben (Nomura et al., 1994). Nachdem Leegwater und Kollegen 2001 nachweisen konnten, dass Mutationen im *KIAA0027* zu einer Erkrankung namens Megalenzephalie Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten führt, wurde das Gen in *MLC1* (*Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts*) umbenannt (Leegwater et al., 2001). Nach dem HUGO *Nomenclature Committee* ist *MLC1* das offizielle Gensymbol.

*MLC1* ist auf Chromosom 22q13.33 lokalisiert. Das Gen besteht aus 12 Exons, von denen das erste nicht codierend ist. Das Genprodukt ist ein 377 Aminosäuren (AS) langes Membranprotein.

*MLC1* wird fast ausschließlich im Gehirn exprimiert. Die Expression konnte bisher in humanem Gewebe aus *Cerebellum*, *Cortex*, *Amygdala*, *Caudate nucleus*, *Corpus callosum*, *Hippocampus*, *Substantia nigra* und *Thalamus* nachgewiesen werden (Meyer et al., 2001; Schmitt et al., 2003). Boor und Kollegen konnten zusätzlich eine Expression in Leukozyten nachweisen (Boor et al., 2005). Die Zelltypen, in denen eine Expression nachgewiesen werden konnte, beschränken sich dabei auf Astrozyten, Bergmann-Gliazellen, Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten (Boor et al., 2005; Meyer et al., 2001; Schmitt et al., 2003).

Über die genaue Funktion des *MLC1*-Proteins ist nichts bekannt. Die meisten Computerprogramme zur Vorhersage von Transmembrandomänen deuten auf ein durch acht Transmembrandomänen charakterisiertes Membranprotein hin. Boor und Kollegen konnten zeigen, dass beide NH<sub>4</sub><sup>+</sup> und COOH- Enden des *MLC1*-Proteins im Zytoplasma zu vermuten sind, was die Vorhersage einer geraden Anzahl an Transmembrandomänen stützt (Boor et al., 2005).

Aufgrund einer geringen Sequenzhomologie zum spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.1, wurde eine Funktion von MLC1 als Ionen-Kanal in Betracht gezogen (Leegwater et al., 2001; Meyer et al., 2001). Jedoch konnte bis heute keine Ionen-Kanal-Aktivität nachgewiesen werden.

Boor und Kollegen konnten zeigen, dass *MLC1* hauptsächlich an der *Membrana limitans glia perivascularis* und der Blut-Hirn Schranke exprimiert wird (Boor et al., 2005). Untermauert wurde der Befund von Teijido und Mitarbeitern, die anhand von Elektronenmikroskopie die Lokalisation von MLC1 in den Gefäßfüßchen der Astrozyten, aus denen die *Membrana limitans glia perivascularis* gebildet wird, nachweisen konnten (Teijido et al., 2004).

Die Befunde über die Lokalisation von MLC1 und die gefundene, wenn auch geringe Sequenzhomologie zu Ionenkanälen und auch zu ABC2-Transportern lässt vermuten, dass MLC1 ein membranständiges Transportprotein ist.

#### 1.4 Das murine *Mlc1*-Gen

In *Mus musculus* ist *Mlc1* auf Chromosom 15E3 lokalisiert. Es besteht aus 12 Exons, von denen das erste nicht codierend ist. Das gebildete Membranprotein besteht aus 382 AS. Die Sequenzhomologie zum humanen *MLC1*-Protein beträgt 87 %.

Das murine *Mlc1* ist ebenfalls im Gehirn exprimiert (Steinke et al., 2003). Eine Expression des Gens konnte für Astrozyten, Ependymalzellen und Bergmann-Glia gezeigt werden (Schmitt et al., 2003). Während Schmitt und Kollegen für Mikroglia, Tanozyten, Oligodendrozyten und Nervenzellen keine Expression zeigen konnten, konnten Teijido und Kollegen ebenfalls eine Expression von *Mlc1* in Nervenzellen nachweisen (Schmitt et al., 2003; Teijido et al., 2007; Teijido et al., 2004).

Weitere Studien zu *Mlc1* zeigten, dass die Expressionsstärke von *Mlc1* im Laufe der Entwicklung variiert. Schmitt und Kollegen untersuchten den Entwicklungszeitraum vom 14. Embryonaltag (E14) bis zum 20. Tag nach der Geburt (postnatal; P20). Mittels *In situ*-Hybridisierung konnte die Arbeitsgruppe eine Zunahme *Mlc1*-positiver Zellen in der subventrikulären Zone der Lateralvesikel von Tag E18 bis P20 zeigen (Schmitt et al., 2003).

Tejido und Kollegen untersuchten die *Mlc1*-Expression im Vorder-/Mittelhirn und Hinterhirn von *Mus musculus* und zeigten ebenfalls einen Anstieg in der Expression von E16 bis P21.

Der genomische Aufbau des murinen *Mlc1*-Gens wurde von Steinke und Kollegen näher beschrieben. Hierbei fand auch eine erste strukturelle Beschreibung der regulatorischen Region von *Mlc1* statt (Steinke et al., 2003). Steinke und Kollegen zeigten für die 5'-regulatorische Region von *Mlc1* zwei CCAAT-Boxen 27 bp und 114 bp stromaufwärts von *Mlc1*. CCAAT-Boxen kommen häufig 70-105 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts vor und stellen eine Bindestelle für Transkriptionsfaktoren dar, die zur Initiation der Transkription notwendig sind. Weiterhin ist eine potentielle Transkriptionsfaktorbindestelle für den hypophysenspezifischen Transkriptionsfaktor 1 (Pit-1; *pituitary-specific transcription factor 1*) und den Glukokortikoidrezeptor (GR) beschrieben. Zudem befindet sich in der von Steinke und Kollegen beschriebenen regulatorischen Region ein *Alu-J like element* (*Alu*). Ein *Alu-J like element* ist eine dem AluJ-Element ähnliche Sequenz und gehört der Gruppe der *Short Interspersed Nuclear Elements* (SINEs) an. Alu-Elemente sind 200 bis 300 bp große transponierbare Elemente, die bisher ausschließlich für Primaten beschrieben wurden (Hasler and Strub, 2006; Lander et al., 2001). Ursprünglich sind sie vor 55 Millionen Jahren aus einer 5' zu 3' Fusion des *7SL RNA*-Gens hervorgegangen. Diese damaligen Alu-Monomere haben durch eine weitere Fusion zu einem dimeren Alu-Element geführt, das in drei Hauptklassen unterteilt werden kann: AluJ-Elemente, AluS-Elemente und AluY-Elemente. Mittlerweile konnten verschiedene Arbeitsgruppen nachweisen, dass Alu-Elemente einen Einfluss auf die Genexpression haben können (Chen and Randeva; Mariner et al., 2008; Polak and Domany, 2006). Des Weiteren wurde von Steinke und Kollegen im 5' Bereich des *Mlc1* ein Pseudogen mit hoher Homologie zum *Hspc014*-Gen (*Homo sapiens voltage-gated K channel beta subunit 4.1 mRNA*) beschrieben (Steinke et al., 2003). Nach dem offiziellen *HUGO Gene Nomenclature Committee* handelt es sich bei dem *Hspc014*-Gen um das *proteasome maturation protein*-Gen (*Pomp*). Pseudogene sind ursprünglich aus einer Genduplikation entstanden. Sie enthalten daher eine hohe Sequenzidentität zu dem ursprünglichen Gen bzw. Genort. Im Gegensatz zu funktionellen Genen sind Pseudogene jedoch „nicht funktionell“, da sie keinen eigenen Promotor besitzen und oft Sequenzbereiche des ursprünglichen Gens fehlen (Campbell, 1998; Strachan, 2005). Die beiden Mechanismen die zur Entstehung von Pseudogenen führen können sind die tandemförmige Genduplikation und die Genduplikation durch Retroposition. Der tandemförmigen Genduplikation liegt ein ungleiches *Crossing-over* zu Grunde, das zu einer Verdopplung eines bestimmten Genabschnitts führt. Bei der

Genduplikation durch Retroposition wird die mRNA eines exprimierten Gens durch reverse Transkription in DNA umgeschrieben und wieder in das Genom eingebaut. Dies geschieht für gewöhnlich unter Beteiligung von Transposons, die der Gruppe der *Long Interspersed Nuclear Elements (LINEs)* angehören. Während durch tandemförmige Genduplikation Pseudogene mit Intron-Exon-Struktur entstehen, kennzeichnen sich durch Retroposition entstandene Pseudogene durch fehlende Intronbereiche aus (Gerstein and Zheng, 2006).

Aufbauend auf diese erste Beschreibung durch Steinke und Kollegen sollten in der hier vorliegenden Dissertation weitere Experimente zur Bestimmung und Charakterisierung der regulatorischen Einheit von *Mlc1* durchgeführt werden.

## 1.5 Megalenzephalale Leukoenzephalopathie

Die Megalenzephalale Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten (MLC) wurde erstmals 1995 von van der Knaap und Kollegen beschrieben. Es handelt sich dabei um eine monogene Erkrankung mit autosomal-rezessivem Vererbungsmuster. Betroffene zeigen in Verlauf des ersten Lebensjahres eine abnorme Vergrößerung des Kopfes (Makrozephalie). Weiterhin treten fortschreitende motorische Defizite, wie Ataxie und Spastiken auf. Eine kognitive Degeneration folgt erst im späteren Verlauf der Erkrankung. Mittels Magnetresonanztomographie (MRI) ist eine Schwellung der weißen Substanz in den zerebralen Hemisphären und zystische Vakuolen in den subkortikalen Bereichen erkennbar (van der Knaap et al., 1995). Histopathologische Befunde zeigen, dass nur die äußersten Lamellen der Myelinscheiden von der Vakuolenbildung betroffen sind, was zu einer Aufspaltung der Myelinscheide führt (van der Knaap et al., 1996). Weiterhin stellte Sener 2003 einen Anstieg von Glyzin und Taurin bei MLC-Patienten fest (Sener, 2003a; Sener, 2003b). Außerdem wurde eine Reduktion bestimmter Metabolite, wie N-Acetylaspartat, Kreatin und Cholin nachgewiesen (Brockmann et al., 2003; De Stefano et al., 2001).

Das verantwortliche *MLC1*-Gen wurde auf Chromosom 22 lokalisiert (Leegwater et al., 2001; Topcu et al., 2000). Bei den meisten der Betroffenen konnte eine Mutation in diesem Gen nachgewiesen werden. Da jedoch auch Fälle bekannt wurden, in denen trotz der MLC-Symptomatik das Gen intakt war, wird noch ein zweiter Genloкус für die Entstehung von MLC vermutet (Leegwater et al., 2001; Patrono et al., 2003).

## 1.6 Genregulation

Ein Gen enthält den Bauplan für ein Protein oder eine regulatorische RNA. Damit die Stoffwechselwege in der Zelle effizient ablaufen, muss die Auswahl und die Menge an gebildeten Proteinen oder regulatorischer RNA ständig kontrolliert werden. Somit ist es absolut notwendig, dass es Mechanismen gibt, die die Genexpression regulieren. Dies kann zum einen auf der prätranskriptionalen Ebene, durch Beeinflussung der Transkription (Ablesen) eines Gens und zum anderen auf der post-Transkriptionalen Ebene, durch Beeinflussung des bereits gebildeten Transkripts, geschehen. Im Folgenden wird sich auf die Regulation durch prätranskriptionale Mechanismen beschränkt. Die Regulation läuft dabei über Proteinfaktoren ab, die an bestimmte Nukleinsäuresequenzen binden. Der Bereich, der die für die Genregulation wichtigen Nukleinsäuresequenzen enthält, wird als Promotor bezeichnet. Die Promotorstruktur wird in Regionen unterteilt, die sich den drei Kategorien Kernpromotor, proximalen Promotor und distaler Promotor (Enhancerelemente) zuordnen lassen (Conaway and Conaway, 1991).

### 1.6.1 Der Kernpromotor

Der Kernpromotor befindet sich in unmittelbarer Nähe zum Transkriptionsstartpunkt (TSS) des Gens. So wird der Positionsbereich mit -40 bis +40 bp, ausgehend vom TSS (+1), angegeben (Burke and Kadonaga, 1997). Der Kernpromotor enthält wichtige regulatorische Sequenzelemente, die zur Bildung des Präinitiationskomplexes notwendig sind. Der Präinitiationskomplex ist essentiell, damit die RNA-Polymerase die Transkription des Gens starten kann. Zwei wichtige Sequenzmotive die häufig im Kernpromotor zu finden sind, sind die TATA-Box und das Initiator-Element (Inr). Die TATA-Box befindet sich 25 bis 30 bp vor dem TSS, während die Sequenz des Inr mit dem TSS überlappt (Smale and Baltimore, 1989). Weiterhin kann sich 30 bp hinter dem TSS ein *downstream promoter element* (DPE) befinden. Die Bildung des Präinitiationskomplexes wird eingeleitet, indem sich Transkriptionsfaktoren (TFIID, TFIIA, TFIIB) an diese Sequenzmotive anlagern. Im weiteren Verlauf lagern sich dort die RNA-Polymerase und weitere Transkriptionsfaktoren (TFIIE, TFIIH, TFIIF) an. Nach der Bildung des Präinitiationskomplexes wird die Transkription durch die RNA-Polymerase eingeleitet. Der Kernpromotor ist somit der Bereich, in dem die Bindung der RNA-Polymerase erfolgt und der den Transkriptionsstartpunkt für das Gen enthält (Burke and Kadonaga, 1997; Conaway and Conaway, 1991; Smale and Baltimore, 1989).

### **1.6.2 Der proximale Promotor**

Der proximale Promotor ist der Sequenzbereich, der sich unmittelbar stromaufwärts vor dem Kernpromotor befindet. Die Position liegt für gewöhnlich zwischen -50 und -200 bp, ausgehend vom TSS (Crawford et al., 1999; Roeder, 1991; Strachan, 2005). In diesem Bereich befinden sich weitere regulatorische Elemente. Zu nennen sind hier die GC- und CCAAT-Boxen, an den Transkriptionsaktivatoren binden. Die GC-Boxen befinden sich bevorzugt 45 bis 74 bp vor dem TSS, die CCAAT-Boxen befinden sich bevorzugt 70 bis 105 bp vor dem TSS (Suzuki et al., 2001). Zudem zeigten Roeder und Kollegen für den Sequenzbereich bis 200 bp vor dem TSS eine Akkumulation an Bindestellen für gewebespezifische Transkriptionsfaktoren (Roeder et al., 2009).

### **1.6.3 Der distale Promotor**

Der distale Promotor kann sich einige hundert bis einige tausend Basenbaare vom TSS entfernt befinden. Je nachdem, ob der distale Promotor eine aktivierende, oder eine inhibierende Wirkung auf die Transkription zeigt, wird er als Enhancer oder Silencer bezeichnet. Der Effekt, der an Enhancer/Silencer gebundenen Transkriptionsfaktoren auf die Transkription kann dadurch erklärt werden, dass die DNA durch Schleifenbildung in der Lage ist, zwei weit auseinanderliegende Bereiche in räumliche Nähe zueinander zu bringen. Somit kann ein entsprechender Transkriptionsfaktor in die Nähe des Präinitiationskomplexes gelangen und dort durch Wechselwirkung mit Bestandteilen des Komplexes oder nahe gelegener Transkriptionsaktivatoren die Transkription beeinflussen (Lehninger, 1998).

### **1.6.4 Regulatorische Modifikationen**

Neben regulatorischen Promotorelementen gibt es verschiedene Modifikationen an der DNA und den DNA-Verpackungsproteinen (Histone), die einen direkten Einfluss auf die Gentranskription besitzen können. Im Zellkern liegt die DNA in Verbindung mit Histonen vor. Die Histone bilden ein Histonoktamer mit positiv geladenen Seitenketten, um das sich die negativ geladene DNA windet. Einige AS der Histone können durch Anlagerung bestimmter Molekülgruppen modifiziert werden. So führt ein Anlagern von Methyl- oder Phosphatgruppen zu einer Verstärkung der positiven Ladung der Seitenketten, und damit zu einer stärkeren Affinität zwischen Histonen und DNA. Die Anlagerung von Acetylgruppen führt hingegen zu einer Verminderung oder einem Verlust der positiven Ladung, und

verringert damit die Affinität zwischen Histonen und DNA (Berger, 2002; Goll and Bestor, 2002; Turner, 2002).

Für die Modifikationen auf DNA-Ebene sind Methylierungen des Cytosins bei Cytosin-Guanin-Sequenzen (CpG-Sequenzen) beschrieben, die einen Einfluss auf die Transkription zeigen (Weaver et al., 2004). Zudem zeigten bereits 1987 Gardiner und Kollegen, dass in der Nähe von Genen häufig eine Akkumulation an CpG-reichen Sequenzen auftritt, die dort als CpG-Inseln bezeichnet werden (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Die Entdeckung, dass CpG-Inseln häufig in 5'-Bereich von Genen zu finden sind, hat dazu geführt, dass Promotoren in der Literatur mittlerweile häufig in CpG-arme und CpG-reiche Promotoren eingeteilt werden.

### **1.7 *BUB1B* als Kandidatengen für die Periodische Katatonie**

Stöber und Kollegen zeigten in einer genomweiten Kopplungsstudie mit zwölf Großfamilien mit Periodischer Katatonie, dass Bereiche auf den Chromosomen 15q15 und 22q13 mit der Erkrankung segregieren (Stöber et al., 2000). Die Kopplung auf Chromosom 15q15 wurde in einem zweiten Genscan mit vier weiteren Familien bestätigt. Der gekoppelte Bereich konnte von Stöber und Kollegen durch Rekombinationsergebnisse zwischen den Markern D15S1042 (15q14) und D15S659 (15q15) eingegrenzt werden (Stöber et al., 2002). Freedman und Kollegen zeigten für den unmittelbar benachbarten Bereich auf Chromosom 15q13 eine schwache Kopplung zwischen einem Marker im *CHRNA7*-Gen und Schizophrenie (Freedman et al., 1997). Es gibt viele Hinweise in der Literatur, die *CHRNA7* zu einem idealen Kandidatengen für die Schizophrenie machen (siehe 1.8.1.2). Weitere Untersuchungen mit den Großfamilien mit Periodischer Katatonie zeigten jedoch, dass *CHRNA7* durch Rekombinationsergebnisse als Ursache für die Periodische Katatonie ausgeschlossen werden kann (Meyer et al., 2002). Eine weitere Eingrenzung des Kandidatenlokus auf Chromosom 15 erfolgte von Ekawardhani. Der ca. 4,3 Megabasen große Bereich wird durch die Marker D15S1042 und D15S968 eingegrenzt (Ekawardhani, 2009). Alle in dieser Region befindlichen Gene gelten als potentielle Kandidatengene für die Periodische Katatonie. Bisher sind für diesen Bereich 15 putative und 12 bekannte Gene beschrieben, von denen drei als Ursache für die Periodische Katatonie ausgeschlossen werden konnten (Ekawardhani, 2009). Das *BUB1B*-Gen (*budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta*) befindet sich



ebenfalls in dieser Kandidatenregion und ist damit als potentieller Kandidatengene für die Periodische Katatonie anzusehen.

## 1.8 Fall-Kontroll-Assoziationsstudie

In Assoziationsstudien macht man sich das Vorhandensein von Polymorphismen zu Nutze. Betrachtet wird die Verteilung der jeweiligen Allele. In der klassischen Fall-Kontroll-Assoziationsstudie werden Träger eines Merkmals mit einer Kontrollgruppe, die das Merkmal nicht aufweist, verglichen. Es besteht dabei kein verwandtschaftliches Verhältnis zwischen Merkmalsträgern und Nicht-Merkmalsträgern. Zeigt die Verteilung der Allele in der Gruppe der Merkmalsträger eine signifikante Abweichung zur Verteilung in der Kontroll-Gruppe, so lässt dies einen Zusammenhang zwischen dem Merkmal und dem entsprechenden Allel vermuten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Fall-Kontroll-Studie mit Schizophreniepatienten und gesunden Kontrollpersonen durchgeführt. Untersucht wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) von drei bekannten Kandidatengenen für die Schizophrenie: *bromodomain containing protein 1 (BRDI)*, *nikotinerger Acetylcholinrezeptor, alpha 7 (CHRNA7)* und *D-amino acid oxidase activator (DAOA)*.

### 1.8.1 Kandidatengene für die Schizophrenie-Assoziationsstudie

#### 1.8.1.1 *Bromodomain containing protein 1 (BRDI)*

Das *BRDI*-Gen ist auf Chromosom 22q13.33 lokalisiert. Es kodiert für eine Proteinkomponente, die an der Chromatinregulation beteiligt ist. Aktuellere Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen *BRDI* und dem Auftreten psychiatrischer Erkrankungen, wie Autismus, Bipolarer Störung und Schizophrenie hin (Severinsen et al., 2006; van der Zwaag et al., 2009). So konnten Severinsen und Mitarbeiter in einer Schizophreniestichprobe eine signifikant veränderte Allelverteilung von einem A/C-Polymorphismus im Promotorbereich und einem T/C-Polymorphismus im 3'UTR von *BRDI* nachweisen (Severinsen et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob die von Severinsen und Kollegen gezeigte Assoziation repliziert werden kann.

### **1.8.1.2 Nikotinerger Acetylcholinrezeptor, alpha 7 (*CHRNA7*)**

Das *CHRNA7*-Gen ist auf Chromosom 15q13.3 lokalisiert. Es kodiert für einen nikotinergen Acetylcholinrezeptor. Es handelt sich dabei um einen ligandengesteuerten Ionenkanal, der für eine schnelle Signalweiterleitung an Synapsen verantwortlich ist. Dieses Gen liegt in einer Region, die in Kopplungsstudien schon öfter mit Schizophrenie in Zusammenhang gebracht wurde (Leonard and Freedman, 2006; Shinawi et al., 2009). Zudem lässt auch die Beobachtung, dass viele Schizophrenieerkrankte gleichzeitig starke Raucher sind, den Schluss zu, dass der nikotinerge Acetylcholinrezeptor bzw. *CHRNA7* an der Ätiopathogenese der Schizophrenie beteiligt ist (Stassen et al., 2000). Weiterhin konnten Freedman und Kollegen zeigen, dass der P50-Defizit (*sensory gating deficit, SGD*) in Schizophreniepatienten gekoppelt mit dem Marker D15S1360, dessen Position sich im *CHRNA7*-Gen befindet, vorliegt (Freedman et al., 1996). Bei P50 handelt es sich um eine Methode die Reaktion auf einen akustischen Stimulus zu messen. Dabei werden der Testperson zwei Töne im Abstand von 500 ms vorgespielt und die Reaktion mittels Elektroenzephalografie (EEG) und Elektrokulographie (EOG) gemessen. Die Reaktion tritt für gewöhnlich 50 ms nach dem ersten akustischen Stimulus ein und ist nach dem zweiten akustischen Stimulus inhibiert. Für Schizophreniepatienten wurde gezeigt, dass auch nach dem zweiten Stimulus die Reaktion nach 50 ms (P50) auftritt (Adler et al., 1982). Hochdosierte Nikotingaben normalisieren vorübergehend die P50-Reaktion bei Schizophrenen (Adler et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bestimmte Allelvarianten des *CHRNA7* (ein G/A-Polymorphismus im Promotorbereich, ein C/G-Polymorphismus im Intron und ein T/C-Polymorphismus im Exon) eine Assoziation zu Schizophrenie zeigen.

### **1.8.1.3 D-amino acid oxidase activator (*DAOA*)**

*DAOA* ist auch unter dem Alias *G72* bekannt. Es ist auf Chromosom 13q33.2 lokalisiert. Das Protein ist ein Aktivator der D-Aminosäure-Oxidase (DAAO), einem Enzym, das D-Serin abbaut (Chumakov et al., 2002). D-Serin gilt als Aktivator der NMDA-Rezeptoren. Da gezeigt werden konnte, dass NMDA-Rezeptoren eine Rolle in der Entwicklung von Symptomen der Schizophrenie spielen (Itil et al., 1967; Krystal et al., 1994; Luby et al., 1959), ist *DAOA* als ideales Kandidatengen für die Ätiopathogenese der Schizophrenie anzusehen. Weiterhin wurden bereits einige Polymorphismen in *DAOA* mit Schizophrenie und Bipolarer Störung in Verbindung gebracht (Mossner et al., 2009; Shi et al., 2008). In

dieser Arbeit sollten weitere Polymorphismen, ein T/C-Polymorphismus im Promotor, ein A/G-Polymorphismus im vierten Exon und ein C/T-Polymorphismus im vierten Intron, auf einen Zusammenhang mit Schizophrenie untersucht werden.

## 1.9 Zielsetzung der Arbeit

Mutationen im *MLC1*-Gen sind verantwortlich für die Krankheitsentstehung der megalenzephalen Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten. Des Weiteren wird eine seltene L309M-Variante des Proteins im Zusammenhang mit der Pathogenese von Periodischer Katatonie diskutiert. Die Regulation dieses Gens und die genaue Funktion des Proteins sind bisher unbekannt. Während spätere Studien an *Mlc1*-Knock-Out Mäusen Aufschluss über die Funktion des Mlc1-Proteins geben sollen, sollte hier die Regulation des *Mlc1*-Gens untersucht werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den regulatorischen Bereich des murinen *Mlc1*-Gens zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Dazu sollten potentielle regulatorische Bereiche auf ihre Promotoraktivität überprüft werden. Neben der Aktivitätsbestimmung unter basalen Bedingungen sollten Stimulationen durchgeführt werden, um die Reaktivität des potentiellen Promotors auf verschiedene Stimulantien hin zu überprüfen. In diesem Zusammenhang sollten auch vergleichende Experimente mit dem potentiellen Promotor des humanen *MLC1* durchgeführt werden. Darüberhinaus sollte untersucht werden, ob es in verschiedenen Gehirnarealen von *Mus musculus* qualitative und/oder quantitative Unterschiede bezüglich nachgewiesener *Mlc1*-Transkripte gibt.

Aufbauend auf der Finemapping-Studie von Ekawardhani und Kollegen sollte in einem zweiten Teil der Arbeit ein weiteres Kandidatengen für die Periodische Katatonie untersucht werden. Die Studie basierte auf der von Stöber und Kollegen gefundenen Segregation des Abschnitts auf Chromosom 15q15 mit der Periodischen Katatonie. Der durch Ekawardhani weiter eingegrenzte Bereich beinhaltet das Kandidatengen *BUB1B*, das im Rahmen dieser Arbeit auf eine mögliche Ursache zur Krankheitsentstehung der Periodischen Katatonie hin überprüft werden sollte. Zu diesem Zweck sollten alle exonischen Bereiche durch Sequenzieren auf Mutationen hin überprüft werden.

In einem dritten Teil der Arbeit sollten weitere Kandidatengene in Bezug auf Schizophrenie untersucht werden. Hierzu wurde eine Fall-Kontroll-Assoziationsstudie mit 68 Schizophrenen und 49 Gesunden durchgeführt. Untersucht werden sollte, ob die allelische Ausprägung bestimmter Polymorphismen in den Kandidaten-Gene *BRD1*, *CHRNA7* und *DAOA* mit Schizophrenie assoziiert ist.

## 2 Material und Methoden

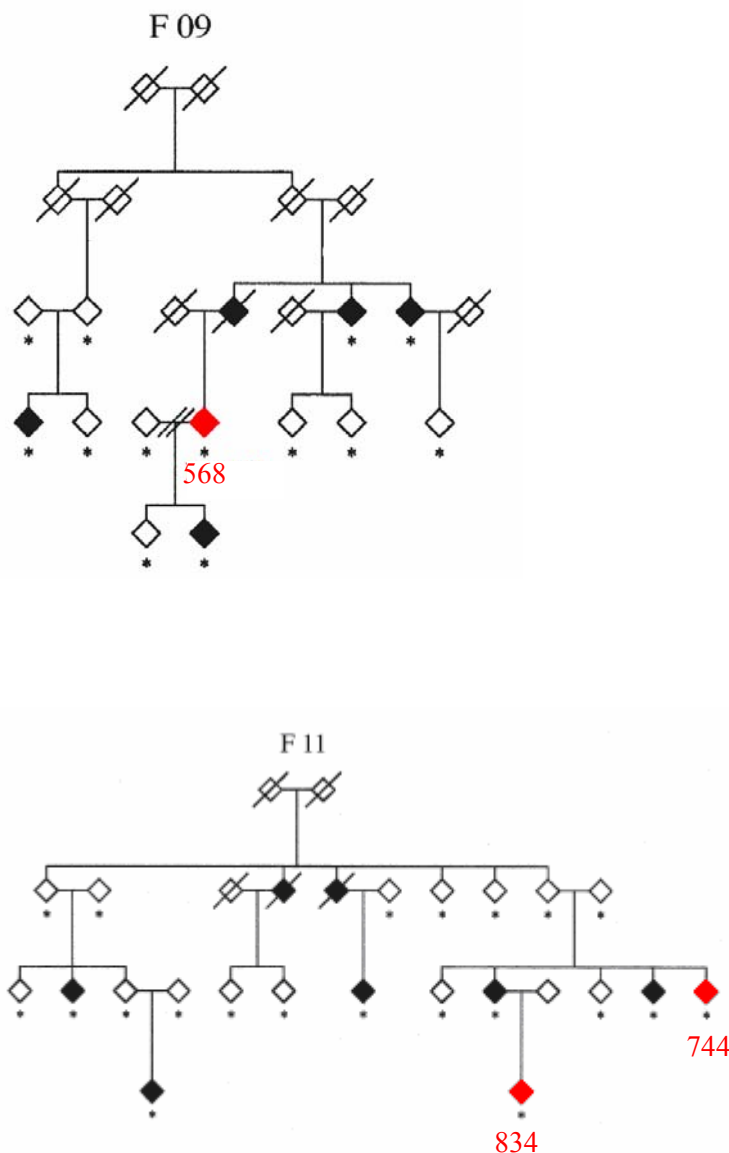
### 2.1 Material

#### 2.1.1 Studienteilnehmer für die Assoziationsstudie

Für die Assoziationsstudie wurde die DNA von 68 Schizophreniepatienten und 49 Kontrollen untersucht. Alle Teilnehmer der Studie wurden zwischen 2003 und 2007 von der Universitätsklinik des Saarlandes rekrutiert. Die Diagnosestellung erfolgte nach den Kriterien des DSM IV. Ausschlusskriterien für die Studie war das Vorliegen einer organisch bedingten ZNS-Störung (Epilepsie, Gehirnverletzungen, infektiöse, toxische oder zerebrovaskuläre Erkrankung), sowie mentale Retardierung oder mangelnde Kenntnisse der deutschen Sprache. Alle Patienten standen zum Zeitpunkt der Untersuchung unter Medikation. Für die Probanden der Kontrollgruppe existierte keine familiäre Vorgeschichte bezüglich neurologischer oder psychologischer Störungen, noch zeigten sie selber Anzeichen solcher Störungen. Bei allen Studienteilnehmern handelte es sich um Europäer. Das durchschnittliche Alter betrug  $47,9 \pm 12,4$  Jahre in der Patientenstichprobe und  $32,5 \pm 10,1$  Jahre in der Kontrollgruppe. Die Geschlechterverteilung lag bei 41 männlichen und 27 weiblichen Probanden in der Patientenstichprobe, sowie 20 männlichen und 27 weiblichen Probanden in der Kontrollgruppe. Für drei Probanden aus der Kontrollgruppe lagen keine Altersangaben vor. Des Weiteren lagen für zwei der drei Probanden ebenfalls keine Angaben über das Geschlecht vor. Die Teilnehmer für die Assoziationsstudie entsprangen dabei aus einer Patientenstichprobe, die von Gruber und Kollegen in einer größer angelegten Studie untersucht wurden. Gruber und Kollegen untersuchten bei Kontrollpersonen und Patienten mit Schizophrenie, Bipolarer Störung oder Zwangsstörung verschiedene parametrische Daten wie Gehirn- und hippocampales Volumen, Lern- und Erinnerungsvermögen, sowie die Konzentration verschiedener Metabolite im Gehirn. Zusätzlich wurden Patienten und Kontrollen genotypisiert, um mögliche Effekte von Allelvarianten bestimmter Gene auf die Ausprägung der gemessenen parametrischen Daten zu erfassen (Gruber et al., 2010).

### 2.1.2 Studienteilnehmer zur Untersuchung von *BUB1B*

Für die Sequenzierung von *BUB1B* wurde auf die Großfamilien mit Periodischer Katatonie zurückgegriffen, die bereits von Stöber und Kollegen untersucht wurden (Stöber et al., 2001). Hierzu wurde die DNA zweier Erkrankter aus Familie Nr. 11 und eines Erkrankten aus Familie Nr. 9 verwendet. Die entsprechenden Personen sind im Stammbaum rot hervorgehoben und mit Nummer angegeben. Als Kontrolle wurde die DNA einer gesunden, weiblichen Probandin (Würzburger Transfusionskontrolle Nr. 66) eingesetzt.



**Abbildung 2.1.1: Familienstammbäume mit Periodischer Katatonie**

Gezeigt sind zwei deutsche Familien mit Periodischer Katatonie, die in Würzburg von Stöber und Kollegen rekrutiert wurden (entnommen von Stöber et al. 2001). Ausgefüllte Symbole sind betroffene und nicht ausgefüllte Symbole sind gesunde Familienmitglieder. Durchgestrichene Symbole stehen für bereits verstorbene Familienmitglieder. Sterne stehen für die Verfügbarkeit von DNA.

### 2.1.3 Gewebe

Als Ausgangsmaterial für die quantitative PCR wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Melly Oitzl, von der Universität Leiden, Gehirngewebe von *Mus musculus domesticus Black 6* zur Verfügung gestellt. Das Material stammte ausschließlich aus männlichen Versuchstieren. Es wurden jeweils vier *Hippocampi*, vier *Hypothalami*, vier *Amygdalae*, zwei *Cortex* und zwei *Cerebella* zur Verfügung gestellt.

### 2.1.4 Zelllinien

Zelllinien	Typ
U373MG (ECACC 89081403)	humane Astrozytenzelllinie
SK-N-SH (ECACC 89081402)	humane Neuroblastomazelllinie
Astrozytenzelllinie (Dr. M. Eckhardt, Universität Bonn)	murine Astrozytenzelllinie

### 2.1.5 Bakterienstämme

Escherichia coli K12, XL1-Blue, (Stratagene, La Jolla, CA, USA)  
 Escherichia coli K12, XL10-Gold, (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

### 2.1.6 Vektoren

Cosmid K08537Q2  
 pUC BM 20  
 pGL3-Basic, Promega, (Madison, USA)  
 pGL3-Control, Promega, (Madison, USA)  
 pGL4.74, Promega, (Madison, USA)

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG und Biomers bezogen. Die verwendete MgCl<sub>2</sub>-Konzentration des Puffers lag bei 15 bzw. 20 mM. Die gewählte Annealing-Temperatur lag je nach Primerkombination zwischen 51 °C und 63 °C.

#### Oligonukleotide zum Expressionsnachweis von *MLC1*:

Gen/ accession number	Name	interne Nr.	Sequenz (5'-3'-Orientierung)
<i>MLC1</i> / <i>NM_015166</i>	hsMLC1 Exon 1A for	# 889	CCAAGGCCACACAGCTAAG
	hsMLC1 Exon 1B for	# 890	TCTTGCTGGAAGTCCCTCAC
	hsMLC1 Exon 1C for	# 891	CCAATTGGAGCAGTTTAACG
	hsMLC1 Exon 1E for	# 892	TCTCACCCCTGAACCCAGACT
	hsMLC1 Exon 2 rev	# 893	AGAAGACCCACGTCTTGTGG

#### Oligonukleotide zum Expressionsnachweis von *Mlc1*:

Gen/ accession number	Name	interne Nr.	Sequenz (5'-3'-Orientierung)
<i>Mlc1</i> / <i>NM_133241</i>	mMlc1_Ex1aF	# 900	CAGCAGTTCAAGGGCCAGC
	mMlc1Ex1bF	# 901	GAGGCCAGCTTTCCCAAC
	mMlc1Ex1cF	# 902	AGAAGCTCACCTCTGTTTGG
	mMlc1Ex1eF	# 903	AGATGAAGGCTGAGTGTGCT
	mMlc1Ex1a-eR	# 904	TGTAGCTGCCTGGGTCCCTGC
	KI-for-A	# 720	TTAGAGAGTTTCGGCTACTG
	KI-for-B	# 721	TTGCTACCAGCCTGAGCTG
	KI-for-C	# 722	CTACTGAAGAACAGGGCATG
	KI-for-D	# 723	AAGAGTCACGATCTTCTCTG
	KI-rev-D	# 724	AGGGATATTAAGTGCGCAAG
	KI-rev-C	# 727	GAGAAGGTTTTATGACAGCC
	KI-rev-B	# 726	TACGTTTGACTTTCTCTGTG
	KI-rev-A	# 725	GAAACAGCTCTGTGAGATCC
	cDNA-Mlc1F(ifoMlc1)	# 651	TTGGGTGTAAACTGATCCTG
	cDNA-Mlc1R(ifoMlc1)	# 652	AGCAGCAGGAGAACATCATA
	mMlc1cDNAFor	# 676	CTAACCATTCACGGCTACT
	mMlc1cDNARev	# 677	CAAGTGAGCTGCCTAGAAGG
	mMlc1cDNA2For	# 678	TATGCAATCAAGGAGAGCAC
	mMlc1cDNA2Rev	# 679	CAGAGAACACCCATGTCTTG
	Mlc1 pgkprom f	# 680	ATTCTCGCACGCTTCAAAG



**Oligonukleotide für verwendete Haushaltsgene:**

Gen/ accession number	Name	interne Nr.	Sequenz (5'-3'-Orientierung)
Aktin	m_Actinb_For	# 565	AGGCTGTGCTGTCCCTGTAT
	m_Actinb_Rev	# 566	GTTTGCTCCAACCAACTGCT
	Aktin-mausF	# 732	ACTACCTCATGAAGATCCTG
Aktin	Beta actin-for	# lux	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC
	Beta actin-rev	# lux	CAATAGTGATGACCTGGCCGT
Gapdh	GAPDH-for	# lux	AATTCAACGGCACAGTCAAGGC
	GAPDH-rev	# lux	CGTGGTTCACACCCATCACAAA
Ppia	PPIA-for	# lux	CAAGACTGAATGGCTGGATGGC
	PPIA-rev	# lux	CAGGACATTGCGAGCAGATGG

**Oligonukleotide für humane *MLC1*-Promotorkonstrukte:**

Name	interne Nr.	Sequenz (5'-3'-Orientierung)
hMLC1MluP1	# 905	ATAACGCGTCTGATGACTTTGCTCAAG
hMLC1XhoIP1	# 906	ATTCTCGAGCTTTATCTCTGCTCACC
hMLC1MluP2	# 907	ATAACGCGTCCACACAGCTAAGCCGA
hMLC1XhoIP2	# 908	ATTCTCGAGAAGAAGTATTCACAAATG
hMLC1MluP3	# 909	ATAACGCGTAACGGCAGAGCAGCGG
hMLC1_XhoI_P3	# 910	ATTCTCGAGTTGGTAGCTAAACGAGAG
hMLCMluP4	# 911	ATAACGCGTCAGCGGGGGAGGTAAGT
hMLCXhoIP4	# 912	ATTCTCGAGCCTCCAGGTGCAACAC
pGL3_for	# -	CTAGCAAATAGGCTGTCCCC
pGL3_rev_2008	# 688	TATGTTTTTGGCGTCTTCCATG

**Oligonukleotide für murine *Mlc1*-Promotorkonstrukte:**

Name	interne Nr.	Sequenz (5'-3'-Orientierung)
Mlc-KI-antisenseF	# 643	ATACTCGAGAAGCTTCCAAAGGCCTG
Mlc-KI-antisenseR	# 644	ATTACGCGTATTACTTGACGAAAATCTCC
Mlc-KIV-antisenseF	# 645	ATTCTCGAGGTCAGTTGAGAGCCTAGAGG
Mlc-KIV-antisenseR	# 646	ATTACGCGTGTTCTTGATTTTGGCAAAGC
Mlc-KI-sense-For	# 650	ATAACGCGTAAGCTTCCAAAGGCCTG
Mlc-KI-sense-Rev	# 651	ATTCTCGAGATTACTTGACGAAAATCTCC
Mlc-KIV-sense-For	# 652	ATTACGCGTGTCAGTTGAGAGCCTAGAGG
Mlc-KIV-sense-Rev	# 653	ATTCTCGAGGTTCTTGATTTTGGCAAAGC
Mlc-KIV-sense-For2	# 675	TCCCTGATTAGAAACCAGTG
mMlc1_MluP1	# 947	ATAACGCGTCAAGTACTCTGGGCTGAG

**Oligonukleotide für murine *Mlc1*-Promotorkonstrukte:**

Name	interne Nr.	Sequenz (5'-3'-Orientierung)
mMlc1_XhoIP1	# 948	ATTCTCGAGGGCAGCCCCAAGGATTG
mMlc1_MluP2	# 949	ATAACGCGTTTCAAGGGCCAGCTTTGC
mMlc1_XhoIP2	# 950	ATTCTCGAGCTGGCCTCTGGGTGATG
mMlc1_MluP3	# 951	ATAACGCGTCATCACCCAGAGGCCAGCT
mMlc1_XhoIP3	# 952	ATTCTCGAGATGGGAACATGAGATTAC
mMlc1_MluP4	# 953	ATAACGCGTCTCACCTCTGTTTGGGAC
mMlc_XhoIP4	# 954	ATTCTCGAGCACACTCAGCCTTCATCT

**Oligonukleotide zur Sequenzierung von *BUB1B*:**

Gen/ accession number	Name	interne Nr.	Sequenz (5'-3'-Orientierung)
<i>BUB1B</i> / <i>NM_001211</i>	Bub1b_P1_for	# 436	ATAAACTACAAGCCCCAGAA
	Bub1b_P1_rev	# 437	CGGAGCCTTCTATTACCTAC
	Bub1b_P2_for	# 438	TATCCTTGCCAAGTTGTCTT
	Bub1b_P2_rev	# 439	CGAAAGCAGGTAGAGAACA
	Bub1b_P3_for	# 440	CACTCCATATAACCCCAATT
	Bub1b_P3_rev	# 430	CCTGGCCTTTTCTATTCTA
	Bub1b_P4_for	# 431	GGATACAGGCTTAGGGTATG
	Bub1b_P4_rev	# 432	TCTTAAAAGGGCGAAAATAC
	Bub1b_P5_for	# 433	TATCTCCAGTGATTGTTTGG
	Bub1b_P5_rev	# 434	GCACTTTATTCAGATGCAAA
	Bub1b_P6_for	# 435	TTGGGATATTTCTGCATTCT
	Bub1b_P6_rev	# 424	TTGACTTCCTTCTTTTTGCT
	Bub1b_P7_P8_for	# 425	TCCTTGAGTTGAGGAAGAAT
	Bub1b_P7_P8_rev	# 426	TGCCTTTGGGAAGTAGAATA
	Bub1b_P9_for	# 427	TATTGATGGCCCTTGTAAT
	Bub1b_P9_rev	# 428	TTGGCTGATACACAGAAACA
	Bub1b_P10_for	# 429	AGAGGCCTAGACCACAAGTT
	Bub1b_P10_rev	# 418	CCGGCTACTAACAGCTAAGA
	Bub1b_P11_for	# 419	ATTGGAAATGACTTTTGTGG
	Bub1b_P11_rev	# 420	AAACGTCAAGGAGACTTCAA
	Bub1b_P12_for	# 421	AAAAGCCTCTTGGACTTTTA
	Bub1b_P12_rev	# 422	CCTGTCTTTCAATCCCTTTA
	Bub1b_P13_P14_for	# 423	TCCTGCTTTCAAACAACAC
	Bub1b_P13_P14_rev	# 412	TGCTTAATTCAAGTCAGTGG
Bub1b_P15_for	# 413	TGCTATTCTGTACCCTGTG	
Bub1b_P15_rev	# 414	ACAAGCACATGCAGAATAAG	
Bub1b_P16_for	# 415	GACAAGAGCAAACCTCCATC	
Bub1b_P16_rev	# 416	GAGTTTGATTGTGCCACTG	

**Oligonukleotide zur Sequenzierung von *BUB1B*:**

<b>Gen/ accession number</b>	<b>Name</b>	<b>interne Nr.</b>	<b>Sequenz (5'-3'-Orientierung)</b>
<i>BUB1B/ NM_001211</i>	Bub1b_P17_P18_for	# 417	ATCCATTTTAAGCATTAGGG
	Bub1b_P17_P18_rev	# 406	TGATGGTAACATGAGGACAG
	Bub1b_P19_for	# 407	AAGGAATGTGTTTCAACCTG
	Bub1b_P19_rev	# 408	GCTAAATGGAGCACAAATCT
	Bub1b_P20_for	# 409	CGTCCAGTAGAGAACAAGG
	Bub1b_P20_rev	# 410	TAAGATGGGAGAATCGTTTG
	Bub1b_P21_for	# 411	TTGTTGGCATAGCTAAGATG
	Bub1b_P21_rev	# 400	AGGAGTCGGTATCAGTAAACA
	Bub1b_P22_for	# 401	CTTCCTACCGAAATAAGCTG
	Bub1b_P22_rev	# 402	AGAGATAGCACCCAAGAGAA
	Bub1b_P23T1_for	# 403	GGTGCATAAATGTACCACTG
	Bub1b_P23T1_rev	# 404	TAGAACAGCAATGGTAGTGC
	Bub1b_P23T2_for	# 405	GCACTACCATTGCTGTTCTA
	Bub1b_P23T2_rev	# 397	TCTGTCTCATCACAACCCTA

**Oligonukleotide zur Genotypisierung:**

<b>Gen/ accession number</b>	<b>Name</b>	<b>interne Nr.</b>	<b>Sequenz (5'-3'-Orientierung)</b>
<i>CHRNA7/ NM_000746</i>	Rs 965435	# 379	AGCATCAAAGACACCAATG
	Rs 965435	# 380	TGAATATTCTTGACCCTTTTCA
	Rs 12899798	# 381	TTTCTGGATGGTAAGGTTGC
	Rs 12899798	# 382	ATGAGATGGGCACCAAATTA
	Rs 2651417	# 383	TGCTACAGAGCTGACTGAGG
	Rs 2651417	# 384	GAGATAAGCCAGAACGAAGG
<i>DAOA/ NM_172370</i>	rs778294neu_for	# 398	TTCTAACCAATGGAACATGG
	rs778294neu_rev	# 399	GGAAGAATCTGCTTCCAAAC
	Rs 1935058_for	# 385	GTATCTCCCCCATAACCAAGC
	Rs 1935058_rev	# 386	TTTTTGCAGGGAGGGATATT
	Rs 9558562_for	# 393	AATTCCTACAATCGCTCCAC
	Rs 9558562_rev	# 394	AAAAGCCCAGAGAAGTTGC
	rs 138880	# 1055	CTGCCAAGGCTCTGCAGAAG
<i>BRDI/ NM_014577</i>	rs 138880	# 1056	CCTAAACCACTCTTCCCC
	rs 4468	# 1072	CAGTGAATTTGTTAGATGATTAC
	rs 4468	# 1073	ATTCTCCCCTCTTCCAC

### 2.1.8 Enzyme

<b>Enzym</b>	<b>Hersteller</b>
<i>EarI</i>	Fermentas, St. Leon Roth
<i>HindIII</i>	Fermentas, St. Leon Roth
<i>KpnI</i>	Fermentas, St. Leon Roth
<i>MluI</i>	Fermentas, St. Leon Roth
<i>MnII</i>	Fermentas, St. Leon Roth
<i>MspI</i>	Fermentas, St. Leon Roth
<i>PflMI</i>	Fermentas, St. Leon Roth
<i>PshAI</i>	Fermentas, St. Leon Roth
<i>XhoI</i>	Fermentas, St. Leon Roth
<i>BtgI</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>SmaI</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Pronase E (1g in 50 ml dH <sub>2</sub> O)	Sigma-Adrich, München
<i>Taq</i> -Polymerase	hausgemacht
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon Roth

### 2.1.9 Medien und Puffer

#### **Lysispuffer**

155 mM NH<sub>4</sub>Cl

10 mM KHCO<sub>3</sub>

0,1 mM EDTA

auf 1000 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> auffüllen

#### **Kernlysispuffer**

10 mM Tris-HCl pH 8

400 mM NaCl

2 mM Na<sub>2</sub>EDTA-Puffer

(pH 8,2)

auf 1000 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> auffüllen

**10xRB**

10,5 g MOPS

1 g NaAcetat

0,5 g EDTA

mit H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> auf etwa 230 ml auffüllen und den pH Wert mit 6 N NaOH auf 7,0 einstellen,  
danach mit H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> auf 250 ml auffüllen

**1xRB**

22 ml 10xRB + 200 ml DEPC-H<sub>2</sub>O

**DEPC-H<sub>2</sub>O**

1 ml DEPC auf 1 L H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>

nach 24 stündiger Inkubationszeit autoklavieren

**RNase-Away:**

0,4 N NaOH

0,5 % SDS

1 L H<sub>2</sub>O

**PCR-Puffer**

	<b>Tris-HCl (pH 8,3)</b>	<b>Tween20</b>	<b>BSA</b>	<b>MgCl<sub>2</sub></b>
<b>Puffer A</b>	100 mM	0,25%	0,25 mg/ml	7,5 mM
<b>Puffer B</b>	100 mM	0,25%	0,25 mg/ml	10 mM
<b>Puffer C</b>	100 mM	0,25%	0,25 mg/ml	15 mM
<b>Puffer D</b>	100 mM	0,25%	0,25 mg/ml	20 mM

### **TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl pH 8

0,1 mM EDTA

### **LB-Agar Platten**

5 g NaCl

5 g Trypton

2,5 g Hefeextrakt

10 g Agar Agar

auf 500 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> auffüllen und autoklavieren

25 ml der noch flüssigen Lösung in Petrischalen überführen und aushärten lassen

### **LB-Medium**

5 g NaCl

5 g Trypton

2,5 g Hefeextrakt

auf 500 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> auffüllen und autoklavieren

### **TB-Puffer (Transformationspuffer nach Inoue et al. (1990))**

10 mM PIPES 3g/L

15 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 2,25 g/L

250 mM KCl 18,7 g/L

mit 2,5 - 3 ml KOH<sub>5N</sub> auf pH 5,6 - 6,7 einstellen

55 mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 10,9 g/L (erst nach Einstellung des pH-Wert zugeben!)

mit H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> auf 1 L auffüllen.

vor dem Gebrauch sterilfiltrieren

### **Einfriermedium:**

90% D-MEM (+10 % FKS)

10 % DMSO

### 2.1.10 Reagenzien

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Bovine Albumin Serum (BSA)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Dexamethason	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	Biowest, Nuaille, Frankreich
Dulbecco's MEM High Glucose (DMEM)	Biowest, Nuaille, Frankreich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biowest, Nuaille, Frankreich
Dinatriummethylenediamineteracetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethanol (100%)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	Biowest, Nuaille, Frankreich
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Forskolin (For)	Sigma-Aldrich, München
Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon
Gene Ruler 1Kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon
L-Glutamin (2 mM)	Biowest, Nuaille, Frankreich
Glycerin Amresco	Ohio/USA
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES Puffer	Biowest, Nuaille, Frankreich
IPTG (Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid)	Sigma-Aldrich, München
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
PIPES	Roth, Karlsruhe

Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA)	Sigma-Adrich, München
Penicillin/Streptomycin	Biowest, Nuaille, Frankreich
RNase-Inhibitor	Fermentas, St. Leon
SuperFect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Taq-Polymerase	hausgemacht
TBE Puffer (10X) Rotiphorese	Roth , Karlsruhe
Trypsin	Biowest, Nuaille, Frankreich
Tryptanblau	Biowest, Nuaille, Frankreich
Trypton/Pepton	Roth , Karlsruhe
Tween 20	Roth , Karlsruhe

### 2.1.11 Stimulantien

Es wurden folgende Stocklösungen angesetzt, die vor Gebrauch mit serumhaltigem Medium auf die jeweilige Endkonzentration eingestellt wurden:

#### **Dexamethason (1 mM):**

10 mg Dexamethason  
 5,5 ml DMSO  
 20 ml serumfreies Medium (DMEM)

#### **Forskolin (10 mM):**

5 mg Forskolin  
 1,218 ml DMSO

#### **PMA (0,1 mM):**

1 mg PMA  
 16,21 ml DMSO

#### **LPS (1mg/ml):**

1 mg LPS  
 1 ml PBS



Die Lagerung des 10 mM Forskolins erfolgte im Kühlschrank, alle anderen Stocklösungen wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.1.12 kommerzielle Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
dNTPs (ATP, TTP, CTP, GTP)	Fermentas, St. Leon Roth
Min Elute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
peqGold Gel Extraction Kit	PeqLab, Erlangen
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II	PeqLab, Erlangen
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
peqGOLD RNAPure	PeqLab, Erlangen
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon Roth
Big Dye Terminator v.1.1. Cycle Sequencing	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Genome Lab DTCS Quick Start Kit	Beckman Coulter, USA

### 2.1.13 Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer PE	Applied Biosystems, Weiterstadt
Brutschrank	Sanyo, München
CEQ8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter
D-50 Digital-Kamera	Nikon, Düsseldorf
DU-62-Spectrometer	Beckman
Electrophoresis Power Supply EPS200	Pharmacia Biotech, Freiburg
Gelkammer LKB GNA 100	Pharmacia Biotech, Freiburg
Gene Amp PCR-System 9700 PE	Biosystems, Weiterstadt
Opticon 2 Real-Time PCR Detection-System	<i>MJ Research, Landgraf,</i> Niederlande
2 RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech, Freiburg
Microplate Luminometer	Berthold, Oak Ridge, USA

Mikroskop	Hundt, Wetzlar
Mikrowellengerät	Sharp, Hamburg
Sterilbank	Jouan, Fernwald
Spektrophotometer	Bertold, Oak Ridge, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Z 233 M	Hermle, Wehingen
Tischzentrifuge Z 233 MK-2	Hermle, Wehingen
UV-Schirm N -90M	INTAS UV – Systeme, Wiesloch
Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia/NY
Waage L420P	Sartorius Laboratory, Göttingen
Wärmeblock Schutron	Schnipptherm Wolf, York/UK

#### 2.1.14 Datenbanken

<b>Datenbanken</b>	<b>Web-Adresse</b>
Bimas-Promotor-Scan	<a href="http://bimas.dcert.nih.gov/molbio/proscan/">http://bimas.dcert.nih.gov/molbio/proscan/</a>
ClustalW	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html</a>
Genecards	<a href="http://www.genecards.org">http://www.genecards.org</a>
Database of Transcriptional Start Sites	<a href="http://dbtss.hgc.jp/">http://dbtss.hgc.jp/</a>
Ensembl	<a href="http://ensembl.org">http://ensembl.org</a>
Human Genome Browser Gateway	<a href="http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway">http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway</a>
NEBcutter	<a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php">http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php</a>
Primer3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_">http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_</a>
PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Fall-Kontroll-Studie

Für die von Gruber und Kollegen geplante Assoziationsstudie wurden 191 psychisch erkrankte Patienten, 24 Angehörige, sowie 49 gesunde Kontrollen genotypisiert. Eine Untergruppe der psychiatrisch Erkrankten, die mit Schizophrenie diagnostizierten Patienten, sollten in der hier vorliegenden Arbeit auf eine Assoziation zu bestimmten Allelvarianten untersucht werden. Insgesamt standen 68 Schizophreniepatienten und 49 gesunde Kontrollen für die Schizophrenie-Assoziationsstudie zur Verfügung. Die untersuchten Polymorphismen in verschiedenen Genen, sowie die verwendeten Restriktionsenzyme samt Schnittstellen sind in Tabelle 2.2.1 aufgeführt. Zur Genotypisierung wurde zunächst ein DNA-Abschnitt mittels PCR vervielfältigt. Im Anschluss wurde die DNA mit dem jeweiligen Enzym geschnitten. Pro Restriktionsschnitt wurden 10 µl des PCR-Produkts eingesetzt. Dabei wurden die Angaben in der Gebrauchsanleitung vom Hersteller beachtet. Die geschnittene DNA wurde über ein Agarosegel aufgetrennt, und die Größe der DNA-Banden mit Hilfe eines Größenmarkers bestimmt. Die erhaltene Allelverteilung wurde mit der Verteilung in der Gesamtbevölkerung verglichen. Mit der Berechnung des Signifikanzwerts (*p-value*) der logistischen Regression wurde die Verteilung auf statistisch signifikante Unterschiede überprüft.  $P < 0,05$  gilt dabei als signifikant.

Gen	SNP	Enzym
<i>DAOA</i>	rs1935058	<i>Mnl1</i>
<i>DAOA</i>	rs9558562	<i>Ear1</i>
<i>DAOA</i>	rs778294	<i>Msp1</i>
<i>CHRNA7</i>	rs965435	<i>PshA1</i>
<i>CHRNA7</i>	rs12899798	<i>PflM1</i>
<i>CHRNA7</i>	rs2651417	<i>Mnl1</i>
<i>BRD1</i>	rs138880	<i>BtgI</i>
<i>BRD1</i>	rs4468	<i>SmaI</i>

Tabelle 2.2.1: Untersuchte Polymorphismen

### 2.2.2 Erstellung der *Mlc1*-Promotorkonstrukte

Um die regulatorische Region von *Mlc1* zu identifizieren, wurden verschiedene Promotorkonstrukte erstellt. Dazu wurden die zu untersuchenden DNA-Fragmente in den pGL3-Basic Vektor eingebracht. Die zu untersuchenden DNA-Bereiche vor dem

Transkriptionsstart von *Mlc1* wurden mittels PCR vervielfältigt. Um an dem 5'- und 3'-Ende des DNA-Fragments Restriktionsschnittstellen zu erhalten, die zu den Schnittstellen im Polylinker des pGL3-Basic Vektor kompatibel sind, wurden spezielle Primer verwendet. Die Primer wurden dabei so konzipiert, dass sie neben der zur DNA passenden Sequenz an ihrem 5'-Ende weitere Nukleotide besitzen, die eine *XhoI*- bzw. *MluI*-Erkennungsstelle beinhalten. Ausserdem sind dieser Erkennungssequenz drei weitere, beliebige Nukleotide angehängt, die dafür sorgen, dass dem Enzym eine Bindung an die DNA erleichtert wird und sich dadurch die Restriktionseffizienz erhöht. Anschließend wurde das PCR-Produkt mit *XhoI* und *MluI* geschnitten (s. 2.2.10.2) und aufgereinigt (s. 2.2.8). Mit dem pGL3-Basic Vektor wurde auf die gleiche Weise verfahren. Da dadurch Vektor und DNA-Fragment beide kompatible Enden aufwiesen, konnte im Anschluss eine Ligation durchgeführt werden. Durch die Ligation werden die kompatiblen DNA-Enden kovalent miteinander verknüpft. Um zu Überprüfen, ob der Einbau des DNA-Fragments in den pGL3-Basic erfolgreich war, wurde das Ligationsprodukt in kompetente Bakterien transfiziert. Die Bakterien wurden hochgezogen und anschließend eine *Colony*-PCR durchgeführt. Anhand der Größe des erhaltenen PCR-Produkts konnte erkannt werden, ob das DNA-Fragment eingebaut wurde. Um zu überprüfen, dass die jeweiligen Promotorkonstrukte die erwartete Nukleotidsequenz zeigten, wurden alle Konstrukte sequenziert.

mMlc1\_MluP1\_forward: 5'-**ataacgcgt**caagtactctgggctgcg-3'  
 mMlc1\_XhoIPI\_reverse: 5'-**attctcgagg**gcagccccaaggattg-3'

**Abbildung 2.2.1: Primerdesign für die Promotorkonstrukte**

Zu sehen sind hier zwei verwendete Primer zur Erstellung des pGL3-mB-Promotorkonstruktes. Fett hervorgehoben ist die Erkennungssequenz für das jeweilige Restriktionsenzym. Grün markiert sind weitere angehängte Nukleotide, die für eine effizientere Restriktion sorgen.

### 2.2.3 DNA Isolation aus Leukozyten

Für die DNA Isolation wurden 10 ml Blut in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 30 ml 4 °C kaltem Lysispuffer versetzt. Die Lösung wurde im Anschluss stark durchmischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 20 min bei 400 g und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und dem Pellet 10 ml Kernlysispuffer zugegeben. Nach starkem Durchmischen wurden 660 µl 10%iges SDS zugegeben und stark geschüttelt, um die Kernmembranen der Lymphozyten aufzubrechen. Dann erfolgte die Zugabe von 500 µl Pronase E (20 µg/ml) und ein 20 - 120 stündiger Inkubationsschritt im Inkubator bei 37 °C

und 130 rpm. Während dieser Zeit erfolgte die proteolytische Wirkung der Pronase, um Ribonukleasen, Histone und andere störende Proteine abzubauen. Nach der Inkubation wurden der Lösung 3,4 ml einer 6 molaren NaCl-Lösung zugegeben und stark gevortext, um die abgebauten Proteine zu fällen. Durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 3000 g wurden die ausgefallenen Peptide pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltene DNA wurde durch Zugabe von 7,5 ml 100 %igem Isopropanol ausgefällt. Um die DNA in ein vorbereitetes 1,5 ml -Reaktionsgefäß mit 500 µl TE-Puffer zu überführen, benutzt man eine als „Angel“ umfunktionierte Pasteurpipette. Dazu wurde die Spitze der Pasteurpipette zu einem Hakenförmigen Ende umgeschmolzen. Nachdem man die DNA in den TE-Puffer überführt hatte, wurde die Lösung durchmischt und über Nacht stehen gelassen, damit sich die DNA gut lösen konnte. Im Anschluss erfolgte eine photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration und eine Erstellung einer DNA-Arbeitslösung mit einer Konzentration von 20 ng/µl.

#### **2.2.4 RNA Isolation**

Zur RNA Isolation wurde das peqGOLD RNAPure Kit verwendet. Die Gewebeproben wurden vor der Isolation gewogen und mit 100 µl peqPure versetzt. Die Homogenisierung erfolgte per Hand mit einem PP-Pistill. Danach wurden die Homogenisate mit 1 ml peqPure pro 50 mg Frischgewicht aufgefüllt und 5 min bei RT inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten genau nach Anweisung des Herstellers. Die isolierte RNA wurde anschließend in 30 - 60 µl RNase freiem Wasser gelöst. Um die Qualität der RNA zu überprüfen, wurde ein Aliquot der Probe auf einem RNA-Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt.

#### **2.2.5 Reverse Transkription**

Die RNA wurde mit Hilfe des RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit umgeschrieben. Hierbei wurde die RNA mit Dnase versetzt. Dazu wurde ein 20 µl Reaktionsansatz mit ca. 1 µg RNA, 2 µl 10x Dnase Puffer, 0,5 µl Rnase Inhibitor, 0,5 µl Dnase und einer entsprechenden Menge Rnasefreies H<sub>2</sub>O für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde im Anschluss durch Zugabe von 2 µl 25 mM EDTA und fünfminütiges Erhitzen auf 65 °C abgestoppt. Bei der Umschreibung der RNA in cDNA wurden oligodT-Primer verwendet.

## 2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um bis zu 3 kb große DNA-Sequenzen zu vervielfältigen. Der Start und das Ende der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz werden durch Primer, ca. 20 bp lange Oligonukleotide, festgelegt. Diese binden an die komplementäre Sequenz des einzelsträngigen DNA-Strangs und bilden somit den Startpunkt für die DNA-Polymerase, das Enzym, welches den DNA-Strang durch Einbau von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) vervollständigt. Das Prinzip der PCR beruht auf drei Phasen, die 35- bis 40-mal wiederholt werden. Phase 1 ist die Denaturierungs-Phase bei 94 °C, hier wird der doppelsträngige DNA-Strang in zwei Einzelstränge aufgetrennt. In der folgenden Annealing-Phase binden die Primer an die komplementäre Sequenz auf dem DNA-Einzelstrang. Hier ist die gewählte Temperatur von der Primerlänge und dem GC-Gehalt abhängig und liegt meistens zwischen 50 und 65 °C. Die dritte Phase ist die Elongations-Phase, sie findet bei 72 °C statt, da die verwendete thermostabile Taq-DNA-Polymerase hier ihre optimale Aktivität aufweist. Für jedes verwendete Primerpaar wurden experimentell der zu verwendende Puffer und die optimale Annealingtemperatur bestimmt. Je nach Länge des zu erwartenden DNA-Fragments wurde ebenfalls die Elongationszeit verändert, als Richtwert galt hierfür 60 s pro 1 kb erwartete Fragmentgröße.

### 2.2.6.1 *Qualitative PCR*

Bei der qualitativen PCR geht es um den Nachweis eines Genprodukts. Dazu nimmt man eine genügend hohe Anzahl an Zyklen, um eine genügend hohe Ausbeute des Genprodukts zu erhalten. Standardmäßig wird die Reaktion in einem 50 µl Reaktionsansatz angesetzt. Für die durchgeführten PCR-Reaktionen ist hier als Beispiel der Reaktionsansatz für eine PCR mit *Mcl1*-Primern (mMcl1Exon 1C) und das dazugehörige, verwendete PCR-Programm angegeben.

PCR Ansatz:

5 µl DNA (20 ng/µl)

36,8 µl H<sub>2</sub>O

5 µl Puffer C

1 µl dNTPs (10 mM)

1 µl # 900 (10 pmol)

1  $\mu$ l # 902 (10 pmol)

0,2  $\mu$ l Taq-Polymerase (0,5 U)

PCR-Programm:

94°C – 4 min

94°C – 30 s

63°C – 30 s    39 x

72°C – 30 s

72°C – 10 min

4°C –  $\infty$

### 2.2.6.2 Colony-PCR

Die Colony-PCR dient dem schnellen Nachweis von “positiven” Bakterienkolonien. In den hier verwendeten Experimenten wurden die jeweiligen Plasmide in *Escherichia coli* eingebracht. Durch pGL3 spezifische Primer konnte untersucht werden, ob die auf den LB-Amp-Platten gewachsenen Bakterienkolonien das jeweilige Insert im pGL3 Vektor integriert war. Dazu wurde ein 50  $\mu$ l PCR-Reaktionsansatz vorgelegt. Mit einem sterilen Zahnstocher wurde nun ein Teil der Bakterienkolonie zu dem Reaktionsansatz gegeben und ein anderer Teil auf eine neue LB-Amp-Platte überführt. Für die PCR wurden 25 Zyklen gewählt.

### 2.2.6.3 Quantitative PCR (Real Time PCR)

Um die Expressionsstärke der verschiedenen *Mlcl*-Transkripte zu untersuchen, wurde zunächst die RNA der jeweiligen Gewebe in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe der quantitativen *real time* PCR wurde anschließend die ursprüngliche Menge der cDNA in einem Reaktionsansatz ermittelt. Dazu wurde das *Opticon 2 Real-Time PCR Detection System* verwendet. Dieses Gerät dient der Detektion von PCR-Produkten über die Bindung von SYBR Green I an doppelsträngige DNA. Gemessen wurden die Ct-Werte (*cycle threshold*), also die Werte, ab denen die gemessene Fluoreszenz signifikant über das Hintergrundrauschen hinausgeht. Dabei handelt es sich um die Phase, in der die cDNA exponentiell vermehrt wird. Eine Quantifizierung ist nur während dieser exponentiellen Phase möglich. Für die PCR wurden 25  $\mu$ l Reaktionsansätze bestehend aus 20 mM Tris-HCl (pH

8,4), 50 mM KCl, 200 mM dNTPs, 1fach konzentriertes SYBR Green (Cambrex, Verviers, Belgien) und 2,5 U Platinum Taq DNA-Polymerase (Invitrogen) angesetzt. Das PCR-Programm setzte sich wie folgt zusammen: zwei min bei 95 °C, 40 bis 44 Zyklen mit 20 s bei 95 °C, 20 s Annealing und 20 s bei 72 °C, gefolgt von 10 min bei 72 °C.

Die verwendete MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, die eingesetzte Primerkonzentration, sowie die *Annealing*-Temperatur und Zyklenanzahl wurden experimentell ermittelt. Um die Spezifität der Reaktion zu Übrüfen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Zusätzlich wurden die PCR-Proben nach der Reaktion auf einem Agarose Gel aufgetrennt, um die Reaktion auf eventuelle unspezifische Nebenprodukte zu überprüfen. Als Auswertung wurde die relative Quantifizierung gewählt. Hierzu wurde die relative Expression der mRNA mit der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001), unter Verwendung eines stabilen Haushaltgens berechnet. Zur Normalisierung wurde das murine  $\beta$ -Aktin (*Actb*), *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* (*Gapdh*) und *Peptidylprolyl Isomerase A* (*Ppia*) verwendet. Die jeweiligen ermittelten PCR-Bedingungen sind in Tabelle 2.2.2 angegeben.

Amplikon	Amplikongröße (bp)	c (MgCl) (mM)	c (Primer) (mM)	Annealingtemp. (°C)	Zyklen
<i>Actb</i>	138	3	0,5	59	44
<i>Gapdh</i>	249	2	1	54	44
<i>Ppia</i>	235	3	0,5	59	44
<i>Astrozytenzelllinie</i>					
<i>Mlc1</i> Exon 1B	143	2	1	62	44
<i>Mlc1</i> Exon 1E	480	1,5	0,5	65	47
<i>Gehirngewebe</i>					
<i>Mlc1</i> Exon 1B	143	2	1	62	44
<i>Mlc1</i> Exon 1E	480	1,5	0,1	65	47

Tabelle 2.2.2: Optimierte Bedingungen für die Real Time PCR

### 2.2.7 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, durch die Größe und Länge von Nukleinsäure-Fragmenten abgeschätzt werden können. Durch das Anlegen einer Spannung werden die Nukleinsäure-Fragmente in dem Gel ihrer Größe nach aufgetrennt. Mit Hilfe eines Größenmarkers, der aus Fragmenten bekannter Länge besteht, kann die Größe der aufgetrennten Nukleinsäuren bestimmt werden. Je nachdem, ob DNA- oder RNA-Fragmente aufgetrennt werden sollten, wurden unterschiedliche Gelelektrophorese-Methoden verwendet.



### **2.2.7.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Zu analytischen und präparativen Zwecken wurden die DNA durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Je nach aufzutrennender Fragmentgröße wurden 0,8 %ige (bei einer Fragmentlänge zwischen 1-10 kb) bis 2 %ige Agarosegele (bei Fragmentlängen unter 0,5 kb) verwendet. Für ein mittelgroßes 1 %iges Agarosegel wurde 1,5 g Agarose in 150 ml 0,5 x TBE-Puffer im Mikrowellenherd aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurden 9 µl Ethidiumbromid-Lösung hinzugegeben, und die Gellösung in das vorbereitete Gelbett gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde es in eine mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllte Gelkammer gegeben. Es war darauf zu achten, dass das Gel mit dem Puffer bedeckt ist. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 2 µl Ladepuffer versetzt. Als Längenstandard wurde entweder ein 100 bp Marker (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus, Fermentas, St. Leon-Rot) oder ein 1 kb Marker (1 kb Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Durch Anlegen einer Spannung von 120 – 160 V und einer Stromstärke von bis zu 400 mA wanderten die DNA-Fragmente aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrats in Richtung Anode. Hierbei wandern kleine Fragmente schneller durch das Gel als große, was eine Auftrennung der DNA-Banden nach der jeweiligen Größe erlaubt. Anschließend wurde das Gel in einer Dunkelkammer auf einen UV-Tisch gelegt und die Bandengröße bzw. Fluoreszenz der Bande durch eine Digitalkamera dokumentiert.

### **2.2.7.2 Formaldehyd-Agarosegel**

Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurde die RNA über ein denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Dazu wurden die Arbeitsfläche und alle Arbeitsgegenstände gründlich mit RNase Away abgewischt. Für ein kleines RNA-Gel (70 ml) wurden 0,7 g Agarose in 58 ml DEPC-H<sub>2</sub>O aufgeköcht. Nach Abkühlen auf 60 °C wurden 7 ml 10xRB und 4,6 ml Formaldehyd zugeben und das noch flüssige Gel in eine vorbereitete Form gegossen. Als Laufpuffer wurde 1xRB verwendet. Vor dem Beladen des Gels mit den Proben, wurden diese denaturiert. Dazu wurden in ein steriles 1,5 ml -Reaktionsgefäß 2 µl 10xRB, 2,4 µl Formaldehyd, 8 µl Formamid und 8 µl RNA (1µg RNA mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 8 µl aufgefüllt) gegeben und für 15 min bei 65 °C denaturiert. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt, 0,4 µl EtBr zugegeben und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung fand unter dem Abzug für 1-2 h bei 60 V statt.

### 2.2.8 Aufreinigung von DNA Fragmenten

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde das peqGold Gel Extraction Kit verwendet. Die DNA wurde schließlich in 20-30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  eluiert und für weitere Experimente wie z.B. Sequenzierung oder Ligation verwendet.

### 2.2.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Dazu wurde ein PCR-Ansatz erstellt, der nur einen Primer (forward oder reverse) enthielt. Außerdem wurden neben den üblichen dNTPs auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleinsäure-triphosphate (ddNTPs) zugegeben, wobei jedes der vier Nukleotide eine andere Farbmarkierung erhält. Wird während der Elongationsphase ein ddNTP in den DNA-Strang eingebaut, bricht die Synthese ab. Man erhält so verschieden lange Fragmente, die durch eine Kapillare der Größe nach aufgetrennt werden. Ein Laser detektiert die Signale des fluoreszierenden Farbstoffs, woraus sich die Nukleotidsequenz ableiten lässt. Um ein möglichst sauberes Signal zu erhalten, wurde das PCR-Produkt vorher aufgereinigt. Dazu wurde die mitgelieferte CleanSEQ-Flasche mit den *magnetic beads* geschüttelt, um die *beads* zu resuspendieren. Im Anschluss wurden 10  $\mu\text{l}$  der *magnetic beads* in das PCR-Reaktionsgefäß mit der DNA-Probe überführt. Dann wurden 62  $\mu\text{l}$  85% EtOH zugeben und durch 5- bis 7- mal auf- und abpipettieren gemischt. Die Probe wurde in die Sequenzierplatte überführt und für 3 min auf eine Magnetplatte gestellt. Hierbei lagern sich die *magnetic beads*, an denen sich die DNA-Stränge angelagert haben, ringförmig am Gefäßrand an.

Dann wurde der Überstand vollständig abgenommen und verworfen, der *bead*-Ring, der sich durch die Inkubation gebildet hatte, sollte dabei nicht berührt werden. Anschließend erfolgte ein Waschschriff mit 100  $\mu\text{l}$  85%iger EtOH für 30 s. Erneut wurde der Überstand vollständig entfernt. Nun wurde die Sequenzierplatte von der Magnetplatte heruntergenommen und die Proben in 40  $\mu\text{l}$  *sample loading solution* (SLS) resuspendiert. Um die *magnetic beads* zu pelletieren, wurde die Sequenzierplatte noch einmal für 3-5 min auf die Magnetplatte gestellt, diesmal jedoch mit einem Blatt Papier dazwischen, damit sie sich am Gefäßboden absetzen. Nachdem sich die *magnetic beads* am Gefäßboden abgesetzt hatten, wurde den Proben als Verdunstungsschutz ein Tropfen Mineralöl zugegeben und der Sequenzierer mit den Proben beladen.

## 2.2.10 Klonierung

### 2.2.10.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Beim Klonieren werden ringförmige DNA-Moleküle (Plasmide) als Vektoren verwendet, um bestimmte DNA-Sequenzen in Bakterien einzubringen. Die hohe Teilungsrate der Bakterienzellen und die Replikation des Vektors in der Zelle führen zu einer starken Vermehrung der eingebrachten DNA. Damit Bakterien in der Lage sind DNA aufzunehmen, müssen diese zuerst "kompetent" gemacht werden. Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde ein abgewandeltes Protokoll nach Inoue und Kollegen (1990) verwendet. Dazu wurden 3 ml LB mit 50 µl Tetracyclin (6 mg/ml) versetzt und mit einer frisch gepickten Kolonie von *XL-1 blue* bzw. *XL10 gold* angeimpft. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C und 190 rpm in einem Inkubator 16-18 h inkubiert. Von dieser Vorkultur überimpfte man 400 µl in einen sterilen 1 l Kolben mit 200 ml Flüssig-LB-Medium, das zuvor mit 1 ml Mg<sup>2+</sup> versetzt wurde. Die überimpften Bakterien wurden nun für weitere 8 - 10 h bei einer Temperatur von 30 °C und 170 rpm inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,5 erreicht war. Es folgte eine 10 minütige Inkubation der Bakterien auf Eis. Dann wurden die Bakterien vorsichtig in sterile 50 ml Reaktionsgefäß dekantiert und für 10 min bei 2500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien-Pellets vorsichtig in insgesamt 50 ml eiskaltem, sterilfiltriertem TB-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 2500 g und 4 °C. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und verworfen. Es folgte eine wiederholte Resuspendierung der Bakterien-Pellets in diesmal insgesamt 20 ml eiskaltem, sterilfiltriertem TB-Puffer. Nach Zugabe von 1,5 ml DMSO (entspricht einer Endkonzentration von 7 %) wurden die Bakterien kurz durchmischt und je 100 µl in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Bakterien wurden so auf einem Eisakku über Nacht im Kühlschrank gelagert, um eine höhere Transformationseffizienz zu erreichen, und am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 2.2.10.2 Restriktionsschnitt

Restriktionsenzyme sind Enzyme, die bestimmte DNA-Sequenzen erkennen und zerschneiden. Dies wird genutzt, um z. B. ringförmige DNA zu linearisieren, Fremd-DNA einzubringen, oder bestimmte Polymorphismen nachzuweisen.

Für den Restriktionsschnitt wurden 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl 10x Puffer, 7,7 µl H<sub>2</sub>O und jeweils 0,35 µl des jeweiligen Enzyms versetzt und für 2-3 h bei 37 °C inkubiert. Für das Enzym *SmaI* wurde die von New England Biolabs empfohlene Temperatur von 25 °C eingehalten.

### **2.2.10.3 Ligation**

Die Ligation ist eine enzymvermittelte Reaktion, bei der zwei kompatible DNA-Enden kovalent miteinander verbunden werden. Für die Ligationsreaktion wurden die zu ligierenden DNA-Fragmente, 2 µl des Ligase-Puffers und 1 µl Ligase mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt und über Nacht (bis zu 3 Tage) im Kühlschrank inkubiert. Die Reaktion wurde im Anschluss für 10 min bei 65 °C abgestoppt, um den DNA-Enzym-Komplex zu zerstören und dadurch die Transformationseffizienz zu erhöhen. Zur Ligation wurden 50 ng linearisierter Vektor (pGL3-Basic) mit der 3-5 fachen molaren Menge an einzubringender DNA versetzt. Dabei richtet sich die genaue Menge nach der Formel:  $X \text{ ng DNA} = (\text{Summe an bp DNA} * 50 \text{ ng Vektor}) / \text{Summe bp Vektor-DNA}$ .

### **2.2.10.4 Transformation**

Die Transformation ist eine Methode, um DNA in Bakterienzellen einzubringen. Die jeweiligen Plasmide wurden in Inoue-kompetenten Bakterienzellen des Stammes XL-1 blue bzw. XL10 gold eingebracht. Hierzu wurden den Bakterien 8 - 10 µl einer Ligationsreaktion zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein "heat shock" für 45 s bei 42 °C und eine sofortige Inkubation von 2 - 3 min auf Eis. Danach wurde der Ansatz mit 700 µl LB-Medium versetzt und für 45 - 60 min auf einem Schüttler bei 37 °C inkubiert. 100 µl der Bakteriensuspension wurden dann auf vorgewärmte LB-Amp Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank hochgezogen.

### **2.2.10.5 Hochziehen von Bakterien**

Zum Hochziehen einzelner Bakterienkolonien wurden LB-Agarplatten verwendet. Diese wurden je nach Resistenz des jeweiligen Plasmids mit dem entsprechenden Antibiotikum behandelt. Die Anzucht erfolgte dabei für 12 - 16 h bei 37 °C im Brutschrank. Um eine

größere Menge an Bakterien zu erhalten, erfolgte eine Anzucht der Bakterien in bis zu 200 ml Flüssig-LB-Medium. Dieses wurde ebenfalls mit einem Antibiotikum als Selektionsmarker versetzt. Die Inkubation der Bakterien erfolgte für 12 - 16 h bei 37 °C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator.

#### ***2.2.10.6 Plasmid isolation***

Je nach benötigter Plasmidmenge erfolgte die Isolation mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II oder dem Qiagen Plasmid Midi Kit. Hierbei wurden die isolierten Plasmide in 50 µl bzw. 200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration photometrisch, sowie mittels Gelelektrophorese überprüft.

#### ***2.2.10.7 Lagerung von Bakterien***

Zur längeren Lagerung von Bakterien wurde ein Glycerolstock erstellt. Dazu wurden 200 µl steriles Glycerol mit 800 µl einer Bakterien-Übernachtskultur versetzt, gut gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### **2.2.11 Zellkulturexperimente**

#### ***2.2.11.1 Kultivieren von Zellen***

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> ventilierten Kulturflaschen mit D-MEM High Glucose (+ 10 % FKS, + 1 % P/S, + 1 % Glutamin) in einem Brutschrank bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Für die Passage der Zellen wurde das Medium entnommen und durch 2 ml Trypsin-EDTA ersetzt. Durch den Chelatbildner EDTA wurden die für die Zell-Zell-Adhäsion wichtigen Ca<sup>2+</sup>-Ionen gebunden; die Protease Trypsin sorgte für die Spaltung der Proteinbrücken zwischen den einzelnen Zellen und zum Gefäßboden und löste so die Zellen aus ihrem Verband. Um alle Zellen mit Trypsin-EDTA zu benetzen wurde die Zellkulturflasche sorgfältig geschwenkt. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen und die Zellen für 1 - 5 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Durch Klopfen mit der Handfläche gegen die Zellkulturflasche wurden die Zellen abgelöst und dann in 6 ml Medium

aufgenommen. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension in eine Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt.

### ***2.2.11.2 Auftauen und Lagerung***

Die gefrorenen Zellen wurden kurz im 37 °C Wasserbad aufgetaut und in eine vorbereitete Kulturflasche mit D-MEM High Glucose (+ 10 % FKS, + 1 % P/S, + 1 % Glutamin) überführt. Nach 24 h erfolgte ein Medienwechsel, um eine schädigende Wirkung des DMSO möglichst gering zu halten.

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte im flüssigen Stickstoff. Dazu wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst (s. 2.2.11.1). Die durch Klopfen abgelösten Zellen wurden in 3 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und zu weiteren 7 ml Medium, welches in einem 15 ml Reaktionsgefäß vorgelegt wurde, gegeben. Es folgte eine Zentrifugation bei 300 g und 12 °C für 8-10 min. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Zusätzlich wurden die Zellen gezählt und zum Einfrieren auf  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Ein Cryoröhrchen wurde mit 1,8 ml der Zellsuspension befüllt und in der "Nalgene Cryo Freezing Box" für ca. 12 h in den -80 °C-Schrank gestellt. Durch diese Box ist eine langsame Abkühlrate von 1 °C/min gewährleistet. Im Anschluss wurde die Probe im flüssigen Stickstoff gelagert.

### ***2.2.11.3 Transfektion und Stimulation***

Die Transfektion ist eine Methode, um DNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Zur Transfektion wurde hier das Transfektionsreagenz Superfect von QIAGEN verwendet. 24 h vor Transfektion wurden die Zellen mit einer Konzentration von  $2-8 \times 10^4$  Zellen/Näpfchen in einer 24 Näpfchen-Platte ausgesät. Für die Transfektion wurden 1 µg DNA (0,8 µg pGL3-Konstrukt + 0,2 µg pGL4.74 bzw. 0,96 µg pGL3-Konstrukt + 0,04 µg pGL4.74) mit Medium (ohne FKS / ohne Antibiotika) auf ein Gesamtvolumen von 60 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 5-10 µl SuperFect Transfektionsreagenz wird das Gemisch 10 s gevortext und für 5-10 min bei RT inkubiert, damit sich der DNA/SuperFect-Komplex bilden kann. Während der Inkubation wurde bei den Zellen das Medium vorsichtig abgesaugt und mit 500 µl PBS

gewaschen. Nun wurde zu dem DNA/SuperFect-Komplex 350 µl Medium (mit Serum und Antibiotika) zugegeben und durch vorsichtiges Pipettieren kurz gemischt.

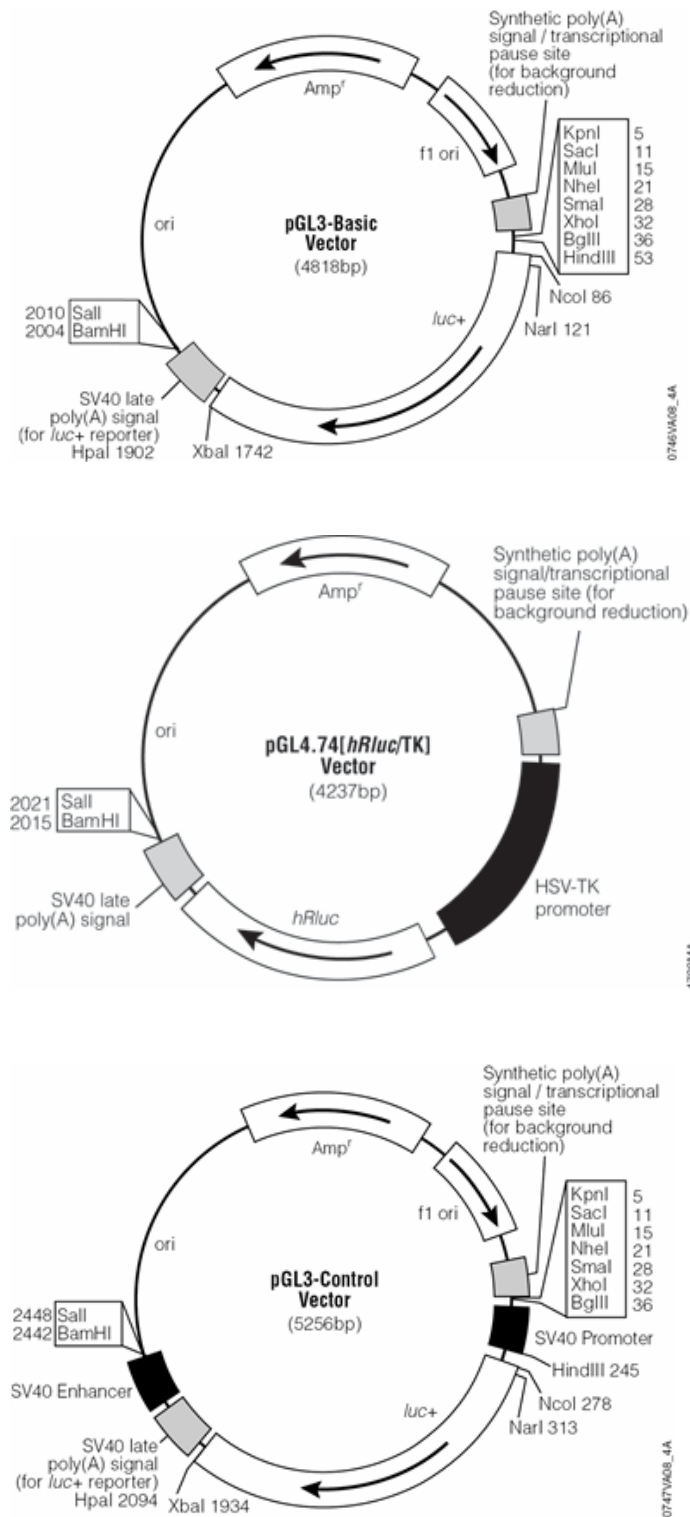
Nach Zugabe der 410 µl Medium + Komplex zu den Zellen, erfolgte eine Inkubation von 2 - 3 h im Brutschrank. Im Anschluss an die Inkubationszeit erfolgte ein Mediumwechsel, um eine schädigende Wirkung des Transfektionsreagenz zu verhindern. Dazu wurde das Medium durch 1 ml frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt und die Zellen für weiter 24 h im Brutschrank inkubiert.

Im Anschluss erfolgte die Stimulation je nach Experiment mit Dexamethason (Dex), Forskolin (For), Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA) oder Lipopolysacchariden (LPS). Diese Substanzen regen über verschiedene Signalwege die Stoffwechselaktivität der Zelle an, in dem sie verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren. Dexamethason bindet an den Glucocorticoidrezeptor und sorgt für dessen Aktivierung als Transkriptionsfaktor. Forskolin stimuliert die Aktivierung von Proteinkinasen A (PKA), die durch Phosphorylierungsreaktionen auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren einwirken. PMA aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die ebenfalls Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. LPS wirkt inflammatorisch und aktiviert unter anderem NFkappaB. Um die Promotoraktivität von *Mcl1* unter dem Einfluss der eingesetzten Stimulantien zu untersuchen, wurden die entsprechenden Stocklösungen (s. 2.1.11) in DMEM (+10 % FKS, + 1 % P/S, + 1 % Glutamin) auf die jeweiligen Endkonzentrationen eingestellt. Die verwendeten Endkonzentrationen betragen für Dexamethason 50 µM, für Forskolin 50µM, für PMA 2µM und für LPS 100 ng/µl. Das Medium wurde im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Dann wurde von den Zellen das alte Medium abgesaugt und durch 1 ml des stimulantienhaltigen Mediums ersetzt. Bei unstimulierten und LPS stimulierten Zellen erfolgte nach 24 h ebenfalls ein Mediumwechsel, um möglichst gleiche Bedingungen zu gewährleisten. Die Stimulationsdauer für Dexamethason, Forskolin und PMA betrug 24 Stunden. Die LPS stimulierten Zellen wurden 30 min vor der Ernte stimuliert, da die Induktion von NFkappaB zu der Zeit ein Maximum erreicht hat und später wieder absinkt (Ten Hove, 1999). Für die unstimulierten Zellen wurde der Mediumwechsel mit DMSO-haltigem Medium (1 % DMSO) durchgeführt.

### **2.2.12 Luciferase Assay**

Zur Bestimmung der Promotoraktivität von *Mcl1* wurde das *Dual-Luciferase Reporter Assay* System von Promega verwendet. Dieses System verwendet zeitgleich ein Plasmid mit einem

Reportergen (s. pGL3-Basic) und ein Plasmid mit einem Referenzgen (s. pGL4.74). Bei beiden Genen handelt es sich um Luciferasegene, deren Aktivität durch Fluoreszenzmessung bestimmt werden kann.

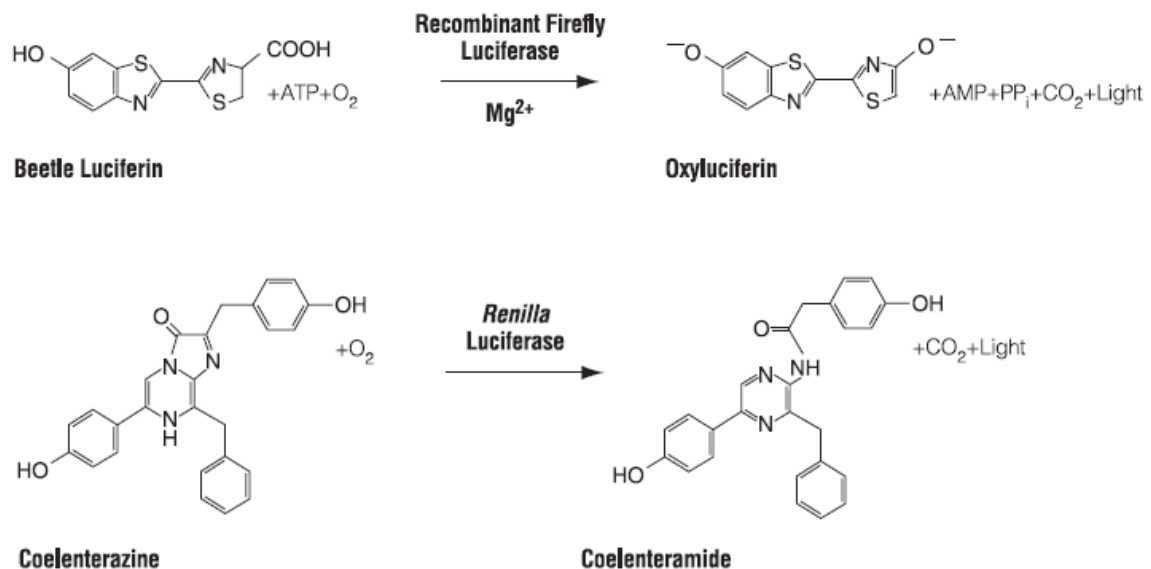


**Abbildung 2.2.2: Luciferasevektoren**

Die verwendeten Plasmide im Dual-Luciferase Reporter Assay: pGL3-Basic (Reportervektor), pGL4.74 (Referenzvektor) und pGL3-Control (Kontrollvektor). (Abbildung Promega)



Der pGL3-Basic-Vektor trägt als Reporter gen das Luciferasegen aus der Leuchtkäferart *Photinus pyralis* („Firefly“). Allerdings ist dem Gen kein Promotor vorgeschaltet, so dass keine Expression stattfindet. Genau an dieser Position vor dem Reporter gen, wurde nun das zu untersuchende DNA-Fragment als Promotor eingebracht. Die Promotoraktivität des DNA-Fragments wurde anschließend über die Expressionsstärke des Luciferasegens bestimmt. Das Prinzip beruht auf der Messung der Lumineszenz, die bei der durch Luciferase katalysierten Umsetzung des Luciferin zu Oxyluciferin freigesetzt wird. Als Referenz verwendet man ein weiteres Plasmid (pGL4.74). Dieses Plasmid besitzt als Referenzgen das Luciferasegen aus der Seefedernart *Renilla reniformis*, mit entsprechendem Promotor, der für eine konstante Expression des Gens sorgt. Hierbei katalysiert die *Renilla*-Luciferase die Umsetzung von Coelenterazine zu Coelenteramide, ebenfalls unter Freisetzung von Lumineszenz.



### Abbildung 2.2.3: Biolumineszenzreaktionen

Biolumineszenzreaktionen die durch *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase katalysiert werden. (Abbildung Promega)

Es wird von einer gleich effizienten Aufnahme der beiden Plasmide in die Zelle ausgegangen, so dass anhand der gemessenen Lumineszenz des pGL4.74-Vektors die Zellzahl abgeschätzt werden kann. Durch Bildung des Verhältnis der Lumineszenz von pGL3-Basic und pGL4.74 kann so eine relative Promotoraktivität bestimmt werden. Als Positiv-Kontrolle für eine erfolgreiche Transfektion wurden auf jeder Platte Zellen mit dem Kontrollvektor (pGL3-Control) transfiziert. In pGL3-Control ist dem *Firefly*-Luciferasegen ein starker Promotor vorgeschaltet, der bei einer erfolgreichen Transfektion zu einer hohen Lumineszenz führt.

Für die Durchführungen des *Dual-Luciferase Reporter Assays* müssen die Zellen zunächst geerntet werden. Dazu wurden alle Reagenzien wie in der Anwendungsanleitung beschrieben vorbereitet.

Die Ernte erfolgte mit dem *Passive Lysis Puffer* (PLB). Dazu wurde bei den Zellen, die in 24-Näpfchen Platten vorlagen, das Medium vollständig entfernt und 50 µl PLB zugegeben. Anschließend erfolgte für 15 min, bei Raumtemperatur eine Inkubation unter leichtem Schütteln. Dann wurden die Lysate in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und bis zur Messung bei -80 °C eingefroren. Zur eigentlichen Messung wurde in der Luminometer-Messplatte 50 µl LAR II vorgelegt, 10 µl des Zelllysats zugegeben und direkt gemessen (für 10 s). LAR II ist das Substrat für die *Firefly*-Luciferase, dessen Umsetzung zu Oxyluciferin zu einer Lichtemission führt. Danach wurden 50 µl Stop&Glo zugegeben und erneut für 10 s gemessen. Stop&Glo stoppt die Luciferaseaktivität der *Firefly*-Luciferase und initiiert die Aktivität der *Renilla*-Luciferase. Von jeder Stimulationsbedingung wurden pro Zelllinie drei unabhängige 4er Ansätze gefahren, also insgesamt 12 Einzelmessungen.

## 3 Ergebnisse

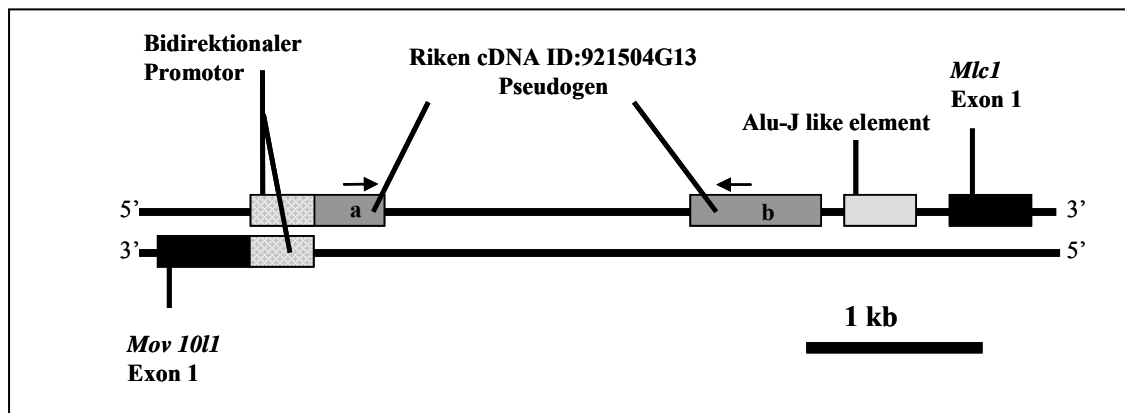
### 3.1 Identifikation und Charakterisierung der *Mlc1*-Promotorregion

#### 3.1.1 Charakterisierung der 5'-Region des murinen *Mlc1*-Gens

Aufbauend auf der Studie von Steinke und Kollegen (Steinke et al., 2003) wurde der 5'-Bereich stromaufwärts von *Mlc1* auf regulatorische Eigenschaften hin untersucht. In der Studie von Steinke und Kollegen wurde der Transkriptionsstartpunkt von *Mlc1* mittels der „rapid amplification of cDNA ends“ (5'-RACE) - Methode bestimmt. Es wurden mehrere Transkriptionsstartstellen im Bereich von +1 bp bis +68 bp beschrieben. Die am weitesten 5'-wärts liegende Transkriptionsstartstelle (+1 bp) wurde in der Gen-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* unter der accession no. BG297871 veröffentlicht. Die Sequenz entspricht dem Transkriptionsstart, der in der Gen-Datenbank (Ensembl Version 56; September 2009) einzusehen ist. Steinke und Kollegen beschrieben für die 5'-regulatorische Region von *Mlc1* zwei CCAAT-Boxen: 27 bp und 114 bp stromaufwärts von *Mlc1*. CCAAT-Boxen kommen häufig 70-105 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts vor und stellen eine Bindestelle für Transkriptionsfaktoren dar, die die RNA-Polymerase unterstützen die Transkription einzuleiten. Zusätzlich sind eine potentielle Transkriptionsfaktorbindestelle für Pit-1 (*Pituitary-specific positive transcription factor1*) und ein GRE (*glucocorticoid receptor element*) beschrieben. Der von Steinke und Kollegen erwähnte GRE legt eine Regulation des *Mlc1*-Gens durch das Stresshormon Cortisol nahe. Weiterhin befindet sich in der von Steinke und Kollegen beschriebenen regulatorischen Region ein *Alu-J like element* (Alu). Dabei handelt es sich um ein Transposon, für das sowohl hemmende als auch aktivierende Wirkungen auf die Genexpression beschrieben sind (Chen and Randeva; Mariner et al., 2008).

Für die vorliegende Studie wurde mit der Promotor-Scan-Software PROSCAN Version 1.7 die Sequenz vor dem Transkriptionsstart von *Mlc1* bis zu seinem benachbarten Gen untersucht. Bei dem benachbarten Gen (RIKEN cDNA Klon 4921504G13, GenBank accession no. AV253704) handelt es sich um ein durch Retrotransposition entstandenes Pseudogen. Da zwischen dem Pseudogen und *Mlc1* kein Promotor vorhergesagt werden konnte, wurde der zu untersuchende Bereich bis zum 5'-wärts benachbartem Gen *Moloney leukemia virus 10-like 1 (Mov10l1)* ausgeweitet. Dabei wurde mit PROSCAN ein bidirektionaler Promotor 4,3 kb 5' von *Mlc1* vorhergesagt. Flankiert wird dieser Promotor 3'

von einem putativen Gen (Riken cDNA Klon 921504G13, GenBank accession no. BB614475) und 5' von *Mov10l1* (siehe Abbildung 3.1.1).



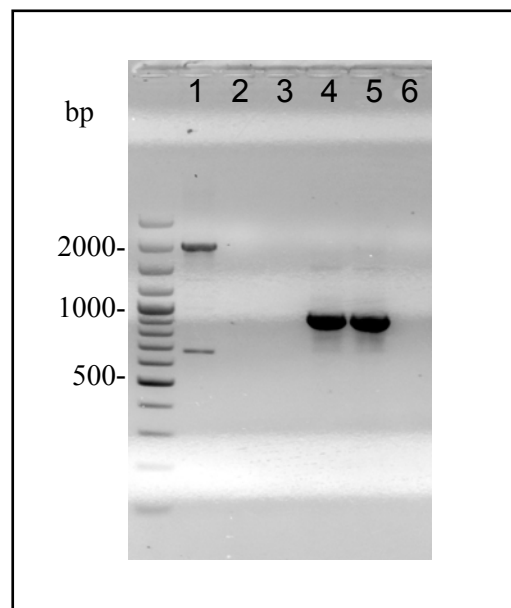
**Abbildung 3.1.1: Schematische Darstellung der 5'-Region vor *Mlc1***

Der mit PROSCAN vorhergesagte Promotor ist grau schraffiert dargestellt. Die beiden Sequenzen a: BB614475 und b: AV253704 des Riken cDNA Klons 921504G13 sind grau dargestellt. Die Pfeile symbolisieren die Primerbindestellen, die zur Amplifikation der dazwischenliegenden Sequenz genutzt wurden.

Die Datenbankrecherche im NCBI (Version Juni 2007) zum Riken cDNA Klon 921504G13 zeigte, dass zwei sich nicht überlappende cDNA-Sequenzen mit der Genbank accession no. BB614475 und AV253704 vorlagen. Beide Sequenzen wurden mit *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* auf homologe Bereiche im Mausgenom und Übereinstimmungen in der cDNA-Datenbank überprüft. Die Sequenz von AV253704 zeigte eine Übereinstimmung von 87 % zu der cDNA Sequenz des *proteasome maturation proteine gene (Pomp)* (siehe Abbildung 7.1.1). Für BB614475 konnte nur die Übereinstimmung zu seiner genomischen Sequenz bestätigt werden. Da sich BB614475 und AV253704 im selben Riken cDNA-Klon befinden, stellte sich die Frage, ob der komplette genomische Bereich zwischen BB614475 und AV253704 in cDNA umgeschrieben wird, oder ob in diesem Bereich auch Introns vorhanden sind. Dazu wurde zunächst isolierte mRNA aus *Mus musculus C57 Black 6* in cDNA umgeschrieben. Da die Riken cDNA des Klons 921504G13 aus Hodengewebe von *Mus musculus* stammt, und damit sicher ist, dass das Transkript in diesem Gewebe exprimiert wird, wurde zur Untersuchung Hodengewebe verwendet. Außerdem wurde noch mRNA aus dem Hirngewebe von *Mus musculus* untersucht. Hierbei stand die Frage im Vordergrund, ob das Transkript auch im selben Gewebe exprimiert wird wie *Mlc1*. Die verwendeten Primer zur Amplifikation wurden so gewählt, dass der forward-Primer (#651) im 3'-Bereich der bekannten BB614475-Sequenz und der reverse-Primer (#652) im 5'-Bereich der bekannten AV253704-Sequenz lag. Im Folgenden wird der gesamte Sequenzbereich von BB614475 bis einschließlich AV253704 als „*Pomp*-Pseudogen“ bezeichnet. Aus dem Ergebnis der

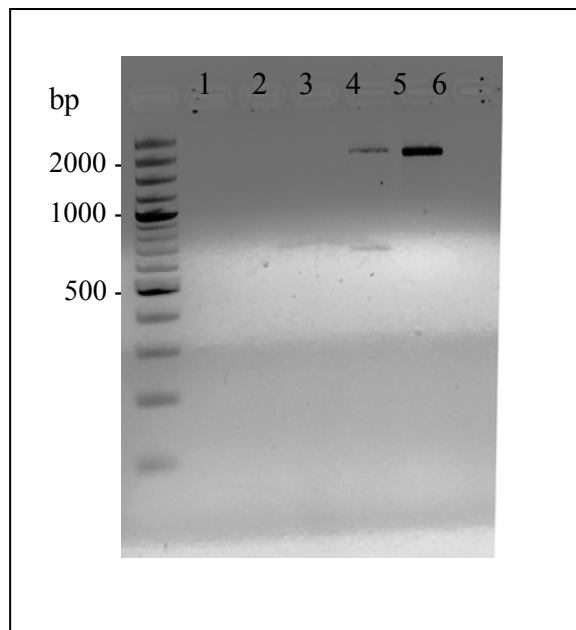
durchgeführten Expressionsanalyse (Abbildung 3.1.2 und Abbildung 3.1.3) geht hervor, dass das *Pomp*-Pseudogen in Hodengewebe exprimiert ist. Eine Expression im Gehirn, sowie in der murine Astrozytenzelllinie, in der spätere Reporterstudien durchgeführt werden sollten, konnte nicht nachgewiesen werden.

Es konnten im Hodengewebe zwei verschiedene Amplikons für das *Pomp*-Pseudogen nachgewiesen werden. Um die Identität der beiden Amplikons zu überprüfen, wurden die DNA-Banden aus dem Gel isoliert, in einen TOPO-Vektor eingebracht und sequenziert. Bei der 2015 bp Bande handelte es sich um den zu erwartenden genomischen Sequenzbereich. Die Sequenzierung der ca. 700 bp langen Amplikon zeigte, dass es sich um zwei verschiedene Spleißvarianten des *Pomp*-Pseudogens (siehe Anhang Abbildung 5.1.2) handelte. Die beiden erhaltenen Amplikongrößen der Spleißvarianten betragen 675 bp und 676 bp.



**Abbildung 3.1.2: Nachweis der Expression des *Pomp*-Pseudogens in *Mus musculus***

Zum Expressionsnachweis wurde cDNA aus Hodengewebe (Spalte 1 und 4), sowie aus Gehirn (Spalte 2 und 5) eingesetzt. Spalte 1 zeigt die Expression des *Pomp*-Pseudogens in Hodengewebe. Die obere Bande bei 2015 bp entspricht der genomischen Sequenz des *Pomp*-Pseudogens. Bei der unteren Bande handelt es sich um zwei Spleißvarianten (675 bp und 676 bp) des *Pomp*-Pseudogens. Spalte 2 zeigt, dass in Gehirngewebe keine Expression des *Pomp*-Pseudogens vorliegt. Die Positivkontrolle mit *Aktin* (Spalte 4 und 5) zeigt, dass die Menge an eingesetzter cDNA in etwa gleich ist. Die **Negativkontrolle** (Spalte 3 und 6), bei der statt cDNA H<sub>2</sub>O eingesetzt wurde zeigt, dass keine Verunreinigung vorliegt. Zum Nachweis der Expression des *Pomp*-Pseudogens wurden die Primer #651 und #652 verwendet. Für die Aktinkontrolle wurden die Primer #565 und #566 verwendet.



**Abbildung 3.1.3: Nachweis der Expression des *Pomp*-Pseudogens in murinen Astrozytencellen / Gewebe**

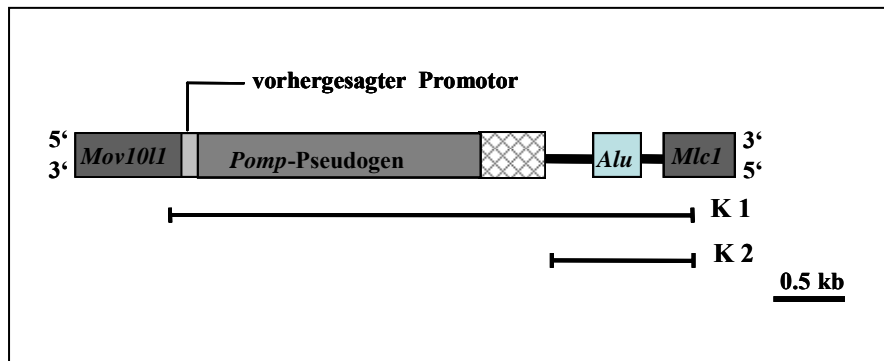
Zum Expressionsnachweis wurde cDNA aus der **Astrozytencelllinie (Spalte 1 und 2)**, cDNA aus **Cortex (Spalte 3)** und cDNA aus **Hoden (Spalte 4)** eingesetzt. Es konnte nur für die cDNA aus Hoden eine Expression für das *Pomp*-Pseudogen nachgewiesen werden. Die obere Bande bei 2015 bp entspricht der genomischen Sequenz des *Pomp*-Pseudogens. Bei der unteren Bande handelt es sich um zwei Spleißvarianten (675 bp und 676 bp) des *Pomp*-Pseudogens. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich **gDNA (Spalte 5)** von *Mus musculus* eingesetzt. Als **Negativkontrolle (Spalte 6)**, wurde statt DNA H<sub>2</sub>O eingesetzt. (Anmerkung: Bei der cDNA der Astrozytencelllinie und des Cortex handelt es sich um dieselbe cDNA, die auch für die Experimente in 3.1.5 und 3.1.6 verwendet wurde).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der mit PROSCAN vorhergesagte Promotor 4,3 kb stromaufwärts von *Mlc1* den Promotor für das *Pomp*-Pseudogen (ID: 921504G13) und vermutlich für *Mov10l1* darstellt. Über die Funktion des *Pomp*-Pseudogen-Transkripts und seine Spleißvarianten kann hier keine Aussage getroffen werden. Da dieses Transkript im Gehirn nicht exprimiert wird und es keine hinreichenden Hinweise auf einen weiteren Promotor vor *Mlc1* gibt, stellt sich die Frage, ob der Promotor des *Pomp*-Pseudogens einen Effekt auf die Expression von *Mlc1* zeigt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden in einem weiteren Versuch verschiedene Promotorkonstrukte erstellt.

### 3.1.2 Reporterstudie I: Untersuchung der Promotorregion von *Mlc1*

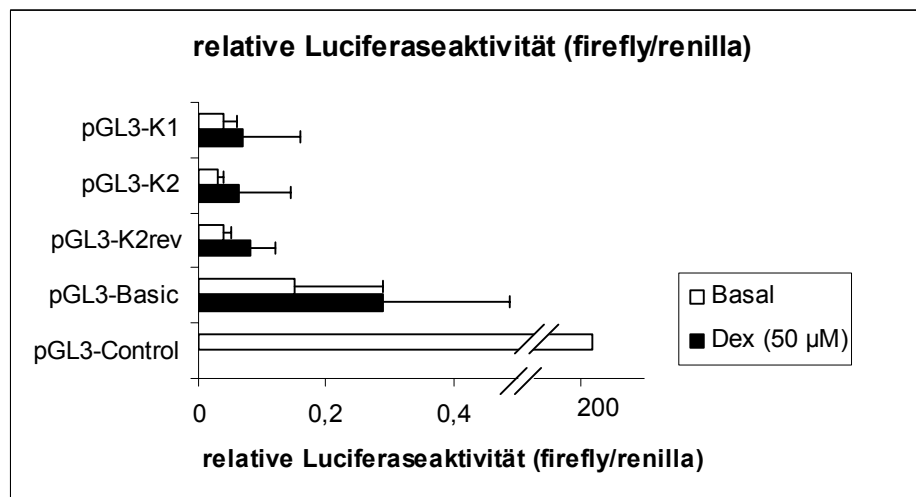
Als Ausgangsbasis zur Erstellung der Promotorkonstrukte wurde auf das Cosmid MPMGc121K08537Q2 (siehe Steinke und Kollegen, 2003) zurückgegriffen, auf dem die gesamte Gensequenz von *Mlc1* samt 5'-Region enthalten ist. Hieraus wurde ein 4,3 kb großes Fragment, zwischen Mov1011 Exon 1 Position +282 bp bis *Mlc1* Exon 1 Position +162 bp herausgeschnitten und in pUC BM20 eingebracht. Die Fragmente, deren regulatorische Funktion untersucht werden sollte, wurden mittels PCR amplifiziert und in den Reportervektor pGL3-Basic eingebracht (siehe 2.2.2). Untersucht wurde der Sequenzbereich -4183 bp bis +162 bp (K1) und -873 bp bis +162 bp (K2) (Abbildung 3.1.4). Es sollte untersucht werden, ob der Promotor des *Pomp*-Pseudogens einen Einfluss auf die Expression von *Mlc1* haben könnte, oder ob der Sequenzbereich zwischen dem Pseudogen und *Mlc1* als Promotor fungiert. Als Negativkontrollen wurde der leere pGL3-Vektor und ein pGL3-Konstrukt, das K2 in reverser Orientierung enthält (pGL3-K2rev) eingesetzt. Vor dem eigentlichen Experiment wurden die Konstrukte pGL3-K1, pGL3-K2 und pGL3-K2rev durch Sequenzieren auf Mutationen hin überprüft. Die Sequenzierung ergab für pGL3-K1 vier Abweichungen zur Sequenz aus der Datenbank: an Position 535 eine G/T-Transversion, an Position 1759 eine T/G-Transversion, an Position 2483 eine TGG-Deletion (innerhalb eines TGG-repeats) und an Position 3436 eine A-Deletion (innerhalb eines A-repeats). Um festzustellen, ob die beiden Transversionen möglicherweise zu einer Transkriptionsfaktorbindestelle führen, wurde mit TFSEARCH Version 1.3 eine Transkriptionsfaktorbindestellenanalyse durchgeführt. Es wurde für die Sequenzbereiche keine Transkriptionsfaktorbindestelle in Vertebraten vorhergesagt. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Größe des Konstrukts wurde deswegen auf eine Beseitigung der Sequenzabweichung verzichtet. Durch Transfektion wurden die pGL3-Konstrukte in die murine Astrozytenzelllinie eingebracht (2.2.11.3). Das eingesetzte Verhältnis von pGL3-Konstrukt zu pGL4.74 betrug 20:1. 24 h nach Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel oder eine Stimulation mit Dexamethason. Nach weiteren 24 h erfolgte die Ernte der Zellen und die Messung der Promotoraktivität mit dem Luciferase Assay System (s. 2.2.12). Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 3.1.4 dargestellt. Es konnte keine Promotoraktivität für pGL3-K1 und pGL3-K2 gezeigt werden. Beide Konstrukte zeigten dieselbe geringe Aktivität wie pGL3-K2rev, das als Negativkontrolle diente. Die Negativkontrolle des Herstellers, der promotorlose pGL3-Basic zeigte eine höhere Aktivität als die untersuchten Konstrukte. Damit konnte gezeigt werden, dass der 4,3 kb entfernte Promotor keinen Einfluss auf die Expression

von *Mlc1* hat. Es konnte auch keine Promotoraktivität für den 900 bp Bereich vor *Mlc1* nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.1.4: Ausgewählte Bereiche für die Promotorsuche**

Zu sehen ist der schematische Aufbau zwischen *Mov10l1* und *Mlc1*. Die beiden Sequenzabschnitte (K1 und K2), die auf regulatorische Eigenschaften überprüft werden sollten, sind als schwarze Linien dargestellt. K1 umfasst den Sequenzbereich von Position -4183 bp bis +162 bp. K2 umfasst den Sequenzbereich von -873 bp bis +162 bp. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Transkriptionsstartpunkt (+1) von *Mlc1*. Die schraffierte Box ist der Teil des *Pomp*-Pseudogens, der die Sequenzhomologie (87 %) zu *Pomp* aufweist (ClustalW).



**Abbildung 3.1.5: Relative Luciferaseaktivität**

Dargestellt ist die relative Luciferaseaktivität von firefly(RLU)/renilla(RLU), der verschiedenen pGL3-Promotorkonstrukte in der murinen Astrozytenzelllinie. Die relative Luciferaseaktivität entspricht der Promotoraktivität. Die weißen Balken entsprechen den Werten unter nicht stimulierten Bedingungen. Die schwarzen Balken entsprechen der Aktivität nach Stimulation mit 50 µM Dexamethason für 24 h.



### 3.1.3 Identifizierung weiterer Transkriptionsstartpunkte für *Mlc1*

Für gewöhnlich befinden sich stromaufwärts von Transkriptionsstartpunkten regulatorische Elemente, die der RNA-Polymerase erlauben, die Transkription zu starten. Daher sind Transkriptionsstartpunkte Anhaltspunkte für den Hinweis auf regulatorische Bereiche. Aufgrund der fehlenden Promotoraktivität im 5'-Bereich von *Mlc1* sollte untersucht werden, ob es für *Mlc1* noch andere Transkriptionsstartpunkte gibt. Zur Analyse von alternativen Transkriptionsstartpunkten wurde die Datenbank *database of transcriptional start sites* (DBTSS Version 4.0) verwendet. Da in DBTSS für *MLC1* aus *Homo sapiens* mehr Informationen vorlagen, als von *Mlc1* aus *Mus musculus*, wurden diese verwendet, um Rückschlüsse auf Transkriptionsstartpunkte von *Mlc1* zu erhalten. Die Datenbankrecherche mit DBTSS Version 4.0 zeigte insgesamt neun verschiedene Transkriptionsstartpunkte für *MLC1* (Abbildung 3.1.6).

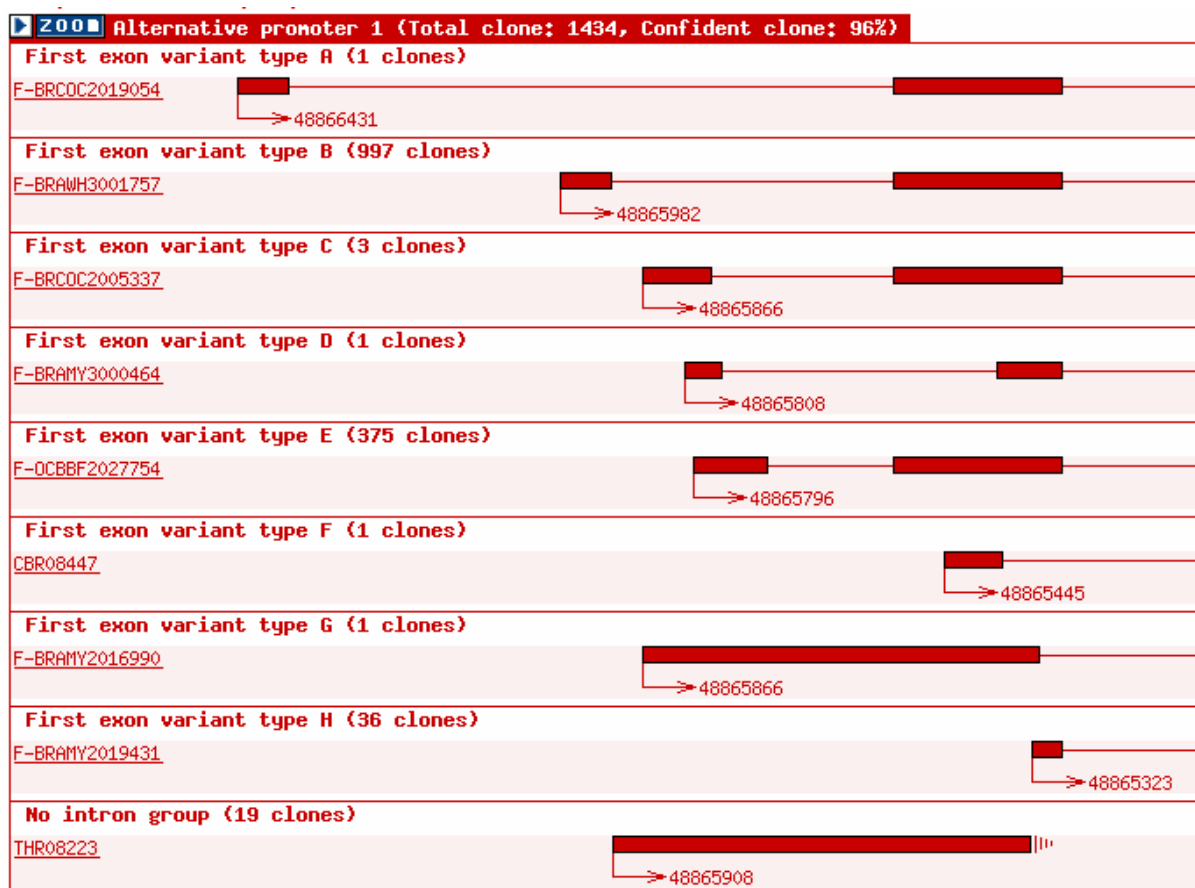
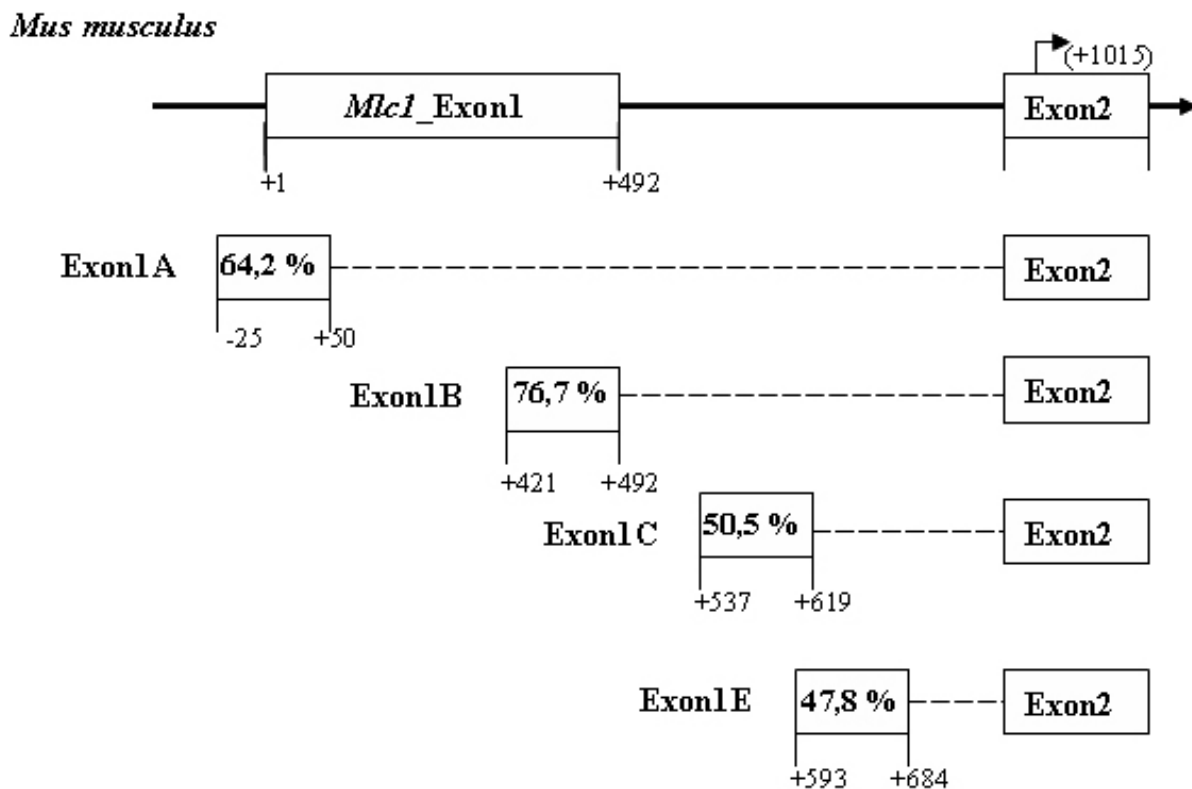


Abbildung 3.1.6: Alternative Transkriptionsstartpunkte für *MLC1* in *Homo sapiens*  
(Quelle: DBTSS Version 4.0)

Es sollte untersucht werden, ob in *Mus musculus* ebenfalls verschiedene Transkriptionsstartpunkte von *Mlc1* vorhanden sind. Dazu wurde die Sequenz der Transkripte aus DBTSS mit der genomischen Sequenz von *Mus musculus* verglichen. Es wurden für den Sequenzvergleich nur die Transkripte herangezogen, die eine echte GT-Spleißdonorstelle aufwiesen. Dies traf für Exon 1 Variante Typ A, Typ B, Typ C und Typ E zu. Die Sequenzidentität zwischen den Transkripten und der entsprechenden Region in *Mus musculus* ist in Abbildung 3.1.7 dargestellt. Die Position der verwendeten Primer, um die Expression der alternativen Exons 1A-E nachzuweisen, und die erwarteten Fragmentgrößen der Amplikons sind in Tabelle 3.1.1 dargestellt.



**Abbildung 3.1.7: Orthologe Bereiche der alternativen Transkriptionsstartpunkte in *Mus musculus***

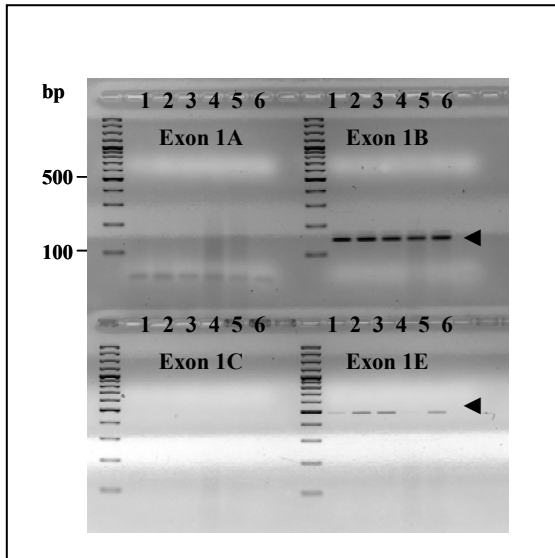
Die Boxen symbolisieren die orthologen Sequenzabschnitte der Transkripte bei *Mus musculus*. Der Grad der Sequenzübereinstimmung ist in Prozent angegeben. Die angegebenen Positionen der alternativen Exons 1 gelten ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt (+1) von *Mlc1*, der aus der Ensembl-Datenbank Version 56 entnommen wurde. Der Pfeil über Exon 2 symbolisiert den Translationsstartpunkt für *Mlc1* an Position +1015 bp.

Transkript	Primer	Positionsstart des Primers	erwartete Amplikongröße (bp)
<b>Exon 1A</b>	#900	+ 15	603
	#904	+1098	
<b>Exon 1B</b>	#901	+457	160
	#904	+1098	
<b>Exon 1C</b>	#902	+568	177
	#904	+1098	
<b>Exon 1E</b>	#903	+638	172
	#904	+1098	

**Tabelle 3.1.1: Verwendete Primer zum Nachweis der alternativen Exons 1**

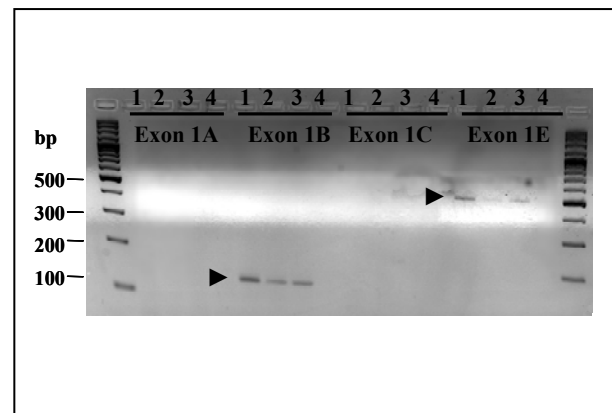
Angegeben sind die verwendeten Primerpaare, sowie deren Lokalisation und die zu erwartende Größe der Amplikons unter Verwendung von cDNA. Die angegebenen Positionen der Primer gelten ausgehend vom Transkriptionsstartpunkt (+1) von *Mcl1*, der aus der Ensembl-Datenbank Version 56 entnommen wurde.

Die Expression der alternativen ersten Exons wurde in Astrozytenzellen, sowie verschiedenen Gehirnregionen von *Mus musculus* überprüft. Dazu wurde aus Amygdala, Hypothalamus, Hippocampus, Cerebellum, Cortex und der Astrozytenzelllinie RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde mit intronüberspannenden Aktinprimern getestet, um zu sicherzustellen, dass keine Verunreinigung mit genomischer DNA (gDNA) vorlag. Um möglichst optimale Bedingungen für die PCR zu gewährleisten, fand zunächst eine Optimierung mit gDNA statt. Die Optimierung zeigte für Exon 1A die besten Ergebnisse unter Verwendung von Puffer D und einer Annealing-Temperatur von 63 °C. Für Exon 1B, 1C und 1E ergab die Verwendung von Puffer C und einer Annealing-Temperatur von 63 °C die besten Resultate. Diese Bedingungen wurden für die PCR mit der cDNA übernommen. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.1.8 und Abbildung 3.1.9 dargestellt. Zu sehen ist eine deutliche Expression von Exon 1B in allen untersuchten Gehirngeweben und der Astrozytenzelllinie. Für Exon 1E konnte ebenfalls eine Expression gezeigt werden. Diese fiel jedoch geringer aus, als die Expression von Exon 1B. Zudem lag die DNA-Bande nicht bei der erwarteten cDNA Größe von 172 bp, sondern bei ca. 500 bp. Für Exon 1A und Exon 1C konnte keine Expression nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.1.9: Expression der alternativen Exons 1 in *Mus musculus***

Zum Expressionsnachweis der alternativen *Mcl1* Exons1 (Exon 1A bis Exon 1E) wurde cDNA von 1) Amygdala, 2) Hypothalamus, 3) Hippocampus, 4) Cerebellum und 5) Cortex eingesetzt. Spalte 6 zeigt die Wasserkontrolle. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3.1.1 dargestellt. Gezeigt werden konnte hier eine Expression für Exon 1B (143 bp-Bande) und Exon 1E (480 bp-Bande) (siehe Pfeile).



**Abbildung 3.1.8: Expression der alternativen Exons 1 in der murinen Astrozytenzelllinie**

In den Spalten 1 bis 3 wurde cDNA der murinen Astrozytenzelllinie eingesetzt. Spalte 4 zeigt die Negativkontrolle, in der cDNA durch H<sub>2</sub>O ersetzt wurde. Die verwendeten Primer zum Nachweis der alternativen ersten Exons1A bis 1E von *Mcl1* sind in Tabelle 3.1.1 dargestellt. Gezeigt werden konnte hier eine Expression für Exon 1B (143 bp-Bande) und Exon 1E (480 bp-Bande) (siehe Pfeile).

Die erhaltenen Fragmente für Exon 1B und Exon 1E wurden isoliert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen sind im Anhang (Abbildung 5.1.3 und Abbildung 7.1.4) dargestellt. Während in der Datenbank (Ensembl Version 56) der Übergang von Exon 1 in Exon 2 an Position +492 bp/+993 bp beschrieben ist, zeigte die Sequenzierung von Exon 1B eindeutig einen Übergang an Position +/492 bp/+1010 bp. Das erhaltene Amplikon hat eine Länge von 143 bp. Exon 1E geht ohne Intron in Exon 2 über. Das Amplikon hat eine Länge von 480 bp.

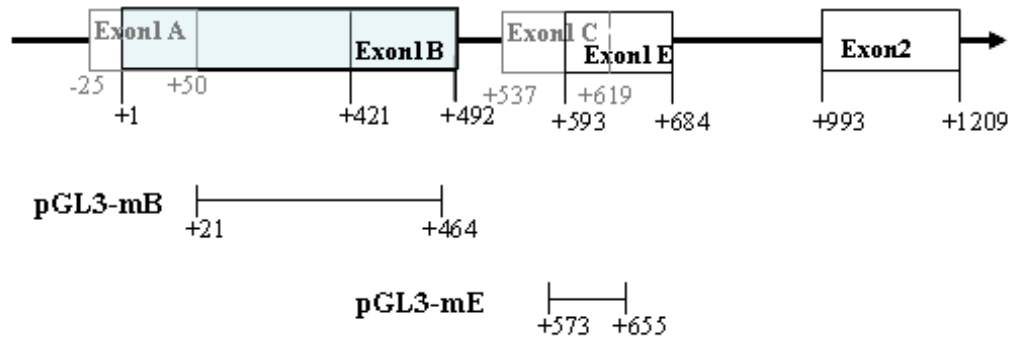
Aus den Ergebnissen geht hervor, dass zwei gängige alternative Transkripte für *Mcl1* Exon 1 existieren. Das Transkript von Exon 1B in *Mus musculus* ist ebenfalls in der Datenbank beschrieben (siehe EST ID: BY262360). Der dort angegebene Startpunkt für Exon 1B liegt an Position +438 bp. Ein Transkript für Exon 1E wurde bisher nicht beschrieben.

### 3.1.4 Reporterstudie II: Untersuchung der Promotors von *Mlc1* und *MLC1*

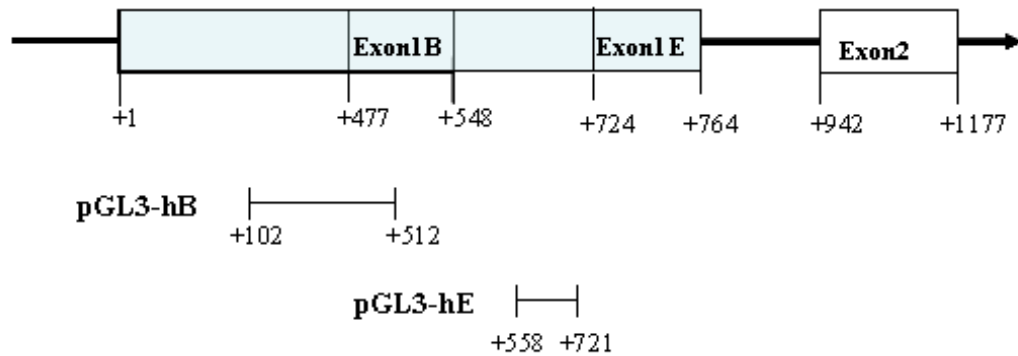
Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen die Existenz von verschiedenen alternativen ersten Exons für *Mlc1*. Dementsprechend sind auch verschiedene alternative Promotoren für *Mlc1* zu erwarten. Um die Aktivität der alternativen Promotoren zu untersuchen, wurden pGL3-Konstrukte erstellt, für deren dazugehörigen Exonvarianten eine Expression in *Mus musculus* gezeigt werden konnte (siehe Tabelle 3.1.2). Da pGL3-K2 den Sequenzbereich von -873 bp bis +162 bp von *Mlc1* umfasste und keine Promotoraktivität aufwies, wurde der zu untersuchende Sequenzbereich für die Regulation für Exon 1B so ausgewählt (+21 bp bis +464 bp), dass er mit dem Sequenzbereich von pGL3-K2 und dem Transkriptionsstart von Exon 1B überlappt, um eine lückenlose Untersuchung des 5'-Bereichs zu gewährleisten. Der zu untersuchende Sequenzbereich für Exon 1E wurde so gewählt, dass die potentielle Promotorregion für Exon 1E abgedeckt wurde. Ausgehend von dem Ergebnis, dass für Exon 1C keine Expression nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 3.1.9 und Abbildung 3.1.8), wurde angenommen, dass die Sequenz zwischen Transkriptionseende von Exon 1B und dem untersuchten Transkriptionsstartpunkt von Exon 1C (Position +568 bp) keine Promotorfunktion aufweist. Der zu untersuchende Promotorabschnitt für Exon 1E wurde aus technischen Gründen erst 5 bp später, an Position +573 bp, begonnen. Da TRANSFAC Version 2009.1 für diesen Positionsbereich keine TF-Bindestelle vorhersagt ist von keinem starken Effekt auf die Promotoraktivität auszugehen. Der untersuchte Sequenzbereich reicht von Position +573 bp bis +655 bp und überlappt damit um 17 bp den Bereich, für den die Expression von Exon 1E nachgewiesen ist (siehe Abbildung 3.1.9 und Tabelle 3.1.1).

Um einen Vergleich zwischen der Regulation von *Mlc1* in *Mus musculus* und *Homo sapiens* ziehen zu können, wurden zusätzlich entsprechende Promotorkonstrukte für *MLC1* von *Homo sapiens* erstellt. Die Positionen der Sequenzbereiche, die zur Bestimmung der Promotoraktivität in pGL3 eingebracht wurden, sind in Tabelle 3.1.2 beschrieben und in Abbildung 3.1.10 graphisch dargestellt.

A)

*Mus musculus*

B)

*Homo sapiens***Abbildung 3.1.10: Position der untersuchten Promotorbereiche**

A) Schematischer Aufbau von *Mlc1* Exon 1 und 2 in *Mus musculus*. Das in Ensembl (Version 56; September 2009) beschriebene erste Exon ist blau unterlegt (Position +1 bp bis +492 bp). Die Positionsangaben der alternativen ersten Exons beziehen sich auf die orthologen Sequenzbereiche, die aus DBTSS Version 4.0 für das humane *MLC1* entnommen wurden. Die Exons 1A und 1C, für die keine Expression gezeigt werden konnte, sind grau dargestellt. Für Exon 1B ist die Expression ab Position +457 bp und für Exon 1E ab Position +638 bp nachgewiesen. Das Promotorkonstrukt pGL3-mB enthält den Sequenzabschnitt von +21 bp bis +464 bp und das Promotorkonstrukt pGL3-mE enthält den Sequenzabschnitt +573 bp bis +655 bp. Alle Positionsangaben beziehen sich auf den Transkriptionsstart (+1) von *Mlc1*. B) Schematischer Aufbau von *MLC1* Exon 1 und 2 in *Homo sapiens*. Das in Ensembl (Version 56; September 2009) beschriebene erste Exon ist blau unterlegt (Position +1 bp bis +764 bp). Die Positionsangaben für *MLC1* Exon 1B und Exon 1E entstammen aus DBTSS Version 4.0. Die Expression konnte in der Glioblastomazelllinie U373 bestätigt werden. Die Sequenzbereiche die zur Erstellung der Promotorkonstrukte verwendet wurden stammen von Position +102 bp bis +512 bp für pGL3-hB und von Position +558 bp bis +721 bp für pGL3-hE. Die Positionsangaben beziehen sich auf den Transkriptionsstartpunkt (+1) von *MLC1*.

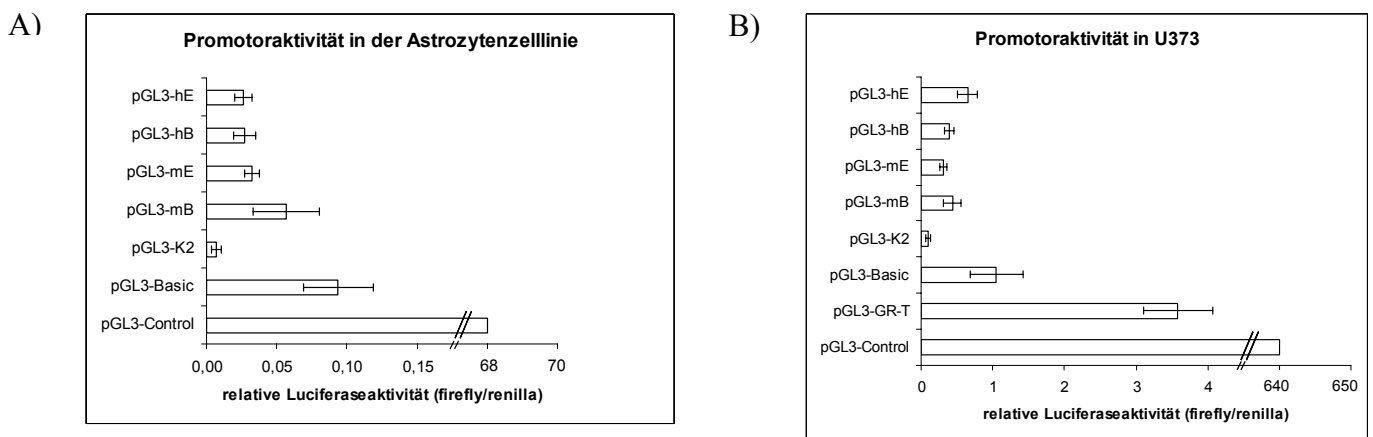
<i>Mus musculus</i>	Position	Größe (bp)
pGL3-mA	-182 bis -11	172
pGL3-mB	+21 bis +464	444
pGL3-mAB	-182 bis +464	645
pGL3-mC	+448 bis +552	105
pGL3-mE	+573 bis +655	83
<i>Homo sapiens</i>	Position	Größe (bp)
pGL3-hB	+102 bis +512	411
pGL3-hE	+558 bis +721	164

**Tabelle 3.1.2: pGL3-Promotorkonstrukte**

Für die Erstellung der pGL3-Konstrukte wurde der angegebene Sequenzbereich aus *Mlc1* bzw. *MLC1* in pGL3 hineinkloniert. Die Position bezieht sich auf den Transkriptionsstart (+1) des Gens, der aus der Datenbank (Ensembl Version 56; September 2009) entnommen wurde. Grau unterlegte Konstrukte wurden erstellt, aber aufgrund nicht nachgewiesener Expression nicht für die Versuche verwendet.

Für die Durchführung der Reporterstudie wurde neben den zu untersuchenden Konstrukten pGL3-mB, pGL3-mE, pGL3-hB und pGL3-hE als Negativkontrolle pGL3-Basic und als Positivkontrolle pGL3-Control mitgemessen. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde pGL3-K2 verwendet, da hierfür nachweislich kein exprimiertes Exon 1A in der Astrozytenzelllinie vorlag. Für beide verwendeten Zelllinien, die murine Astrozytenzelllinie und die humane Glioblastomazelllinie U373, konnte in einem Vorexperiment die Expression von *Mlc1* Exon 1B und Exon 1E bzw. *MLC1* Exon 1B und Exon 1E nachgewiesen werden. Damit war gewährleistet, dass alle nötigen Transkriptionsfaktoren für die Expression der Exonvarianten in den Zelllinien exprimiert werden. Die Promotorkonstrukte wurden in einem Verhältnis von 25:1 (pGL3-Konstrukt:pGL4.74) in die Zellen eingebracht (2.2.11.3). Neben der basalen Promotoraktivität wurde die Aktivität des Promotors auch unter der Wirkung verschiedener Stimulanzen getestet. Der Vergleich der pGL3-Konstrukte unter basalen (unstimulierten) Bedingungen zeigte in der murinen Astrozytenzelllinie keine Promotoraktivität (Abbildung 3.1.11). Da für Exon 1B und 1E eine Expression nachgewiesen wurde, wäre hier eine höhere Aktivität der pGL3-Konstrukte im Vergleich zu pGL3-Basic zu erwarten gewesen. Gleichzeitig stellte sich die Frage, ob die Aktivität des promotorlosen pGL3-Basic höher ist, als sie sein dürfte. Deswegen wurde für die Experimente in der humanen Glioblastomazelllinie U373 ein zusätzliches pGL3-Konstrukt als Kontrolle verwendet. Diese Kontrolle ist ein pGL3-Promotorkonstrukt des Glukokortikoidrezeptors, der von Kumsta und Kollegen beforscht wurde und für den eine Aktivität nachgewiesen ist (Kumsta et al., 2009). Es handelt sich dabei um eine 458 bp große Region aus der 5'-UTR des GR, der einen C/T-Polymorphismus (rs10482605) beherbergt. Als Positivkontrolle wurde hier

die T-Allelvariante (pGL3-GR-T) untersucht. Das Ergebnis der Luciferasemessung in U373 zeigte im Vergleich mit pGL3-Basic eine Promotoraktivität des pGL3-GR-T Konstrukts. Alle pGL3-Promotorkonstrukte zeigten eine geringere Aktivität als die pGL3-Basic Negativkontrolle. Unter der Annahme, dass pGL3-Basic keine Promotoraktivität besitzt, konnte somit gezeigt werden, dass die gewählten 5'-Regionen der alternativen ersten Exone unter den gewählten Bedingungen keine Promotoraktivität aufweisen.



**Abbildung 3.1.11: Basale Promotoraktivität der *Mlc1*- bzw. *MLC1*-Konstrukte**

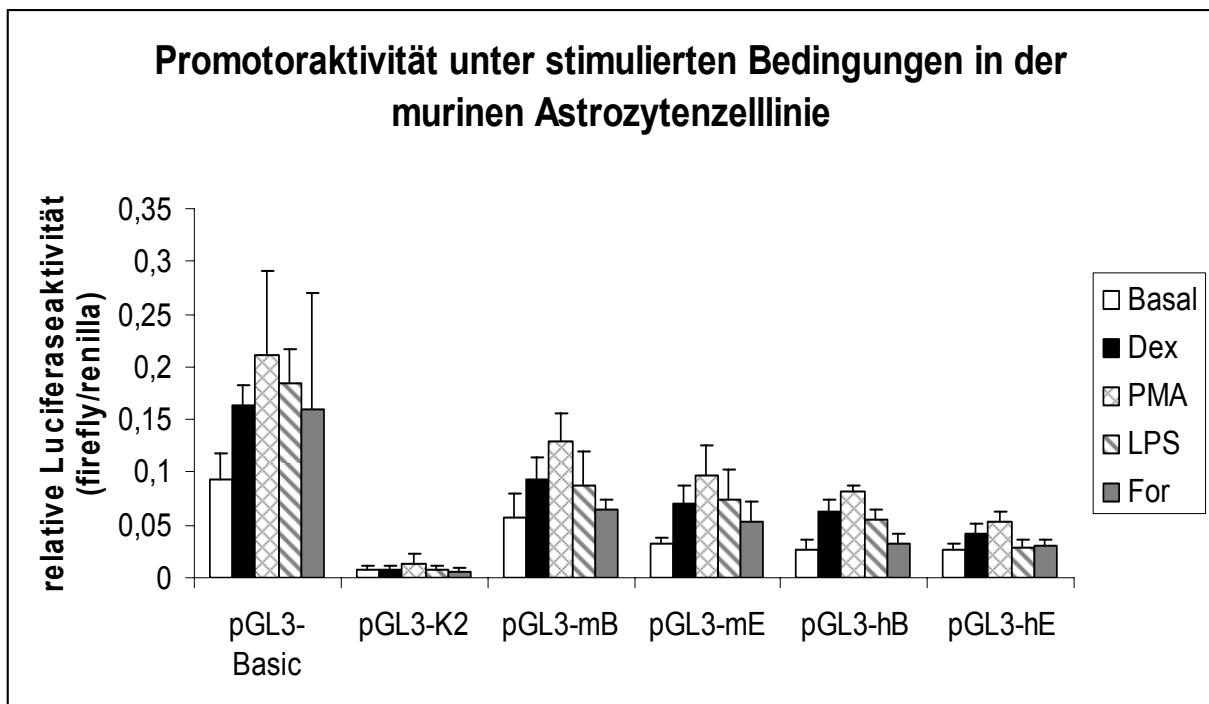
Gezeigt ist die relative Luciferaseaktivität (firefly/renilla), die der Promotoraktivität entspricht. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen in Triplikaten durchgeführt. A) Promotoraktivität der pGL3-Konstrukte unter unstimulierten Bedingungen in der murinen Astrozytenzelllinie. B) Promotoraktivität der pGL3-Konstrukte unter unstimulierten Bedingungen in der humanen Glioblastomazelllinie U373.

Die Stimulationen wurden durchgeführt um zu überprüfen, ob eine Änderung in der Aktivität der Konstrukte zu beobachten ist. Da LPS zu einer Stimulation der NfkappaB-Expression führt (Tessa ten Hove, 1999) und für pGL3-mB zwei NfkappaB-Bindestellen vorhergesagt wurden, wäre hier ein Effekt zu erwarten gewesen. Da an NfkappaB-Bindestellen auch GR-NfkappaB-Heterodimere binden können, wurde ebenfalls die Auswirkung von Dexamethason untersucht. PMA und Forskolin aktivieren weitere TF, die häufig eine Rolle bei der Expression von Genen spielen.

Stimuliert wurde mit 50  $\mu$ M Dex, 50  $\mu$ M For oder 2  $\mu$ M PMA für 24 h oder 100 ng/ $\mu$ l LPS für 30 min bzw. 2 h. Da sich die Werte unter LPS nach 30 min Inkubation und nach 2 h Inkubation nicht unterschieden, wurden hier nur die Ergebnisse nach 30minütiger Inkubation dargestellt. Die Ergebnisse zeigten, dass keine der Stimulationsbedingungen einen Einfluss auf die Aktivität der pGL3-Konstrukte hatten (Abbildung 3.1.12 und Abbildung 3.1.11). Die

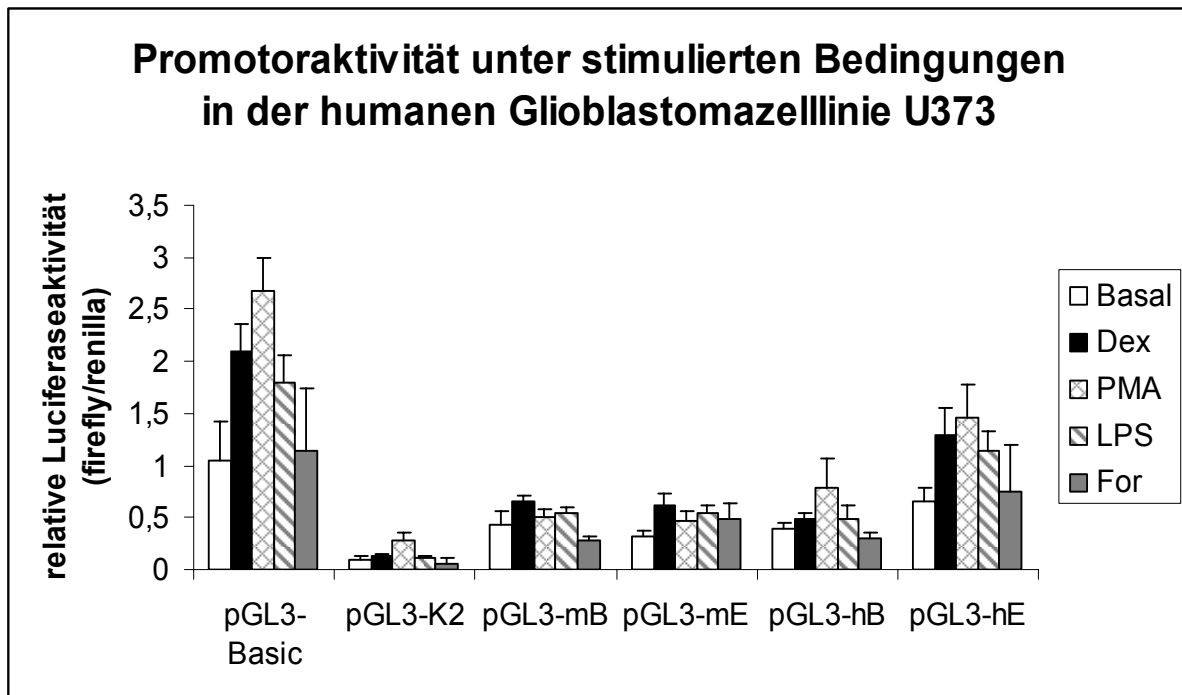


zu beobachtende Stimulierbarkeit der pGL3-Konstrukte ist auf die Stimulierbarkeit der Negativkontrolle (pGL3-Basic) zurückzuführen. Für alle pGL3-Konstrukte lag die Aktivität immer noch unter der von pGL3-Basic. Damit konnte in diesem Experiment weder für Astrozyten noch für U373-Zellen eine Promotoraktivität von pGL3-mB, pGL3-mE, pGL3-hB und pGL3-hE gezeigt werden.



**Abbildung 3.1.12: Promotoraktivität der *Mlc1*- bzw. *MLC1*-Konstrukte unter stimulierten Bedingungen in der murinen Astrozytenzelllinie**

Gezeigt ist die relative Luciferaseaktivität von *firefly* (RLU)/*renilla* (RLU) unter unstimulierten (Basal) und stimulierten Bedingungen. Dazu wurden die Zellen vor der Ernte für 24 h mit 50  $\mu$ M Forskolin (For), 2  $\mu$ M PMA oder 50  $\mu$ M Dexamethason (Dex), bzw. 30 min vor der Ernte mit 100 ng/ $\mu$ l LPS stimuliert. Es wurden drei unabhängige Messungen in Triplikaten durchgeführt. Ausreisser (>2SD) wurden herausgenommen.



**Abbildung 3.1.13: Promotoraktivität der *Mlc1*- bzw. *MLC1*-Konstrukte unter stimulierten Bedingungen in der humanen Glioblastomazelllinie U373**

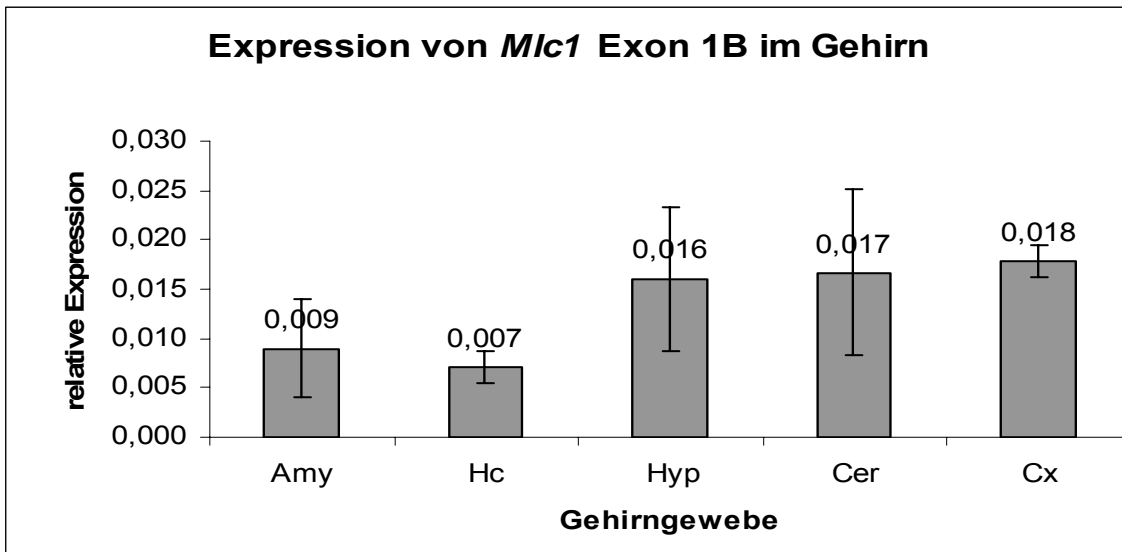
Gezeigt ist die relative Luciferaseaktivität von *firefly* (RLU)/*renilla* (RLU) unter unstimulierten (Basal) und stimulierten Bedingungen. Dazu wurden die Zellen vor der Ernte für 24 h mit 50  $\mu$ M Forskolin (For), 2  $\mu$ M PMA oder 50  $\mu$ M Dexamethason (Dex), bzw. 30 min vor der Ernte mit 100 ng/ $\mu$ l LPS stimuliert. Es wurden drei unabhängige Messungen in Triplikaten durchgeführt. Ausreisser ( $>2SD$ ) wurden herausgenommen.

### 3.1.5 Hinweise auf unterschiedliche *Mlc1* Exon 1B-Expression im Gehirn

In dieser Arbeit wurden für *Mlc1* zwei unterschiedliche Transkriptionsstartpunkte und damit auch zwei unterschiedliche erste Exons nachgewiesen. Da 5'-UTRs oftmals regulatorische Funktion besitzen, deuten zwei unterschiedliche 5'-UTRs auf verschieden regulierte Transkripte hin. Es stellte sich die Frage, ob es Hinweise gibt, die auf Unterschiede in der Regulation der *Mlc1*-Expression in den verschiedenen Gehirngeweben von *Mus musculus* hindeuten. Hierzu sollte die Menge der beiden Transkripte in den verschiedenen Gehirngeweben untersucht werden. Die quantitative Bestimmung der beiden Transkripte erfolgte mittels Real-Time-PCR. Zunächst wurde jeweils mRNA von vier verschiedenen Versuchstieren aus Amygda, Hypothalamus und Hippocampus, und von zwei Versuchstieren aus Cerebellum und Cortex isoliert. Diese wurde im nächsten Schritt in cDNA umgeschrieben und in der Real-Time-PCR eingesetzt. Die verwendeten PCR-Bedingungen wurden für jedes verwendete Primerpaar optimiert und sind in Tabelle 2.2.2 aufgeführt. Als Referenzgen wurde *Gapdh* verwendet, da für *GAPDH* die Expressionsstärke für die verschiedenen Gehirnregionen bekannt und annähernd gleich ist (Barber et al., 2005).

Es wurden für jede Gewebeprobe jeweils drei unabhängige Messungen in Duplikaten durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Aus den Mittelwerten von *Mlc1* und *Gapdh* wurde der  $\Delta$  Ct-Wert und der  $2^{-\Delta Ct}$ -Wert bestimmt (Tabelle 5.1.1). Der  $2^{-\Delta Ct}$ -Wert gibt an, wieviel Mal mehr *Mlc1* Exon 1B im Gegensatz zu *Gapdh* exprimiert wird. Für jeden Gewebetyp wurde aus den  $2^{-\Delta Ct}$ -Werten der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.1.14 graphisch dargestellt. Es ist die Tendenz einer erhöhten *Mlc1* Exon 1B in Hypothalamus, Cerebellum und Cortex im Vergleich zu Amygdala und Hippocampus zu beobachten. Der größte Unterschied liegt dabei zwischen Hippocampus (relative Expressionsstärke: 0,007) und Cortex (relative Expressionsstärke: 0,018). Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Die PCR-Optimierung für Exon 1E, unter Verwendung der Opticoncycler, stellte sich als sehr problematisch heraus. Für Exon 1E konnte keine stabile PCR-Bedingung gefunden, die nur das erwartete Amplikon von 480 bp zeigte. Daher konnte die Quantifizierung für *Mlc1* Exon 1E nicht ausgewertet und somit auch kein Expressionsvergleich zwischen Exon 1B und Exon 1E durchgeführt werden. Ergänzende Informationen zur Quantifizierung und Schmelzkurvenanalyse von Exon 1B und Exon 1E sind im Anhang dargestellt (Abbildung 5.1.5 und Abbildung 5.1.6).



**Abbildung 3.1.14: Expression von *Mlc1* Exon 1B in verschiedenen Gehirngeweben**

Dargestellt ist die relative Expression ( $2^{-\Delta Ct}$ ) von *Mlc1* zu *Gapdh*. Es wurden jeweils drei unabhängige Messungen in Duplikaten durchgeführt. Es gilt für: Amygdala (Amy) n = 4, Hippocampus (Hc) n = 4, Hypothalamus (Hyp) n = 4, Cerebellum (Cer) n = 2 und Cortex (Cx) n = 2; n = Anzahl der Tiere aus denen das Gehirngewebe entnommen wurde.

### 3.1.6 Stimulation der Astrozytenzellen zeigt keinen Effekt auf die *Mlc1*-Expression

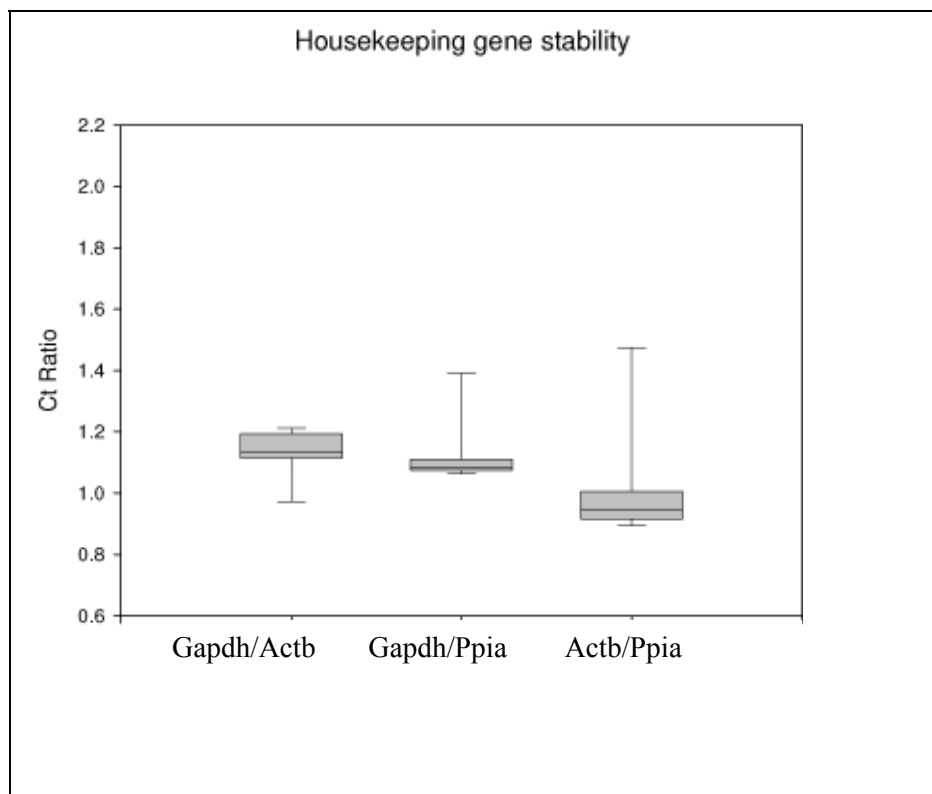
Die Funktion von *Mlc1* ist noch weitestgehend unbekannt. Um Hinweise darüber zu erhalten, wäre es interessant, Schnittpunkte zu anderen, schon bekannten Stoffwechselwegen zu finden. Es sollte hier deswegen der Einfluss von verschiedenen Stimulantien auf die Aktivität des *Mlc1*-Promotors untersucht werden. Für die Untersuchung wurde die murine Astrozytenzelllinie verwendet, für die die natürliche Expression von *Mlc1* bereits nachgewiesen wurde. Das Experiment wurde in 6well Platten durchgeführt. Pro well wurden 5 ml  $8 \cdot 10^4$  Zellen/ml ausplattiert und nach 24 Stunden mit 50  $\mu$ M Dex, 50  $\mu$ M For, 2  $\mu$ M PMA oder 100 ng/ $\mu$ l LPS stimuliert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen in 1 ml peqPure resuspendiert und die RNA isoliert. Für LPS-stimulierte Zellen erfolgte die Ernte nach 6 h. Anschließend wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und mit intronübergreifenden Aktinprimern auf Verunreinigung mit genomischer DNA getestet. Die cDNA wurde für die Quantifizierung von *Mlc1* Exon 1B in der Real-Time-PCR eingesetzt. Als Referenzgene wurden *Gapdh*, *Actb* und *Ppia* verwendet. Um das stabilste Referenzgen zu ermitteln, wurden die jeweiligen Ct-Werte im Verhältnis zueinander betrachtet (Abbildung 3.1.15). Als stabilstes Referenzgen ist demnach *Gapdh* zu betrachten.

Die verwendete Methode hat den Vorteil, dass über die gebildete Menge des Genprodukts direkt Aussagen über die Promotorregulation getroffen werden können, unabhängig von dessen Lokalisation bzw. der Lokalisation anderer wichtiger Faktoren wie z.B. Enhancern. Eine veränderte Expression von *Mlc1* würde auf eine Beteiligung der TF an der Genregulation hindeuten, die durch die jeweiligen Stimulantien aktiviert werden. Für For bzw. PMA wären das TF, die durch PKA bzw. PKC aktiviert werden. Eine Expressionsänderung unter Dex würde auf eine Regulation durch GR, und unter LPS auf eine Regulation durch NFkappaB hinweisen. Da es sich bei *Mlc1* um ein potentielles Kandidatengenes für die Schizophrenie handelt und bekannt ist, dass Stress bei Betroffenen zu einem Krankheitsschub führen kann, ist gerade die Auswirkung von Dex auf die *Mlc1*-Expression interessant.

Die ermittelten Ct-Werte für unstimulierte Zellen (14,79), Dex- (15,12), LPS- (14,36), For- (14,68) und PMA-stimulierte Zellen (15,05) zeigen eine ähnliche Verteilung der *Mlc1* Exon 1B Expression. Abbildung 3.1.16: Relative *Mlc1*-Expression zeigt das arithmetische Mittel der Ct-Werte und die Standardabweichung. Die Bildung des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wertes verdeutlicht den Expressionsunterschied von *Mlc1* unter stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen (Abbildung 3.1.17). Das Ergebnis des Experiments zeigte für Dex und

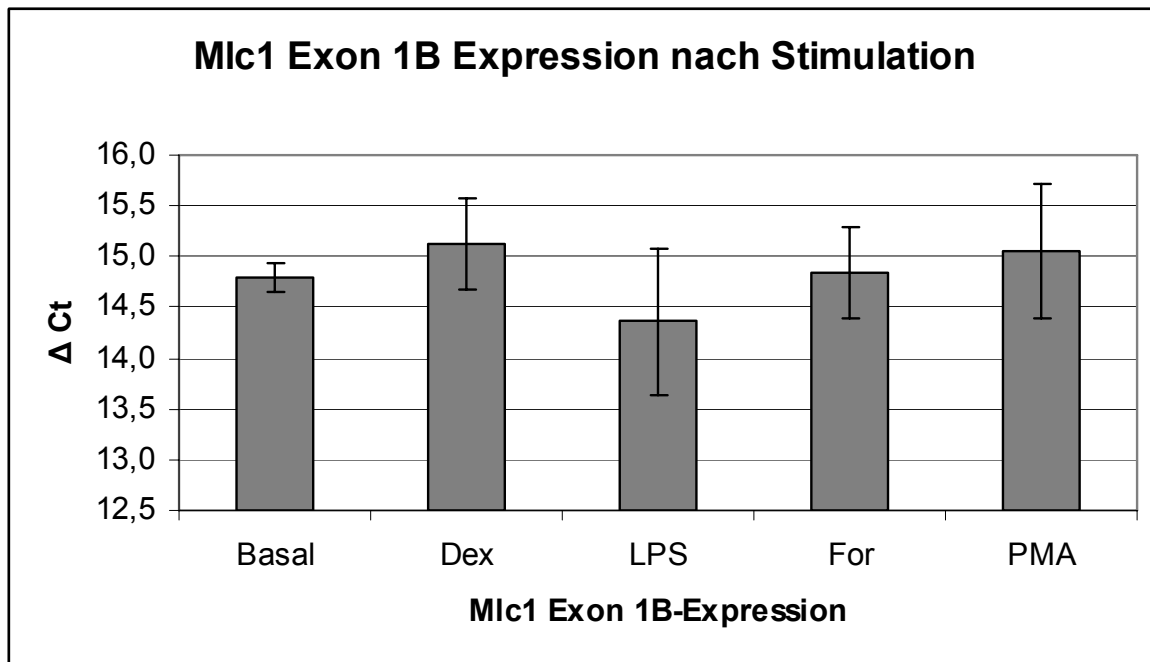
PMA mit 0,80 und 0,84 eine leicht verringerte Expression von *Mlc1*. Dies entspricht einer ca. 20 % verringerten Expression im Vergleich zur unstimulierten Bedingung. For zeigte mit 1,08 nahezu keine veränderte, LPS mit 1,35 eine um ca. 35 % erhöhte Expression im Vergleich zur unstimulierten Bedingung (Abbildung 3.1.17). Aufgrund der geringen Probenzahl von  $n = 4$  bzw.  $n = 2$ , ist der Effekt viel zu gering, um statistische Signifikanz zu erreichen.

Demnach spielen die entsprechenden TF keine wesentliche Rolle bei der Regulation von *Mlc1*. Um diesen Befund zu sichern, müssten jedoch weitere Experimente mit mehr Stichproben, verschiedenen Konzentrationen und Inkubationszeiträumen durchgeführt werden.



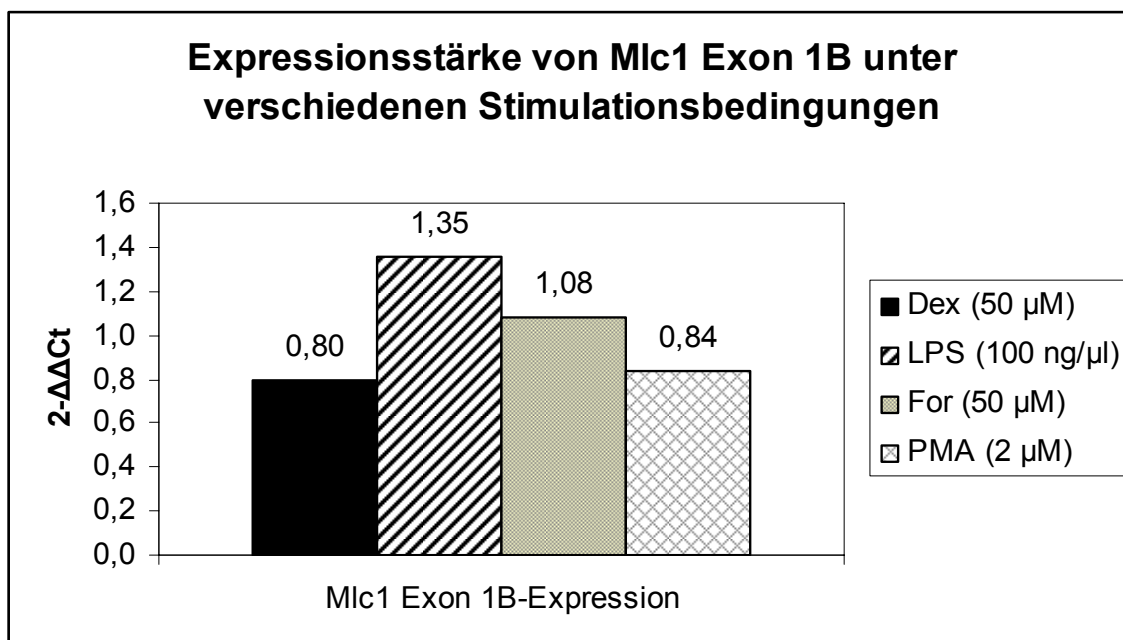
**Abbildung 3.1.15: Referenzgene**

Dargestellt sind die relativen Ct-Werte von *Gapdh*, *Actb* und *Ppia*. Die mittlere Linie symbolisiert den Median und die Boxen die 75 und 25 Perzentile und die Fehlerbalken die Standardabweichung des arithmetischen Mittels.



**Abbildung 3.1.16: Relative *Mlc1*-Expression**

Die *Mlc1* Exon 1B-Expression wurde zu *Gapdh* normalisiert. Die Stimulationsversuche wurden in der murinen Astrozytenzelllinie durchgeführt. Stimuliert wurde mit 50  $\mu\text{M}$  Dexamethason (Dex),  $n = 4$ ; 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$  Lipopolysaccharide (LPS),  $n = 2$ ; 50  $\mu\text{M}$  Forskolin (For),  $n = 2$ ; 2  $\mu\text{M}$  Phorbol-12-Myristat-13-Azetat (PMA),  $n = 4$  und unstimuliert (Basal),  $n = 2$ . Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.



**Abbildung 3.1.17: Expressionsstärke von *Mlc1* Exon 1B**

Die Expressionsstärke ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) von *Mlc1* Exon 1B wurde auf *Gapdh* und die unstimulierte Bedingung normalisiert. Die Expression für die unstimulierte Bedingung entspricht dem  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Wert von 1. Die Messung erfolgte für *Mlc1* in zwei Triplikatmessungen und für *Gapdh* in einer Duplikatmessung. (Es gilt für: basal  $n = 2$ , Dex  $n = 4$ , LPS  $n = 2$ , For  $n = 4$ , PMA  $n = 2$ ). Dex = Dexamethason, LPS = Lipopolysaccharide, For = Forskolin, PMA = Phorbol-12-Myristat-13-Azetat.

### 3.1.7 *In silico* Sequenzanalyse

Für die Sequenzanalyse des putativen humanen und murinen *MLC1*-Promotors wurde der Sequenzbereich von Position -350 bp bis zum Translationsstartpunkt des Gens auf regulatorische Einheiten untersucht. Zunächst wurde eine erneute Promotorsuche mit PROSCAN Version 1.7 durchgeführt. Die Suche lieferte keine Vorhersage für einen Promotor. Als nächstes wurde die Sequenz auf TATA-, CCAAT- und GC-Boxen untersucht. Dabei handelt es sich um allgemeine Promotorelemente, die der Initiation der Transkription dienen. Es konnten nur die zwei CCAAT-Boxen in *Mus musculus*, die bereits von Steinke und Kollegen beschrieben wurden (Steinke et al., 2003) nachgewiesen werden (Tabelle 3.1.4).

Das Vorkommen von allgemeinen Promotorelementen in potentiellen Promotorregionen wurde von Suzuki und Kollegen anhand von 1031 humanen Genen untersucht (Suzuki et al., 2001). Das Ergebnis zeigte, dass nur 32 % der Gene TATA-Boxen aufwiesen. 64 % der Gene besaßen CAAT-Boxen und 97 % GC-Boxen. Zudem lagen 48 % der potentiellen Promotorregionen in CpG-Inseln. CpG-Inseln sind definiert als Sequenzabschnitte (>200 bp) mit hohem GC-Gehalt (>50 %) und einem Verhältnis von beobachteten CpGs zu erwarteten CpGs von mehr als 0,6 (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Roider und Kollegen zeigten 2009, dass Gene die im Gehirn exprimiert werden, mit 70% besonders häufig CpG-Inseln in ihren Promotorregionen aufweisen (Roider et al., 2009).

Da es sich bei *Mlc1* um ein Gen mit einer spezifischen Expression im Gehirn handelt (Meyer et al., 2001), wurde die Sequenz auf CpG-Inseln untersucht. Dazu wurden neben dem gesamten Sequenzabschnitt auch jeweils die Teilsequenzen untersucht, die in pGL3-mB und pGL3-hB eingebracht wurden. Da die Sequenzlängen für pGL3-mE und pGL3-hE weniger als 200 bp betragen, wurden sie nicht separat analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1.4 dargestellt. Es sind keine CpG-Inseln in der Promotorregion von *Mlc1* bzw. *MLC1* vorhanden.

TF-Bindestelle	Konsensussequenz	cut off	bevorzugte Position	in <i>Mus musculus</i>	in <i>Homo sapiens</i>
TATA-Box	STATAAAWRN*	0,77	-40 ~ -23	-	-
GC-Box	RGGGGCGGGGCNK*	0,78	-55 ~ +56	-	-
CCAAT-Box	NNRRCCAATSA*	0,78	+105 ~ -70	Position -27 und Position -114	-

**Tabelle 3.1.3: Analyse auf allgemeine Promotorelemente**

Die Konsensussequenzen sind entnommen aus der Veröffentlichung von Suzuki und Kollegen, 2001. Die minimalste Sequenzübereinstimmung (cut off) wurde zwischen 77 und 78 Prozent angesetzt. \* zusätzliche Symbole: N = A,C,G oder T; R = A oder G; S = C oder G; W = A oder T; K = G oder T.



Spezies	Sequenzabschnitt	GC-Gehalt %	CpG(B/E)	CpGs	Cs	Gs	N
<i>Mus musculus</i>	-350 bp ~ +1015 bp	46,5	0,20	15	295	340	1367
<i>Mus musculus</i>	+21 bp ~ +464 bp	46,8	0,25	6	105	103	444
<i>Homo sapiens</i>	-350 bp ~ +1020 bp	46,5	0,50	37	303	335	1372
<i>Homo sapiens</i>	+102 bp ~ +512 bp	49,6	0,51	13	101	103	411

**Tabelle 3.1.4: GC- und CpG-Gehalt der *MLC1* Promotorregion**

Angegeben ist der GC-Gehalt des jeweiligen Sequenzabschnittes. CpG(B/E) ist das Verhältnis der beobachteten CpGs zu den erwarteten CpGs. Das Verhältnis wurde nach folgender Formel berechnet:  $CpG(B/E) = (CpG / (Cs * Gs)) * N$ ; dabei ist N die gesamte Basenpaaranzahl der Sequenz.

Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei dem potentiellen Promotor von *Mlc1* um keine GC- und CpG-reiche Sequenz handelt. Im Vergleich von CpG-reichen und CpG-armen Promotoren wurde von Roider und Kollegen für letztere Gruppe eine starke Akkumulation spezifischer Transkriptionsfaktoren bis zu 200 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartpunkts beschrieben (Roider et al., 2009).

Für die Verwendung des Transkriptionsstartpunkts von *MLC1* Exon 1B, Exon 1E und *Mlc1* Exon 1B wurde die Sequenz der cDNA-Klone aus der *database of transcriptional start sites* (DBTSS) herangezogen. Demnach befindet sich der Transkriptionsstartpunkt für *MLC1* Exon 1B bei +477 bp, für Exon 1E bei +724 bp und für *Mlc1* Exon 1B bei +437 bp. Für *Mlc1* Exon 1E wurde als potentieller Startpunkt +638 bp gewählt, da ab dieser Position eine Transkription nachgewiesen werden konnte. Alle Positionsangaben beziehen sich auf das Exon 1, das in der Datenbank (Ensembl Version 56) angegeben ist. Für die Analyse auf spezifische Transkriptionsfaktorbindestellen wurde die Sequenz bis 250 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstartpunkt mit TRANSFAC Version 2009.3 untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.1.5 dargestellt.

Für *Mus musculus* wurde zusätzlich eine Transkriptionsfaktorsuche mit TRANSFAC Version 10.1 für den gesamten Sequenzbereich zwischen dem *Pomp*-Pseudogen und dem Transkriptionsstartpunkt (+1) für *Mlc1* durchgeführt. Im Gegensatz zu Steinke und Kollegen konnte jedoch kein GRE im Promotorbereich von *Mlc1* nachgewiesen werden.

TF-Bindestelle	<i>Homo sapiens</i>		<i>Mus musculus</i>	
	pGL3-hB (+227bp ~ +477 bp)	pGL3-hE (+474bp ~ +724 bp)	pGL3-mB (+187 bp ~ +437 bp )	pGL3-mE (+388 bp ~ +638 bp)
BCL6			1(+)	
BRCA1:USF2				1(+)
C/EBP		1(-)		
C/EBPalpha	1	1(+)	1(-)	
C/EBPgamma			1(-)	
C/EBPdelta			1(-)	
CACD			1(+)	
CDP		1(+)		
Crx				1(+)
c-Rel			1(-); 1(+)	
DBP	1(-)	1(-)		
ELK1				1(+)
HLF			1(+)	
HNF4				1(+)
GATA1			1(+); 1(-)	
GATA4			1(-)	
IRF7			1(+)	1(+)
IK1			1(+)	
IPF1		1(-)		1(+)
Kid3	1(-); 1(+)		1(+)	1(-)
MINI19				1(+)
NFkappaB			1(+); 1(-)	
RFX		1(+)		
Pax				1(+)
PBX				1(-)
PITX2				1(+)
STAT			1(+)	
TAL1			1(-)	
TBX5		1(+)		
TGIF	1(-)	1(+); 1(-)		
v-Myb				1(-)
WHNB				1(-)

**Tabelle 3.1.5: TRANSFAC-Analyse**

Vorhergesagte Transkriptionsfaktor (TF)-Bindestellen für die potentiellen Promotorbereiche für *MLC1* Exon 1B (+227 bp bis +477 bp), Exon 1E (+474 bp bis +724 bp), *Mlc1* Exon 1B (+187 bp bis +437 bp) und *Mlc1* Exon 1E (+388 bp bis +638 bp). Angegeben ist die Anzahl und Orientierung der TF-Bindestellen: Gegenstrang (-); Sinnstrang (+). Der cut off wurde bei 80 % Sequenz-übereinstimmung gesetzt. Die TF-Sequenzanalyse wurde mit TRANSFAC Version 2009.1 durchgeführt (schwarze Schrift). Die Tabelle wurde mit Daten aus einer früheren TF-Sequenzanalyse (TRANSFAC Version 10.1; 12.2007), die für *Mus musculus* durchgeführt wurde, ergänzt.

### 3.2 Ausschluss von *BUBIB* als Ursache für die Periodische Katatonie

In einer genomweiten Kopplungsstudie von Stöber und Kollegen wurde eine Kopplung des Abschnitts auf Chromosom 15q15 mit Periodischer Katatonie gefunden. Dieser Bereich konnte von Ekawardhani und Kollegen weiter auf Chromosom 15q14-15.1 eingegrenzt werden. Demnach liegt *BUBIB* in dem Bereich, der gekoppelt mit der PK vererbt wird. Um Mutationen im *BUBIB* auszuschließen, die für die Kopplung zur Periodischen Katatonie verantwortlich sein könnten, wurden alle Exone von *BUBIB*, samt flankierender Intronbereiche, sequenziert. Es wurde darauf geachtet, dass die exonischen Sequenzbereiche jeweils in beide Richtungen sequenziert wurden. Für die Sequenzierung wurden Betroffene aus den bereits von Stöber und Ekawardhani untersuchten Familien herangezogen. Es wurden zwei Betroffene aus Familie 11 (Patient Nr. 744 und Nr. 834) und ein Betroffener aus Familie 9 (Patient Nr. 568) ausgewählt. Zusätzlich wurde *BUBIB* einer gesunden Kontrollprobandin sequenziert. Anschließend wurden die Sequenzen mit der Sequenz aus einer Datenbank (ensembl Version: Dezember 2007) verglichen und als *alignment* dargestellt. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigte, dass in den Exonen und den flankierenden Bereichen keine Mutation vorhanden ist. Eine Ausnahme bildete Patient Nr. 568, dessen Sequenz in Intron vier ein zusätzliches Cytosin aufwies. Da an dieser Stelle keine überlappende Sequenzierung mehr stattgefunden hatte, konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob es sich um eine echte Mutation im Intron handelte, oder um eine Mutation, die bei der Amplifikation während der PCR entstanden war. Da diese Veränderung im Intron bei keinem der anderen beiden Patienten nachgewiesen werden konnte, ist ein Zusammenhang zwischen der Veränderung und der Periodischen Katatonie sehr unwahrscheinlich. Aufgrund dessen wurde auf eine zusätzliche Sequenzierung zur Verifikation der Mutation verzichtet. Ein Gendefekt in *BUBIB*, der für die Erkrankung der Periodischen Katatonie verantwortlich sein könnte, wurde hiermit für die untersuchten Familien ausgeschlossen. Die Sequenz-Alignments von Exon 1 bis Exon 23 des *BUBIB*-Gens sind der Übersichtlichkeit halber im Anhang (s. 5.2) dargestellt.

### 3.3 Ergebnis der Schizophrenie-Assoziationsstudie

Im Rahmen einer Studie von Gruber und Kollegen, in der Patienten mit Schizophrenie, Bipolarer Störung oder Zwangsstörung im Hinblick auf verschiedene parametrische Daten wie Gehirn- und Hippocampales Volumen, Lern- und Erinnerungsvermögen, sowie die Konzentration verschiedener Metabolite im Gehirn untersucht werden sollen, sollten hier zusätzlich der Einfluß genetischer Faktoren untersucht werden. Dazu wurden zunächst alle Studienteilnehmer bezüglich der zu untersuchenden Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) genotypisiert. Für die Auswertung wurde sich auf die Gruppe der Schizophreniepatienten, sowie der gesunden Kontrollpersonen beschränkt. Die Kriterien, nach denen die Polymorphismen ausgewählt wurden, waren eine möglichst gleichmäßige Verteilung über den gesamten Genbereich, sowie eine mögliche Funktionalität. Dabei wurden Polymorphismen bevorzugt, die im Exon zu einem AS-Austausch führen. Es sollten zwei SNPs des *BRDI*-Gens, drei SNPs des *CHRNA7*- und drei SNPs des *DAOA*-Gens auf eine Assoziation mit Schizophrenie überprüft werden. Die ausgewählten SNPs sind in Tabelle 3.3.1 dargestellt. Die Tabelle wurde mit der aktuellen Version der Ensembl-Datenbank (Ensembl Version 57, März 2010) und der HapMap-Datenbank (HapMap; Februar 2010) abgeglichen und aktualisiert.

Zu Beginn der Fall-Kontroll Studie wurde für rs9558562 eine Allelverteilung von 96 % A zu 4 % G beschrieben (HapMap; Juli 2006). Für die Allelverteilung von rs12899798 lag derzeit keine Information vor (HapMap; Juli 2006). Die Genotypisierung dieser beiden SNPs ergab für rs9558562 100 % A/A und für rs12899798 100 % T/T. Dies entspricht auch der aktuellen Angaben in der Datenbank (s. HapMap; Februar 2010). Aufgrund der fehlenden Variabilität wurden diese beiden SNPs in der Auswertung nicht weiter berücksichtigt. Für rs778294 war zu Beginn der Studie eine Lokalisation im Intron 4 des *DAOA*-Gens beschrieben (Ensembl Version 43; Februar 2007). Mittlerweile ist der Datenbank (Ensembl Version 57; März 2010) zu entnehmen, dass rs778294 im Exon lokalisiert ist, dort aber zu keinem AS-Austausch führt.

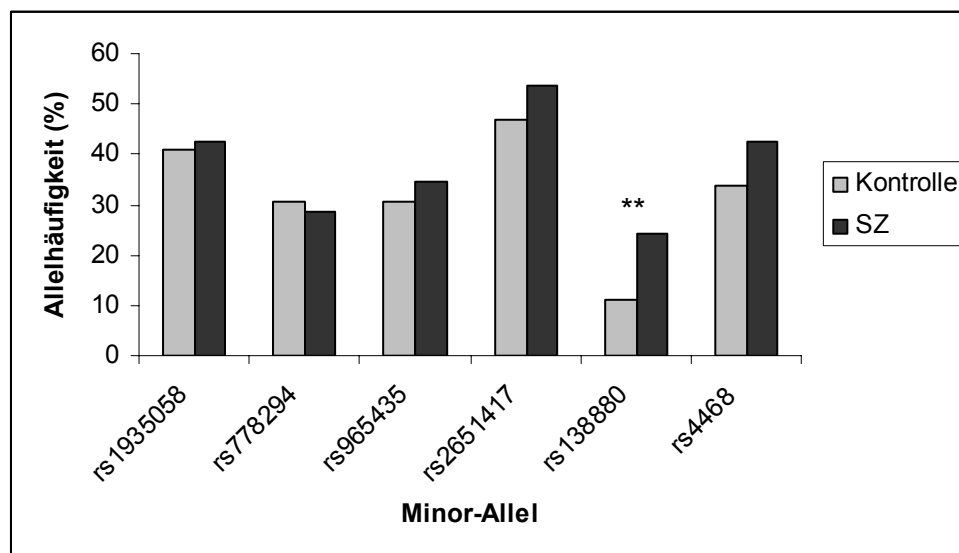
Die erhaltene Allelverteilung ist in Abbildung 3.3.1 graphisch dargestellt. Gezeigt wird die prozentuale Verteilung des weniger häufiger vorkommenden Allels (*Minor*-Allel). Mittels logistischer Regression wurden die Unterschiede in der Allelverteilung auf Signifikanz überprüft. Das Ergebnis zeigt eine signifikante Abweichung in der Verteilung des A-Allels von rs138880 ( $p=0,009$ ) (siehe Tabelle 3.3.2). Eine *In silico*-Analyse zeigte, dass das C-Allel von rs138880 zu einer potentiellen Bindestelle für zwei Transkriptionsfaktoren führt. Es

handelt sich dabei um den *zinc-finger binding protein factor* (ZNF202) und den *hairy and enhancer of split homolog 1* (HES-1) (Severinsen et al., 2006).

SNP	Polymorphismus	Lokalisation	Chr.	Chr. Position	Allelverteilung (%)
rs 138880	A/C	Intron	22	50218611	A (81) / C (19)
rs 4468	A/G	3'-UTR	22	50167652	A (58) / G (42)
rs 1935058	T/C	5'-Bereich	13	106111350	keine Angaben
rs 9558562	A/G	Exon, nonsyn. A(Lys)/G(Glu)	13	106124937	A (100)
rs 778294	C/T	Exon (syn.)	13	106142235	C (60) / T (40)
rs 965435	G/A	Intron	15	32314759	G (70) / A (30)
rs 12899798	T/G	Exon, nonsyn. G(Gly)/T(Trp)	15	32393539	T (100)
rs 2651417	C/G	Intron	15	32440934	C (52) / G (48)

**Tabelle 3.3.1: Untersuchte Polymorphismen**

Die angegebenen Position der Polymorphismen wurden auf den aktuellen Stand der Datenbankversion von März 2010 (Ensembl Version 57) abgeglichen. Die Allelverteilung ist der HapMap-Datenbank (Version Februar 2010) entnommen.



**Abbildung 3.3.1: Graphische Darstellung der prozentualen Allelverteilung**

Verglichen wurde hier die Häufigkeit des *Minor*-Alles in der Schizophreniegruppe (SZ) mit der Häufigkeit des *Minor*-Allels in der Kontrollgruppe. (\*\*  $p < 0,01$ )

SNP		Genotyp			Allele		p-Wert	R
		dd [n(%)]	dD [n(%)]	DD [n(%)]	d [(%)]	D [(%)]		
rs1935058 (T/C)	SZ	14 (20,6)	30 (44,1)	24 (35,3)	58 (42,6)	78 (57,4)	0,900	0,011
( <i>DAOA</i> )	Kontrolle	8 (16,3)	24 (49,0)	17 (34,7)	40 (40,8)	58 (59,2)		
rs778294 (C/T)	SZ	6 (8,8)	27 (39,7)	35 (51,5)	39 (28,7)	97 (71,3)	0,540	-0,055
( <i>DAOA</i> )	Kontrolle	4 (8,2)	22 (44,9)	23 (46,9)	30 (30,6)	68 (69,4)		
rs965435 (G/A)	SZ	5 (7,4)	37 (54,4)	26 (38,2)	47 (34,6)	89 (65,4)	0,179	0,120
( <i>CHRNA7</i> )	Kontrolle	7 (14,3)	16 (32,7)	26 (53,1)	30 (30,6)	68 (69,4)		
rs2651417 (C/G)	SZ	22 (32,4)	29 (42,6)	17 (25,0)	73 (53,7)	63 (46,3)	0,501	-0,06
( <i>CHRNA7</i> )	Kontrolle	12 (24,5)	22 (44,9)	15 (30,6)	46 (46,9)	52 (53,1)		
rs138880 (A/C)	SZ	5 (7,4)	23 (33,8)	40 (58,8)	33 (24,3)	103 (75,7)	0,009**	0,234
( <i>BRDI</i> )	Kontrolle	2 (4,1)	7 (14,3)	40 (81,6)	11 (11,2)	87 (88,8)		
rs4468 (A/G)	SZ	13 (19,1)	32 (47,1)	23 (33,8)	58 (42,6)	78 (57,4)	0,186	0,118
( <i>BRDI</i> )	Kontrolle	6 (12,2)	21 (42,9)	22 (44,9)	33 (33,7)	65 (66,3)		

**Tabelle 3.3.2: Verteilung der Genotypen und Allele in der Schizophrenie (SZ) - und der Kontrollgruppe**

Die Tabelle zeigt die Verteilung der Genotypen und Allele der untersuchten SNPs in 76 Schizophreniepatienten (SZ) und 51 Kontrollpersonen (Kontrolle). n = Anzahl an Individuen; d = Minor Allel; D = Major Allel; R = Korrelationskoeffizient; \*\*Signifikanzniveau bei  $p < 0,01$ .

## 4 Diskussion

Die Untersuchung des *MLC1*-Gens im Zusammenhang mit Schizophrenie gründet auf den Ergebnissen der Kopplungsstudie von Stöber und Kollegen. Stöber und seine Arbeitsgruppe untersuchten in einer genomweiten Kopplungsstudie zwölf Großfamilien mit Periodischer Katatonie. Bei dieser Erkrankung handelt es sich nach Karl Leonhard um eine Unterform der unsystematischen Schizophrenie (Leonhardt, 2003). Das Ergebnis der Kopplungsstudie führte zu einer Kandidatenregion für Periodische Katatonie auf Chromosom 15q15 (LOD-Score = 3,57) und auf Chromosom 22q13 (LOD-Score = 1,85) (Stöber et al., 2000). Nach den Kriterien für eine Kopplung von Lander und Kruglyak (Lander and Kruglyak, 1995) ist die Kopplung zu Chromosom 15q15 als signifikant und die Kopplung zu Chromosom 22q13 als wahrscheinlich zu betrachten. Der Fund von zwei Kandidatenregionen für die Periodische Katatonie spricht für eine heterogene Erkrankung. Die Kandidatenregion auf Chromosom 22q13 rührt dabei nur von einer der untersuchten Familien her. Meyer und Kollegen konnten in dieser Familie eine Mutation im *MLC1*-Gen nachweisen, die mit dem Auftreten der Erkrankung segregierte (Meyer et al., 2001). Bei dieser Mutation handelt es sich um eine sehr seltene Leu309Met-Variante. 2003 fanden Rubie und Kollegen eine weitere Familie mit Periodischer Katatonie und dieser Mutation, in der keine Segregation zwischen der Mutation und der Erkrankung gefunden werden konnte (Rubie et al., 2003). Allerdings sind für diese Familie einige Unklarheiten in Bezug auf die Diagnosestellung bekannt (Ekawardhani, 2009). So wurde beschrieben, dass weder die Mutter des Betroffenen, noch ihre Geschwister, die als periodisch kataton diagnostiziert waren, jemals eine psychiatrische Einrichtung besucht hätten. Hingegen wurde für den als „gesund“ beschriebenen Vater, der Überträger der Leu309Met-Variante war, ein klinischer Aufenthalt genannt. Zudem soll er in früheren Jahren ähnliche Symptome aufgewiesen haben, wie der betroffene Sohn (Ekawardhani, 2009). Weitere Hinweise für eine Rolle des *MLC1*-Gens in psychiatrischen Erkrankungen liefert eine Assoziationsstudie von Verma und Kollegen. Diese konnten zwei Polymorphismen des *MLC1*-Gens mit Schizophrenie und Bipolarer Störung in Zusammenhang bringen (Verma et al., 2005). Des Weiteren fanden sie in einer Familie mit Bipolarer Störung eine Mutation im *MLC1*-Gen, die zu einer Leu308Gln-Variante des Proteins führte. Diese Mutation segregierte in der Familie mit dem Auftreten der Bipolaren Störung (Verma, mündliche Mitteilung durch J. Meyer). *MLC1* ist zudem fast ausschließlich im Gehirn exprimiert (Meyer et al., 2001). Dass *MLC1* eine wichtige Rolle in der Gehirnentwicklung spielt, ist dadurch gezeigt, dass homozygote Mutationen im *MLC1* zu einer auffällig veränderten Gehirnmorphologie führen.

Die Betroffenen zeigen im Verlauf des ersten Lebensjahres eine Makrozephalie. MRT-Aufnahmen zeigen eine Schwellung der weißen Substanz in den zerebralen Hemisphären und zystischen Vakuolen in subkortikalen Bereichen. Die als Megalenzephalie Leukoenzephalopathie mit subkortikalen Zysten bezeichnete Erkrankung führt zu fortschreitenden Defiziten in der Motorik, sowie im späteren Verlauf zu einer kognitiven Degeneration (van der Knaap et al., 1995). MLC1 ist ein Transmembranprotein, das hauptsächlich in den Endfüßchen von Astrozytenzellen, aber auch in anderen Zelltypen wie Bergmann-Gliazellen und Leukozyten lokalisiert ist (Boor et al., 2005; Schmitt et al., 2003; Teijido et al., 2004). Die Funktion des MLC1-Proteins ist bis heute nicht aufgeklärt. Aufgrund einer geringen Sequenzhomologie zum spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.1 könnte für MLC1 eine Funktion als Ionen-Kanal in Betracht kommen (Leegwater et al., 2001; Meyer et al., 2001). Für diese Annahme spricht, dass Ionenkanäle schon öfters mit dem Auftreten psychischer und neurologischer Beschwerden in Zusammenhang gebracht wurden. So sind Mutationen in Genen für Ionenkanäle als ursächlich für Epilepsie beschrieben (Mulley et al., 2003). Epileptische Anfälle sind für über 60 % aller MLC-Patienten beschrieben, obwohl solche Symptome für die meisten Leukodystrophien untypisch sind (Yalcinkaya et al., 2003). Meyer und Kollegen zeigten zudem eine Assoziation zwischen Allelvarianten des *SLC12A6*-Gens, das für einen Kalium-Ionentransporter kodiert, und Depression sowie Periodischer Katatonie (Meyer et al., 2005). Jedoch konnte für MLC1 bisher keine Ionenkanal-Aktivität nachgewiesen werden (Teijido et al., 2004). Leegwater und Kollegen beschreiben für MLC1 auch eine Sequenzhomologie zu ABC2-Transportern und Natrium-Glukose-Transportern (Leegwater et al., 2001). Dies lässt eine Transportfunktion für MLC1 vermuten. Ein weiterer Hinweis, dass MLC1 in Verbindung mit psychischen Beschwerden stehen könnte, ist die Lokalisation des MLC1-Proteins in den die Blutgefäße des ZNS umgebenden Astrozytendfüßchen (Ambrosini et al., 2008; Boor et al., 2005), die Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke sind (Shalev et al., 2009). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten eine Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke bei Depressions- und Schizophreniepatienten nachweisen (Gudmundsson et al., 2007; Muller and Ackenheil, 1995; Schwarz et al., 1998). Ein weiteres Indiz für einen Einfluss von MLC1 auf die Funktion der Blut-Hirn-Schranke liefern Ambrosini und Kollegen, die eine Assoziation zwischen MLC1 und dem Dystrophin-Glykoprotein-Komplex (DGK) nachwiesen. Der DGK spielt eine entscheidende Rolle bei der Verankerung des Zellgerüsts mit der extrazellulären Matrix und bei der Ausbildung und dem Erhalt der Bluthirnschranke (Ambrosini et al., 2008; Cohn, 2005).



Eine erste Charakterisierung des *Mlc1*-Gens erfolgte von Steinke und Kollegen in *Mus musculus* (Steinke et al., 2003), an welche in der vorliegenden Arbeit angeknüpft wurde. Steinke und Kollegen beschreiben für *Mlc1* 12 Exons, die ein ca. 2,8 kb langes Transkript ergeben. Der Transkriptionsstartpunkt liegt 496 bp vor dem ATG-Startcodon und ist in der Datenbank auf Chromosom 15 Position 88809437 vermerkt (Ensembl Version 57). Die regulatorische Region befindet sich nach Steinke und Kollegen in einem ca. 740 bp großen Sequenzbereich zwischen dem Transkriptionsstartpunkt und einem transkribierten Pseudogen 5'-wärts von *Mlc1*, das eine Homologie zu dem *Pomp*-Gen aufweist. Beschrieben wurden weiterhin ein *Alu-J like* Element, CAAT-Boxen und Bindestellen für Pit-1 und den GR (Steinke et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine *in silico*-Analyse mit TRANSFAC Version 10.1 für die von Steinke und Kollegen vermutete regulatorische Region durchgeführt. Die von Steinke und Kollegen beschriebenen Bindestellen für Pit-1 und GR konnten durch die *in silico*-Analyse nicht bestätigt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Untersuchung der 5'-Region von *Mlc1* zeigte, dass es sich bei dem von Steinke und Kollegen beschriebenen Pseudogen nur um das 3'-Ende eines insgesamt 2015 bp langen Transkripts handelt. Für dieses als *Pomp*-Pseudogen bezeichnete Transkript konnte hierbei eine Expression in Hodengewebe nachgewiesen werden. Im Gehirn findet keine Expression des *Pomp*-Pseudogens statt. Für die Promotorsuche mit der Promotorscan-Software (PROSCAN Version 1.7) wurde die gesamte Sequenz des *Mlc1*-Gens inklusive des 5'-Bereichs bis zum nächsten Transkript eingeschlossen. Die Promotorscan-Software sagte für *Mlc1* keinen Promotor voraus. Der nächstgelegene Promotor 5' von *Mlc1*, der durch die Promotorscan-Software vorausgesagt wurde, nimmt den gesamten intergenischen Spacer zwischen *Mov1011* und *Pomp*-Pseudogen ein, woraus folgt, dass es sich bei diesem wahrscheinlich um den Promotor für *Mov1011* und das *Pomp*-Pseudogen handelt. Da das *Pomp*-Pseudogen nicht im Gehirn exprimiert wird ist anzunehmen, dass der Promotorbereich im Gehirn durch einen inhibitorischen Faktor oder fehlende aktivierende Faktoren stillgelegt ist. Dennoch wurde aufgrund fehlender Hinweise auf andere regulatorische Elemente überprüft, ob der Promotor des *Pomp*-Pseudogens einen Einfluss auf die Expression von *Mlc1* zeigt. Dazu wurde ein Luciferase-Konstrukt erstellt, das den gesamten 5'-Bereich vor *Mlc1* inklusive des Promotors für das *Pomp*-Pseudogen enthielt. Weiterhin wurde ein zweites Luciferase-Konstrukt, welches den untranskribierten 5'-Bereich vor *Mlc1* enthielt untersucht, um die von Steinke und Kollegen beschriebene regulatorische Region auf Promotoraktivität zu überprüfen. Für keines

der beiden Konstrukte konnte eine Promotoraktivität nachgewiesen werden. Demnach ist das Ergebnis des Luciferase-Assays deckungsgleich zu der Vorhersage der Promotorscan-Software.

Da für das humane *MLC1* bereits verschiedene Transkriptionsstartpunkte (TSS) in der Datenbank (DBTSS Version 4.0) beschrieben waren, wurde für das murine *Mlc1* eine Expressionsanalyse durchgeführt. Hierbei wurde sich an alternativen TSS für das humane *MLC1* orientiert (DBTSS Version 4.0). In der Expressionsanalyse für *Mlc1* in *Mus musculus* konnten zwei alternative erste Exons (Exon 1B und Exon 1E) nachgewiesen werden. Beide beginnen erst einige 100 bp nach dem offiziellen TSS. Somit befindet sich die zu erwartende Promotorregion von *Mlc1* nicht 5', sondern 3'wärts des in der Datenbank beschriebenen TSS. Dies erklärt die fehlende Promotoraktivität für den untersuchten 5'-Bereich. Die Expressionsanalyse zeigte weiterhin, dass es sich bei den in *Mus musculus* nachgewiesenen Transkripten für Exon 1B und Exon 1E um die beiden Transkripte handelte, die auch in *Homo sapiens* am häufigsten nachgewiesen werden konnten (DBTSS Version 4.0).

In einem weiteren Schritt wurden Luciferase-Konstrukte mit den potentiellen Promotorregionen von Exon 1B und Exon 1E erstellt und die Promotoraktivität ermittelt. Durchgeführt wurden die Experimente mit PGL3-Promotorkonstrukten für das murine und das humane *MLC1* in der murinen Astrozytenzelllinie und der humanen Glioblastomazelllinie U373. Unter den gewählten Bedingungen konnte keine Promotoraktivität nachgewiesen werden. Da eine Expression für Exon 1B und Exon 1E in beiden Zelllinien gezeigt werden konnte, wären in dem untersuchten Bereich regulatorische Elemente zu erwarten gewesen. Tatsächlich ist tendenziell eine höhere Aktivität der murinen und humanen Promotorkonstrukte im Vergleich des murinen pGL3-K2 zu beobachten. pGL3-K2 stellt den Promotorbereich für das potentielle *Mlc1* Exon 1A in *Mus musculus* dar, für das in der murinen Zelllinie keine Expression gezeigt werden konnte. Fraglich ist warum pGL3-Basic, der ebenfalls keine Promotoraktivität besitzen sollte, deutlich mehr Aktivität zeigt als pGL3-K2. Der Vergleich von pGL3-Basic zu pGL3-GR-T, für den Kumsta und Kollegen eine Promotoraktivität nachgewiesen haben (Kumsta et al., 2009), zeigte eine für pGL3-Basic zu erwartende deutlich geringere Grundaktivität. So scheint eine gewisse Grundaktivität des pGL3-Basic normal zu sein. Verschiedene Studien belegten bereits, dass die Grundaktivität eines Promotors durch spezifische Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden kann (Alheim et al., 2003; Tirumurugaan et al., 2008). Die in dieser Arbeit untersuchten Promotorkonstrukte

zeigten keine Stimulierbarkeit im Vergleich zum pGL3-Basic. Auch das Promotorkonstrukt für das murine *Mlc1* Exon 1B (pGL3-mB), für das TRANSFAC Version 10.1 zwei Transkriptionsfaktorbindestellen für NfkappaB voraus gesagt hatte, zeigte keine veränderte Aktivität unter den Stimulationsbedingungen. NfkappaB ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Han und Kollegen wiesen eine durch LPS vermittelte NfkappaB-Aktivierung nach (Han et al., 2002). Demnach wäre für pGL3-mB nach LPS-Stimulation eine Auswirkung auf die Expression des Reportergens zu erwarten gewesen. Des Weiteren sind Interaktionen für NfkappaB und GR beschrieben, die zu einer Expressionsminderung GR-gesteuerter Gene (McKay and Cidlowski, 1998; Ray and Prefontaine, 1994), als auch NfkappaB-gesteuerter Gene führen (Eggert et al., 2001; Nissen and Yamamoto, 2000; Scheinman et al., 1995). Somit ist anzunehmen, dass eine erhöhte Menge an Glucocorticoiden, die zu einer Aktivierung des GR führen, auch einen Einfluß auf NfkappaB gesteuerte Gene haben kann. In Stresssituationen wird die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse (HHNA) aktiviert, was eine erhöhte Ausschüttung des Glucocorticoids Cortisol zur Folge hat. Oftmals werden bei Schizophrenen akute Symptome und Psychosen durch psychosozialen Stress ausgelöst. Das Gehirn schizophrener Personen scheint demnach sensibler auf Stress zu reagieren, als das gesunder Personen. Da durch die Transkriptionsfaktorbindestellensuche mit TRANSFAC Version 10.1 für *MLC1* mehrere NfkappaB-Bindestellen vorausgesagt wurden und es sich demnach bei *MLC1* um ein NfkappaB-gesteuertes Gen handelt, ist ein Effekt der Aktivierung der HHNA, z. B. durch psychosozialen Stress, auf die *MLC1*-Expression nicht auszuschließen. Dies ist von Bedeutung, da für *MLC1* eine Rolle in der Schizophrenie vermutet wird. Dass das Promotorkonstrukt pGL3-mB keine NfkappaB-Sensitivität aufwies, ließ sich durch eine erneute Transkriptionsfaktorbindestellensuche mit der aktuellen TRANSFAC Version 2009.1 erklären. Die Analyse sagte keine NfkappaB-Bindestellen mehr in pGL3-mB voraus (siehe Tabelle 3.1.5). Hiermit kristallisiert sich eine grundlegende Schwierigkeit bei der Verwendung von Datenbanken, wie z. B. TRANSFAC, heraus. So können sich durch kleine Veränderungen in der aktualisierten Datenbankversion, z. B. durch leichte Änderungen in der angegebenen Sequenzidentität für Transkriptionsfaktorbindestellen, die Vorhersagen für diese Transkriptionsfaktorbindestellen ändern.

Für die weitere *in silico* Promotoranalyse wurde sich auf den Sequenzbereich bis 250 bp vor dem jeweiligen potentiellen TSS konzentriert, da sich in dem Bereich für gewöhnlich Kern- und proximaler Promotor befinden (Crawford et al., 1999; Roeder, 1991; Strachan, 2005). Es

konnte keines der gängigen Promotorelemente wie TATA-, CAAT- oder GC-Boxen gefunden werden. Suzuki und Kollegen untersuchten 1031 potentielle Promotorregionen und zeigten, dass genau diese Promotorelemente weit verbreitet sind. GC-Boxen zeigten die höchste Ubiquität und waren bei 97 % aller potentiellen Promotorregionen anzutreffen (Suzuki et al., 2001). Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass *Mlc1* keine CpG-Inseln aufweist, die für ca. 70 % aller gehirnspezifischen Genpromotoren beschrieben sind (Roider et al., 2009). Die vorliegenden Ergebnisse der *in silico*-Analyse decken sich mit den Ergebnissen des Luziferase-Assays. Es konnte weder für das murine *Mlc1* noch für das humane *MLC1* ein Promotor nachgewiesen werden. Daher lässt sich vermuten, dass ein weiter entferntes distales Promotorelement für die Expression von *MLC1* verantwortlich ist. Interessanterweise wird im Zusammenhang mit der megalenzephalen Leukodystrophie mit subkortikalen Zysten (MLC) ein zweiter Genlocus für die Erkrankung diskutiert. Bei MLC handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, bei der Patienten auf beiden Allelen Mutationen im *MLC1* aufweisen. Leegwater und Kollegen zeigten jedoch, dass es auch Patienten gibt, die nur ein oder gar kein defektes Allel aufweisen. Drei der betroffenen Familien bei denen keine Mutation im *MLC1*-Gen nachgewiesen werden konnte, zeigten ebenfalls keine Kopplung zu dem Locus auf Chromosom 22q<sub>tel</sub>, was als starker Hinweis für genetische Heterogenität anzusehen ist (Leegwater et al., 2002; Leegwater et al., 2001). Da in dieser Arbeit eine Expression von *Mlc1* gezeigt werden konnte, aber keinerlei Promotoraktivität nachzuweisen war, ist zu vermuten, dass es sich bei diesem zweiten Genort um einen wichtigen Koaktivator oder ein distales Promotorelement (Enhancer) von *Mlc1* handelt. Diese Vermutung wird durch eine Studie von Boor und Kollegen unterstützt. Boor und Kollegen erstellten aus Lymphozyten von MLC-Patienten Lymphoblasten-Zelllinien und verglichen die *MLC1*-Expression mit Lymphoblasten-Zelllinien von nicht an MLC erkrankter Personen. Sie fanden, dass Patienten die nur eine oder gar keine Mutation im *MLC1*-Gen zeigten, eine deutliche Veränderung in der *MLC1*-Expression aufwiesen, während Patienten mit homozygotem *MLC1*-Defekt eine normale bis leicht erhöhte *MLC1*-Expression zeigten (Boor et al., 2006).

In den letzten Jahren beschäftigten sich verschiedene Studien mit der Interaktion zwischen distalen Promotorelementen (Enhancer) und dem Kernpromotor (Butler and Kadonaga, 2001; Ernst et al., 1996; Ohtsuki et al., 1998). Diese Studien zeigten, dass es verschiedene Typen an Kernpromotoren gibt, und entsprechende distale Enhancerelemente selektiv bestimmte Kernpromotortypen bevorzugen. Untersucht wurden überwiegend Kernpromotoren, die

entweder eine TATA-Box oder ein *downstream promoter element* (DPE) enthielten. Während TATA-Boxen ca. 30 bp stromaufwärts des TSS liegen, befinden sich DPEs ca. 30 bp stromabwärts des TSS (Burke and Kadonaga, 1997; Smale and Baltimore, 1989). Beide Elemente liefern Bindestellen für TFDII, der für die Einleitung des Präinitiationskomplexes essentiell ist. Charakteristischerweise treten TATA-Box und DPE in Kombination mit einem Initiatorelement (Inr) auf. Die Suche nach Inr wurde in der vorliegenden Arbeit vernachlässigt, da die Konsensussequenz des Inr (NNCANN) statistisch gesehen alle 16 bp zu finden ist und aufgrund der fehlenden Kenntnis über den genauen TSS der alternativen ersten *Mlc1*-Exons keine hohe Aussagekraft besitzt. Für TATA-lose Promotoren sind bisher hauptsächlich DPEs als Bindestelle für TFIID beschrieben (Burke et al., 1998; Butler and Kadonaga, 2001). Allerdings zeigen mutmaßlich nur 20 % der TATA-losen Promotoren ein DPE, weswegen weitere Erkennungssequenzen für TFIID vorhanden sein müssen (Burke and Kadonaga, 1997). Auch andere Studien weisen auf eine hohe Variabilität von Kernpromotoren hin (Aso et al., 1994; Azizkhan et al., 1993; Crawford et al., 1999; Roeder, 1991; Smale, 2001). Um den Kernpromotor von *Mlc1* zu identifizieren müssten Folgeexperimente durchgeführt werden, die eine Aussage über TFIID-Bindestellen erlauben. Der Nachweis, welche Sequenz als Bindestelle für TFIID dient, kann mit Hilfe des *DNase I footprintings* geführt werden. Diese Methode macht sich zu Nutze, dass nur der Teil eines DNA-Stangs durch DNase zerschnitten wird, der nicht an das Protein gebunden vorliegt. Es wird dazu ein zu untersuchendes 200 bis 300 bp langes DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert und radioaktiv markiert. Durch eine kurze Inkubationsphase mit DNase wird der Strang einmal an einer zufälligen Stelle geschnitten. Man erhält auf diese Weise ein spezifisches Bandenmuster. Das Bandenmuster unterscheidet sich in Abhängigkeit davon, ob und wo der hinzugefügte Transkriptionsfaktor an die DNA gebunden hat. Es ist sehr wahrscheinlich, dass mit dieser Methode ein Kernpromotor für *Mlc1* nachgewiesen werden kann. Es ist jedoch anzumerken, dass es sich bei TFIID um einen Proteinkomplex handelt, dessen Untereinheit TBP (TATA-Box binding Protein) hauptsächlich für die Bindung an die DNA verantwortlich ist (Aso et al., 1994; Greenblatt, 1991). Zusätzlich wurde gezeigt, dass es sowohl Promotoren mit TATA-Box, als auch ohne TATA-Box gibt, bei denen der TFIID Komplex nur in Anwesenheit von TFIIB, TFIIF und RNA-Polymerase II stabil an die DNA binden kann (Aso et al., 1994). Solche Ergebnisse sollten bei der Durchführung weiterführender Experimente zur Promotorbestimmung von *Mlc1* berücksichtigt werden.

Um eine Aussage über den Promotor von *Mlc1* treffen zu können, ohne die Sequenzen und Positionen der regulatorischen Elemente bzw. des Promotors zu kennen, wurde der direkte Einfluss von Stimulantien auf die *Mlc1*-Expression in einer murinen Astrozytenzelllinie untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Astrozytenzellen mit Forskolin, PMA, Dexamethason oder LPS stimuliert und die Menge an *Mlc1* Exon 1B bestimmt. Da im Zellkern alle nötigen Promotorelemente von *Mlc1* enthalten sind, lässt sich so nachweisen, ob und wie sehr *Mlc1* in Signalwege, die durch die Stimulantien aktiviert werden, eingebunden ist. Die *Mlc1*-Quantifizierung zeigte keine wesentlichen Veränderungen in der Expression unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen. Demzufolge ist die *Mlc1*-Expression unabhängig von der Regulation durch Glukokortikoide, NF-kappaB und der durch PMA und Forskolin aktivierten Transkriptionsfaktoren. Da es sich hierbei um einen zelllinienspezifischen Effekt handeln kann, müsste der Versuch mit anderen *Mlc1*-exprimierenden Zelllinien wiederholt werden. Zudem sind in der Literatur für andere Gene Expressionsänderung durch Stimulantien in Abhängigkeit von deren Konzentration und Inkubationsdauer beschrieben (Han et al., 2002; Slater et al., 1993; Ten Hove, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde sich aus Kosten- und Zeitgründen auf gängige Inkubationszeiten und Konzentrationen beschränkt. Es ist durchaus anzunehmen, dass in Abhängigkeit des untersuchten Gens und der verwendeten Zelllinie andere Konzentrationen und Inkubationszeiten für einen Effekt auf die Expression verantwortlich sind. Um einen Effekt der verwendeten Substanzen auf die *Mlc1*-Expression gänzlich auszuschließen, müssten weitere Versuche mit Konzentrationsreihen und verschiedenen Inkubationszeiten durchgeführt werden. Ein weiterer Ansatz, um Transkriptionsfaktoren zu identifizieren, die mit der *Mlc1*-Expression im Zusammenhang stehen, ist der Vergleich von Expressionsprofilen. Schmitt und Kollegen isolierten mRNA aus Gehirnen von *Mus musculus* während verschiedener Entwicklungsstadien (Tag E14 bis Erwachsenenstadium). Sie fanden einen Expressionsanstieg an *Mlc1* von Tag E14 bis zum Tag P5. Im weiteren Entwicklungsverlauf bis ins Erwachsenenalter war eine annähernd gleiche bis leicht sinkende Expression zu beobachten (Schmitt et al., 2003). Teijido und Kollegen verwendeten einen *Mlc1*-Antikörper, um die Expression im Gehirn von *Mus musculus* zu untersuchen. Sie fanden eine steigende Expression an *Mlc1* von Tag E13 bis P21 (Teijido et al., 2007). Interessant für ein vergleichendes Expressionsprofil ist der Zeitraum von Tag E13 bis P5, da dort die Expressionsunterschiede von *Mlc1* gut quantifizierbar sind. Transkriptionsfaktoren mit einem ähnlichen Expressionsprofil könnten in weiteren Experimenten als potentielle Aktivatoren für die *Mlc1*-Expression untersucht werden.

Genauso bedeutend sind Transkriptionsfaktoren, die ein gegenläufiges Expressionsprofil zeigen, da es sich dabei um potentielle Inhibitoren für die *Mlc1*-Expression handeln könnte.

Neben der Charakterisierung des *Mlc1*-Promotors interessierte die Frage, ob es Unterschiede in der Expression der beiden Exonvarianten gibt. Die Amplifikation von *Mlc1* Exon 1B und Exon 1E auf dem *Gene Amp PCR-System 9700 PE Cyclern* zeigte eine stärkere Expression von Exon 1B. Demnach liegt in den Zellen mehr der Exon 1B-Variante im Vergleich zu der Exon 1E-Variante vor. Dieses stimmt mit den Ergebnissen aus der DBTSS Version 4.0 für das humane MLC1 überein. Dort ist zu sehen, dass die *MLC1* Exon 1B-Variante zwei- bis dreimal häufiger nachgewiesen wurde als die Exon-Variante 1E. Eine vergleichende Quantifizierung der beiden Exonvarianten anhand der Real Time PCR konnte nicht durchgeführt werden, da *Mlc1* Exon 1E aufgrund eines Nebenproduktes (eine Doppelbande bei ca. 400 bp) nicht quantifizierbar war. Hierbei ist anzumerken, dass die Bedingungen zur Amplifikation von Exon 1E bei einer hohen Annealtemperatur (65 °C) und einer geringen Primerkonzentration (0,5 mM) erfolgte. Dieses deutet auf ein spezifisches Nebenprodukt hin. Demnach ist es wahrscheinlich, dass noch weitere Spleißvarianten für *Mlc1* existieren.

Die Mengenbestimmung der *Mlc1* Exon 1B-Expression erfolgte mittels *Real Time PCR* für verschiedene Gehirnregionen. Im Einzelnen wurde die exprimierte Menge an Genprodukt in Amygdala, Hippocampus, Hypothalamus, Cerebellum und Cortex von *Mus musculus* untersucht. Die Quantifizierung zeigte eine ca. doppelt so hohe *Mlc1* Exon 1B-Expression in Hypothalamus, Cerebellum und Cortex im Vergleich zu Hippocampus und Amygdala. Aufgrund der geringen Anzahl an untersuchten Gehirnen wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Die Ergebnisse decken sich nur zum Teil mit der in der Literatur beschriebenen Verteilung von *Mlc1* im Gehirn. Schmitt und Kollegen untersuchten die *Mlc1*-Expression in Cortex, Hippocampus, Thalamus, Striatum, Hirnstamm, *olfactory bulb* und Cerebellum. Sie beschreiben ebenfalls eine etwa doppelt so starke *Mlc1*-Expression im Cerebellum im Vergleich zum Hippocampus. Jedoch wird für die *Mlc1*-Expression im Cortex ein ähnlich niedriger Wert wie im Hippocampus beschrieben (Schmitt et al., 2003). Schmitt und Kollegen verwendeten zum Nachweis der *Mlc1*-Expression Primer, die in Exon 10 und Exon 11 lokalisiert sind. Damit enthält die bestimmte Menge an *Mlc1*-Transkript beide Exon 1-Varianten von *Mlc1*. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nur die Menge an *Mlc1* Exon 1B Transkript bestimmt. Da es sich bei Exon 1B um das Haupttranskript handelt, wäre dennoch eine ähnliche Verteilung wie bei der *Mlc1*-Gesamttranskriptmenge zu erwarten

gewesen. Teijido und Mitarbeiter beschreiben für das murine Gehirn im postnatalen Stadium ein ähnliches Ergebnis wie Schmitt und Kollegen. Sie untersuchten vielzählige Gehirnregionen und Unterregionen und beschreiben für Strukturen des Cortex, der hippocampalen Formation und des Amygdaloiden Komplexes eine moderate *Mlc1*-Expression. Für Hypothalamus ist eine hohe und für Cerebellum eine hohe bis sehr hohe Expression beschrieben. Teijido und Kollegen beschreiben jedoch auch einen deutlichen Anstieg der *Mlc1*-Expression im Cortex vom postnatalen ins adulte Stadium. Eine differenzierte *Mlc1*-Expressionsanalyse, die Teijido und Kollegen für das embryonale, sowie das postnatale Entwicklungsstadium durchgeführt hatten, wurde für das Erwachsenenalter nicht durchgeführt. Der Hinweis auf eine maximale *Mlc1*-Expression im Cortex erfolgte mittels Western Blot-Analyse. Dieser Befund unterstützt die in der vorliegenden Arbeit gefundene „hohe“ *Mlc1*-Expression im Cortex von *Mus musculus*.

Neben *MLC1* als Kandidatengen für die Periodische Katatonie führte die Kopplungsstudie von Stöber und Kollegen zu einer Reihe weiterer potentieller Kandidatengene auf Chromosom 15q (Stöber et al., 2001; Stöber et al., 2000). Ekarwardhani konnte nachweisen, dass acht der zwölf untersuchten Familien mit Periodischer Katatonie eine gemeinsame Kopplung auf Chromosom 15q14-15.1 zeigten. Der ca. 4,3 Megabasen große Bereich konnte zwischen den Markern D15S1042 und D15S968 eingrenzt werden (Ekawardhani, 2009). In diesem Bereich befinden sich 15 putative und zwölf bekannte Gene. *Phospholipase C, beta 2 (PLCB2)*, *Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4 (EIFK2AK4)* und *Sprouty-related, EVH1 domain containing 1 (SPRED 1)* konnten bereits als Kandidatengene für die Periodische Katatonie ausgeschlossen werden (McKeane et al., 2005; Stober et al., 2005). In dieser Arbeit sollte nun *BUB1B*, ein weiteres Gen aus der Kandidatenregion, auf Mutationen hin untersucht werden, um es als mögliche Ursache für die Periodische Katatonie zu überprüfen. Bei *BUB1B* handelt es sich um eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die eine wichtige Kontrollfunktion während der Mitose besitzt. *BUB1B* ist an den Kinetochoren der Chromosomen lokalisiert. Dort verhindert es in Abhängigkeit seiner Kinaseaktivität die Bildung des mitoseeinleitenden Anaphase-Promoting Komplexes (APC), bis alle Kinetochoren der Chromosomen Mikrotubuli des Spindelappaates gebunden haben (Lampson and Kapoor, 2005). Dadurch wird eine ordnungsgemäße Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen gewährleistet. Mutationen in *BUB1B* sind mit dem *Mosaic Variegated Aneuploidy* Syndrom (MVA) assoziiert und führen zu einem hohen Krebsrisiko (Hanks et al.,



2004). Da Mutationen in *BUB1B* bisher hauptsächlich im Zusammenhang mit verschiedenen Krebserkrankungen beschrieben sind, ist eine Ursache für die Periodische Katatonie unwahrscheinlich. Doch da auch für andere mitosebeeinflussende Gene, wie z. B. *Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1)*, ein Zusammenhang mit Schizophrenie gezeigt werden konnte (Kamiya et al., 2005; Millar et al., 2000), ist ein möglicher Effekt von *BUB1B* nicht völlig auszuschließen. Zur Überprüfung, ob Mutationen vorliegen, die mit der Periodischen Katatonie in Zusammenhang gebracht werden können, wurden alle 23 Exons samt flankierender Intronbereiche von drei betroffenen Familienmitgliedern sequenziert. Die Sequenzierung schloss weiterhin einen Großteil des von Myslinski und Kollegen identifizierten minimalen Promotors von *BUB1B* ein. Es konnte keine Mutation in *BUB1B* nachgewiesen werden. In Anbetracht, dass keine Mutation im *BUB1B*-Gen nachgewiesen werden konnte und dass Mutationen in *BUB1B* im Zusammenhang mit einer anderen Erkrankung - dem MVA-Syndrom - beschrieben werden, kann *BUB1B* als Kandidatengen für die Periodische Katatonie ausgeschlossen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde auch eine Assoziationsstudie mit Kandidatengen für die Schizophrenie durchgeführt. Die Probanden sind Teil einer Studie von Gruber und Kollegen, in der schizophrene, bipolar gestörte oder zwangsgestörte Patienten auf verschiedene parametrische Daten wie Gehirn- und hippocampales Volumen, Lern- und Erinnerungsvermögen, sowie die Konzentration verschiedener Metabolite im Gehirn untersucht wurden. Ziel war es zu erfahren, ob bestimmte Allelvarianten von Kandidatengen mit den parametrischen Daten assoziieren (Gruber et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurden schizophrene Patienten und gesunde Kontrollprobanden bezüglich bestimmter Allelvarianten von *CHRNA7*, *DAOA* und *BRD1* verglichen.

Das *CHRNA7*-Gen ist auf Chromosom 15q13.3 lokalisiert und befindet sich innerhalb des 15q13-14-Lokus, für den in einigen Studien eine Kopplung zu Schizophrenie gezeigt werden konnte (Freedman et al., 1997; Leonard and Freedman, 2006; Stassen et al., 2000). Freedman und Kollegen beschrieben 1997 eine Kopplung zwischen dem *sensory gating deficit* (SGD) und einem Dinukleotidpolymorphismus im Intron des *CHRNA7*-Gens (LOD-score = 5,3;  $p = 0,00$ ). SGD ist unter Schizophrenieerkrankten weit verbreitet, während es bei Nicht-Schizophrenen eher selten vorkommt. Des Weiteren konnten Freedman und Kollegen auch eine schwache Kopplung zwischen *CHRNA7* und Schizophrenie (LOD-score = 1,33;  $p = 0,07$ ) zeigen (Freedman et al., 1997). Auch die Beobachtung, dass unter Schizophrenen viele

starke Raucher vorkommen, erhärtet die Vermutung, dass *CHRNA7* an der Ätiogenese der Schizophrenie beteiligt ist. Dabei wird das Rauchen als eine Art Selbstmedikation betrachtet (Adler et al., 1998). Zudem wurde eine Assoziation von Allelvarianten des *CHRNA7*-Promotors mit Schizophrenie beschrieben (Houy et al., 2004; Leonard et al., 2002). In dieser Arbeit wurden für *CHRNA7* zwei im Intron lokalisierte SNPs (rs965435 und rs2651417) und ein im Exon lokalisierter SNP (rs12899798) analysiert. Bei rs12899798 handelt es sich um einen funktionellen T/G-Polymorphismus, dessen T-Variante im Protein zu einem Tryptophan-Einbau und dessen G-Variante zu einem Glycin-Einbau führt. Durch den Unterschied in der AS-Sequenz ist eine leicht veränderte Konformation des Proteins denkbar, die Auswirkung auf dessen Aktivität besitzen kann. Es war deswegen interessant zu sehen, ob hier eine Assoziation zwischen einer Allelvariante und der Schizophrenie vorlag. Informationen über die Allelverteilung des rs12899798 in der Normalbevölkerung lagen zu Beginn der Studie nicht vor. Die Genotypisierung zeigte, dass alle 127 Probanden homozygot für das T-Allel waren. Aufgrund dieses Ergebnisses ist es fraglich, ob es sich bei rs12899798 tatsächlich um einen Polymorphismus handelt. Mittlerweile ist auch in den Datenbanken eine Allelverteilung von 100 % zu Gunsten des T-Allels dokumentiert. Die Genotypisierung zu den beiden intronischen SNPs rs965435 und rs2651417 ergab eine ähnliche Allelverteilung in der Schizophrenie- und der Kontrollgruppe. Somit konnte keine Assoziation zwischen den untersuchten Polymorphismen des *CHRNA7*-Gens und dem Auftreten der Schizophrenie gezeigt werden.

Ein weiteres Kandidatengen, *D-amino acid oxidase activator (DAOA)*, ist auf Chromosom 13q33.2 lokalisiert. DAOA ist am Abbau von D-Serin beteiligt. D-Serin ist eine AS, die als Aktivator der NMDA-Glutamat-Rezeptoren wirkt, und damit an der Reizweiterleitung über Nervenzellen beteiligt ist. Hinweise auf eine Auswirkung von DAOA auf die Entstehung schizophrener Symptome entstammen aus Studien von Krystal und Kollegen. Sie konnten zeigen, dass NMDA-Glutamat-Rezeptoren eine Rolle in der Entwicklung von Symptomen der Schizophrenie spielen (Itil et al., 1967; Krystal et al., 1994; Luby et al., 1959). So wird beschrieben, dass NMDA-Glutamat-Rezeptor-Antagonisten wie z. B. PCP Halluzinationen, katatone Störungen, Denkstörungen und kognitive Beeinträchtigung hervorrufen. Des Weiteren wurde bei Schizophrenen eine veränderte Anzahl an Untereinheiten des NMDA-Glutamat-Rezeptors im Hippokampus und Cortex beschrieben (Akbarian et al., 1996; Gao et al., 2000). Ein weiterer Hinweis für *DAOA* als Kandidatengen für die Schizophrenie wurde durch verschiedene Assoziationsstudien belegt (Addington et al., 2004; Bass et al., 2009;

Mossner et al., 2009; Schumacher et al., 2004; Shi et al., 2009; Shi et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde ein SNP (rs1935058) stromaufwärts und zwei SNPs (rs9558562 und rs778294) im *DAOA*-Gen untersucht. Für keinen der untersuchten SNPs konnte eine Assoziation zu Schizophrenie gezeigt werden. Bei rs9558562 handelt es sich um einen funktionellen A/G-Polymorphismus, dessen A-Variante zu einem Einbau von Lysin und dessen G-Variante zu einem Einbau von Glutaminsäure führt. Zu Beginn der Studie war für diesen Polymorphismus in der Datenbank eine Allelverteilung von 4 % G-Allel zu 96 % A-Allel beschrieben. Aktuell liegt in der Datenbank die Angabe einer Allelverteilung von 100 % zu Gunsten des A-Allels vor. Dies stimmt mit dem Ergebnis der in dieser Arbeit durchgeführten Genotypisierung überein, in der alle untersuchten Probanden homozygot für das A-Allel waren. Bei rs778294 handelte es sich zu Beginn der Studie um einen intronischen C/T-Polymorphismus. Nach der aktuellen Datenbankversion ist dieser Polymorphismus im Exon lokalisiert. Er führt zu keinem AS-Austausch und ist damit wahrscheinlich nicht funktionell.

Als weiteres Gen wurde *BRD1* für die Assoziationsstudie herangezogen. *BRD1* ist an der Chromatinregulation, und damit wahrscheinlich auch unmittelbar an der Regulation verschiedener Gene, beteiligt. Mehrere Studien zeigten eine Kopplung zwischen dem Chromosomenabschnitt 22q12-13, in dem auch *BRD1* lokalisiert ist, und psychischen Störungen wie z. B. Schizophrenie, Periodische Katatonie und Bipolarer Störung (Coon et al., 1994; Mowry et al., 2004; Stöber et al., 2000; Takahashi et al., 2005). Severinsen und Kollegen führten eine Assoziationsstudie mit Genen des gekoppelten Chromosomenabschnitts auf Chr. 22q12-13 durch und fanden zwei Polymorphismen innerhalb des *BRD1*-Genbereichs, die eine Assoziation zu Schizophrenie zeigten. Bei den beiden Polymorphismen handelte es sich um den im Promotorbereich lokalisierten SNP rs138880, und den im 3'UTR lokalisiertem SNP rs4468 (Severinsen et al., 2006). Diese beiden Polymorphismen wurden in dieser Arbeit ebenfalls untersucht, um zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse von Severinsen und Kollegen mit der vorliegenden Schizophreniestichprobe replizieren ließen. Während für rs4468 keine Assoziation zu Schizophrenie gezeigt werden konnte, ließ sich die Assoziation zu rs138880 bestätigen. Genau wie Severinsen und Kollegen konnte hier das C-Allel als Risiko-Allel für die Schizophrenie identifiziert werden. Die C-Allelvariante führt zu einer potentiellen Transkriptionsfaktorbindestelle für *hairy and enhancer of split homolog 1* (HES-1), einem neuronalen Transkriptionsfaktor der als Repressor für die Ausdifferenzierung von Nervenzellen im Hippocampus dient (Castella et al., 1999; Ishibashi, 2004; Severinsen et

al., 2006). Es ist vorstellbar, dass durch die C-Allelvariante eine verringerte *BRDI*-Expression vorliegt, die zu einer verringerten oder verlangsamten Ausdifferenzierung der Nervenzellen führt. Dass eine Verringerung im neuronalen Wachstum mit Schizophrenie und anderen psychischen Störungen in Verbindung gebracht wird, zeigen Studien zu gehirnanatomischen Untersuchungen (Corey-Bloom et al., 1995; Kamiya et al., 2005; Miyata et al., 2009).

Trotz der plausiblen Erklärungen, wie *CHRNA7*, *DAOA* und *BRDI* zur Entstehung der Schizophrenie beitragen können und der von anderen Arbeitsgruppen gefundenen Assoziationen zwischen den Genen und Schizophrenie, konnte in dieser Studie nur ein einziger Polymorphismus mit der Erkrankung assoziiert werden. Dabei ist anzumerken, dass der untersuchte SNP rs12899798 in *CHRNA7* und rs9558562 in *DAOA* keine Verteilung zeigten, und damit möglicherweise nicht als echte Polymorphismus anzusehen sind. Das Ergebnis von Severinsen und Kollegen, die eine signifikante Assoziation der G-Allelvariante des rs4468 mit Schizophrenie zeigten, war in dieser Arbeit nicht replizierbar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Effektstärke. Je größer die untersuchte Stichprobe ist, desto schneller werden auch kleinere Effekte signifikant. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass in der kleineren Stichprobengröße, die hier untersucht wurde, der Unterschied in der Allelverteilung größer sein muss, um einen signifikanten Effekt zu erhalten. Die Aussagekraft der durchgeführten Assoziationsstudie ist sehr gering, da aus einer fehlenden Assoziation weniger Polymorphismen eines Gens nicht darauf geschlossen werden kann, dass dieses Gen keinen Einfluss auf die Pathogenese der Schizophrenie hat oder haben könnte. Polymorphismen, die eine Assoziation zu einer Erkrankung zeigen, können funktionell sein. Dies wird durch verschiedene Assoziationsstudien belegt, in denen gefundene Polymorphismen, die mit einer Erkrankung assoziieren, auch zu einer veränderten Genexpression führen (Moffatt et al., 2007), auch wenn diese zum Teil weit von den betreffenden Genen entfernt liegen (Libioulle et al., 2007). Andererseits sind auch Assoziationen von nicht-funktionellen SNPs mit einer Erkrankung denkbar, die in einem hohen *linkage disequilibrium* zu einem funktionellen SNP stehen.

Das Argument für die Durchführung von Assoziationsstudien basiert für gewöhnlich auf der *Common Disease - Common Allele*-Hypothese (CDCA) (Pearson and Manolio, 2008). Diese geht davon aus, dass jede Allelvariante für sich allein gesehen nur einen geringen Effekt zeigt und sich erst in Kombination mit anderen Varianten und zusammen mit Umwelteinflüssen auf die Entstehung der Erkrankung auswirkt. Demnach führt die ungünstige Kombination

gewöhnlicher Allele zum Auftreten komplex vererbter Erkrankungen (Doris, 2002). Die CDCA versucht so zu begründen, warum Erkrankungen, wie z. B. die Schizophrenie, in Kopplungs- und Assoziationsstudien oftmals nur eine schwache Assoziation zu verschiedenen Kandidatengen aufweist (McClellan et al., 2007). Ein anderer Erklärungsansatz für die Entstehung komplexer Erkrankungen ist die *Common Disease - Rare Allele*-Hypothese (CDRA). Die CDRA geht von seltenen Varianten oder Mutationen aus, die für die Entstehung komplexer Erkrankungen von Bedeutung sind. Es gibt derzeit sehr viele Hinweise die bei psychischen und neurologischen Störungen für die CDRA-Hypothese sprechen. So wurde im Zusammenhang mit Schizophrenie das Auftreten verschiedener Chromosomenaberrationen beobachtet. Eine der bekanntesten Chromosomenaberrationen im Zusammenhang mit Schizophrenie ist die Translokation von Chromosom 1 und Chromosom 11 (1;11)(q42.1;q14.3). Diese Translokation wurde in einer schottischen Großfamilie beschrieben, die ein breites Spektrum an psychotischen und affektiven Störungen, wie Schizophrenie, Bipolare Störung und Depression aufwies (Blackwood et al., 2001). Die beiden betroffenen Gene auf Chromosom 1, *Gene Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1)* und *Disrupted in Schizophrenia 2 (DISC2)*, sind durch die Translokation unterbrochen. DISC1 ist Bestandteil des Mikrotubuli-assoziierten Dynein-Motor-Komplexes und spielt eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung des Zentrosoms. Ein nicht funktionierendes DISC1 führt zu einem veränderten Zellwachstum und wird mit einer gestörten Entwicklung des cerebralen Cortex in Verbindung gebracht (Kamiya et al., 2005). Bei DISC2 handelt es sich um ein nicht-proteinkodierendes Gen. Es wird angenommen, dass es über einen antisense-RNA-Mechanismus die DISC1-Expression reguliert (Millar et al., 2000). Weitere unabhängige Kopplungsstudien konnten den DISC-Lokus in Verbindungen mit psychiatrischen Störungen, wie Schizophrenie, schizoaffektive Störungen, Bipolare Störung und Major-Depression, bestätigen (Ekelund et al., 2001; Hovatta et al., 1999). Weitere Beispiele für die CDRA-Hypothese sind Mutationen und seltene Allelvarianten im Gen für den Kaliumchlorid-Co-Transporter3 (*Solute carrier family 12 member 6; SLC12A6*). In diesem Gen auf Chromosom 15q13 wurde eine Mutationen beschrieben, die zur Entstehung des Andermann-Syndroms führt. Dies ist eine neurologischen Störung, die oft mit Fehlen des *Corpus callosums* einhergeht (Howard et al., 2002). Ferner fanden Meyer und Kollegen seltene Allelvarianten im Promotorbereich des *SLC12A6*, die mit dem Auftreten der Bipolaren Störung assoziiert waren (Meyer et al., 2005).

Dass es mehr Hinweise für die CDRA-Hypothese gibt, könnte vor allem daran liegen, dass es einfacher ist Mutationen oder seltenere Allelvarianten in Bezug zu einer Erkrankung zu setzen, als „die“ Kombination von gewöhnlichen Allelvarianten zu finden, die verantwortlich für eine bestimmte Erkrankung ist. In den letzten Jahren ist die Technik weit genug fortgeschritten, um sich durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) einen Überblick über die Bedeutung der Kombination von gewöhnlichen Allelvarianten zu verschaffen. So ist es z. B. möglich, mittels des neuen Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Array 6.0 bis zu 1,8 Millionen genetische Marker zu untersuchen, die mehr als 906.600 SNPs und mehr als 946.000 *copy number variations* (CNV) detektieren. Die Nachteile von GWAS sind die entstehende Datenmenge, die ausgewertet werden muss und die noch recht hohen Kosten. Zudem wird eine hohe Rate an falsch-positiven Assoziationen beschrieben (Pearson and Manolio, 2008). Dennoch konnten mit dieser Methode bereits „Risiko-Haplotypen“ für z. B. die Entstehung von *Morbus Alzheimer* und des Glaukoms identifiziert werden (Reiman et al., 2007; Thorleifsson et al., 2007). Durch das *Welcome Trust Case Control Consortium* (WTCCC) wurde 2007 gezeigt, dass mit Hilfe von GWAS potentielle Kandidatenloki komplexer Erkrankungen identifiziert werden können. Das Consortium untersuchte über eine halbe Millionen SNPs bei je 2000 Betroffenen für gängige Erkrankungen (Bipolare Störung, Morbus Crohn, Diabetes Typ1 und Typ2, koronare Arterienerkrankung, rheumatoide Arthritis, Hypertonie) und 3000 Kontrollen. Sie konnten eine Assoziation zwischen verschiedener SNPs und den untersuchten Erkrankungen nachweisen (WTCCC, 2007).

Neben den SNPs, die etwa 0,1 % des Genoms ausmachen (Lander et al., 2001), sind auch CNVs für die Variation des Genoms verantwortlich. Redon und Kollegen zeigten, dass CNVs ca. 12 % des Genoms ausmachen und unter anderem in Genen, funktionellen Einheiten und bekannten Krankheitsloci zu finden sind (Redon et al., 2006). Da sich die Studie von Redon und Kollegen nur auf CNVs ab einer Größe von 1 kb bezieht, schätzen weitere Forscher, wie Estivill und Armengol, aufgrund vieler noch nicht nachgewiesener, kleinerer CNVs, den CNV-Anteil im Genom auf etwa 30 % (Estivill and Armengol, 2007). CNVs wurden im Zusammenhang mit veränderter Genexpression, phänotypischer Variation, komplexen Krankheitsmerkmalen sowie auch im Zusammenhang mit mentaler Retardierung, Bipolarer Störung oder Autismus beschrieben (Inoue and Lupski, 2002; Lachman et al., 2007; Lupski and Stankiewicz, 2005; Sebat et al., 2007; Shaw-Smith et al., 2004). Klassische Beispiele für CNVs bedingte Erkrankungen sind z. B. das Prader-Willi-Syndrom und das Williams-Beuren-Syndrom (Bartholdi, 2008). Bruder und Kollegen zeigten, dass CNVs zu einer höheren

interindividuellen Varianz führen, und beschreiben sogar für eineiige Zwillinge Unterschiede in den CNVs (Bruder et al., 2008). Dies könnte die breite Spanne der publizierten Konkordanzraten von 48 % bis 80 % bei eineiigen Zwillingen mit Schizophrenie erklären. Aufgrund des hohen Anteils der CNVs im Genom und bereits zahlreicher Publikationen über krankheitsrelevanter CNVs, ist anzunehmen, dass diese eine nicht zu unterschätzende Rolle bei der Entstehung von neurologischen sowie psychischen Erkrankungen einnehmen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Entstehung komplexer Erkrankungen ist der Schnittpunkt zwischen Gen und Umwelt. Da die gesamten Gensequenzen in der Zelle bereits festgelegt sind, kann die Gen-Umwelt-Interaktion nur über die Regulation der jeweiligen Gene und Genprodukte ablaufen. Eine der Regulationsmechanismen auf DNA-Ebene ist die Methylierung von Cytosinen. Es konnte gezeigt werden, dass DNA-Methylierungsmuster im Hippocampus durch Umwelteinflüsse veränderbar sind. Miller und Kollegen wiesen nach, dass DNA-Methylierung und -Demethylierung im Hippocampus an der Gedächtnisbildung beteiligt sind (Miller et al., 2008; Miller and Sweatt, 2007). Mill und Kollegen untersuchten das Methylierungsmuster in Zellen aus humanem Cortexgewebe und Keimbahnzellen bei Schizophrenen, Depressiven und Kontrollen. Sie fanden eine Assoziation zwischen den Erkrankungen und einem veränderten DNA-Methylierungsmuster in untersuchten Promotorbereichen von Kandidatengenen und Genbereichen, die eine Rolle in glutaminergen und GABAergen Stoffwechsel spielen (Mill et al., 2005). Auch indirekte Faktoren, wie z. B. Histondemethylierung/-deacetylierung wirken sich auf die Genexpression aus. Diese Wirkungen machen sich nicht-selektive Monoaminoxidase-Inhibitoren wie Tranylcypromin oder das Antipsychotikum Haloperidol zu nutze, die bei Depressionen oder Schizophrenie eingesetzt werden (Karagiannis et al., 2006; Lee et al., 2006). In der Literatur sind viele weitere Belege für einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Genexpression und dem Auftreten psychischer Erkrankungen, wie z. B. Schizophrenie, zu finden (Bruneau et al., 2005; Eastwood and Harrison, 2005; Gupta et al., 2005; Miyaoka et al., 1999; Smith et al., 2001). Zusammenfassend lässt sich für die Erforschung psychiatrischer Erkrankungen im Allgemeinen und der Schizophrenie im Speziellen festhalten, dass das Hauptaugenmerk auf die Erforschung der Regulationsmechanismen gelegt werden sollte, um einen besseren Überblick über Gen-Gen und Gen-Umwelt-Interaktionen zu erhalten.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit der Identifizierung und Charakterisierung der regulatorischen Region für das *MLC1*-Gen. Defekte im *MLC1*-Gen führen zur megalencephalen Leukoencephalopathie mit subkortikalen Zysten. Einer seltenen, autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung, die mit motorischen Störungen und im späteren Verlauf mit kognitiver Degeneration einhergeht. *MLC1* wird zudem als Kandidatengen für die Periodische Katatonie, einer Unterform der Schizophrenie, diskutiert. Charakteristika der Periodischen Katatonie sind psychomotorische Störungen, die mit ängstlichem, aggressivem oder impulsivem Verhalten und in manchen Fällen mit psychotischen Phasen einhergehen. In dieser Arbeit wurde sich hauptsächlich auf das murine *Mlc1*-Gen fokussiert. Es konnten hierfür in einer Astrozytenzelllinie und im Gehirngewebe die Expression von zwei Transkriptvarianten für *MLC1* nachgewiesen werden. Die *in silico* Promotor-Analyse für das murine und das humane *MLC1* zeigten, dass keine typischen Promotorelemente vorhanden sind. Der durchgeführte Reporter-gen-Assay mit potentiellen Promotor-Luziferasekonstrukten ergab ebenfalls keinen Hinweis auf eine Promotoraktivität. Stimulationen der Astrozytenzellen mit Dexamethason, LPS, PMA und Forskolin führten zu keiner veränderten *MLC1*-Expression. Den Ergebnissen nach handelt es sich um eine recht ungewöhnliche Promotorstruktur. Daraus folgt, dass für die *Mlc1*-Expression ein distales Promotorelement verantwortlich sein könnte, welches bisher noch nicht identifiziert wurde. Unterstützt wird die Annahme durch Ergebnisse aus der MLC-Forschung, die neben Mutationen im *MLC1*-Gen Hinweise für einen zweiten mitverantwortlichen Genloкус geben.

Des Weiteren wurde *BUB1B*, ein Gen aus der von Ekawardhani und Kollegen eingegrenzten Kandidatenregion für die Periodische Katatonie auf Chromosom 15q14-15, auf Mutationen hin untersucht. Keiner der untersuchten Probanden mit Periodischer Katatonie zeigte Mutationen in exonischen Bereichen oder flankierenden Spleißdonor/Akzeptorstellen. Demnach wurde *BUB1B* als verantwortliches Gen für die Periodische Katatonie für die untersuchten Familien ausgeschlossen.

Ein dritter Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung von Kandidatengenen auf eine Assoziation zu Schizophrenie. Dazu wurden Allelvarianten ausgewählter SNPs aus dem *DAOA*-, *BRD1*-, und *CHRNA7*-Gen in einer Schizophreniestichprobe und einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Es konnte lediglich die Assoziation zwischen der C-Allelvariante



des rs138880 im 3'UTR des *BRDI*-Gens und der Schizophrenie bestätigt werden, die bereits 2006 von Severinsen und Kollegen gezeigt wurde.

## 6 Literatur

- Addington, AM, Gornick, M, Sporn, AL, Gogtay, N, Greenstein, D, Lenane, M, Gochman, P, Baker, N, Balkissoon, R, Vakkalanka, RK, Weinberger, DR, Straub, RE, Rapoport, JL (2004) Polymorphisms in the 13q33.2 gene G72/G30 are associated with childhood-onset schizophrenia and psychosis not otherwise specified. *Biol Psychiatry*, 55(10): 976-980.
- Adler, LE, Hoffer, LD, Wiser, A, Freedman, R (1993) Normalization of auditory physiology by cigarette smoking in schizophrenic patients. *Am J Psychiatry*, 150(12): 1856-1861.
- Adler, LE, Olincy, A, Waldo, M, Harris, JG, Griffith, J, Stevens, K, Flach, K, Nagamoto, H, Bickford, P, Leonard, S, Freedman, R (1998) Schizophrenia, sensory gating, and nicotinic receptors. *Schizophr Bull*, 24(2): 189-202.
- Adler, LE, Pachtman, E, Franks, RD, Peceovich, M, Waldo, MC, Freedman, R (1982) Neurophysiological evidence for a defect in neuronal mechanisms involved in sensory gating in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 17(6): 639-654.
- Akbarian, S, Sucher, NJ, Bradley, D, Tafazzoli, A, Trinh, D, Hetrick, WP, Potkin, SG, Sandman, CA, Bunney, WE, Jr., Jones, EG (1996) Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *J Neurosci*, 16(1): 19-30.
- Alheim, K, Corness, J, Samuelsson, MK, Bladh, LG, Murata, T, Nilsson, T, Okret, S (2003) Identification of a functional glucocorticoid response element in the promoter of the cyclin-dependent kinase inhibitor p57Kip2. *J Mol Endocrinol*, 30(3): 359-368.
- Ambrosini, E, Serafini, B, Lanciotti, A, Tosini, F, Scialpi, F, Psaila, R, Raggi, C, Di Girolamo, F, Petrucci, TC, Aloisi, F (2008) Biochemical characterization of MLC1 protein in astrocytes and its association with the dystrophin-glycoprotein complex. *Mol Cell Neurosci*, 37(3): 480-493.
- Andreasen, NC, O'Leary, DS, Cizadlo, T, Arndt, S, Rezai, K, Ponto, LL, Watkins, GL, Hichwa, RD (1996) Schizophrenia and cognitive dysmetria: a positron-emission tomography study of dysfunctional prefrontal-thalamic-cerebellar circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(18): 9985-9990.
- Arinami, T, Ohtsuki, T, Ishiguro, H, Ujike, H, Tanaka, Y, Morita, Y, Mineta, M, Takeichi, M, Yamada, S, Imamura, A, Ohara, K, Shibuya, H, Suzuki, Y, Muratake, T, Kaneko, N, Someya, T, Inada, T, Yoshikawa, T, Toyota, T, Yamada, K, Kojima, T, Takahashi, S, Osamu, O, Shinkai, T, Nakamura, M, Fukuzako, H, Hashiguchi, T, Niwa, SI, Ueno, T, Tachikawa, H, Hori, T, Asada, T, Nanko, S, Kunugi, H, Hashimoto, R, Ozaki, N, Iwata, N, Harano, M, Arai, H, Ohnuma, T, Kusumi, I, Koyama, T, Yoneda, H, Fukumaki, Y, Shibata, H, Kaneko, S, Higuchi, H, Yasui-Furukori, N, Numachi, Y, Itokawa, M, Okazaki, Y (2005) Genomewide high-density SNP linkage analysis of 236 Japanese families supports the existence of schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 1p, 14q, and 20p. *Am J Hum Genet*, 77(6): 937-944.
- Aso, T, Conaway, JW, Conaway, RC (1994) Role of core promoter structure in assembly of the RNA polymerase II preinitiation complex. A common pathway for formation of preinitiation intermediates at many TATA and TATA-less promoters. *J Biol Chem*, 269(42): 26575-26583.
- Azizkhan, JC, Jensen, DE, Pierce, AJ, Wade, M (1993) Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 3(4): 229-254.

- Barber, RD, Harmer, DW, Coleman, RA, Clark, BJ (2005) GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*, 21(3): 389-395.
- Bass, NJ, Datta, SR, McQuillin, A, Puri, V, Choudhury, K, Thirumalai, S, Lawrence, J, Quested, D, Pimm, J, Curtis, D, Gurling, HM (2009) Evidence for the association of the DAOA (G72) gene with schizophrenia and bipolar disorder but not for the association of the DAO gene with schizophrenia. *Behav Brain Funct*, 5: 28.
- Berger, SL (2002) Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev*, 12(2): 142-148.
- Blackwood, DH, Fordyce, A, Walker, MT, St Clair, DM, Porteous, DJ, Muir, WJ (2001) Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am J Hum Genet*, 69(2): 428-433.
- Boor, PK, de Groot, K, Mejaski-Bosnjak, V, Brenner, C, van der Knaap, MS, Scheper, GC, Pronk, JC (2006) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts: an update and extended mutation analysis of MLC1. *Hum Mutat*, 27(6): 505-512.
- Boor, PK, de Groot, K, Waisfisz, Q, Kamphorst, W, Oudejans, CB, Powers, JM, Pronk, JC, Scheper, GC, van der Knaap, MS (2005) MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(5): 412-419.
- Bowers, MB, Jr., Bannon, MJ, Hoffman, FJ, Jr. (1987) Activation of forebrain dopamine systems by phencyclidine and footshock stress: evidence for distinct mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)*, 93(1): 133-135.
- Brockmann, K, Finsterbusch, J, Terwey, B, Frahm, J, Hanefeld, F (2003) Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts in an adult: quantitative proton MR spectroscopy and diffusion tensor MRI. *Neuroradiology*, 45(3): 137-142.
- Bruder, CE, Piotrowski, A, Gijsbers, AA, Andersson, R, Erickson, S, de Stahl, TD, Menzel, U, Sandgren, J, von Tell, D, Poplawski, A, Crowley, M, Crasto, C, Partridge, EC, Tiwari, H, Allison, DB, Komorowski, J, van Ommen, GJ, Boomsma, DI, Pedersen, NL, den Dunnen, JT, Wirdefeldt, K, Dumanski, JP (2008) Phenotypically concordant and discordant monozygotic twins display different DNA copy-number-variation profiles. *Am J Hum Genet*, 82(3): 763-771.
- Bruneau, EG, McCullumsmith, RE, Haroutunian, V, Davis, KL, Meador-Woodruff, JH (2005) Increased expression of glutaminase and glutamine synthetase mRNA in the thalamus in schizophrenia. *Schizophr Res*, 75(1): 27-34.
- Burke, TW, Kadonaga, JT (1997) The downstream core promoter element, DPE, is conserved from Drosophila to humans and is recognized by TAFII60 of Drosophila. *Genes Dev*, 11(22): 3020-3031.
- Burke, TW, Willy, PJ, Kutach, AK, Butler, JE, Kadonaga, JT (1998) The DPE, a conserved downstream core promoter element that is functionally analogous to the TATA box. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 63: 75-82.
- Butler, JE, Kadonaga, JT (2001) Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs. *Genes Dev*, 15(19): 2515-2519.
- Castella, P, Wagner, JA, Caudy, M (1999) Regulation of hippocampal neuronal differentiation by the basic helix-loop-helix transcription factors HES-1 and MASH-1. *J Neurosci Res*, 56(3): 229-240.
- Chen, J, Randeva, HS Genomic organization and regulation of the human orexin (hypocretin) receptor 2 gene: identification of alternative promoters. *Biochem J*.
- Chumakov, I, Blumenfeld, M, Guerassimenko, O, Cavarec, L, Palicio, M, Abderrahim, H, Bougueleret, L, Barry, C, Tanaka, H, La Rosa, P, Puech, A, Tahri, N, Cohen-Akenine, A, Delabrosse, S, Lissarrague, S, Picard, FP, Maurice, K, Essioux, L, Millasseau, P, Grel, P, Debailleul, V, Simon, AM, Caterina, D, Dufaure, I, Malekzadeh, K, Belova,

- M, Luan, JJ, Bouillot, M, Sambucy, JL, Primas, G, Saumier, M, Boubkiri, N, Martin-Saumier, S, Nasroune, M, Peixoto, H, Delaye, A, Pinchot, V, Bastucci, M, Guillou, S, Chevillon, M, Sainz-Fuertes, R, Meguenni, S, Aurich-Costa, J, Cherif, D, Gimalac, A, Van Duijn, C, Gauvreau, D, Ouellette, G, Fortier, I, Raelson, J, Sherbatich, T, Riazanskaia, N, Rogaev, E, Raeymaekers, P, Aerssens, J, Konings, F, Luyten, W, Macciardi, F, Sham, PC, Straub, RE, Weinberger, DR, Cohen, N, Cohen, D (2002) Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21): 13675-13680.
- Cohn, RD (2005) Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond. *Neuromuscul Disord*, 15(3): 207-217.
- Conaway, JW, Conaway, RC (1991) Initiation of eukaryotic messenger RNA synthesis. *J Biol Chem*, 266(27): 17721-17724.
- Coon, H, Jensen, S, Holik, J, Hoff, M, Myles-Worsley, M, Reimherr, F, Wender, P, Waldo, M, Freedman, R, Leppert, M, et al. (1994) Genomic scan for genes predisposing to schizophrenia. *Am J Med Genet*, 54(1): 59-71.
- Corey-Bloom, J, Jernigan, T, Archibald, S, Harris, MJ, Jeste, DV (1995) Quantitative magnetic resonance imaging of the brain in late-life schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 152(3): 447-449.
- Crawford, DL, Segal, JA, Barnett, JL (1999) Evolutionary analysis of TATA-less proximal promoter function. *Mol Biol Evol*, 16(2): 194-207.
- Crow, TJ (1980) Molecular pathology of schizophrenia: more than one disease process? *Br Med J*, 280(6207): 66-68.
- De Stefano, N, Balestri, P, Dotti, MT, Grosso, S, Mortilla, M, Morgese, G, Federico, A (2001) Severe metabolic abnormalities in the white matter of patients with vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. A proton MR spectroscopic imaging study. *J Neurol*, 248(5): 403-409.
- Deutch, AY, Tam, SY, Freeman, AS, Bowers, MB, Jr., Roth, RH (1987) Mesolimbic and mesocortical dopamine activation induced by phencyclidine: contrasting pattern to striatal response. *Eur J Pharmacol*, 134(3): 257-264.
- Doris, PA (2002) Hypertension genetics, single nucleotide polymorphisms, and the common disease: common variant hypothesis. *Hypertension*, 39(2 Pt 2): 323-331.
- Eastwood, SL, Harrison, PJ (2005) Decreased expression of vesicular glutamate transporter 1 and complexin II mRNAs in schizophrenia: further evidence for a synaptic pathology affecting glutamate neurons. *Schizophr Res*, 73(2-3): 159-172.
- Eastwood, SL, McDonald, B, Burnet, PW, Beckwith, JP, Kerwin, RW, Harrison, PJ (1995) Decreased expression of mRNAs encoding non-NMDA glutamate receptors GluR1 and GluR2 in medial temporal lobe neurons in schizophrenia. *Brain Res Mol Brain Res*, 29(2): 211-223.
- Eggert, M, Schulz, M, Neck, G (2001) Molecular mechanisms of glucocorticoid action in rheumatic autoimmune diseases. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 77(4-5): 185-191.
- Ekawardhani, S, Dissection of schizophrenia susceptibility loci at chromosomes 15q14-15.1 and 22q13.33, OPUS (2009)
- Ekelund, J, Hovatta, I, Parker, A, Paunio, T, Varilo, T, Martin, R, Suhonen, J, Ellonen, P, Chan, G, Sinsheimer, JS, Sobel, E, Juvonen, H, Arajärvi, R, Partonen, T, Suvisaari, J, Lonnqvist, J, Meyer, J, Peltonen, L (2001) Chromosome 1 loci in Finnish schizophrenia families. *Hum Mol Genet*, 10(15): 1611-1617.
- Ernst, P, Hahm, K, Trinh, L, Davis, JN, Roussel, MF, Turck, CW, Smale, ST (1996) A potential role for Elf-1 in terminal transferase gene regulation. *Mol Cell Biol*, 16(11): 6121-6131.

- Estivill, X, Armengol, L (2007) Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. *PLoS Genet*, 3(10): 1787-1799.
- Freedman, R, Coon, H, Myles-Worsley, M, Orr-Urtreger, A, Olincy, A, Davis, A, Polymeropoulos, M, Holik, J, Hopkins, J, Hoff, M, Rosenthal, J, Waldo, MC, Reimherr, F, Wender, P, Yaw, J, Young, DA, Breese, CR, Adams, C, Patterson, D, Adler, LE, Kruglyak, L, Leonard, S, Byerley, W (1997) Linkage of a neurophysiological deficit in schizophrenia to a chromosome 15 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(2): 587-592.
- Gao, XM, Sakai, K, Roberts, RC, Conley, RR, Dean, B, Tamminga, CA (2000) Ionotropic glutamate receptors and expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: effects of schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 157(7): 1141-1149.
- Gardiner-Garden, M, Frommer, M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, 196(2): 261-282.
- Gerstein, M, Zheng, D (2006) The real life of pseudogenes. *Sci Am*, 295(2): 48-55.
- Goll, MG, Bestor, TH (2002) Histone modification and replacement in chromatin activation. *Genes Dev*, 16(14): 1739-1742.
- Greenblatt, J (1991) Roles of TFIID in transcriptional initiation by RNA polymerase II. *Cell*, 66(6): 1067-1070.
- Gross, J, Grimm, O, Ortega, G, Teuber, I, Lesch, KP, Meyer, J (2001) Mutational analysis of the neuronal cadherin gene CELSR1 and exclusion as a candidate for catatonic schizophrenia in a large family. *Psychiatr Genet*, 11(4): 197-200.
- Gudmundsson, P, Skoog, I, Waern, M, Blennow, K, Palsson, S, Rosengren, L, Gustafson, D (2007) The relationship between cerebrospinal fluid biomarkers and depression in elderly women. *Am J Geriatr Psychiatry*, 15(10): 832-838.
- Gupta, DS, McCullumsmith, RE, Beneyto, M, Haroutunian, V, Davis, KL, Meador-Woodruff, JH (2005) Metabotropic glutamate receptor protein expression in the prefrontal cortex and striatum in schizophrenia. *Synapse*, 57(3): 123-131.
- Han, SJ, Ko, HM, Choi, JH, Seo, KH, Lee, HS, Choi, EK, Choi, IW, Lee, HK, Im, SY (2002) Molecular mechanisms for lipopolysaccharide-induced biphasic activation of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *J Biol Chem*, 277(47): 44715-44721.
- Hanks, S, Coleman, K, Reid, S, Plaja, A, Firth, H, Fitzpatrick, D, Kidd, A, Mehes, K, Nash, R, Robin, N, Shannon, N, Tolmie, J, Swansbury, J, Irrthum, A, Douglas, J, Rahman, N (2004) Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat Genet*, 36(11): 1159-1161.
- Hasler, J, Strub, K (2006) Alu elements as regulators of gene expression. *Nucleic Acids Res*, 34(19): 5491-5497.
- Horn, AS, Snyder, SH (1971) Chlorpromazine and dopamine: conformational similarities that correlate with the antischizophrenic activity of phenothiazine drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(10): 2325-2328.
- Houy, E, Raux, G, Thibaut, F, Belmont, A, Demily, C, Allio, G, Haouzir, S, Fouldrin, G, Petit, M, Frebourg, T, Campion, D (2004) The promoter -194 C polymorphism of the nicotinic alpha 7 receptor gene has a protective effect against the P50 sensory gating deficit. *Mol Psychiatry*, 9(3): 320-322.
- Hovatta, I, Varilo, T, Suvisaari, J, Terwilliger, JD, Ollikainen, V, Arajärvi, R, Juvonen, H, Kokko-Sahin, ML, Vaisanen, L, Mannila, H, Lonnqvist, J, Peltonen, L (1999) A genomewide screen for schizophrenia genes in an isolated Finnish subpopulation, suggesting multiple susceptibility loci. *Am J Hum Genet*, 65(4): 1114-1124.
- Howard, HC, Mount, DB, Rochefort, D, Byun, N, Dupre, N, Lu, J, Fan, X, Song, L, Riviere, JB, Prevost, C, Horst, J, Simonati, A, Lemcke, B, Welch, R, England, R, Zhan, FQ,

- Mercado, A, Siesser, WB, George, AL, Jr., McDonald, MP, Bouchard, JP, Mathieu, J, Delpire, E, Rouleau, GA (2002) The K-Cl cotransporter KCC3 is mutant in a severe peripheral neuropathy associated with agenesis of the corpus callosum. *Nat Genet*, 32(3): 384-392.
- Ibrahim, HM, Hogg, AJ, Jr., Healy, DJ, Haroutunian, V, Davis, KL, Meador-Woodruff, JH (2000) Ionotropic glutamate receptor binding and subunit mRNA expression in thalamic nuclei in schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 157(11): 1811-1823.
- Inoue, K, Lupski, JR (2002) Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 3: 199-242.
- Ishibashi, M (2004) Molecular mechanisms for morphogenesis of the central nervous system in mammals. *Anat Sci Int*, 79(4): 226-234.
- Itil, T, Keskiner, A, Kiremitci, N, Holden, JM (1967) Effect of phencyclidine in chronic schizophrenics. *Can Psychiatr Assoc J*, 12(2): 209-212.
- Janowsky, DS, Davis, JM (1976) Methylphenidate, dextroamphetamine, and levamfetamine. Effects on schizophrenic symptoms. *Arch Gen Psychiatry*, 33(3): 304-308.
- Jentsch, JD, Taylor, JR, Roth, RH (1998) Subchronic phencyclidine administration increases mesolimbic dopaminergic system responsivity and augments stress- and psychostimulant-induced hyperlocomotion. *Neuropsychopharmacology*, 19(2): 105-113.
- Kamiya, A, Kubo, K, Tomoda, T, Takaki, M, Youn, R, Ozeki, Y, Sawamura, N, Park, U, Kudo, C, Okawa, M, Ross, CA, Hatten, ME, Nakajima, K, Sawa, A (2005) A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat Cell Biol*, 7(12): 1167-1178.
- Karagiannis, TC, Kn, H, El-Osta, A (2006) The epigenetic modifier, valproic acid, enhances radiation sensitivity. *Epigenetics*, 1(3): 131-137.
- Kendler, KS, Myers, JM, O'Neill, FA, Martin, R, Murphy, B, MacLean, CJ, Walsh, D, Straub, RE (2000) Clinical features of schizophrenia and linkage to chromosomes 5q, 6p, 8p, and 10p in the Irish Study of High-Density Schizophrenia Families. *Am J Psychiatry*, 157(3): 402-408.
- Klausner, JD, Sweeney, JA, Deck, MD, Haas, GL, Kelly, AB (1992) Clinical correlates of cerebral ventricular enlargement in schizophrenia. Further evidence for frontal lobe disease. *J Nerv Ment Dis*, 180(7): 407-412.
- Krystal, JH, Karper, LP, Seibyl, JP, Freeman, GK, Delaney, R, Bremner, JD, Heninger, GR, Bowers, MB, Jr., Charney, DS (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry*, 51(3): 199-214.
- Kumsta, R, Moser, D, Streit, F, Koper, JW, Meyer, J, Wust, S (2009) Characterization of a glucocorticoid receptor gene (GR, NR3C1) promoter polymorphism reveals functionality and extends a haplotype with putative clinical relevance. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 150B(4): 476-482.
- Lachman, HM, Pedrosa, E, Petruolo, OA, Cockerham, M, Papolos, A, Novak, T, Papolos, DF, Stopkova, P (2007) Increase in GSK3beta gene copy number variation in bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 144B(3): 259-265.
- Lampson, MA, Kapoor, TM (2005) The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat Cell Biol*, 7(1): 93-98.
- Lander, E, Kruglyak, L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*, 11(3): 241-247.
- Lander, ES, Linton, LM, Birren, B, Nusbaum, C, Zody, MC, Baldwin, J, Devon, K, Dewar, K, Doyle, M, FitzHugh, W, Funke, R, Gage, D, Harris, K, Heaford, A, Howland, J, Kann, L, Lehoczky, J, LeVine, R, McEwan, P, McKernan, K, Meldrim, J, Mesirov, JP, Miranda, C, Morris, W, Naylor, J, Raymond, C, Rosetti, M, Santos, R, Sheridan,

- A, Sougnez, C, Stange-Thomann, N, Stojanovic, N, Subramanian, A, Wyman, D, Rogers, J, Sulston, J, Ainscough, R, Beck, S, Bentley, D, Burton, J, Clee, C, Carter, N, Coulson, A, Deadman, R, Deloukas, P, Dunham, A, Dunham, I, Durbin, R, French, L, Grafham, D, Gregory, S, Hubbard, T, Humphray, S, Hunt, A, Jones, M, Lloyd, C, McMurray, A, Matthews, L, Mercer, S, Milne, S, Mullikin, JC, Mungall, A, Plumb, R, Ross, M, Shownkeen, R, Sims, S, Waterston, RH, Wilson, RK, Hillier, LW, McPherson, JD, Marra, MA, Mardis, ER, Fulton, LA, Chinwalla, AT, Pepin, KH, Gish, WR, Chissoe, SL, Wendl, MC, Delehaunty, KD, Miner, TL, Delehaunty, A, Kramer, JB, Cook, LL, Fulton, RS, Johnson, DL, Minx, PJ, Clifton, SW, Hawkins, T, Branscomb, E, Predki, P, Richardson, P, Wenning, S, Slezak, T, Doggett, N, Cheng, JF, Olsen, A, Lucas, S, Elkin, C, Uberbacher, E, Frazier, M, Gibbs, RA, Muzny, DM, Scherer, SE, Bouck, JB, Sodergren, EJ, Worley, KC, Rives, CM, Gorrell, JH, Metzker, ML, Naylor, SL, Kucherlapati, RS, Nelson, DL, Weinstock, GM, Sakaki, Y, Fujiyama, A, Hattori, M, Yada, T, Toyoda, A, Itoh, T, Kawagoe, C, Watanabe, H, Totoki, Y, Taylor, T, Weissenbach, J, Heilig, R, Saurin, W, Artiguenave, F, Brottier, P, Bruls, T, Pelletier, E, Robert, C, Wincker, P, Smith, DR, Doucette-Stamm, L, Rubenfield, M, Weinstock, K, Lee, HM, Dubois, J, Rosenthal, A, Platzer, M, Nyakatura, G, Taudien, S, Rump, A, Yang, H, Yu, J, Wang, J, Huang, G, Gu, J, Hood, L, Rowen, L, Madan, A, Qin, S, Davis, RW, Federspiel, NA, Abola, AP, Proctor, MJ, Myers, RM, Schmutz, J, Dickson, M, Grimwood, J, Cox, DR, Olson, MV, Kaul, R, Shimizu, N, Kawasaki, K, Minoshima, S, Evans, GA, Athanasiou, M, Schultz, R, Roe, BA, Chen, F, Pan, H, Ramser, J, Lehrach, H, Reinhardt, R, McCombie, WR, de la Bastide, M, Dedhia, N, Blocker, H, Hornischer, K, Nordsiek, G, Agarwala, R, Aravind, L, Bailey, JA, Bateman, A, Batzoglu, S, Birney, E, Bork, P, Brown, DG, Burge, CB, Cerutti, L, Chen, HC, Church, D, Clamp, M, Copley, RR, Doerks, T, Eddy, SR, Eichler, EE, Furey, TS, Galagan, J, Gilbert, JG, Harmon, C, Hayashizaki, Y, Haussler, D, Hermjakob, H, Hokamp, K, Jang, W, Johnson, LS, Jones, TA, Kasif, S, Kasprzyk, A, Kennedy, S, Kent, WJ, Kitts, P, Koonin, EV, Korf, I, Kulp, D, Lancet, D, Lowe, TM, McLysaght, A, Mikkelsen, T, Moran, JV, Mulder, N, Pollara, VJ, Ponting, CP, Schuler, G, Schultz, J, Slater, G, Smit, AF, Stupka, E, Szustakowski, J, Thierry-Mieg, D, Thierry-Mieg, J, Wagner, L, Wallis, J, Wheeler, R, Williams, A, Wolf, YI, Wolfe, KH, Yang, SP, Yeh, RF, Collins, F, Guyer, MS, Peterson, J, Felsenfeld, A, Wetterstrand, KA, Patrinos, A, Morgan, MJ, de Jong, P, Catanese, JJ, Osoegawa, K, Shizuya, H, Choi, S, Chen, YJ (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822): 860-921.
- Lee, MG, Wynder, C, Schmidt, DM, McCafferty, DG, Shiekhattar, R (2006) Histone H3 lysine 4 demethylation is a target of nonselective antidepressive medications. *Chem Biol*, 13(6): 563-567.
- Leegwater, PA, Boor, PK, Yuan, BQ, van der Steen, J, Visser, A, Konst, AA, Oudejans, CB, Schutgens, RB, Pronk, JC, van der Knaap, MS (2002) Identification of novel mutations in MLC1 responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum Genet*, 110(3): 279-283.
- Leegwater, PA, Yuan, BQ, van der Steen, J, Mulders, J, Konst, AA, Boor, PK, Mejaski-Bosnjak, V, van der Maarel, SM, Frants, RR, Oudejans, CB, Schutgens, RB, Pronk, JC, van der Knaap, MS (2001) Mutations of MLC1 (KIAA0027), encoding a putative membrane protein, cause megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Am J Hum Genet*, 68(4): 831-838.
- Lehninger, Nelson, Cox, Prinzipien der Biochemie, Spektrumverlag, 2.Auflage (1998)
- Leonard, S, Freedman, R (2006) Genetics of chromosome 15q13-q14 in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 60(2): 115-122.

- Leonard, S, Gault, J, Hopkins, J, Logel, J, Vianzon, R, Short, M, Drebing, C, Berger, R, Venn, D, Sirota, P, Zerbe, G, Olincy, A, Ross, RG, Adler, LE, Freedman, R (2002) Association of promoter variants in the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit gene with an inhibitory deficit found in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 59(12): 1085-1096.
- Lewis, CM, Levinson, DF, Wise, LH, DeLisi, LE, Straub, RE, Hovatta, I, Williams, NM, Schwab, SG, Pulver, AE, Faraone, SV, Brzustowicz, LM, Kaufmann, CA, Garver, DL, Gurling, HM, Lindholm, E, Coon, H, Moises, HW, Byerley, W, Shaw, SH, Mesen, A, Sherrington, R, O'Neill, FA, Walsh, D, Kendler, KS, Ekelund, J, Paunio, T, Lonnqvist, J, Peltonen, L, O'Donovan, MC, Owen, MJ, Wildenauer, DB, Maier, W, Nestadt, G, Blouin, JL, Antonarakis, SE, Mowry, BJ, Silverman, JM, Crowe, RR, Cloninger, CR, Tsuang, MT, Malaspina, D, Harkavy-Friedman, JM, Svrakic, DM, Bassett, AS, Holcomb, J, Kalsi, G, McQuillin, A, Brynjolfson, J, Sigmundsson, T, Petursson, H, Jazin, E, Zoega, T, Helgason, T (2003) Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. *Am J Hum Genet*, 73(1): 34-48.
- Libioulle, C, Louis, E, Hansoul, S, Sandor, C, Farnir, F, Franchimont, D, Vermeire, S, Dewit, O, de Vos, M, Dixon, A, Demarche, B, Gut, I, Heath, S, Foglio, M, Liang, L, Laukens, D, Mni, M, Zelenika, D, Van Gossum, A, Rutgeerts, P, Belaiche, J, Lathrop, M, Georges, M (2007) Novel Crohn disease locus identified by genome-wide association maps to a gene desert on 5p13.1 and modulates expression of PTGER4. *PLoS Genet*, 3(4): e58.
- Lieberman, JA, Kane, JM, Alvir, J (1987) Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*, 91(4): 415-433.
- Livak, KJ, Schmittgen, TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- Luby, ED, Cohen, BD, Rosenbaum, G, Gottlieb, JS, Kelley, R (1959) Study of a new schizophrenomimetic drug; sernyl. *AMA Arch Neurol Psychiatry*, 81(3): 363-369.
- Lupski, JR, Stankiewicz, P (2005) Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. *PLoS Genet*, 1(6): e49.
- Mariner, PD, Walters, RD, Espinoza, CA, Drullinger, LF, Wagner, SD, Kugel, JF, Goodrich, JA (2008) Human Alu RNA is a modular transacting repressor of mRNA transcription during heat shock. *Mol Cell*, 29(4): 499-509.
- Maziade, M, Chagnon, YC, Roy, M-A, Bureau, A, Fournier, A, Merette, C (2009) Chromosome 13q13-q14 locus overlaps mood and psychotic disorders: the relevance for redefining phenotype. *Eur J Hum Genet*, 17(8): 1034-1042.
- McClellan, JM, Susser, E, King, MC (2007) Schizophrenia: a common disease caused by multiple rare alleles. *Br J Psychiatry*, 190: 194-199.
- McKay, LI, Cidlowski, JA (1998) Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. *Mol Endocrinol*, 12(1): 45-56.
- McKeane, MP, Strieter, RM, Belperio, JA (2005) Mechanisms and mediators of pulmonary fibrosis. *Crit Rev Immunol*, 25(6): 429-463.
- Meador-Woodruff, JH, Healy, DJ (2000) Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Brain Res Rev*, 31(2-3): 288-294.
- Meyer, J, Huberth, A, Ortega, G, Syagailo, YV, Jatzke, S, Mossner, R, Strom, TM, Ulzheimer-Teuber, I, Stober, G, Schmitt, A, Lesch, KP (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(3): 302-306.
- Meyer, J, Johannssen, K, Freitag, CM, Schraut, K, Teuber, I, Hahner, A, Mainhardt, C, Mossner, R, Volz, HP, Wienker, TF, McKeane, D, Stephan, DA, Rouleau, G, Reif, A, Lesch, KP (2005) Rare variants of the gene encoding the potassium chloride co-



- transporter 3 are associated with bipolar disorder. *Int J Neuropsychopharmacol*, 8(4): 495-504.
- Meyer, J, Ortega, G, Schraut, K, Nurnberg, G, Ruschendorf, F, Saar, K, Mossner, R, Wienker, TF, Reis, A, Stober, G, Lesch, KP (2002) Exclusion of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit gene as a candidate for catatonic schizophrenia in a large family supporting the chromosome 15q13-22 locus. *Mol Psychiatry*, 7(2): 220-223.
- Meyer, J, Ruschendorf, F, Lesch, KP (2003) A second large family with catatonic schizophrenia supports the region distally of CHR7 on chromosome 15q14-15. *Mol Psychiatry*, 8(3): 259-260.
- Mill, J, Asherson, P, Craig, I, D'Souza, UM (2005) Transient expression analysis of allelic variants of a VNTR in the dopamine transporter gene (DAT1). *BMC Genet*, 6(1): 3.
- Millar, JK, Wilson-Annan, JC, Anderson, S, Christie, S, Taylor, MS, Semple, CA, Devon, RS, St Clair, DM, Muir, WJ, Blackwood, DH, Porteous, DJ (2000) Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. *Hum Mol Genet*, 9(9): 1415-1423.
- Miller, CA, Campbell, SL, Sweatt, JD (2008) DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem*, 89(4): 599-603.
- Miller, CA, Sweatt, JD (2007) Covalent modification of DNA regulates memory formation. *Neuron*, 53(6): 857-869.
- Miyaoka, T, Seno, H, Ishino, H (1999) Increased expression of Wnt-1 in schizophrenic brains. *Schizophr Res*, 38(1): 1-6.
- Miyata, J, Hirao, K, Namiki, C, Fujiwara, H, Shimizu, M, Fukuyama, H, Sawamoto, N, Hayashi, T, Murai, T (2009) Reduced white matter integrity correlated with cortico-subcortical gray matter deficits in schizophrenia. *Schizophr Res*, 111(1-3): 78-85.
- Moffatt, MF, Kabesch, M, Liang, L, Dixon, AL, Strachan, D, Heath, S, Depner, M, von Berg, A, Bufe, A, Rietschel, E, Heinzmann, A, Simma, B, Frischer, T, Willis-Owen, SA, Wong, KC, Illig, T, Vogelberg, C, Weiland, SK, von Mutius, E, Abecasis, GR, Farrall, M, Gut, IG, Lathrop, GM, Cookson, WO (2007) Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature*, 448(7152): 470-473.
- Mohn, AR, Gainetdinov, RR, Caron, MG, Koller, BH (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*, 98(4): 427-436.
- Mossner, R, Schuhmacher, A, Wagner, M, Quednow, BB, Frommann, I, Kuhn, KU, Schwab, SG, Rietschel, M, Falkai, P, Wolwer, W, Ruhrmann, S, Bechdorf, A, Gaebel, W, Klosterkötter, J, Maier, W (2009) DAOA/G72 predicts the progression of prodromal syndromes to first episode psychosis. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*.
- Mowry, BJ, Holmans, PA, Pulver, AE, Gejman, PV, Riley, B, Williams, NM, Laurent, C, Schwab, SG, Wildenauer, DB, Bauche, S, Owen, MJ, Wormley, B, Sanders, AR, Nestadt, G, Liang, KY, Duan, J, Ribble, R, Norton, N, Soubigou, S, Maier, W, Ewen-White, KR, DeMarchi, N, Carpenter, B, Walsh, D, Williams, H, Jay, M, Albus, M, Nertney, DA, Papadimitriou, G, O'Neill, A, O'Donovan, MC, Deleuze, JF, Lerer, FB, Dikeos, D, Kendler, KS, Mallet, J, Silverman, JM, Crowe, RR, Levinson, DF (2004) Multicenter linkage study of schizophrenia loci on chromosome 22q. *Mol Psychiatry*, 9(8): 784-795.
- Muller, N, Ackenheil, M (1995) Immunoglobulin and albumin content of cerebrospinal fluid in schizophrenic patients: relationship to negative symptomatology. *Schizophr Res*, 14(3): 223-228.
- Mulley, JC, Scheffer, IE, Petrou, S, Berkovic, SF (2003) Channelopathies as a genetic cause of epilepsy. *Curr Opin Neurol*, 16(2): 171-176.

- Nissen, RM, Yamamoto, KR (2000) The glucocorticoid receptor inhibits NFkappaB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev*, 14(18): 2314-2329.
- Nomura, N, Miyajima, N, Sazuka, T, Tanaka, A, Kawarabayasi, Y, Sato, S, Nagase, T, Seki, N, Ishikawa, K, Tabata, S (1994) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. I. The coding sequences of 40 new genes (KIAA0001-KIAA0040) deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. *DNA Res*, 1(1): 27-35.
- Ohtsuki, S, Levine, M, Cai, HN (1998) Different core promoters possess distinct regulatory activities in the Drosophila embryo. *Genes Dev*, 12(4): 547-556.
- Patrono, C, Di Giacinto, G, Eymard-Pierre, E, Santorelli, FM, Rodriguez, D, De Stefano, N, Federico, A, Gatti, R, Benigno, V, Megarbane, A, Tabarki, B, Boespflug-Tanguy, O, Bertini, E (2003) Genetic heterogeneity of megalencephalic leukoencephalopathy and subcortical cysts. *Neurology*, 61(4): 534-537.
- Pearson, TA, Manolio, TA (2008) How to interpret a genome-wide association study. *JAMA*, 299(11): 1335-1344.
- Polak, P, Domany, E (2006) Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes. *BMC Genomics*, 7: 133.
- Ray, A, Prefontaine, KE (1994) Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(2): 752-756.
- Redon, R, Ishikawa, S, Fitch, KR, Feuk, L, Perry, GH, Andrews, TD, Fiegler, H, Shapero, MH, Carson, AR, Chen, W, Cho, EK, Dallaire, S, Freeman, JL, Gonzalez, JR, Gratacos, M, Huang, J, Kalaitzopoulos, D, Komura, D, MacDonald, JR, Marshall, CR, Mei, R, Montgomery, L, Nishimura, K, Okamura, K, Shen, F, Somerville, MJ, Tchinda, J, Valsesia, A, Woodwark, C, Yang, F, Zhang, J, Zerjal, T, Armengol, L, Conrad, DF, Estivill, X, Tyler-Smith, C, Carter, NP, Aburatani, H, Lee, C, Jones, KW, Scherer, SW, Hurles, ME (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444(7118): 444-454.
- Reiman, EM, Webster, JA, Myers, AJ, Hardy, J, Dunckley, T, Zismann, VL, Joshipura, KD, Pearson, JV, Hu-Lince, D, Huentelman, MJ, Craig, DW, Coon, KD, Liang, WS, Herbert, RH, Beach, T, Rohrer, KC, Zhao, AS, Leung, D, Bryden, L, Marlowe, L, Kaleem, M, Mastroeni, D, Grover, A, Heward, CB, Ravid, R, Rogers, J, Hutton, ML, Melquist, S, Petersen, RC, Alexander, GE, Caselli, RJ, Kukull, W, Papassotiropoulos, A, Stephan, DA (2007) GAB2 alleles modify Alzheimer's risk in APOE epsilon4 carriers. *Neuron*, 54(5): 713-720.
- Roeder, RG (1991) The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem Sci*, 16(11): 402-408.
- Roider, HG, Lenhard, B, Kanhere, A, Haas, SA, Vingron, M (2009) CpG-depleted promoters harbor tissue-specific transcription factor binding signals--implications for motif overrepresentation analyses. *Nucleic Acids Res*, 37(19): 6305-6315.
- Rubie, C, Lichtner, P, Gartner, J, Siekiera, M, Uziel, G, Kohlmann, B, Kohlschutter, A, Meitinger, T, Stober, G, Bettecken, T (2003) Sequence diversity of KIAA0027/MLC1: are megalencephalic leukoencephalopathy and schizophrenia allelic disorders? *Hum Mutat*, 21(1): 45-52.
- Sagawa, K, Kawakatsu, S, Shibuya, I, Oiji, A, Morinobu, S, Komatani, A, Yazaki, M, Totsuka, S (1990) Correlation of regional cerebral blood flow with performance on neuropsychological tests in schizophrenic patients. *Schizophr Res*, 3(4): 241-246.
- Scheinman, RI, Gualberto, A, Jewell, CM, Cidlowski, JA, Baldwin, AS, Jr. (1995) Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol*, 15(2): 943-953.

- Schmitt, A, Gofferje, V, Weber, M, Meyer, J, Mossner, R, Lesch, KP (2003) The brain-specific protein MLC1 implicated in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts is expressed in glial cells in the murine brain. *Glia*, 44(3): 283-295.
- Schumacher, J, Jamra, RA, Freudenberg, J, Becker, T, Ohlraun, S, Otte, AC, Tullius, M, Kovalenko, S, Bogaert, AV, Maier, W, Rietschel, M, Propping, P, Nothen, MM, Cichon, S (2004) Examination of G72 and D-amino-acid oxidase as genetic risk factors for schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry*, 9(2): 203-207.
- Schwarz, MJ, Ackenheil, M, Riedel, M, Muller, N (1998) Blood-cerebrospinal fluid barrier impairment as indicator for an immune process in schizophrenia. *Neurosci Lett*, 253(3): 201-203.
- Sebat, J, Lakshmi, B, Malhotra, D, Troge, J, Lese-Martin, C, Walsh, T, Yamrom, B, Yoon, S, Krasnitz, A, Kendall, J, Leotta, A, Pai, D, Zhang, R, Lee, YH, Hicks, J, Spence, SJ, Lee, AT, Puura, K, Lehtimaki, T, Ledbetter, D, Gregersen, PK, Bregman, J, Sutcliffe, JS, Jobanputra, V, Chung, W, Warburton, D, King, MC, Skuse, D, Geschwind, DH, Gilliam, TC, Ye, K, Wigler, M (2007) Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science*, 316(5823): 445-449.
- Seeman, P (1992) Dopamine receptor sequences. Therapeutic levels of neuroleptics occupy D2 receptors, clozapine occupies D4. *Neuropsychopharmacology*, 7(4): 261-284.
- Seeman, P, Guan, HC, Van Tol, HH (1993) Dopamine D4 receptors elevated in schizophrenia. *Nature*, 365(6445): 441-445.
- Sener, RN (2003a) The glycine peak in brain diseases. *Comput Med Imaging Graph*, 27(4): 297-305.
- Sener, RN (2003b) Proton MR spectroscopy demonstration of taurine peaks in megalencephalic leukoencephalopathy with cysts. *Comput Med Imaging Graph*, 27(1): 23-26.
- Severinsen, JE, Bjarkam, CR, Kiaer-Larsen, S, Olsen, IM, Nielsen, MM, Blechingberg, J, Nielsen, AL, Holm, IE, Foldager, L, Young, BD, Muir, WJ, Blackwood, DH, Corydon, TJ, Mors, O, Borglum, AD (2006) Evidence implicating BRD1 with brain development and susceptibility to both schizophrenia and bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry*, 11(12): 1126-1138.
- Shalev, H, Serlin, Y, Friedman, A (2009) Breaching the blood-brain barrier as a gate to psychiatric disorder. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*, 2009: 278531.
- Shaw-Smith, C, Redon, R, Rickman, L, Rio, M, Willatt, L, Fiegler, H, Firth, H, Sanlaville, D, Winter, R, Colleaux, L, Bobrow, M, Carter, NP (2004) Microarray based comparative genomic hybridisation (array-CGH) detects submicroscopic chromosomal deletions and duplications in patients with learning disability/mental retardation and dysmorphic features. *J Med Genet*, 41(4): 241-248.
- Shi, J, Badner, JA, Gershon, ES, Chunyu, L, Willour, VL, Potash, JB (2009) Further evidence for an association of G72/G30 with schizophrenia in Chinese. *Schizophr Res*, 107(2-3): 324-326.
- Shi, J, Badner, JA, Gershon, ES, Liu, C (2008) Allelic association of G72/G30 with schizophrenia and bipolar disorder: a comprehensive meta-analysis. *Schizophr Res*, 98(1-3): 89-97.
- Shinawi, M, Schaaf, CP, Bhatt, SS, Xia, Z, Patel, A, Cheung, SW, Lanpher, B, Nagl, S, Herding, HS, Nevinny-Stickel, C, Immken, LL, Patel, GS, German, JR, Beaudet, AL, Stankiewicz, P (2009) A small recurrent deletion within 15q13.3 is associated with a range of neurodevelopmental phenotypes. *Nat Genet*, 41(12): 1269-1271.
- Slater, EP, Hesse, H, Muller, JM, Beato, M (1993) Glucocorticoid receptor binding site in the mouse alpha-amylase 2 gene mediates response to the hormone. *Mol Endocrinol*, 7(7): 907-914.

- Smale, ST (2001) Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev*, 15(19): 2503-2508.
- Smale, ST, Baltimore, D (1989) The "initiator" as a transcription control element. *Cell*, 57(1): 103-113.
- Smith, RE, Haroutunian, V, Davis, KL, Meador-Woodruff, JH (2001) Vesicular glutamate transporter transcript expression in the thalamus in schizophrenia. *Neuroreport*, 12(13): 2885-2887.
- Stassen, HH, Bridler, R, Hagele, S, Hergersberg, M, Mehmman, B, Schinzel, A, Weisbrod, M, Scharfetter, C (2000) Schizophrenia and smoking: evidence for a common neurobiological basis? *Am J Med Genet*, 96(2): 173-177.
- Steinke, V, Meyer, J, Syagailo, YV, Ortega, G, Hameister, H, Mossner, R, Schmitt, A, Lesch, KP (2003) The genomic organization of the murine Mlc1 (Wkl1, KIAA0027) gene. *J Neural Transm*, 110(4): 333-343.
- Stober, G, Kohlmann, B, Iekiera, M, Rubie, C, Gawlik, M, Moller-Ehrlich, K, Meitinger, T, Bettecken, T (2005) Systematic mutation analysis of KIAA0767 and KIAA1646 in chromosome 22q-linked periodic catatonia. *BMC Psychiatry*, 5: 36.
- Stöber, G, Pfuhlmann, B, Nurnberg, G, Schmidtke, A, Reis, A, Franzek, E, Wienker, TF (2001) Towards the genetic basis of periodic catatonia: pedigree sample for genome scan I and II. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 251 Suppl 1: I25-30.
- Stöber, G, Saar, K, Ruschendorf, F, Meyer, J, Nurnberg, G, Jatzke, S, Franzek, E, Reis, A, Lesch, KP, Wienker, TF, Beckmann, H (2000) Splitting schizophrenia: periodic catatonia-susceptibility locus on chromosome 15q15. *Am J Hum Genet*, 67(5): 1201-1207.
- Stöber, G, Seelow, D, Ruschendorf, F, Ekici, A, Beckmann, H, Reis, A (2002) Periodic catatonia: confirmation of linkage to chromosome 15 and further evidence for genetic heterogeneity. *Hum Genet*, 111(4-5): 323-330.
- Sullivan, PF, Kendler, KS, Neale, MC (2003) Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch Gen Psychiatry*, 60(12): 1187-1192.
- Suzuki, Y, Tsunoda, T, Sese, J, Taira, H, Mizushima-Sugano, J, Hata, H, Ota, T, Isogai, T, Tanaka, T, Nakamura, Y, Suyama, A, Sakaki, Y, Morishita, S, Okubo, K, Sugano, S (2001) Identification and characterization of the potential promoter regions of 1031 kinds of human genes. *Genome Res*, 11(5): 677-684.
- Takahashi, S, Faraone, SV, Lasky-Su, J, Tsuang, MT (2005) Genome-wide scan of homogeneous subtypes of NIMH genetics initiative schizophrenia families. *Psychiatry Res*, 133(2-3): 111-122.
- Taylor, MA, Fink, M (2003) Catatonia in psychiatric classification: a home of its own. *Am J Psychiatry*, 160(7): 1233-1241.
- Tejjido, O, Casaroli-Marano, R, Kharkovets, T, Aguado, F, Zorzano, A, Palacin, M, Soriano, E, Martinez, A, Estevez, R (2007) Expression patterns of MLC1 protein in the central and peripheral nervous systems. *Neurobiol Dis*, 26(3): 532-545.
- Tejjido, O, Martinez, A, Pusch, M, Zorzano, A, Soriano, E, Del Rio, JA, Palacin, M, Estevez, R (2004) Localization and functional analyses of the MLC1 protein involved in megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum Mol Genet*, 13(21): 2581-2594.
- Ten Hove, T, Vervoordeldonk, Margriet J.B.M., Dekkers, Pascal E.P. (1999) LPS induced translocation of NF-KappaB occurs only in a subpopulation of CD14-positive mononuclear cells *Journal of Endotoxin Research*, 5
- Thorleifsson, G, Magnusson, KP, Sulem, P, Walters, GB, Gudbjartsson, DF, Stefansson, H, Jonsson, T, Jonasdottir, A, Stefansdottir, G, Masson, G, Hardarson, GA, Petursson, H, Arnarsson, A, Motallebipour, M, Wallerman, O, Wadelius, C, Gulcher, JR, Thorsteinsdottir, U, Kong, A, Jonasson, F, Stefansson, K (2007) Common sequence

- variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. *Science*, 317(5843): 1397-1400.
- Tirumurugaan, KG, Kang, BN, Panettieri, RA, Foster, DN, Walseth, TF, Kannan, MS (2008) Regulation of the cd38 promoter in human airway smooth muscle cells by TNF-alpha and dexamethasone. *Respir Res*, 9: 26.
- Topcu, M, Gartiaux, C, Ribierre, F, Yalcinkaya, C, Tokus, E, Oztekin, N, Beckmann, JS, Ozguc, M, Seboun, E (2000) Vacuolizing megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts, mapped to chromosome 22qtel. *Am J Hum Genet*, 66(2): 733-739.
- TRANSFAC, Matys, V.; Kel-Margoulis, O. V.; Fricke, E.; Liebich, I.; Land, S.; Barre-Dirrie, A.; Reuter, I.; Chekmenev, D.; Krull, M.; Hornischer, K.; Voss, N.; Stegmaier, P.; Lewicki-Potapov, B.; Saxel, H.; Kel, A. E.; Wingender E. (2006) "TRANSFAC® and its module TRANSCompel®: transcriptional gene regulation in eukaryotes." *Nucleic Acids Res.* 34(Database issue):D108-110.
- Tsuang, M (2000) Schizophrenia: genes and environment. *Biol Psychiatry*, 47(3): 210-220.
- Turner, BM (2002) Cellular memory and the histone code. *Cell*, 111(3): 285-291.
- van der Knaap, MS, Barth, PG, Stroink, H, van Nieuwenhuizen, O, Arts, WF, Hoogenraad, F, Valk, J (1995) Leukoencephalopathy with swelling and a discrepantly mild clinical course in eight children. *Ann Neurol*, 37(3): 324-334.
- van der Knaap, MS, Barth, PG, Vrensen, GF, Valk, J (1996) Histopathology of an infantile-onset spongiform leukoencephalopathy with a discrepantly mild clinical course. *Acta Neuropathol*, 92(2): 206-212.
- van der Zwaag, B, Franke, L, Poot, M, Hochstenbach, R, Spierenburg, HA, Vorstman, JA, van Daalen, E, de Jonge, MV, Verbeek, NE, Brilstra, EH, van 't Slot, R, Ophoff, RA, van Es, MA, Blauw, HM, Veldink, JH, Buizer-Voskamp, JE, Beemer, FA, van den Berg, LH, Wijmenga, C, van Amstel, HK, van Engeland, H, Burbach, JP, Staal, WG (2009) Gene-network analysis identifies susceptibility genes related to glycobiology in autism. *PLoS One*, 4(5): e5324.
- van Rossum, JM (1966) The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 160(2): 492-494.
- Vazza, G, Bertolin, C, Scudellaro, E, Vettori, A, Boaretto, F, Rampinelli, S, De Sanctis, G, Perini, G, Peruzzi, P, Mostacciolo, ML (2007) Genome-wide scan supports the existence of a susceptibility locus for schizophrenia and bipolar disorder on chromosome 15q26. *Mol Psychiatry*, 12(1): 87-93.
- Verma, A, Moghaddam, B (1996) NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. *J Neurosci*, 16(1): 373-379.
- Verma, R, Mukerji, M, Grover, D, C, BR, Das, SK, Kubendran, S, Jain, S, Brahmachari, SK (2005) MLC1 gene is associated with schizophrenia and bipolar disorder in Southern India. *Biol Psychiatry*, 58(1): 16-22.
- Wang, S, Sun, CE, Walczak, CA, Ziegler, JS, Kipps, BR, Goldin, LR, Diehl, SR (1995) Evidence for a susceptibility locus for schizophrenia on chromosome 6pter-p22. *Nat Genet*, 10(1): 41-46.
- Weaver, IC, Cervoni, N, Champagne, FA, D'Alessio, AC, Sharma, S, Seckl, JR, Dymov, S, Szyf, M, Meaney, MJ (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*, 7(8): 847-854.
- Wright, IC, Rabe-Hesketh, S, Woodruff, PW, David, AS, Murray, RM, Bullmore, ET (2000) Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 157(1): 16-25.

- Yalcinkaya, C, Yuksel, A, Comu, S, Kilic, G, Cokar, O, Dervent, A (2003) Epilepsy in vacuolating megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Seizure*, 12(6): 388-396.
- Zemishlany, Z, Alexander, GE, Prohovnik, I, Goldman, RG, Mukherjee, S, Sackeim, H (1996) Cortical blood flow and negative symptoms in schizophrenia. *Neuropsychobiology*, 33(3): 127-131.



## Sequenz der *Pomp*-Pseudogen-Spleißvarianten

a)

**GGCTGTGCTAGAGGTCCTTGCGCACTTAATATCCCTACCACAAAACACTACATCCCAAAGTTTGTTT**  
**TTGTTTTGCTCGCTGTTTTAAGACAGCATTACAAGCTATAGATTTCTCTTTAAATTTTGGTTAAG**  
**GTGCATCCTATAACAATTTGAATCGCAATTTCAATTTGTCTTGTGGTTTGAGTTTTATTTTGCTGTT**  
**CCCCACCCCAGTCCACACAGGCATGTTGTCAGTATACGACTATTTAGAGAGTTTCGGCTACTGA**  
**TGTTAGTCAGTCTTAGAGAGTAAAATTTGGATGACTTCTGTTCTTAAAACCTTGTCCAGGGCCTAGTG**  
**ATATGCACCTTTAATAGGACTT**AGGAGGAAGAGGCAGGCAGATTTCTGTGACTTCCAGGTCAGTT  
 TGGTCTTCATAGTTCTAGGCCTGCCAGGGCTACATAGTGAGAGGCTGTCTCAAACAAAATAGAA  
 CACAAACCTTATCAAGGGTATCTCCCACTTTGTTGATCTCCTGAATGTCCTTCACTGGATATTCTG  
 TGTGTCATAAACAGTATGTATTCTGTTGTGTTTGTGGGGATCTGATTTAGTTCTAGATTTGGTTTG  
 TCTGTTTGTACATCATTGGCACTCTTCAATTAACCTGGGAGTAATGGCAGCATTGCTTAAACATTTA  
 GAGGCTGTCATAAACCTTCTCAAGTGTGTTACTCAGAATACACAGGAAAATAATACACAGGACCT  
 GACTATTTATAGGGTTTGAGTCATCTTCAGAGATGCTGGCTAGGTACCCAGACAGGCTTTCTTTT  
 ACAGTATCTGGTAGTCCTGGCTTTCAGGACTGTGTGTGGTTGCTACCAGCCTGAGCTGCTGCC  
 CGGATCGGCCTCTTCTACATTTCCAAGCAAATGCCTTACAGACATTGTGACTTCATATCTAAAAGA  
 AAACGTTGCTCCAAGACCTTCTCTGACTGCCTAAAGAGCCCTCCGTAAGTACAGCAAGTAGG  
 ATGGATTGGCTTCTCTTTATCTATCTGGAATTGGATCTCTGCTCACCATTCTGGGTCAAATCTCCC  
 CATTACCCAGCCTGTTCTCCACCCAGCACCAGAATACCACCTTGACCAATCCCACCTCAAGGTC  
 AAAGCCAAGTGGCTTCCATGCCTACAGGTGTCTGTACTTCAATGGCCTCTATATTCTACTTTCCAG  
 AATCCTCAGCTCACCTTCTTCAGCCATGCTCCTGCATGCTCTGGGGCCTTGACACCTCTGAGGC  
 CTACCCTCTGTGCCTTTAGTTCCGCTGTCTCCCTGAAGTCTACACATCTCACACAGAGAAAGTCAA  
 ACGTATTGGCATATTGGCACAGCAGAGCACGCACACACAAAACGATGGCCTGTAAGTCTTCAGTG  
 GGCAGAGGGAGAAAAGGCGGTTGTTTGAAGATTCTACTGAAGAACAGGGCATGCATGTTCTAGG  
 AACCAGTATTGCAGCAGCAACCAAGACATGACACGCAAGTCATTGTAAGTCAGGAGTGAGGAGA  
 GCACGGAGAGTGAGCCCTCCCTCTCTGATTGAGAACAGCTTGTGTTGTTTCTTAATGGGAAACA  
 CTTTTGAAAGTCACAAAAGTGATGTATGCTAAGCATTTCCCCTCCAAAACAAAAACAAAA  
 CAAAAACACACAGCCAGGTCAGTGGTGGTGCATGCTTTAATCCCAGC**ACTTGGGAGGCAGAG**  
**GCAGGCAGATCTCTGAGTTCAAAGCCAGCCTGGTCTACAGAGCAAGTTGCAAGCATTAGGAAT**  
**ACACAGAAAAACCATGTCTCAAAAAAGCAAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACCCAAACAACA**  
**ACAAAAAGAGAGAGAGAGAAAACACAGGCGAGGGGGGAGGTGTCTTGCCCCGAAAACAGAAG**  
**TGAGTGGTTTGGTCAGCCGACTCAGCAGGTTTCGGAGGATCTCACAGAGCTGTTTCCAAGATGA**  
**ACGCCAGAGGCCTTGGGTCCGAGGCTGAAGGACAGTATTCCAGTTGCCGGAGCTCT**

b)

**GGCTGTGCTAGAGGTCCTTGCGCACTTAATATCCCTACCACAAAACACTACATCCCAAAGTTTGTTT**  
**TTGTTTTGCTCGCTGTTTTAAGACAGCATTACAAGCTATAGATTTCTCTTTAAATTTTGGTTAAG**  
**GTGCATCCTATAACAATTTGAATCGCAATTTCAATTTGTCTTGTGGTTTGAGTTTTATTTTGCTGTT**  
**CCCCACCCCAGTCCACACAGGCATGTTGTCAGTATACGACTATTTAGAGAGTTTCGGCTACTGA**  
**TGTTAGTCAGTCTTAGAGAGTAAAATTTGGATGACTTCTGTTCTTAAAACCTTGTCCAGGGCCTAGTG**  
**ATATGCACCTTTAATAGGACTTAGGAGGAAGAGGCAGGAT**TTCTGTGACTTCCAGGTCAGTT  
 TGGTCTTCATAGTTCTAGGCCTGCCAGGGCTACATAGTGAGAGGCTGTCTCAAACAAAATAGAA  
 CACAAACCTTATCAAGGGTATCTCCCACTTTGTTGATCTCCTGAATGTCCTTCACTGGATATTCTG  
 TGTGTCATAAACAGTATGTATTCTGTTGTGTTTGTGGGGATCTGATTTAGTTCTAGATTTGGTTTG  
 TCTGTTTGTACATCATTGGCACTCTTCAATTAACCTGGGAGTAATGGCAGCATTGCTTAAACATTTA  
 GAGGCTGTCATAAACCTTCTCAAGTGTGTTACTCAGAATACACAGGAAAATAATACACAGGACCT  
 GACTATTTATAGGGTTTGAGTCATCTTCAGAGATGCTGGCTAGGTACCCAGACAGGCTTTCTTTT  
 ACAGTATCTGGTAGTCCTGGCTTTCAGGACTGTGTGTGGTTGCTACCAGCCTGAGCTGCTGCC  
 CGGATCGGCCTCTTCTACATTTCCAAGCAAATGCCTTACAGACATTGTGACTTCATATCTAAAAGA  
 AAACGTTGCTCCAAGACCTTCTCTGACTGCCTAAAGAGCCCTCCGTAAGTACAGCAAGTAGG  
 ATGGATTGGCTTCTCTTTATCTATCTGGAATTGGATCTCTGCTCACCATTCTGGGTCAAATCTCCC  
 CATTACCCAGCCTGTTCTCCACCCAGCACCAGAATACCACCTTGACCAATCCCACCTCAAGGTC  
 AAAGCCAAGTGGCTTCCATGCCTACAGGTGTCTGTACTTCAATGGCCTCTATATTCTACTTTCCAG  
 AATCCTCAGCTCACCTTCTTCAGCCATGCTCCTGCATGCTCTGGGGCCTTGACACCTCTGAGGC  
 CTACCCTCTGTGCCTTTAGTTCCGCTGTCTCCCTGAAGTCTACACATCTCACACAGAGAAAGTCAA  
 ACGTATTGGCATATTGGCACAGCAGAGCACGCACACACAAAACGATGGCCTGTAAGTCTTCAGTG  
 GGCAGAGGGAGAAAAGGCGGTTGTTTGAAGATTCTACTGAAGAACAGGGCATGCATGTTCTAGG  
 AACCAGTATTGCAGCAGCAACCAAGACATGACACGCAAGTCATTGTAAGTCAGGAGTGAGGAGA



GCACGGAGAGTGAGCCCTCCCTCTCTGATTCAGAACAGCTTGTTTGTGTTTCTTAATGGGAAACA  
 CTTTTGAAAGTCACAAAAGTGATGATGTATGCTAAGCATTTCCTCCAAAACAAAAACAAAA  
 CAAAAAACACAGAGCCAGGTGGTGGTGGTGCATGATTTAATCCAGCACTTGGGAGGCAGAG  
GCAGGCAGATCTCTGAGTTCAAAGCCAGCCTGGTCTACAGAGCAAGTTGCAAGACATTTAGGAA  
TACACAGAAAAACCATGTCTCAAAAAAGCAAAAAACAAAAACAAAAACCCAAACAAAC  
AACAAAAAGAGAGAGAGAGAAAAACACAGGCGAGGGGGGAGGTGTCTTGGCCCCGGAAACAGAA  
GTGAGTGGTTTGGTCAGCCGACTCAAGCAGGTTCCGAGGATCTCACAGAGCTGTTTCCAAGATG  
AACGCCAGAGGCCTTGGGTCCGAGCTGAAGGACAGTATTCCAGTTGCGGAGCTCT

**Abbildung 7.1.2 Spleißvarianten des *Pomp*-Pseudogens**

Abbildung a) und b) zeigen die beiden nachgewiesenen Spleißvarianten des Pseudogentranskripts. Die Bindestellen für die verwendeten Primer sind dunkelrot markiert. Es ist die gesamte genomische Sequenz zwischen den Primerbindestellen angegeben. Die erhaltene Sequenz von der Sequenzierreaktion ist rot markiert. Fett und unterstrichen sind die *repeats* an denen der Spleißvorgang stattfindet. Aufgrund des *repeats* ist die genaue Bestimmung des Spleißübergangs nicht möglich.

## Sequenzierung des Amplikons von *Mlc1* Exon 1B

```

Ex1B_a          -----GAG-----
Ex1B_b          GAGGCCAGCTTTCCCAACCGCCGGACGACAGCAGAG-----
Ex1B_ensembl    GAGGCCAGCTTTCCCAACCGCCGGACGACAGCAGAGGTAAAGCATTAAAGACATTAAACTGC 60
                *****

Ex1B_a          -----
Ex1B_b          -----
Ex1B_ensembl    AAAGTAGGGGCGTCTTTTGTAACTCATGTTCCCATTTTGTGTTGAATAGGAGAAGCTCA 120

Ex1B_a          -----
Ex1B_b          -----
Ex1B_ensembl    CCTCTGTTTGGGACTCATAGAGTTGCTGGTGAAGCTGAAATGTACTATATCTAAAGAGT 180

Ex1B_a          -----
Ex1B_b          -----
Ex1B_ensembl    CAGATGAAGGCTGAGTGTGCTGAATCTAGATGAGTTTGGGTGGCTTTATTTATGTTGAGA 240

Ex1B_a          -----
Ex1B_b          -----
Ex1B_ensembl    GTTAGGGTTTGTTCCCTCTTTAAGTTCACAGCCCTAGAGTATGAGTATATCTCTAAGA 300

Ex1B_a          -----
Ex1B_b          -----
Ex1B_ensembl    CAGTGTTTGCTTAAGCCAGACATGATAGTGTTTACCCAGGTAGACGTTTAAGCCAGCCTG 360

Ex1B_a          -----
Ex1B_b          -----
Ex1B_ensembl    GGCCACACAGTGATACTTTGTCTCAAGAAAAATTTCCGAAGCACTTTTCATGATAACCA 420

Ex1B_a          -----
Ex1B_b          -----
Ex1B_ensembl    CTTACTACAATTAGAGGGTTTTTCAGTTGTCAAAGTCCATGATGATTTCACTGCATAGGAG 480

Ex1B_a          ----- 9
Ex1B_b          ----- 27
Ex1B_ensembl    GGAATGGTGGTCTGAGTCTGTTCAAGGCTCAGCTTTGGTGTGTGTCACCTCAGTACC 540

Ex1B_a          -----CGCCATGACACGGGAGGGGCAGTTTCAGGGAGGAACCTGGGCTATGA 65
Ex1B_b          -----CGCCGTGACACGGGAGGGGCAGTT-CAGGGAGGAACCTGGGCTATGA 81
Ex1B_ensembl    ATGCCTGTTTCCAGCGCCATGACACGGGAGGGGCAGTT-CAGGGAGGAACCTGGGCTATGA 599
                **** *****

Ex1B_a          CCGGATGCCACACTGGAGAGGGGTCGGCAGGATGCAGGACGGCAGGACCCAGGCAGCTACA 128
Ex1B_b          CCGGATGCCACACTGGAGAGGGGTCGGCAGGATGCAGGACGGCAGGACCCAGGCAGCTACA 143
Ex1B_ensembl    CCGGATGCCACACTGGAGAGGGGTCGGCAGGATGCAGGACGGCAGGACCCAGGCAGCTACA 661
                *****

```

### Abbildung 7.1.3: Sequenz des *Mlc1* Exon 1B-Amplikons

ClustalW-Alignment der gDNA Sequenz von *Mus musculus* und der Sequenz des Exon 1B Amplikons. Ex1B\_a wurde direkt aus dem PCR-Produkt amplifiziert, für die Sequenzierung von Ex1B\_b wurde das PCR-Produkt vorher in den TOPO-Vektor eingebracht. Primerbindestellen sind grün markiert. Die in der Ensembl-Datenbank als exonisch beschriebenen Bereiche sind rot markiert. Orange markiert ist die erhaltene Sequenz aus der Sequenzierung des Exon 1B Amplikons. Spleißdonor- und Akzeptor sind blau markiert. Sternchen stehen für die Übereinstimmung der Sequenz. Das erhaltene Amplikon für Exon 1B hat eine Größe von 143 bp.

## Sequenzierung des Amplikons von *Mlc1* Exon 1E

Ex1E_a	CTCATCTCATAATGAAGGCTGAGTGTGCTGAATCTAGATGAGTTTGGGTGGCTTTATTTA	378
Ex1E_ensembl	-----AGATGAAGGCTGAGTGTGCTGAATCTAGATGAGTTTGGGTGGCTTTATTTA	51
Ex1E_b	TCGGCAGGATGCAGGACGGCAGGACCCAGGCAGCTACAAGAGTTTGGGTGGCTT-ATTTA	467
	* * * * *	
Ex1E_a	TGTTGAGAGTTAGGGGTTTGTTCCTCTTTAAGTTCACAGCCCTAGAGTATGAGTATATT	437
Ex1E_ensembl	TGTTGAGAGTTAGGGGTTTGTTCCTCTTTAAGTTCACAGCCCTAGAGTATGAGTATATT	110
Ex1E_b	TGTTGAGAGTTAGGGGTTTGTTCCTCTTTAAGTTCACAGCCCTAGAGTATGAGTATATT	526
	*****	
Ex1E_a	CCTCTAAGACAGTGTTTGCTTAAGCCAGACATGATAGTGTTTACCCAGGTAGACGTTTAA	497
Ex1E_ensembl	CCTCTAAGACAGTGTTTGCTTAAGCCAGACATGATAGTGTTTACCCAGGTAGACGTTTAA	170
Ex1E_b	CCTCTAAGACAGTGTTTGCTTAAGCCAGACATGATAGTGTTTACCCAGGTAGACGTTTAA	586
	*****	
Ex1E_a	GCCAGCCTGGGCCACACAGTGATACTTTGTCTCAAGAAAAAATTTCCGAGCACTTTCA	557
Ex1E_ensembl	GCCAGCCTGGGCCACACAGTGATACTTTGTCTCAAGAAAAAATTTCCGAGCACTTTCA	230
Ex1E_b	GCCAGCCTGGGCCACACAGTGATACTTTGTCTCAAGAAAAAATTTCCGAGCACTTTCA	646
	*****	
Ex1E_a	TGATAACCACTTACTACAATTAGAGGGTTTTCAGTTGTCAAAGTCCATGATGATTTCACT	617
Ex1E_ensembl	TGATAACCACTTACTACAATTAGAGGGTTTTCAGTTGTCAAAGTCCATGATGATTTCACT	290
Ex1E_b	TGATAACCACTTACTACAATTAGAGGGTTTTCAGTTGTCAAAGTCCATGATGATTTCACT	706
	*****	
Ex1E_a	GCATAGGAGGGAATGGTGGTCTGAGTCTGTTTACAAGGCTCAGCTTTGGTGTGTGTCACT	677
Ex1E_ensembl	GCATAGGAGGGAATGGTGGTCTGAGTCTGTTTACAAGGCTCAGCTTTGGTGTGTGTCACT	350
Ex1E_b	GCATAGGAGGGAATGGTGGTCTGAGTCTGTTTACAAGGCTCAGCTTTGGTGTGTGTCACT	766
	*****	
Ex1E_a	CTCAGTACCATGCCTGTTTCCAGCGCCATGACACGGGAGGGGCAGTTCAGGGAGGAAC TG	737
Ex1E_ensembl	CTCAGTACCATGCCTGTTTCCAGCGCCATGACACGGGAGGGGCAGTTCAGGGAGGAAC TG	410
Ex1E_b	CTCAGTACCATGCCTGTTTCCAGCGCCATGACACGGGAGGGGCAGTTCAGGGAGGAAC TG	826
	*****	
Ex1E_a	GGCTATGACCAGAATGCCCACTGG-AGAGGGTC-----	771
Ex1E_ensembl	GGCTATGACCGGA-TGCCCACTGGAGAGGGGTCGGCAGGATGCAGGACGGCAGGACCC	469
Ex1E_b	GGCTATGACCGGA-TGCCCACTGGAGAGGGGTCGGCAGGATGCAGGACGGCAGGACCC	885
	***** * * *****	
Ex1E_a	-----	
Ex1E_ensembl	AGGCAGCTACA--	480
Ex1E_b	AGGCAGCTACAAA	898

### Abbildung 7.1.4: Sequenz des *Mlc1* Exon 1E-Amplikons

ClustalW-Alignment der gDNA Sequenz von *Mus musculus* und der Sequenz des Exon 1E Amplikons. Ex1E\_a und Ex1E\_b wurden direkt aus dem PCR-Produkt sequenziert. Primerbindestellen sind grün markiert. Es ist die gesamte genomische Sequenz zwischen den Primerbindestellen dargestellt. Die in der Ensembl-Datenbank als exonisch beschriebenen Bereiche sind rot markiert. Orange markiert ist die erhaltene Sequenz aus der Sequenzierung des Exon 1E Amplikons. Sternchen stehen für die Übereinstimmung der Sequenz. Das erhaltene Amplikon für Exon 1E hat eine Größe von 480 bp.

## Rohwerte der Real Time Experimente

	Ct-Wert (Mlc1)	Ct-Wert (Gapdh)	$\Delta$ Ct (Mlc1-Gapdh)	$2^{-\Delta Ct}$
Amy 1	24,860	18,803	6,057	0,015
Amy 2	23,069	15,273	7,795	0,005
Amy 3	24,530	18,020	6,510	0,011
Amy 4	21,131	13,560	7,571	0,005
Hc 1	24,220	16,717	7,503	0,006
Hc 2	21,689	14,750	6,939	0,008
Hc 3	21,257	13,830	7,427	0,006
Hc 4	21,474	14,637	6,838	0,009
Hyp 1	23,591	18,255	5,336	0,025
Hyp 2	20,499	14,817	5,682	0,019
Hyp 3	20,843	14,180	6,663	0,010
Hyp 4	19,853	13,200	6,653	0,010
Cer 1	19,345	12,810	6,535	0,011
Cer 2	18,683	13,217	5,466	0,023
Cx 1	19,463	13,560	5,903	0,017
Cx 2	18,653	12,937	5,716	0,019

**Tabelle 7.1.1: Ct-,  $\Delta$  Ct und  $2^{-\Delta Ct}$ -Werte für Mlc1 und Gapdh**

Angegeben sind die Ct-,  $\Delta$ Ct und  $2^{-\Delta Ct}$ -Werte von Mlc1 und Gapdh. Pro Versuchstier wurden drei unabhängige Messungen in Duplikaten durchgeführt. Für Amy, Hc und Hyp ist n=4, für Cer und Cx ist n=2. Amy = Amygdala, Hc = Hippocampus, Hyp = Hypothalamus, Cer = Cerebellum, Cx = Cortex.

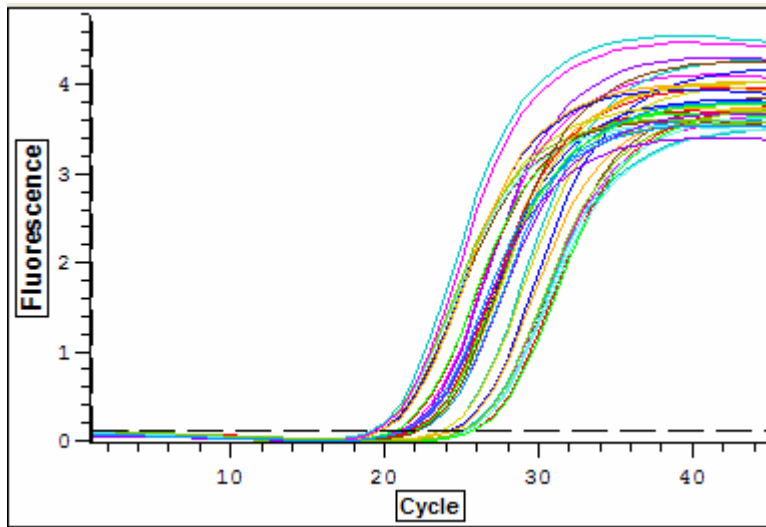
Stimulanz	Ct-Wert (Mlc1)	Ct-Wert (Gapdh)	Ct-Wert (Actb)	Ct-Wert (Ppia)
Dex 1 (50 $\mu$ M)	25,608	10,035	9,41	9,34
Dex 2 (50 $\mu$ M)	25,54	10,1	9,065	9,475
Dex 3 (50 $\mu$ M)	26,106	11,395	9,52	10,39
Dex 4 (50 $\mu$ M)	25,944	11,185	9,91	10,315
LPS 1 (100 ng/ $\mu$ l)	23,854	10,01	8,64	9,26
LPS 2 (100 ng/ $\mu$ l)	25,154	10,285	9,06	9,715
Basal1	24,876	10,175	8,525	9,38
Basal2	26,478	11,59	9,83	10,445
For 1 (50 $\mu$ M)	25,888	11,34	9,275	10,41
For 2 (50 $\mu$ M)	27,478	12,36	10,45	10,965
For 3 (50 $\mu$ M)	27,046	12,105	10,045	11,2
For 4 (50 $\mu$ M)	25,422	11,31	10,005	10,595
PMA 1 (2 $\mu$ M)	27,382	12,805	11,345	11,275
PMA 2 (2 $\mu$ M)	26,916	11,395	10,72	10,27

**Tabelle 7.1.2: Ct-Werte der Astrozytenstimulation**

Angegeben sind die Ct-Werte von Mlc1 und den verwendeten Referenzgenen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen. Dex = Dexamethason, LPS = Lipopolysaccharide, Basal = unstimulierte Bedingung, For = Forskolin, PMA = Phorbol-12-Myristat-13-Azetat

## Quantifizierung und Schmelzkurvenanalyse

A)



B)

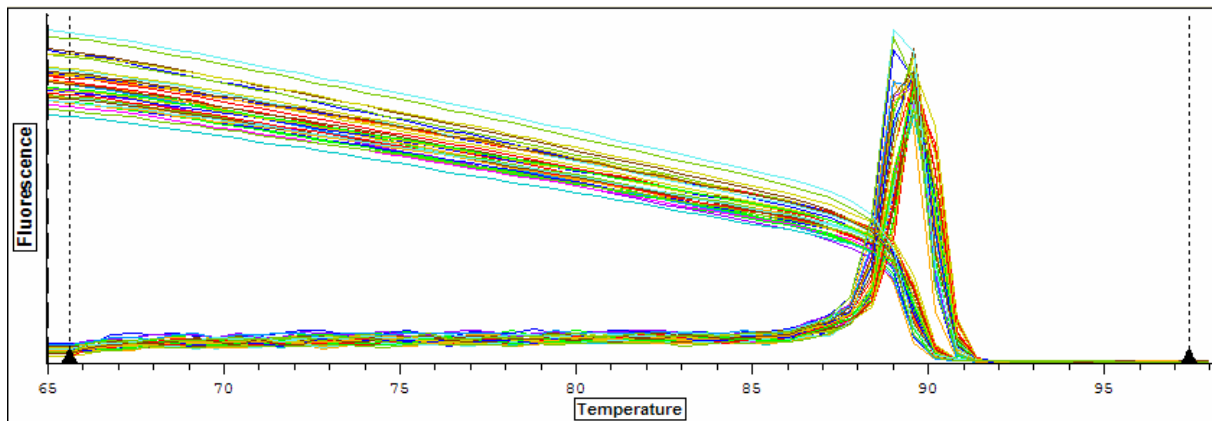


Abbildung 7.1.5: A) Quantifizierung und B) Schmelzkurvenanalyse von *Mlc1* Exon 1B

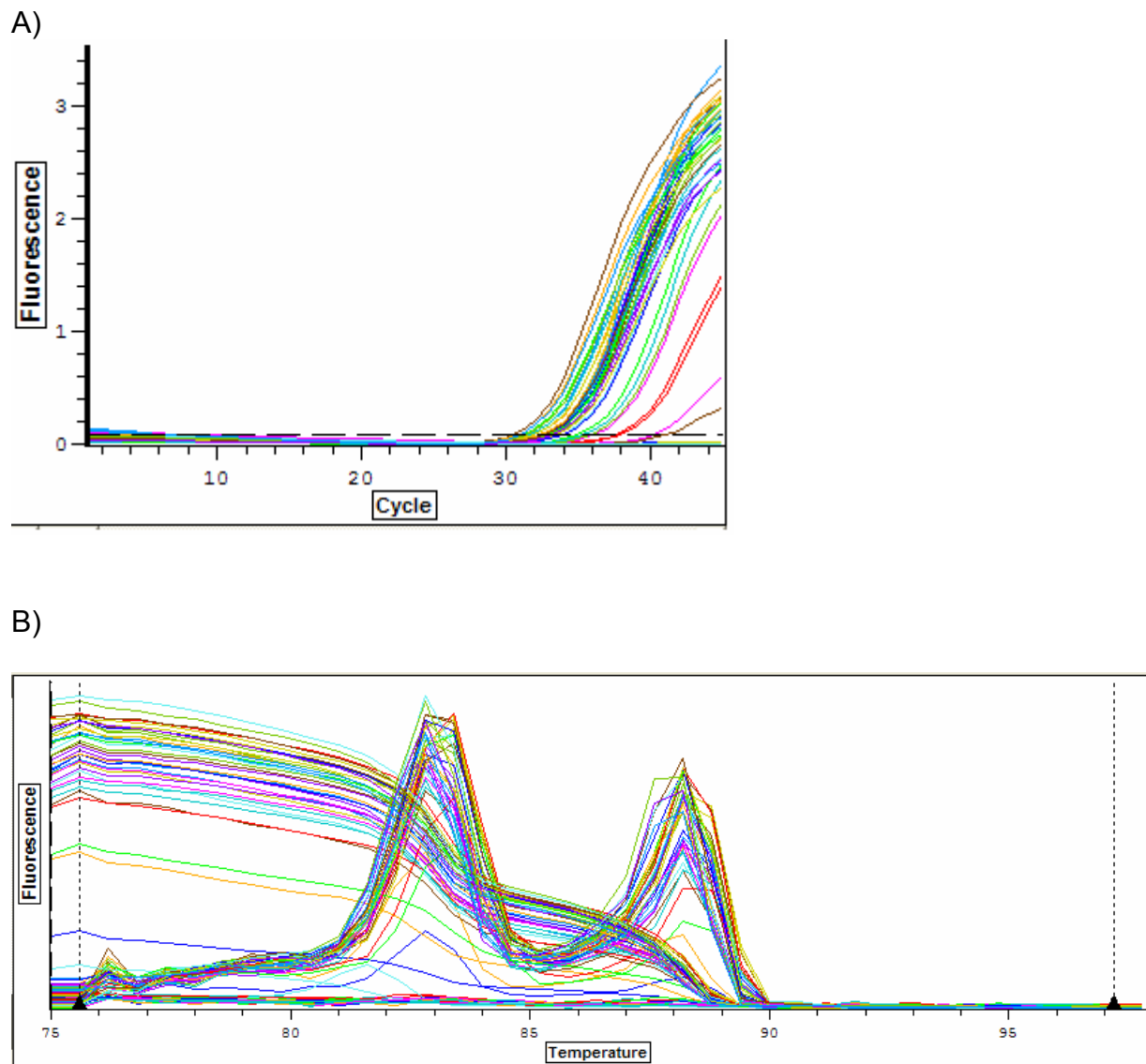


Abbildung 7.1.6: A) Quantifizierung und B) Schmelzkurvenanalyse von *Mlc1* Exon 1E

## 7.2 Anhang zu den Ergebnissen aus 3.2

### DNA-Sequenz von *BUB1B* Exon 1 bis 23

Die Beschriftung setzt sich aus „Proband\_Exonnummer“ zusammen. Die Kontrollprobandin entspricht der Nummer 1, Patient Nr. 834 entspricht Nr. 2, Patient Nr. 744 entspricht Nr. 3, Patient Nr. 568 entspricht Nr. 4. Die fünfte Sequenz stammt aus der Datenbank. Introns sind mit schwarzer Schrift und Exons mit roter Schrift dargestellt. Die grüne Schrift symbolisiert die Bindestellen für die verwendeten Oligonukleotide, die blaue Schrift Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) und die neongrüne Schrift Abweichungen in der Sequenz. Der Translationsstart (ATG) ist fett hervorgehoben. Sternchen stehen für die Übereinstimmung der Sequenz. Im Anschluss sind alle gefundenen Polymorphismen in Tabelle 7.2.1 dargestellt.

#### Exon 1:

```

1_3 -----ACGGAGGANCGGAGGG 16
1_4 -----GCGAGAGCACGGAGGAGCGGAGGG 24
1_1 -----CCACGGAGGAGCGGAGGG 18
reference-Exon 1 -ATAAACTACAAGCCCCAGAATGCCTTGGGCGAGACGCGAGAGCACGGAGGAGCGGAGGG 59
1_2 TATAAACTACAAGCCCCAGAATGCCTTGGGCGAGACGCGAGAGCACGGAGGAGCGGAGGG 60
      *****

1_3 GCGTGGCCACGTCGACCGCGCGGGACCGTTAAATTTGAAACTTGGCGGCTAGGGGTGTGG 76
1_4 GCGTGGCCACGTCGACCGCGCGGGACCGTTAAATTTGAAACTTGGCGGCTAGGGGTGTGG 84
1_1 GCGTGGCCACGTCGACCGCGCGGGACCGTTAAATTTGAAACTTGGCGGCTAGGGGTGTGG 78
reference-Exon 1 GCGTGGCCACGTCGACCGCGCGGGACCGTTAAATTTGAAACTTGGCGGCTAGGGGTGTGG 119
1_2 GCGTGGCCACGTCGACCGCGCGGGACCGTTAAATTTGAAACTTGGCGGCTAGGGGTGTGG 120
      *****

1_3 GCTTGAGGTGGCCGGTTTGTAGGGAGTCGTGTGCGTGCCTTGGTTCGCTTCTGTAGCTCC 136
1_4 GCTTGAGGTGGCCGGTTTGTAGGGAGTCGTGTGCGTGCCTTGGTTCGCTTCTGTAGCTCC 144
1_1 GCTTGAGGTGGCCGGTTTGTAGGGAGTCGTGTGCGTGCCTTGGTTCGCTTCTGTAGCTCC 138
reference-Exon 1 GCTTGAGGTGGCCGGTTTGTAGGGAGTCGTGTGCGTGCCTTGGTTCGCTTCTGTAGCTCC 179
1_2 GCTTGAGGTGGCCGGTTTGTAGGGAGTCGTGTGCGTGCCTTGGTTCGCTTCTGTAGCTCC 180
      *****

1_3 GAGGGCAGGTTGCGGAAGAAAGCCAGGCGGTCTGTGGCCAGAGGAAAGGCCATGCAGCA 196
1_4 GAGGGCAGGTTGCGGAAGAAAGCCAGGCGGTCTGTGGCCAGAGGAAAGGCCATGCAGCA 204
1_1 GAGGGCAGGTTGCGGAAGAAAGCCAGGCGGTCTGTGGCCAGAGGAAAGGCCATGCAGCA 198
reference-Exon 1 GAGGGCAGGTTGCGGAAGAAAGCCAGGCGGTCTGTGGCCAGAGGAAAGGCCATGCAGCA 239
1_2 GAGGGCAGGTTGCGGAAGAAAGCCAGGCGGTCTGTGGCCAGAGGAAAGGCCATGCAGCA 240
      *****

1_3 GGACGAGGACCTGAGCCAGGAATGCAGGATGGCGGC GTGAAGAAGGAAGGGGTGCTCT 256
1_4 GGACGAGGACCTGAGCCAGGAATGCAGGATGGCGGC GTGAAGAAGGAAGGGGTGCTCT 264
1_1 GGACGAGGACCTGAGCCAGGAATGCAGGATGGCGGC GTGAAGAAGGAAGGGGTGCTCT 258
reference-Exon 1 GGACGAGGACCTGAGCCAGGAATGCAGGATGGCGGC GTGAAGAAGGAAGGGGTGCTCT 299
1_2 GGACGAGGACCTGAGCCAGGAATGCAGGATGGCGGC GTGAAGAAGGAAGGGGTGCTCT 300
      *****

1_3 GAGGTAGGTACGGGAGAAAGCTGCTGGGGCTGGGCCTGAGAGAACACGGCCTGGTAGGT 316
1_4 GAGGTAGGTACGGGAGAAAGCTGCTGGGGCTGGGCCTGAGAGAACACGGCCTGGTAGGT 324
1_1 GAGGTAGGTACGGGAGAAAGCTGCTGGGGCTGGGCCTGAGAGAACACGGCCTGGTAGGT 318
reference-Exon 1 GAGGTAGGTACGGGAGAAAGCTGCTGGGGCTGGGCCTGAGAGAACACGGCCTGGTAGGT 359
1_2 GAGGTAGGTACGGGAGAAAGCTGCTGGGGCTGGG----- 335
      *****

```

```

1_3      AATAGAAGGCTCCGAC 332
1_4      AATAGAAGGCTCCGAC 340
1_1      AATAGAAGGGCT---- 330
reference-Exon 1  AATAGAAGGCTCCG-- 373
1_2      -----

```

## Exon 2:

```

reference      TATCCTTGCCAAGTTGTCCTTCTATCAGGCAATACTGTAGCCATAAACTTGAAAAACAGCT 60
2_4           -----TGTAGCCATAAACTTGAAAAACAGCT 26
2_2           -----AACTTGNCAAACAGCT 16
2_3           -----ACTTGAACAACAGCT 15
2_1           -----CTTGNAAAACAGCT 14
                ****      *
reference      AACAAAGAAGCTTAGGCATATAATAATAATAATAATTATGTGTCAGTCCACTATATTCAA 120
2_4           AACAAAGAAGCTTAGGCATATAATAATAATAATAATTNTGTGTCAGTCCACTATATTCAA 86
2_2           AACAAAGAAGCTTAGGCATATAATAATAATAATAAATTCTGTGTCAGTCCACTATATTCAA 76
2_3           AACAAAGAAGCTTAGGCATATAATAATAATAATAAATTCTGTGTCAGTCCACTATATTCAA 75
2_1           AACAAAGAAGCTTAGGCATATAATAATAATAATAAATTCTGTGTCAGTCCACTATATTCAA 74
                *****
reference      CCCAAGACCATGAATAATCACCTTTTCGGAAGACATTTACAATAATCTAGTGCTATAATAG 180
2_4           CCCAAGACCATGAATAATCACCTTTTCGGAAGACATTTACAATAATCTAGTGCTATAATAG 146
2_2           CCCAAGACCATGAATAATCACCTTTTCGGAAGACATTTACAATAATCTAGTGCTATAATAG 136
2_3           CCCAAGACCATGAATAATCACCTTTTCGGAAGACATTTACAATAATCTAGTGCTATAATAG 135
2_1           CCCAAGACCATGAATAATCACCTTTTCGGAAGACATTTACAATAATCTAGTGCTATAATAG 134
                *****
reference      TCAATGTTGGTATGAGATTTACATTTGTTTCCTTCTTCACAGTGAAGCCATGTCCCTGGA 240
2_4           TCAATGTTGGTATGAGATTTACATTTGTTTCCTTCTTCACAGTGAAGCCATGTCCCTGGA 206
2_2           TCAATGTTGGTATGAGATTTACATTTGTTTCCTTCTTCACAGTGAAGCCATGTCCCTGGA 196
2_3           TCAATGTTGGTATGAGATTTACATTTGTTTCCTTCTTCACAGTGAAGCCATGTCCCTGGA 195
2_1           TCAATGTTGGTATGAGATTTACATTTGTTTCCTTCTTCACAGTGAAGCCATGTCCCTGGA 194
                *****
reference      GGGAGATGAATGGGAAGCTGAGTAAAGAAAATGTACAACCTTTAAGGCAAGGGCGGATCAT 300
2_4           GGGAGATGAATGGGAAGCTGAGTAAAGAAAATGTACAACCTTTAAGGCAAGGGCGGATCAT 266
2_2           GGGAGATGAATGGGAAGCTGAGTAAAGAAAATGTACAACCTTTAAGGCAAGGGCGGATCAT 256
2_3           GGGAGATGAATGGGAAGCTGAGTAAAGAAAATGTACAACCTTTAAGGCAAGGGCGGATCAT 255
2_1           GGGAGATGAATGGGAAGCTGAGTAAAGAAAATGTACAACCTTTAAGGCAAGGGCGGATCAT 254
                *****
reference      GTCCACGCTTCAGGGAGCACTGGCACAAGAATCTGCCTGTAAACAATACTCTTCAGCAGCA 360
2_4           GTCCACGCTTCAGGGAGCACTGGCACAAGAATCTGCCTGTAAACAATACTCTTCAGCAGCA 326
2_2           GTCCACGCTTCAGGGAGCACTGGCACAAGAATCTGCCTGTAAACAATACTCTTCAGCAGCA 316
2_3           GTCCACGCTTCAGGGAGCACTGGCACAAGAATCTGCCTGTAAACAATACTCTTCAGCAGCA 315
2_1           GTCCACGCTTCAGGGAGCACTGGCACAAGAATCTGCCTGTAAACAATACTCTTCAGCAGCA 314
                *****
reference      GAAACG GTGTG TAGAATGGCTGAGTCTCAACCTGTCGTCATTCATCCTAAATGTTGTAGA 420
2_4           GAAACG GTGTG TAGAATGGCTGAGTCTCAACCTGTCGTCATTCATCCTAAATGTTGTAGA 386
2_2           GAAACG GTGTG TAGAATGGCTGAGTCTCAACCTGTCGTCATTCATCCTAAATGTTGTAGA 376
2_3           GAAACG GTGT----- 325
2_1           GAAACG GTGTG TAGAATGGCTGAGTCTCAACCTGTCGTCATTCATCCTAAATGTTGTAGA 374
                *****
reference      TAACGTGGGTGTGGATCCATGAGAGATGGCATAATGAGTACTTTTCAAAAATTGGTAGTA 480
2_4_komplett  TAACGTGGGTGTGGATCCATGAGAGATGGCATNATGAG----- 424
2_2_komplett  TAACGTGGGTGTGGATCCATGAGAGATGGCATNATGAG----- 414
2_3           -----
2_1_komplett  TAACGTGGGTGTGGATCCATGAGAGATGGCATTCTC----- 411

```



## Exon 3:

```

reference      --CCTGGCCTTTTCTATTCCTATAACAAACCATAAACTCTAGTGCAATAATTGA-GATC 57
3_2           TCCCTGGCCTTTTCTATTCCTATAACAAACCATAAACTCTAGTGCAATAATTGA-GATC 59
3_3           --CCTGGCCTTTTCTATTCCTATAACAAACCATAAACTCTAGTGCAATAATTAGCATC 58
3_4           -----CCTTTTCTATTCCTATAACAAACCATAAACTCTAGTGCAATAATTGA-CATC 52
3_1           -----TTAGTGCAATAATTGA-GATC 20
                ***** **

reference      AATATTACCTACTTATTACATGAATAAAAAATGGAAGTGATACTTGTTCATTGGCTGTTGT 117
3_2           AATATTACCTACTTATTACATGAATAAAAAATGGAAGTGATACTTGTTCATTGGCTGTTGT 119
3_3           AATATTACCTACTTATTACATGAATAAAAAATGGAAGTGATACTTGTTCATTGGCTGTTGT 118
3_4           AATATTACCTACTTATTACATGAATAAAAAATGGAAGTGATACTTGTTCATTGGCTGTTGT 112
3_1           AATATTACCTACTTATTACATGAATAAAAAATGGAAGTGATACTTGTTCATTGGCTGTTGT 80
                *****

reference      CACTATTGCATATGCTAACTTTTCTGTTTACATTTTCAGGGCATTGGAATATGAAATTTCG 177
3_2           CACTATTGCATATGCTAACTTTTCTGTTTACATTTTCAGGGCATTGGAATATGAAATTTCG 179
3_3           CACTATTGCATATGCTAACTTTTCTGTTTACATTTTCAGGGCATTGGAATATGAAATTTCG 178
3_4           CACTATTGCATATGCTAACTTTTCTGTTTACATTTTCAGGGCATTGGAATATGAAATTTCG 172
3_1           CACTATTGCATATGCTAACTTTTCTGTTTACATTTTCAGGGCATTGGAATATGAAATTTCG 140
                *****

reference      ATTTTACACTGGAAATGACCCTCTGGATGTTTGGGATAGGTGGGTCTTTTTATTTACAA 237
3_2           ATTTTACACTGGAAATGACCCTCTGGATGTTTGGGATAGGTGGGTCTTTTTATTTACAA 239
3_3           ATTTTACACTGGAAATGACCCTCTGGATGTTTGGGATAGGTGGGTCTTTTTATTTACAA 238
3_4           ATTTTACACTGGAAATGACCCTCTGGATGTTTGGGATAGGTGGGTCTTTTTATTTACAA 232
3_1           ATTTTACACTGGAAATGACCCTCTGGATGTTTGGGATAGGTGGGTCTTTTTATTTACAA 200
                *****

reference      GGACAATAGAAACATTAACAGATAAGTCCTTATGGCCATGT-TTCTCAAATGGGGTATA 296
3_2           GGACAATAGAAACATTAACAGATAAGTCCTTATGGCCATGTCTTCTCAAATGGGGTATA 299
3_3           GGACAATAGAAACATTAACAGATAAGTCCTTATGGCCATGT-TTCTCAAATGGGGTATA 297
3_4           GGACAATAGAAACATTAACAGATAAGTCCTTATGGCCATGT-TTCTCAAATGGGGTATA 291
3_1           GGACAATAGAAACATTAACAGATAAGTCCTTATGGCCATGT-TTCTCAAATGGGGTATA 259
                *****

reference      TGG-AGTG- 303
3_2           TGG-AGTG- 306
3_3           TGG-AGTGA 305
3_4           TGG-AGTGA 299
3_1           TGGGAGTGA 268
                *** **

```

## Exon 4

```

4_3 -----
4_4 -----
4_1 -----
reference GATACAGGCTTAGGGTATGTCATTGAGGACCTCAAAAGAAACATACTTTA 50
4_2 -----

4_3 -----CCAGAATGGGTCTTGGAGCAAGAACAAAAAGTACATGT 37
4_4 -----ATCCAGAATGGGTCTTGGAGCAAGAACAAAAAGTACATGT 39
4_1 -----ATCCAGAATGGGTCTTGGAGCAAGAACAAAAAGTACATGT 39
reference CTTCTGCTAAAATCCAGAATGGGTCTTGGAGCAAGAACAAAAAGTACATGT 100
4_2 -----ATCCAGAATGGGTCTTGGAGCAAGAACAAAAAGTACATGT 39
*****

4_3 TCAATTTAAAATGTGTTCTTATCTTTTTCTCCCATTTAGGTATATCAGC 87
4_4 TCAATTTAAAATGTGTTCTTATCTTTTTCTCCCATTTAGGTATATCAGC 89
4_1 TCAATTTAAAATGTGTTCTTATCTTTTTCTCCCATTTAGGTATATCAGC 89
reference TCAATTTAAAATGTGTTCTTATCTTTTTCTCCCATTTAGGTATATCAGC 150
4_2 TCAATTTAAAATGTGTTCTTATCTTTTTCTCCCATTTAGGTATATCAGC 89
*****

4_3 TGGACAGAGCAGAACTATCCTCAAGGTGGGAAAGGAGAGTAATATGTCAAC 137
4_4 TGGACAGAGCAGAACTATCCTCAAGGTGGGAAAGGAGAGTAATATGTCAAC 139
4_1 TGGACAGAGCAGAACTATCCTCAAGGTGGGAAAGGAGAGTAATATGTCAAC 139
reference TGGACAGAGCAGAACTATCCTCAAGGTGGGAAAGGAGAGTAATATGTCAAC 200
4_2 TGGACAGAGCAGAACTATCCTCAAGGTGGGAAAGGAGAGTAATATGTCAAC 139
*****

4_3 GTTATTAGAAAGAGCTGTAGAAGCACTACAAGGAGAAAAACGATATTATA 187
4_4 GTTATTAGAAAGAGCTGTAGAAGCACTACAAGGAGAAAAACGATATTATA 189
4_1F GTTATTAGAAAGAGCTGTAGAAGCACTACAAGGAGAAAAACGATATTATA 189
reference GTTATTAGAAAGAGCTGTAGAAGCACTACAAGGAGAAAAACGATATTATA 250
4_2 GTTATTAGAAAGAGCTGTAGAAGCACTACAAGGAGAAAAACGATATTANA 189
*****

4_3 GTGATCCTCGATTTCTCAATCTCTGGCTTAAATTAGTAAAGTCTTTCTCAA 237
4_4 GTGATCCTCGATTTCTCAATCTCTGGCTTAAATTAGTAAAGTCTTTCTCAA 239
4_1 GTGATCCTCGATTTCTCAATCTCTGGCTTAAATTAGTAAAGTCTTTCTCAA 239
reference GTGATCCTCGATTTCTCAATCTCTGGCTTAAATTAGTAAAGTCTTTCTCAA 300
4_2 GTGATCCTCGATTTCTCAATCTCTGGCTTAAATTAGTAAAGTCTTTCTCAA 239
*****

4_3 GTGCCATCTGAGTTTTAAATATTTAACTAAGAGATTTTCTCTAGAGGTAT 287
4_4 GTGCCATCTGAGTTTTAAATATTTAACTAAGAGATTTTCTCTAGAGGTAT 289
4_1 GTGCCATCTGAGTTTTAAATATTTAACTAAGAGATTTTCTCTAGAGGTAT 289
reference GTGCCATCTGAGTTTTAAATATTTAACTAAGAGATTTTCTCTAGAGGTAT 350
4_2 GTGCCATCTGAGTTTTAAATATTTAACTAAGAGATTTTCTCTAGAGGTAT 289
*****

4_3 C-TGGTATACCAAAAAAAAAAGTAAAACAGCCATTTTGAACCATTTAGTAG 336
4_4 C-TGGTATACCAAAAAAAAAAGTAAAACAGCCATTTTGAACCATTTAGTAG 339
4_1 C-TGGTATACCAAAAAAAAAAGTAAAACAGCCATTTTGAACCATTTAGTAG 338
reference C-TGGTATACCAAAAAAAAAAGTAAAACAGCCATTTTGAACCATTTAGTAG 399
4_2 C-TGGTATACCAAAAAAAAAAGTAAAACAGCCATTTTGAACCATTTAGTAG 338
*****

```

```

4_3      ATTGGAAACATTTAATAAATATGCAATACTTCTTAAATTGGT----- 378
4_4      ATTGGAAACATTTAATAAATATGCAATACTTCTTAAATTGGTTCCTACTTA 389
4_1      ATTGGAAACATTTAATAAATATGCAATACTTCTTAAATTGGTTCCTACT-- 386
reference ATTGGAAACATTTAATAAATATGCAATACTTCTTAAATTGGTTCCTACTTA 449
4_2      ATTGGAAACATTTAATAAATATGCAATACTTCTTAAATTGGTTCCTACTTA 388
          *****

```

```

4_3      -----
4_4      AAGGTGGA----- 397
4_1      -----
reference AAGGTGGACTTAAATATAGTATAATAAGGTATTTTCGCCCTTTTAAGA 497
4_2      AAGGTGGACTTAAATATAGT-----

```

## Exon 5:

```

5_2      -----TTCAATACGTGAGTAGAAATTGGTTA 26
5_3      TATCTCCAGTGATTGTTTGGCAACTAATAGGCATTCAATACGTGAGTAGAAATTGGTTA 60
reference --ATCTCCAGTGATTGTTTGGCAACTAATAGGCATTCAATACGTGAGTAGAAATTGGTTA 58
5_1      -----GCATTCAATACGTGAGTAGAAATTGGTTA 29
5_4      -----CACGTGAGTAGAAATTGGTTA 21
          *****

5_2      ACTGTTAACACTTCTGTTACAGGGGCGTTTATGCAATGAGCCTTTGGATATGTACAGTTA 86
5_3      ACTGTTAACACTTCTGTTACAGGGGCGTTTATGCAATGAGCCTTTGGATATGTACAGTTA 120
reference ACTGTTAACACTTCTGTTACAGGGGCGTTTATGCANTGAGCCTTTGGATATGTACAGTTA 118
5_1      ACTGTTAACACTTCTGTTACAGGGGCGTTTATGCAATGAGCCTTTGGATATGTACAGTTA 89
5_4      ACTGTTAACACTTCTGTTACAGGGGCGTTTATGCAATGAGCCTTTGGATATGTACAGTTA 81
          *****

5_2      CTTGCACAACCAAGGGATTGGTGTTCACCTTGCTCAGTTCATATCTCATGGGCAGAAGA 146
5_3      CTTGCACAACCAAGGGATTGGTGTTCACCTTGCTCAGTTCATATCTCATGGGCAGAAGA 180
reference CTTGCACAACCAAGGGATTGGTGTTCACCTTGCTCAGTTCATATCTCATGGGCAGAAGA 178
5_1      CTTGCACAACCAAGGGATTGGTGTTCACCTTGCTCAGTTCATATCTCATGGGCAGAAGA 149
5_4      CTTGCACAACCAAGGGATTGGTGTTCACCTTGCTCAGTTCATATCTCATGGGCAGAAGA 141
          *****

5_2      ATATGAAGCTAGAGAAAACTTTAGGAAAGCAGATGCGATATTCAGGAAGGGATTCAACA 206
5_3      ATATGAAGCTAGAGAAAACTTTAGGAAAGCAGATGCGATATTCAGGAAGGGATTCAACA 240
reference ATATGAAGCTAGAGAAAACTTTAGGAAAGCAGATGCGATATTCAGGAAGGGATTCAACA 238
5_1      ATATGAAGCTAGAGAAAACTTTAGGAAAGCAGATGCGATATTCAGGAAGGGATTCAACA 209
5_4      ATATGAAGCTAGAGAAAACTTTAGGAAAGCAGATGCGATATTCAGGAAGGGATTCAACA 201
          *****

5_2      GAAGGCTGAACCACTAGAAAGACTACAGTCCCAGCACCGGTAAACTTTCTTTGGAGCTTG 266
5_3      GAAGGCTGAACCACTAGAAAGACTACAGTCCCAGCACCGGTAAACTTTCTTTGGAGCTTG 300
reference GAAGGCTGAACCACTAGAAAGACTACAGTCCCAGCACNGGTAAACTTTCTTTGGAGCTTG 298
5_1      GAAGGCTGAACCACTAGAAAGACTACAGTCCCAGCACCGGTAAACTTTCTTTGGAGCTTG 269
5_4      GAAGGCTGAACCACTAGAAAGACTACAGTCCCAGCACCGGTAAACTTTCTTTGGAGCTTG 261
          *****

5_2      TCTTAACTCTAAAAATAATAGAAATAAATTATCTCTTTTTCATCTGAATAAAAAGTGCA 326
5_3      TCTTAACTCTAAAAATAATAGAAATAAATTATCTCTTTTTCATCTGAATAAAAAGTGCA 360
reference TCTTAACTCTAAAAATAATAGAAATAAATTATCTCTTTTTCATCTGAATAAAA-GTGC- 356
5_1      TCTTAACTCTAAAAATAATAGAAATAAATTATCTCTTTTTCATCTGAATAAAGTG- 325
5_4      TCTTAACTCTAAAAATAATAGAAA----- 285
          *****

```

## Exon 6:

```

6_3 -----
6_4 -----
bubref6 -TTGGGATATTTCTGCATTCTTCCCCAGCCTGCTCTTCTAATTTGTTTACTTTAACAAA 59
6_1 -----CTCTTCTAATTTGTTTACTTTAACAAA 27
6_2 TTGGGATATTTCTGCATTCTTCCCCAGCCTGCTCTTCTAATTTGTTTACTTTAACAAA 60

6_3 -----AATAGTGGTCACCTCACTAAAAGTTGTGCATTCTGGCT 38
6_4 --GGAAATTTTGAGTCTGGTAAAATAGTGGTCACCTCACTAAAAGTTGTGCATTCTG-CT 57
bubref6 TTGGAAATTTTGAGTCTGGTAAAATAGTGGTCACCTCACTAAAAGTTGTGCATTCTG-CT 118
6_1 TTGGAAATTTTGAGTCTGGTAAAATAGTGGTCACCTCACTAAAAGTTGTGCATTCTG-CT 86
6_2 TTGGAAATTTTGAGTCTGGTAAAATAGTGGTCACCTCACTAAAAGTTGTGCATTCTG-CT 119
      ***** **

6_3 ACTTTAGACAATTCCAAGCTCGAGTGTCTCGGCAAACCTCTGTTGGCACTTGAGAAAAGAAG 98
6_4 ACTTTAGACAATTCCAAGCTCGAGTGTCTCGGCAAACCTCTGTTGGCACTTGAGAAAAGAAG 117
bubref6 ACTTTAGACAATTCCAAGCTCGAGTGTCTCGGCAAACCTCTGTTGGCACTTGAGAAAAGAAG 178
6_1 ACTTTAGACAATTCCAAGCTCGAGTGTCTCGGCAAACCTCTGTTGGCACTTGAGAAAAGAAG 146
6_2 ACTTTAGACAATTCCAAGCTCGAGTGTCTCGGCAAACCTCTGTTGGCACTTGAGAAAAGAAG 179
      *****

6_3 AAGAGGAGGAAGTTTTTGTAGTCTTCTGTACCACAACGAAGCACACTAGCTGAACTAAAGA 158
6_4 AAGAGGAGGAAGTTTTTGTAGTCTTCTGTACCACAACGAAGCACACTAGCTGAACTAAAGA 177
bubref6 AAGAGGAGGAAGTTTTTGTAGTCTTCTGTACCACAACGAAGCACACTAGCTGAACTAAAGA 238
6_1 AAGAGGAGGAAGTTTTTGTAGTCTTCTGTACCACAACGAAGCACACTAGCTGAACTAAAGA 206
6_2 AAGAGGAGGAAGTTTTTGTAGTCTTCTGTACCACAACGAAGCACACTAGCTGAACTAAAGA 239
      *****

6_3 GCAAAGGGAAAAAGACAGCAAGAGCTCCAATCATCCGTGTAGGAGGTGCTCTCAAGGGTA 218
6_4 GCAAAGGGAAAAAGACAGCAAGAGCTCCAATCATCCGTGTAGGAGGTGCTCTCAAGGGTA 237
bubref6 GCAAAGGGAAAAAGACAGCAAGAGCTCCAATCATCCGTGTAGGAGGTGCTCTCAAGGGTA 298
6_1 GCAAAGGGAAAAAGACAGCAAGAGCTCCAATCATCCGTGTAGGAGGTGCTCTCAAGGGTA 266
6_2 GCAAAGGGAAAAAGACAGCAAGAGCTCCAATCATCCGTGTAGGAGGTGCTCTCAAGGGTA 299
      *****

6_3 AGTTTGTTAAACGTTATTTTCGGAAAACCTGTTAGTTTCTAGTGGTAAAATCATGTAAGAAG 278
6_4 AGTTTGTTAAACGTTATTTTCGGAAAACCTGTTAGTTTCTAG-GGTAAAATCATGTAAGAAG 296
bubref6 AGTTTGTTAAACGTTATTTTCGGAAAACCTGTTAGTTTCTAGTGGTAAAATCATGTAAGAAG 358
6_1 AGTTTGTTAAACGTTATTTCT----- 286
6_2 AGTTTGTTAAACGTTATTTTCGGAAAACCTGTTAGTTTCTAGGGTAAAATCATGTAAGAAGA 359
      *****

6_3 ATAATACATAAATA----- 292
6_4 ATAATACATAAATATACCTGTGGACACT----- 324
bubref6 ATAATACATAAATATACCTGTGGACACTTCTAGTTTGCTGAATACTGAGTAGCAAAAAGA 418
6_1 -----
6_2 TAATACATAAATATACCTGGGACAC----- 384

6_3 -----
6_4 -----
bubref6 AGGAAGTCAA 428
6_1 -----
6_2 -----

```

## Exon 7 und 8:

7.2	-----GGCTCTAGTTATAATGAAACATTTTACATGAGGTTTTAATATTTTT	46
7.3	-----CTCTAGTTATAATGAAACATTTTACATGAGGTTTTAATATTTTT	44
7.4	-----TAGTTATAATGAAACATTTTACATGAGGTTTTAATATTTTT	41
7.1	-----TAATGAAACATTTTACATGAGGTTTTAATATTTTT	35
reference	ATACTTTATCTGGCATCTAAGTTAATAATGAAACATTTTACATGAGGTTTTAATATTTTT	120
	*****	
7.2	GCTCCTAGCTCCAAGCCAGAACAGAGGACTCCAAAATCCATTTCTCAACAGATGCAAAA	106
7.3	GCTCCTAGCTCCAAGCCAGAACAGAGGACTCCAAAATCCATTTCTCAACAGATGCAAAA	104
7.4	GCTCCTAGCTCCAAGCCAGAACAGAGGACTCCAAAATCCATTTCTCAACAGATGCAAAA	101
7.1	GCTCCTAGCTCCAAGCCAGAACAGAGGACTCCAAAATCCATTTCTCAACAGATGCAAAA	95
reference	GCTCCTAGCTCCAAGCCAGAACAGAGGACTCCAAAATCCATTTCTCAACAGATGCAAAA	180
	*****	
7.2	TAATAGTAGAATTACTGTTTTTGTATGAAAATGCTGATGAGGCTTCTACAGCAGAGTTGTC	166
7.3	TAATAGTAGAATTACTGTTTTTGTATGAAAATGCTGATGAGGCTTCTACAGCAGAGTTGTC	164
7.4	TAATAGTAGAATTACTGTTTTTGTATGAAAATGCTGATGAGGCTTCTACAGCAGAGTTGTC	161
7.1	TAATAGTAGAATTACTGTTTTTGTATGAAAATGCTGATGAGGCTTCTACAGCAGAGTTGTC	155
reference	TAATAGTAGAATTACTGTTTTTGTATGAAAATGCTGATGAGGCTTCTACAGCAGAGTTGTC	240
	*****	
7.2	TAAGCCTACAGTCCAGCCATGGATAGCACCCCCATGCCAGGGCCAAAGAGAATGAGCT	226
7.3	TAAGCCTACAGTCCAGCCATGGATAGCACCCCCATGCCAGGGCCAAAGAGAATGAGCT	224
7.4	TAAGCCTACAGTCCAGCCATGGATAGCACCCCCATGCCAGGGCCAAAGAGAATGAGCT	221
7.1	TAAGCCTACAGTCCAGCCATGGATAGCACCCCCATGCCAGGGCCAAAGAGAATGAGCT	215
reference	TAAGCCTACAGTCCAGCCATGGATAGCACCCCCATGCCAGGGCCAAAGAGAATGAGCT	300
	*****	
7.2	GCAAGCAGGCCCTTGGAACACAGGCAGGTCTTGGAACACAGGTAAGGACTCTTAGATC	286
7.3	GCAAGCAGGCCCTTGGAACACAGGCAGGTCTTGGAACACAGGTAAGGACTCTTAGATC	284
7.4	GCAAGCAGGCCCTTGGAACACAGGCAGGTCTTGGAACACAGGTAAGGACTCTTAGATC	281
7.1	GCAAGCAGGCCCTTGGAACACAGGCAGGTCTTGGAACACAGGTAAGGACTCTTAGATC	275
reference	GCAAGCAGGCCCTTGGAACACAGGCAGGTCTTGGAACACAGGTAAGGACTCTTAGATC	360
	*****	
7.2	CAGTGCTTTGCTGACACAACAAAGACTTCACATTTAGGGTAGAGAAGTATTTTACCATC	346
7.3	CAGTGCTTTGCTGACACAACAAAGACTTCACATTTAGGGTAGAGAAGTATTTTACCATC	344
7.4	CAGTGCTTTGCTGACACAACAAAGACTTCACATTTAGGGTAGAGAAGTATTTTACCATC	341
7.1	CAGTGCTTTGCTGACACAACAAAGACTTCACATTTAGGGTAGAGAAGTATTTTACCATC	335
reference	CAGTGCTTTGCTGACACAACAAAGACTTCACATTTAGGGTAGAGAAGTATTTTACCATC	420
	*****	
7.2	TCTTTTAATTCCTCTTGAATATTTAGCCATGGTCTATATATGCTGTCTGAGAACATAAAA	406
7.3	TCTTTTAATTCCTCTTGAATATTTAGCCATGGTCTATATATGCTGTCTGAGAACATAAAA	404
7.4	TCTTTTAATTCCTCTTGAATATTTAGCCATGGTCTATATATGCTGTCTGAGAACATAAAA	401
7.1	TCTTTTAATTCCTCTTGAATATTTAGCCATGGTCTATATATGCTGTCTGAGAACATAAAA	395
reference	TCTTTTAATTCCTCTTGAATATTTAGCCATGGTCTATATATGCTGTCTGAGAACATAAAA	480
	*****	
8.2	CTATGGTAATTTAGTTTTCTTCTTCATCTCCAGCCTCGTGGCAATACAGCTTCACTGAT	466
8.3	CTATGGTAATTTAGTTTTCTTCTTCATCTCCAGCCTCGTGGCAATACAGCTTCACTGAT	464
8.4	CTATGGTAATTTAGTTTTCTTCTTCATCTCCAGCCTCGTGGCAATACAGCTTCACTGAT	461
8.1	CTATGGTAATTTAGTTTTCTTCTTCATCTCCAGCCTCGTGGCAATACAGCTTCACTGAT	455
reference	CTATGGTAATTTAGTTTTCTTCTTCATCTCCAGCCTCGTGGCAATACAGCTTCACTGAT	540
	*****	
8.2	AGCTGTACCCGCTGTGCTTCCAGTTTCACTCCATATGTGGAAGAGACTGCACAAACAGCC	526
8.3	AGCTGTACCCGCTGTGCTTCCAGTTTCACTCCATATGTGGAAGAGACTGCACAAACAGCC	524
8.4	AGCTGTACCCGCTGTGCTTCCAGTTTCACTCCATATGTGGAAGAGACTGCACAAACAGCC	521
8.1	AGCTGTACCCGCTGTGCTTCCAGTTTCACTCCATATGTGGAAGAGACTGCACAAACAGCC	515
reference	AGCTGTACCCGCTGTGCTTCCAGTTTCACTCCATATGTGGAAGAGACTGCACAAACAGCC	600
	*****	

```

8.2      AGTTATG TGAGTGTGGTTTTTGGATATTTTGAAGTGGGAATTATTAAGGGTGGGCAGAGG 586
8.3      AGTTATG TGAGTGTGGTTTTTGGATATTTTGAAGTGGGAATTATTAAGGGTGGGCAGAGG 584
8.4      AGTTATG TGAGTGTGGTTTTTGGATATTTTGAAGTGGGAATTATTAAGGGTGGGCAGAGG 581
8.1      AGTTATG TGAGTGTGGTTTTTGGATATTTTGAAGTGGGAATTATTAAGGGTGGGCAGAGG 575
reference AGTTATG TGAGTGTGGTTTTTGGATATTTTGAAGTGGGAATTATTAAGGGTGGGCAGAGG 660
*****

```

```

8.2      CACCTATTCTACTTCCCCAAAGGCAGGGTAAG- 618
8.3      CACCTATTCTACTTCCC-AAAGGCAACGGGCGT 616
8.4      CACCTATTCTACTTCCCCAAAGGCAAAAAGGC 614
8.1      CACCTATTCTACTTCCCCAAAGGCAA----- 601
reference CACCTATTCTACTTCCC-AAAGGCAG----- 685
*****

```

## Exon 9:

```

Ex9ref   TATTGATGGCCCTTGTA AATTATTTTTAGCTTCTTTTATCAATCTTATTGATTTTTTTTA 60
9_3      -----CATCTTATTGATTTTTTTTA 20
9_4      -----TCTTTATTGATTTTTTTTA 19
9_2      -----GATTTTTTTTA 11
9_1      -----TCTTATTGATTTTTTTTA 18
*****

```

```

Ex9ref   TTTTGACCCATATGAATAATAGTAATTTTGCTTCTTTAGGACACCATGTAAAATTGAACC 120
9_3      TTTTGACCCATATGAATAATAGTAATTTTGCTTCTTTAGGACACCATGTAAAATTGAACC 80
9_4      TTTTGACCCATATGAATAATAGTAATTTTGCTTCTTTAGGACACCATGTAAAATTGAACC 79
9_2      TTTTGACCCATATGAATANTAGTAATTTTGCTTCTTTAGGACACCATGTAAAATTGAACC 71
9_1      TTTTGACCCATATGAATAATAGTAATTTTGCTTCTTTAGGACACCATGTAAAATTGAACC 78
*****

```

```

Ex9ref   TAGTATAAACCCACATCCTAAGCACCAGAAAGCCTGGAAAGGAAGAAGGAGATCCTCTACA 180
9_3      TAGTATAAACCCACATCCTAAGCACCAGAAAGCCTGGAAAGGAAGAAGGAGATCCTCTACA 140
9_4      TAGTATAAACCCACATCCTAAGCACCAGAAAGCCTGGAAAGGAAGAAGGAGATCCTCTACA 139
9_2      TAGTATAAACCCACATCCTAAGCACCAGAAAGCCTGGAAAGGAAGAAGGAGATCCTCTACA 131
9_1      TAGTATAAACCCACATCCTAAGCACCAGAAAGCCTGGAAAGGAAGAAGGAGATCCTCTACA 138
*****

```

```

Ex9ref   AAGGGTTCAGAGCCATCAGCAAGCCTCTGAGGAGAAGAAAGAGAAGATGATGTATTGTAA 240
9_3      AAGGGTTCAGAGCCATCAGCAAGCCTCTGAGGAGAAGAAAGAGAAGATGATGTATTGTAA 200
9_4      AAGGGTTCAGAGCCATCAGCAAGCCTCTGAGGAGAAGAAAGAGAAGATGATGTATTGTAA 199
9_2      AAGGGTTCAGAGCCATCAGCAAGCCTCTGAGGAGAAGAAAGAGAAGATGATGTATTGTAA 191
9_1      AAGGGTTCAGAGCCATCAGCAAGCCTCTGAGGAGAAGAAAGAGAAGATGATGTATTGTAA 198
*****

```

```

Ex9ref   GGAGAAGATTTATGCAGGAGTAGGGGAATTCCTCTTTGAAGAAATTCGGGCTGAAGTTTT 300
9_3      GGAGAAGATTTATGCAGGAGTAGGGGAATTCCTCTTTGAAGAAATTCGGGCTGAAGTTTT 260
9_4      GGAGAAGATTTATGCAGGAGTAGGGGAATTCCTCTTTGAAGAAATTCGGGCTGAAGTTTT 259
9_2      GGAGAAGATTTATGCAGGAGTAGGGGAATTCCTCTTTGAAGAAATTCGGGCTGAAGTTTT 251
9_1      GGAGAAGATTTATGCAGGAGTAGGGGAATTCCTCTTTGAAGAAATTCGGGCTGAAGTTTT 258
*****

```

```

Ex9ref   CCGGAAGAAATTTAAAAGAGCAAAGGGAAGGTGTGTGTAATTCAGTTTGTGAAGAGGACT 360
9_3      CCGGAAGAAATTTAAAAGAGCAAAGGGAAGGTGTGTGTAATTCAGTTTGTGAAGAGGACT 320
9_4      CCGGAAGAAATTTAAAAGAGCAAAGGGAAGGTGTGTGTAATTCAGTTTGTGAAGAGGACT 319
9_2      CCGGAAGAAATTTAAAAGAGCAAAGGGAAGGTGTGTGTAATTCAGTTTGTGAAGAGGACT 311
9_1      CCGGAAGAAATTTAAAAGAGCAAAGGGAAGGTGTGTGTAATTCNNGTTTGTGAAGAGGACT 318
*****

```

```

Ex9ref   TAACTTAGTTGTGTAAGGTTGAGCTGACCTATTAAGTCTGAAGAAAACCTAACCTTATAG 420
9_3      TAACTTAGTTGTGTAAGGTTGAGCTGACCTATTAAGTCTGAAGAAAACCTAACCTTATAG 380
9_4      TAACTTAGTTGTGTAAGGTTGAGCTGACCTATTAAGTCTGAAGAAAACCTAACCTTATAG 379
9_2      TAACTTAGTTGTGTAAGGTTGAGCTGACCTATTAAGTCTGAAGAAAACCTAACCTTATAG 371
9_1      TAACTTAGTTGTGTAAGGTTGAGCTGACCTATTAAGTCTGAACAAAACCTAACCTTATAG 378
*****

```

```

Ex9ref      TTTGTACCTTTGTATGATGTTTCTATGGTAGTACTGTTTCTTTCTGTGTATCAGCCAAAA 480
9_3        TTTGTACCTTTGTATGATGTTTCTATGGTAGTACTGTTTCTTTCTGTGTATCAGCCAAAA 440
9_4        TTTGTACCTTTGTATGATGTTTCTATGGTAGTACTGTTTCTTTCTGTGTATCAGCCAAAA 439
9_2        TTTGTACC----- 379
9_1        TTTGTACCTTTGTATGATGTTTCTATGCAAGTACTGTTTCTTTCTGTGTATCAGCCAAAC 438
          *****

```

```

Ex9ref      TCCCCTGCTGCCTTCTATGGTTGTACTGTTTCTGTGTATCAGCCAA--- 527
9_3        TCCCCTGCTGCCTTCTATGGTTGTACTGTTTCTGTGTATCAGCCAAA-- 488
9_4        TCCCCTGCTGCCTTCTATGGTTGTACTGTTTCTGTGTATCAGCCAAATT 489
9_2        -----
9_1        TCCCCTGCTGCCTTCTATGGTTGCACGTTTCTGTGTATCAGCCAAAG- 487

```

## Exon 10:

```

10_3F      -----TTAAATCATTTCATCTGTATTAG 24
10_4R      AGAGGCCTAGACCACAAGTTGAGGACCTTATTCCACTTAAATCATTTCATCTGTATTAG 60
10_2R      AGAGGCCTAGACCACAAGTTGAGGACCTTATTCCACTTAAATCATTTCATCTGTATTAG 60
referenceExon AGAGGCCTAGACCACAAGTTGAGGACCTTATTCCACTTAAATCATTTCATCTGTATTAG 60
10_1R      -----CTAGACCACAAGTTGAGGACCTTATTCCACTTAAATCATTTCATCTGTATTAG 54
          *****

```

```

10_3F      TAACATATATGTTGAGGAGATGAGCTCCAAAGGCAGTTTTTGACAGAATGAGTTACTATG 84
10_4R      TAACATATATGTTGAGGAGATGAGCTCCAAAGGCAGTTTTTGACAGAATGAGTTACTATG 120
10_2R      TAACATATATGTTGAGGAGATGAGCTCCAAAGGCAGTTTTTGACAGAATGAGTTACTATG 120
referenceExon TAACATATATGTTGAGGAGATGAGCTCCAAAGGCAGTTTTTGACAGAATGAGTTACTATG 120
10_1R      TAACATATATGTTGAGGAGATGAGCTCCAAAGGCAGTTTTTGACAGAATGAGTTACTATG 114
          *****

```

```

10_3F      AGGAATAATACCTCAAGCAACTTTACTGTTTCTAGCCGAGCTATTGACCAGTGCAGAGAA 144
10_4R      AGGAATAATACCTCAAGCAACTTTACTGTTTCTAGCCGAGCTATTGACCAGTGCAGAGAA 180
10_2R      AGGAATAATACCTCAAGCAACTTTACTGTTTCTAGCCGAGCTATTGACCAGTGCAGAGAA 180
referenceExon AGGAATAATACCTCAAGCAACTTTACTGTTTCTAGCCGAGCTATTGACCAGTGCAGAGAA 180
10_1R      AGGAATAATACCTCAAGCAACTTTACTGTTTCTAGCCGAGCTATTGACCAGTGCAGAGAA 174
          *****

```

```

10_3F      GAGAGCAGAAATGCAGAAACAGATTGAAGAGATGGAGAAGAAGCTAAAAGAAATCCAAAC 204
10_4R      GAGAGCAGAAATGCAGAAACAGATTGAAGAGATGGAGAAGAAGCTAAAAGAAATCCAAAC 240
10_2R      GAGAGCAGAAATGCAGAAACAGATTGAAGAGATGGAGAAGAAGCTAAAAGAAATCCAAAC 240
referenceExon GAGAGCAGAAATGCAGAAACAGATTGAAGAGATGGAGAAGAAGCTAAAAGAAATCCAAAC 240
10_1R      GAGAGCAGAAATGCAGAAACAGATTGAAGAGATGGAGAAGAAGCTAAAAGAAATCCAAAC 234
          *****

```

```

10_3F      TACTCAGCAAGAAAGAACAGGTGATCAGGTAATTTTTCTTTTTTCATACACGAAACTAG- 263
10_4R      TACTCAGCAAGAAAGAACAGGTGATCAGGTAATTTTTCTTTTTTCATACACNAAACTAGA 300
10_2R      TACTCAGCAAGAAAGAACAGGTGATCAGGTAATTTTTCTTTTTTCATACACNAAACTAGA 300
referenceExon TACTCAGCAAGAAAGAACAGGTGATCAGGTAATTTTTCTTTTTTCATACACNAAACTAGA 300
10_1R      TACTCAGCAAGAAAGAACAGGTGATCAGGTAATTTTTCTTTTTTCATACACNAAACTAGA 294
          *****

```

```

10_3F      -----
10_4R      ATTTATTGAAACAAATTTAAACATTATAAAAA----- 332
10_2R      ATTTATTGAAACAAATTTAAACATTATAAAAAATATAGAAGGTTAAAGTCTCCCAACCCC 360
referenceExon ATTTATTGAAACAAATTTAAACATTATAAAAAATATAGAAGGTTAAAGTCTCCCAACCCC 360
10_1R      ATTTATTGAAACAAATTTAAACATTATAAAAAATATAGAAGGTTAAAGTCTCCCAACCCC 354

```

```

10_3F      -----
10_4R      -----
10_2R      CATTTAGAG----- 369
referenceExon CATTTAGAGTTTCTGGTAGTTTCTTAGCTGTTAGTAGCCGG 401
10_1R      CA----- 356

```

**Exon 11:**

```

11_3 -----GTTAGTGGATGTCTAGGGAA-GA 22
11_4 -----GTTAGTGGATGTCTAGGGAAAGA 23
11_2 -----TTAGTGGATGTCTAGGGAAAGA 22
11_1 -----TGTCTAGGGAAAGA 14
reference ATTGGAAATGACTTTTGTGGTACACTCATTTTGACTGTTAGTGGATGTCTAGGGAAAGA 60
                                                ***** **

11_3 GTACAGTAAAGCTAATGTTAGAACTAGAAAATAGCATTTCCTGGATGGGAGGGACATTGA 82
11_4 GTACAGTAAAGCTAATGTTAGAACTAGAAAATAGCATTTCCTGGATGGGAGGGACATTGA 83
11_2 GTACAGTAAAGCTAATGTTAGAACTAGAAAATAGCATTTCCTGGATGGGAGGGACATTGA 82
11_1 GTACAGTAAAGCTAATGTTAGAACTAGAAAATAGCATTTCCTGGATGGGAGGGACATTGA 74
reference GTACAGTAAAGCTAATGTTAGAACTAGAAAATAGCATTTCCTGGATGGGAGGGACATTGA 120
*****

11_3 TTTTGTATTATTTAATGCAAACAGCAAGAAGAGACGATGCCTACAAAGGAGACAACATAAC 142
11_4 TTTTGTATTATTTAATGCAAACAGCAAGAAGAGACGATGCCTACAAAGGAGACAACATAAC 143
11_2 TTTTGTATTATTTAATGCAAACAGCAAGAAGAGACGATGCCTACAAAGGAGACAACATAAC 142
11_1 TTTTGTATTATTTAATGCAAACAGCAAGAAGAGACGATGCCTACAAAGGAGACAACATAAC 134
reference TTTTGTATTATTTAATGCAAACAGCAAGAAGAGACGATGCCTACAAAGGAGACAACATAAC 180
*****

11_3 TGCAAATTGCTTCCGAGTCTCAGAAAATACCAGGAATGACTCTATCCAGTTCTGTTTGTGTC 202
11_4 TGCAAATTGCTTCCGAGTCTCAGAAAATACCAGGAATGACTCTATCCAGTTCTGTTTGTGTC 203
11_2 TGCAAATTGCTTCCGAGTCTCAGAAAATACCAGGAATGACTCTATCCAGTTCTGTTTGTGTC 202
11_1 TGCAAATTGCTTCCGAGTCTCAGAAAATACCAGGAATGACTCTATCCAGTTCTGTTTGTGTC 194
reference TGCAAATTGCTTCCGAGTCTCAGAAAATACCAGGAATGACTCTATCCAGTTCTGTTTGTGTC 240
*****

11_3 AAGTAACTGTTGTGCCAGGTAAGACTACATAGGTGGAAGGGACAATGCATATAGGAGGG 262
11_4 AAGTAACTGTTGTGCCAGGTAAGACTACATAGGTGGAAGGGACAATGCATATAGGAGGG 263
11_2 AAGTAACTGTTGTGCCAGGTAAGACTACATAGGTGGAAGGGACAATGCATATAGGAGGG 262
11_1 AAGTAACTGTTGTGCCAGGTAAGACTACATAGGTGGAAGGGACAATGCATATAGGAGGG 254
reference AAGTAACTGTTGTGCCAGGTAAGACTACATAGGTGGAAGGGACAATGCATATAGGAGGG 300
*****

11_3 CATTTAGAACCAACCTTTGACTCTCTAGTGCCTTGAAGTCTCCTT----- 344
11_4 CATTTAGAACCAACCTTTGACTCTCTAGTGCCTTGAAGTCTCCTT----- 344
11_2 CATTTAGAACCAACCTTTGACTCTCTAGTGCCTTGAAGTCTCCTT----- 344
11_1 CATTTAGAACCAACCTTTGACTCTCTAGTGCCTTGAAGTCTCCTT----- 344
reference CATTTAGAACCAACCTTTGACTCTCTAGTGCCTTGAAGTCTCCTTGACGTTT 352
*****

```



**Exon 12:**

```

12_1      AAAAAGCCTCTTGGACTTTTAAAAATTAACAGTTCTTTCTGTGGGTATTGAGCACATGA 60
12_4      AAAAAGCCTCTTGGACTTTTAAAAATTAACAGTTCTTTCTGTGGGTATTGAGCACNTGA 60
reference -AAAAGCCTCTTGGACTTTTAAAAATTAACAGTTCTTTCTGTGGGTATTGAGCACATGA 59
12_2      -AAAAGCCTCTTGGACTTTTAAAAATTAACAGTTCTTTCTGTGGGTATTGAGCACATGA 59
12_3      -AAAAGCCTGAAGGACTTTTAAAAATTAACAGTTCTTTCTGTGGGTATTGAGCNCATGA 59
          *****
          *****

12_1      TTTAAAACAAGTTTCTTTACAGAGAAACTTCACCTTGCGGAGAACATTTGGCAGGAACAAC 120
12_4      TTTAAAACAAGTTTNTTTACAGAGAAACTTCACNTGCGGAGAACATTTGGCAGGAACAAC 120
reference TTTAAAACAAGTTTCTTTACAGAGAAACTTCACCTTGCGGAGAACATTTGGCAGGAACAAC 119
12_2      TTTAAAACAAGTTTCTTTACAGAGAAACTTCACCTTGCGGAGAACATTTGGCAGGAACAAC 119
12_3      TTTAAAACAAGTTTCTTTACAGAGAAACTTCACCTTGCGGAGAACATTTGGCAGGAACAAC 119
          *****

12_1      CTCATTCTAAAGGTGAGTTGTATTTGACAGCCTTGAGAAGAAGCTGCTGATAACAAATGT 180
12_4      CTCATTCTAAAGGTGAGTTGTATTTGACAGCCTTGAGAAGAAGCTGCTGATAACAAATGT 180
reference CTCATTCTAAAGGTGAGTTGTATTTGACAGCCTTGAGAAGAAGCTGCTGATAACAAATGT 179
12_2      CTCATTCTAAAGGTGAGTTGTATTTGACAGCCTTGAGAAGAAGCTGCTGATAACAAATGT 179
12_3      CTCATTCTAAAGGTGAGTTGTATTTGACAGCCTTGAGAAGAAGCTGCTGATAACAAATG- 178
          *****

12_1      ATTATGTAATAAATGGT----- 197
12_4      ATTATGTAATAAATGGT----- 197
reference ATTATGTAATAAATGGTAAATATTTTAAATTATGATAAAGGGATTGAAAGACAGG 234
12_2      ATTATGTAATAAATGGTAA----- 198
12_3      -----

```

## Exon 13 und 14:

13.1	-----GTTGAAA--ATTTTCTGGTTGTCTTGA-GAGTAAA	33
13.3	-----CATGAAT--ATTTATCTGGTTGTCTTGA-GAGTAA-	32
13.2	-----TTTTAATT--TTTTTCTGGTTGTCTTGA-GAGTAAA	34
13.4	-----TAAAAATTATTTATCTGGTTGTCTTGA-GAGTAAA	34
reference	TCCTGCTTTCAAACAACACAAAATATTGATTA-ATTTATCTGGTTGTCTTGAAGAGTAAA	59
	*           ***   *****   *****	
13.1	GCATTTACTCCTAGAGTATGTATCTAGTCTCTCTTTCTCTAGGTCCAGTGTACCTTTCT	93
13.3	GCATTTACTCCTAGAGTATGTATCTAGTCTCTCTTTCTCTAGGTCCAGTGTACCTTTCT	92
13.2	GCATTTACTCCTAGAGTATGTATCTAGTCTCTCTTTCTCTAGGTCCAGTGTACCTTTCT	94
13.4	GCATTTACTCCTAGAGTATGTATCTAGTCTCTCTTTCTCTAGGTCCAGTGTACCTTTCT	94
reference	GCATTTACTCCTAGAGTATGTATCTAGTCTCTCTTTCTCTAGGTCCAGTGTACCTTTCT	119
	***** *****	
13.1	CCATTTTGGATGAGTTTCTCTTTTCAGAAAAGAAGAATAAAAGGTACGTTGTTTTTTTGT	153
13.3	CCATTTTGGATGAGTTTCTCTTTTCAGAAAAGAAGAATAAAAGGTACGTTGTTTTTTTGT	152
13.2	CCATTTTGGATGAGTTTCTCTTTTCAGAAAAGAAGAATAAAAGGTACGTTGTTTTTTTGT	154
13.4	CCATTTTGGATGAGTTTCTCTTTTCAGAAAAGAAGAATAAAAGGTACGTTGTTTTTTTGT	154
reference	CCATTTTGGATGAGTTTCTCTTTTCAGAAAAGAAGAATAAAAGGTACGTTGTTTTTTTGT	179
	***** *****	
13.1	TTTTTTGGTTTTTTTTTACTTAAGAATTTTCTGTTATTATAAGTGAGGATAAAATTAGGGG	213
13.3	TTTTTTGGTTTTTTTTTACTTAAGAATTTTCTGTTATTATAAGTGAGGATAAAATTAGGGG	212
13.2	TTTTTTGGTTTTTTTTTACTTAAGAATTTTCTGTTATTATAAGTGAGGATAAAATTAGGGG	214
13.4	TTTTTTGGTTTTTTTTTACTTAAGAATTTTCTGTTATTATAAGTGAGGATAAAATTAGGGG	214
reference	TTTTTTGGTTTTTTTTTACTTAAGAATTTTCTGTTATTATAAGTGAGGATAAAATTAGGGG	239
	***** *****	
14.1	TTACTGTTATGAAAAAATGCTAAGTGAGGTATGTCTTTTCCAGTCCTCCTGCAGATC	273
14.3	TTACTGTTATGAAAAAATGCTAAGTGAGGTATGTCTTTTCCAGTCCTCCTGCAGATC	272
14.2	TTACTGTTATGAAAAAATGCTAAGTGAGGTATGTCTTTTCCAGTCCTCCTGCAGATC	274
14.4	TTACTGTTATGAAAAAATGCTAAGTGAGGTATGTCTTTTCCAGTCCTCCTGCAGATC	274
reference	TTACTGTTATGAAAAAATGCTAAGTGAGGTATGTCTTTTCCAGTCCTCCTGCAGATC	299
	***** *****	
14.1	CCCCACGAGTTTGTAGCTCAACGAAGACCCCTTGAGTTCTCAAACCTCAGAAAGCATCA	333
14.3	CCCCACGAGTTTGTAGCTCAACGAAGACCCCTTGAGTTCTCAAACCTCAGAAAGCATCA	332
14.2	CCCCACGAGTTTGTAGCTCAACGAAGACCCCTTGAGTTCTCAAACCTCAGAAAGCATCA	334
14.4	CCCCACGAGTTTGTAGCTCAACGAAGACCCCTTGAGTTCTCAAACCTCAGAAAGCATCA	334
reference	CCCCACGAGTTTGTAGCTCAACGAAGACCCCTTGAGTTCTCAAACCTCAGAAAGCATCA	359
	***** *****	
14.1	CCTCAAATGAAGATGTGTCTCCAGATGTTTGTGTAAGGAGCAGTATCCTTAAGTTAATGT	393
14.3	CCTCAAATGAAGATGTGTCTCCAGATGTTTGTGTAAGGAGCAGTATCCTTAAGTTAATGT	392
14.2	CCTCAAATGAAGATGTGTCTCCAGATGTTTGTGTAAGGAGCAGTATCCTTAAGTTAATGT	394
14.4	CCTCAAATGAAGATGTGTCTCCAGATGTTTGTGTAAGGAGCAGTATCCTTAAGTTAATGT	394
reference	CCTCAAATGAAGATGTGTCTCCAGATGTTTGTGTAAGGAGCAGTATCCTTAAGTTAATGT	419
	***** *****	
14.1	AAATGGGCTAGTGGATTGTTTATTCAAANCCACAAAANGCTTAAGGTTAAAAATTGAAACCA	453
14.3	AAATGGGCTAGTGGATTGTTTATTCAAATCCACAAAANGCTTAAGGTTAAAAATTGAAACCA	452
14.2	AAATGGGCTAGTGGATTGTTTATTCAAATCCACAAAANGCTTAAGGTTAAAAATTGAAACCA	454
14.4	AAATGGGCTAGTGGATTGTTTATTCAAANCCACAAAANGCTTAAGGTTAAAAATTGAAACCA	454
reference	AAATGGGCTAGTGGATTGTTTATTCAAANCCACAAAANGCTTAAGGTTAAAAATTGAAACCA	479
	*****   *****   *****	
14.1	CTGACTTGAATTAAGCAA	471
14.3	CTGACTTGAATTAAGCAA	470
14.2	CTGACTTGAATTAAGCAA	472
14.4	CTGACTTGAATTAAGCAA-	471
reference	CTGACTTGAATTAAGCAA----	493
	*****	



**Exon 16:**

```

16_1 -----
16_3 -----
16_4 TATCATGCAGTTGTGCTCCAGCCTGGGTGACAAGAGCAAAACTCCATCTCAAAAAAAGA 60
Exon 16ref ATCATGC-AGTTGTGCTCCAGCCTGGGTGACAAGAGCAAAACTCCATCTCAAAAAAAGA 59
16_2 ATCATGCCAGTTGTGCTCCAGCCTGGGTGACAAGAGCAAAACTCCATCTCAAAAAAAGA 60

16_1 AAAATGTATACATTAAGAATTTATGAAATTATAACAAAGTTGATATATATTATTCCTATA 60
16_3 -----CATTAAGAATTTATGAAATTATAACAAAGTTGATATATATTATTCCTATA 50
16_4 AAAATGTATACATTAAGAATTTATGAAATTATAACAAAGTTGATATATATTATTCCTATA 120
Exon 16ref AAAATGTATACATTAAGAATTTATGAAATTATAACAAAGTTGATATATATTATTCCTATA 119
16_2 AAAATGTATACATTAAGAATTTATGAAATTATAACAAAGTTGATATATATTATTCCTATA 120
      *****

16_1 AGAATTAACTTATTTTTGATTCCTTTAGCCCAATTATTGAAGACAGTCGTGAAGCCACAC 120
16_3 AGAATTAACTTATTTTTGATTCCTTTAGCCCAATTATTGAAGACAGTCGTGAAGCCACAC 110
16_4 AGAATTAACTTATTTTTGATTCCTTTAGCCCAATTATTGAAGACAGTCGTGAAGCCACAC 180
Exon 16ref AGAATTAACTTATTTTTGATTCCTTTAGCCCAATTATTGAAGACAGTCGTGAAGCCACAC 179
16_2 AGAATTAACTTATTTTTGATTCCTTTAGCCCAATTATTGAAGACAGTCGTGAAGCCACAC 180
      *****

16_1 ACTCCTCTGGCTTCTCTGGTTCTTCTGCCTCGGTTGCAAGCACCTCCTCCATCAAATGTC 180
16_3 ACTCCTCTGGCTTCTCTGGTTCTTCTGCCTCGGTTGCAAGCACCTCCTCCATCAAATGTC 170
16_4 ACTCCTCTGGCTTCTCTGGTTCTTCTGCCTCGGTTGCAAGCACCTCCTCCATCAAATGTC 240
Exon 16ref ACTCCTCTGGCTTCTCTGGTTCTTCTGCCTCGGTTGCAAGCACCTCCTCCATCAAATGTC 239
16_2 ACTCCTCTGGCTTCTCTGGTTCTTCTGCCTCGGTTGCAAGCACCTCCTCCATCAAATGTC 240
      *****

16_1 TTCAAATTCCTGAGAACTAGAACTTACTAATGAGACTTCAGGTAGGATATACATANCAC 240
16_3 TTCAAATTCCTGAGAACTAGAACTTACTAATGAGACTTCAGGTAGGATATACATATCAC 230
16_4 TTCAAATTCCTGAGAACTAGAACTTACTAATGAGACTTCAGGTAGGATATACATANCAC 300
Exon 16ref TTCAAATTCCTGAGAACTAGAACTTACTAATGAGACTTCAGGTAGGATATACATACCAC 299
16_2 TTCAAATTCCTGAGAACTAGAACTTACTAATGAGACTTCAGGTAGGATATACATATCAC 270
      ***** ***

16_1 TATATCCATGCCTAGTGAACACTTGA 266
16_3 TATATCCATGCCTAGTGAACACTTG- 255
16_4 TATATCCATGCCTAGTGAACACTTGA 326
Exon 16ref TATATCCATGCCTAGTGAACACTTG- 324
16_2 TATATCCATGCCTAGTGAACACTTG

```

## Exon 17 und 18:

```

17_1 -----CCCTTTCCTCCCACTG 17
17_2 -----TTCCTCCCACTG 12
reference --ATCCATTTTAAAGCATTAGGGTTTTTTTGGTGATATATTTTCACCTTTCCTCCCACTG 58
17_4 -----CCCTCCCACTG 11
17_3 ATATCATTTTTTGCATTAGGGTTTTTTTGGTGATATATTTTCACCTTTCCTCCCACTG 60
*****

17_1 GCAGAAAACCCCTACTCAGTCACCATGGTGTTCACAGTATCGCAGACAGCTACTGAAGTCC 77
17_2 GCAGAAAACCCCTACTCAGTCACCATGGTGTTCACAGTATCGCAGACAGCTACTGAAGTCC 72
reference GCAGAAAACCCCTACTCAGTCACCATGGTGTTCACAGTATCGCAGACAGCTACTGAAGTCC 118
17_4 GCAGAAAACCCCTACTCAGTCACCATGGTGTTCACAGTATCGCAGACAGCTACTGAAGTCC 71
17_3 GCAGAAAACCCCTACTCAGTCACCATGGTGTTCACAGTATCGCAGACAGCTACTGAAGTCC 120
*****

17_1 CTACCAGAGTTAAGTGCCTCTGCAGAGTTGTGTATAGAAGACAGACCAATGCCTAAGTTG 137
17_2 CTACCAGAGTTAAGTGCCTCTGCAGAGTTGTGTATAGAAGACAGACCAATGCCTAAGTTG 132
reference CTACCAGAGTTAAGTGCCTCTGCAGAGTTGTGTATAGAAGACAGACCAATGCCTAAGTTG 178
17_4 CTACCAGAGTTAAGTGCCTCTGCAGAGTTGTGTATAGAAGACAGACCAATGCCTAAGTTG 131
17_3 CTACCAGAGTTAAGTGCCTCTGCAGAGTTGTGTATAGAAGACAGACCAATGCCTAAGTTG 180
*****

17_1 GAAATTGAGAAGGAAATTGAATTAGGTAAGTACCATTGAACTCATGTCCTCTGGTTCATG 197
17_2 GAAATTGAGAAGGAAATTGAATTAGGTAAGTACCATTGAACTCATGTCCTCTGGTTCATG 192
reference GAAATTGAGAAGGAAATTGAATTAGGTAAGTACCATTGAACTCATGTCCTCTGGTTCATG 238
17_4 GAAATTGAGAAGGAAATTGAATTAGGTAAGTACCATTGAACTCATGTCCTCTGGTTCATG 191
17_3 GAAATTGAGAAGGAAATTGAATTAGGTAAGTACCATTGAACTCATGTCCTCTGGTTCATG 240
*****

17_1 ACAGTATACAAATAAGTGATTATTTGTACTTAAAGCTTGATGCTTGAGCACTGTAAATATT 257
17_2 ACAGTATACAAATAAGTGATTATTTGTACTTAAAGCTTGATGCTTGAGCACTGTAAATATT 252
reference ACAGTATACAAATAAGTGATTATTTGTACTTAAAGCTTGATGCTTGAGCACTGTAAATATT 298
17_4 ACAGTATACAAATAAGTGATTATTTGTACTTAAAGCTTGATGCTTGAGCACTGTAAATATT 251
17_3 ACAGTATACAAATAAGTGATTATTTGTACTTAAAGCTTGATGCTTGAGCACTGTAAATATT 300
*****

17_1 CCTAGATTGTATTTTTTAAAAAAGCAATATAGAGGATGACACATCAGTAACCTCATGTCC 317
17_2 CCTAGATTGTATTTTTTAAAAAAGCAATATAGAGGATGACACATCAGTAACCTCATGTCC 312
reference CCTAGATTGTATTTTTTAAAAAAGCAATATAGAGGATGACACATCAGTAACCTCATGTCC 358
17_4 CCTAGATTGTATTTTTTAAAAAAGCAATATAGAGGATGACACATCAGTAACCTCATGTCC 311
17_3 CCTAGATTGTATTTTTTAAAAAAGCAATATAGAGGATGACACATCAGTAACCTCATGTCC 360
*****

17_1 TAATAATAGGAATTATGTCTTCTCCTCTTGCAATCTTTAACAAATTATTTTTAAAAGTAT 377
17_2 TAATAATAGGAATTATGTCTTCTCCTCTTGCAATCTTTAACAAATTATTTTTAAAAGTAT 372
reference TAATAATAGGAATTATGTCTTCTCCTCTTGCAATCTTTAACAAATTATTTTTAAAAGTAT 418
17_4 TAATAATAGGAATTATGTCTTCTCCTCTTGCAATCTTTAACAAATTATTTTTAAAAGTAT 371
17_3 TAATAATAGGAATTATGTCTTCTCCTCTTGCAATCTTTAACAAATTATTTTTAAAAGTAT 420
*****

17_1 TCTAGATACTACTAACTGGCAAATACACCAGTGCCTCTATCCCTTAAACCAGGAGGTAAA 437
17_2 TCTAGATACTACTAACTGGCAAATACACCAGTGCCTCTATCCCTTAAACCAGGAGGTAAA 432
reference TCTAGATACTACTAACTGGCAAATACACCAGTGCCTCTATCCCTTAAACCAGGAGGTAAA 478
17_4 TCTAGATACTACTAACTGGCAAATACACCAGTGCCTCTATCCCTTAAACCAGGAGGTAAA 431
17_3 TCTAGATACTACTAACTGGCAAATACACCAGTGCCTCTATCCCTTAAACCAGGAGGTAAA 480
*****

18_1 AGCTACAGGGCTGTATATGTTACAGTGATTTTTAAATGGAATCAAACCTTCTCAACAGG 497
18_2 AGCTACAGGGCTGTATATGTTACAGTGATTTTTAAATGGAATCAAACCTTCTCAACAGG 492
reference AGCTACAGGGCTGTATATGTTACAGTGATTTTTAAATGGAATCAAACCTTCTCAACAGG 538
18_4 AGCTACAGGGCTGTATATGTTACAGTGATTTTTAAATGGAATCAAACCTTCTCAACAGG 491
18_3 AGCTACAGGGCTGTATATGTTACAGTGATTTTTAAATGGAATCAAACCTTCTCAACAGG 540
*****

```

```

18_1      TAATGAGGATTACTGCATTAAACGAGAATACCTAATATGTGAAGATTACAAGTTATTCTG 557
18_2      TAATGAGGATTACTGCATTAAACGAGAATACCTAATATGTGAAGATTACAAGTTATTCTG 552
reference TAATGAGGATTACTGCATTAAACGAGAATACCTAATATGTGAAGATTACAAGTTATTCTG 598
18_4      TAATGAGGATTACTGCATTAAACGAGAATACCTAATATGTGAAGATTACAAGTTATTCTG 551
18_3      TAATGAGGATTACTGCATTAAACGAGAATACCTAATATGTGAAGATTACAAGTTATTCTG 600
          *****

18_1      GGTGGCGCCAAGAAACTCTGCAGAATTAACAGTAATAAAGGTGGGACTGATTCTTTATAA 618
18_2      GGTGGCGCCAAGAAACTCTGCAGAATTAACAGTAATAAAGGTGGGACTGATTCTTTATAA 612
reference GGTGGCGCCAAGAAACTCTGCAGAATTAACAGTAATAAAGGTGGGACTGATTCTTTATAA 658
18_4      GGTGGCGCCAAGAAACTCTGCAGAATTAACAGTAATAAAGGTGGGACTGATTCTTTATAA 611
18_3      GGTGGCGCCAAGAAACTCTGCAGAATTAACAGTAATAAAGGTGGGACTGATTCTTTATAA 660
          *****

18_1      TTTCAGTTACTTTGTAAATAATACGGATTGGAGCAATAACTGTCTCTGTTT----- 669
18_2      TTTCAGTTACTTTGTAAATAATACGGATTGGAGCAATAACTGTCTCTGTTTA----- 665
reference TTTCAGTTACTTTGTAAATAATACGGATTGGAGCAATAACTGTCTCTCATGTTACCATCA 718
18_4      TTTC----- 616
18_3      TTTCAGTTACTT-GTAAATAATACG-ATAACCTC----- 692
          *****

```

## Exon 19:

```

19_1      -AAGGAATGTGTTTCAACCTGCCAGCCATAACCATAGACTTAACTGAACCTTATTTTTAAA 59
19_2      -AAGGAATGTGTTTCAACCTGCCAGCCATAACCATAGACTTAACTGAACCTTATTTTTAAA 59
reference -AAGGAATGTGTTTCAACCTGCCAGCCATAACCATAGACTTAACTGAACCTTATTTTTAAA 59
19_3      TAAGGAATGTGTTTCAACCTGCCAGCCATAACCATAGACTTAACTGAACCTTATTTTTAAA 60
19_4      -----CCATANCCATAGNCTTAACTGAACCTTATTTTTAAA 35
          *****

19_1      ATACAATGTCTTACAGGTATCTTCTCAACCTGTCCCATGGGACTTTTATATCAACCTCAA 119
19_2      ATACAATGTCTTACAGGTATCTTCTCAACCTGTCCCATGGGACTTTTATATCAACCTCAA 119
reference ATACAATGTCTTACAGGTATCTTCTCAACCTGTCCCATGGGACTTTTATATCAACCTCAA 119
19_3      ATACAATGTCTTACAGGTATCTTCTCAACCTGTCCCATGGGACTTTTATATCAACCTCAA 120
19_4      ATACAATGTCTTACAGGTATCTTCTCAACCTGTCCCATGGGACTTTTATATCAACCTCAA 95
          *****

19_1      GTTAAAGGAACGTTTAAATGAAGATTTTGATCATTTTTGCAGCTGTTATCAATATCAAGA 179
19_2      GTTAAAGGAACGTTTAAATGAAGATTTTGATCATTTTTGCAGCTGTTATCAATATCAAGA 179
reference GTTAAAGGAACGTTTAAATGAAGATTTTGATCATTTTTGCAGCTGTTATCAATATCAAGA 179
19_3      GTTAAAGGAACGTTTAAATGAAGATTTTGATCATTTTTGCAGCTGTTATCAATATCAAGA 180
19_4      GTTAAAGGAACGTTTAAATGAAGATTTTGATCATTTTTGCAGCTGTTATCAATATCAAGA 155
          *****

19_1      TGGCTGTATTGTTTGGCACCAATATATAAACTGCTTCACCTTCAGGTCTGTAATACTAA 239
19_2      TGGCTGTATTGTTTGGCACCAATATATAAACTGCTTCACCTTCAGGTCTGTAATACTAA 239
reference TGGCTGTATTGTTTGGCACCAATATATAAACTGCTTCACCTTCAGGTCTGTAATACTAA 239
19_3      TGGCTGTATTGTTTGGCACCAATATATAAACTGCTTCACCTTCAGGTCTGTAATNCTAA 240
19_4      TGGCTGTATTGTTTGGCACCAATATATAAACTGCTTCACCTTCAGGTCTGT----- 207
          *****

19_1      AAACATAATTTAAAGTCCTGAAGTAGAGAGATTTGTGCTCCATTTAGC 287
19_2      AAACATAATTTAAAGT----- 255
reference AAACATAATTTAAAGTCCTGAAGTAGAGAGATTTGTGCTCCATTTAGC 287
19_3      AAACATAATTTAA----- 253
19_4      -----

```

## Exon 20:

```

20_1 -----CAGTTTTCAAGGTATTGAGTATAAC 25
20_2 ----CCAGTAGAGAACAAGGAAGACTACAAACCATCAGTTTTCAAGGTATTGAGTATAAC 56
reference CTTTCCAGTAGAGAACAAGGAAGACTACAAACCATCAGTTTTCAAGGTATTGAGTATAAC 60
20_4 -----CAAACCATCAGTTTTCAAGGTATTGAGTATAAC 33
20_3 -----CAAGGTATTGAGTATAAC 18
*****

20_1 TACGATCTGCCAAACTTGAGAAATAGTGAGTTTTCTGTCTTCAATTTCCAGGATCTTCT 85
20_2 TACGATCTGCCAAACTTGAGAAATAGTGAGTTTTCTGTCTTCAATTTCCAGGATCTTCT 116
reference TACGATCTGCCAAACTTGAGAAATAGTGAGTTTTCTGTCTTCAATTTCCAGGATCTTCT 120
20_4 TACGATCTGCCAAACTTGAGAAATAGTGAGTTTTCTGTCTTCAATTTCCAGGATCTTCT 93
20_3 TACGATCTGCCAAACTTGAGAAATAGTGAGTTTTCTGTCTTCAATTTCCAGGATCTTCT 78
*****

20_1 CCAACACAGTGAATATATTACCCATGAAATAACAGTGTGATTATTTATAACCTTTTGAC 145
20_2 CCAACACAGTGAATATATTACCCATGAAATAACAGTGTGATTATTTATAACCTTTTGAC 176
reference CCAACACAGTGAATATATTACCCATGAAATAACAGTGTGATTATTTATAACCTTTTGAC 180
20_4 CCAACACAGTGAATATATTACCCATGAAATAACAGTGTGATTATTTATAACCTTTTGAC 153
20_3 CCAACACAGTGAATATATTACCCATGAAATAACAGTGTGATTATTTATAACCTTTTGAC 138
*****

20_1 AATAGTGGAGATGCTACACAAAGCAGAAATAGTCCATGGTGACTTGAGTCCAAGGTGTCT 205
20_2 AATAGTGGAGATGCTACACAAAGCAGAAATAGTCCATGGTGACTTGAGTCCAAGGTGTCT 236
reference AATAGTGGAGATGCTACACAAAGCAGAAATAGTCCATGGTGACTTGAGTCCAAGGTGTCT 240
20_4 AATAGTGGAGATGCTACACAAAGCAGAAATAGTCCATGGTGACTTGAGTCCAAGGTGTCT 213
20_3 AATAGTGGAGATGCTACACAAAGCAGAAATAGTCCATGGTGACTTGAGTCCAAGGTGTCT 198
*****

20_1 GATTCTCAGAAACAGGTTGGTCCTTTTCATTCTTATAAATCTGCCAGCTGTCTCTTAAAA 265
20_2 GATTCTCAGAAACAGGTTGGTCCTTTTCATTCTTATAAATCTGCCAGCTGTCTCTTAAAA 296
reference GATTCTCAGAAACAGGTTGGTCCTTTTCATTCTTATAAATCTGCCAGCTGTCTCTTAAAA 300
20_4 GATTCTCAGAAACAGGTTGGTCCTTTTCATTCTTATAAATCTGCCAGCTGTCTCTTAAAA 273
20_3 GATTCTCAGAAACAGGTTGGTCCTTTTCATTCTTATAAATCTGCCAGCTGTCTCTTAAAA 258
*****

20_1 CATGGATAGTTGCCACTTTTTTTTTCTTTTTTGAGGCGAGGGTCTCACTCTGTCACCTA 325
20_2 CATGGATAGTTGCCACTTTTTTTTTCTTTTTTGAGGCGAGGGTCTCACTCTGTCACCTA 356
reference CATGGATAGTTGCCACTTTTTTTTTCTTTTTTGAGGCGAGGGTCTCACTCTGTCACCTA 360
20_4 CATGGATAGTTGCCACTTTTTTTTTCTTTTTTGAGGCGAGGGTCTCACTCTGTCACCTA 333
20_3 CATGGATAGTTGCCACTTTTTTTTTCTTTTTTGAGGCGAGGGTCTCACTCTGTCACCTA 318
*****

20_1 GGTGGAGTACAGTGGCATGATCTTGGCTCACTGCAGCCTCCATCTCCCAGGTTCAAACG 385
20_2 GGTGGAGTACAGTGGCATGATCTTGGCTCACTGCAGCCTCCATCTCCCAGGTTCAAACG 416
reference GGTGGAGTACAGTGGCATGATCTTGGCTCACTGCAGCCTCCATCTCCCAGGTTCAAACG 420
20_4 GGTGGAGTACAGTGGCATGATCTTGGCTCACTGCAGCCTCCATCTCCCAGGTTCAAACG 393
20_3 GGTGGAGTACAGTGGCATGATCTTGGCTCACTGCAGCCTCCATCTCCCAGGTTCAAACG 378
*****

20_1 ATT----- 388
20_2 ATTCTCCC----- 424
reference ATTCTCCCATCTTA 434
20_4 ATTCTCCCAT----- 403
20_3 ATTCTCCCATC-- 390

```

**Exon 21:**

```

21_3 -----TGGCATAGCTAAGATGTACCCAAGGTACCTTTTTTTTTTAAAGACCAG 48
21_4 -----GGCATAGCTAAGATGTACCCAAGGTACCTTTTTTTTTTAAAGACCAG 47
21_1 -----TAGCTAAGATGTACCCAAGGTACCTTTTTTTTTTAAAGACCAG 43
reference -----TTGTTGGCATAGCTAAGATGTACCCAAGGTACCTTTTTTTTTTAAAGACCAG 60
21_2 -----CCTTTTTTTTTAAAGACCAG 19
*****

21_3 CTATGCAGCTTCTTTTCATGGCCTATTTTTATTATCTCCTTCTCTTAAATCTGGGCTCAGA 108
21_4 CTATGCAGCTTCTTTTCATGGCCTATTTTTATTATCTCCTTCTCTTAAATCTGGGCTCAGA 107
21_1 CTATGCAGCTTCTTTTCATGGCCTATTTTTATTATCTCCTTCTCTTAAATCTGGGCTCAGA 103
reference CTATGCAGCTTCTTTTCATGGCCTATTTTTATTATCTCCTTCTCTTAAATCTGGGCTCAGA 120
21_2 CTATGCAGCTTCTTTTCATGGCCTATTTTTATTATCTCCTTCTCTTAAATCTGGGCTCAGA 79
*****

21_3 ATCCACGATCCCTATGATTGTAACAAGAACAATCAAGCTTTGAAGATAGTGGACTTTTCC 168
21_4 ATCCACGATCCCTATGATTGTAACAAGAACAATCAAGCTTTGAAGATAGTGGACTTTTCC 167
21_1 ATCCACGATCCCTATGATTGTAACAAGAACAATCAAGCTTTGAAGATAGTGGACTTTTCC 163
reference ATCCACGATCCCTATGATTGTAACAAGAACAATCAAGCTTTGAAGANAGTGGACTTTTCC 180
21_2 ATCCACGATCCCTATGATTGTAACAAGAACAATCAAGCTTTGAAGATAGTGGACTTTTCC 139
*****

21_3 TACAGTGTGACCTTAGGGTGCAGCTGGATGTTTTACCCTCAGCGGCTTTCCGGACTGTA 228
21_4 TACAGTGTGACCTTAGGGTGCAGCTGGATGTTTTACCCTCAGCGGCTTTCCGGACTGTA 227
21_1 TACAGTGTGACCTTAGGGTGCAGCTGGATGTTTTACCCTCAGCGGCTTTCCGGACTGTA 223
reference TACAGTGTGACCTTAGGGTGCANCTGGATGTTTTACCCTCAGCGGCTTTCCGGACTGTA 240
21_2 TACAGTGTGACCTTAGGGTGCAGCTGGATGTTTTACCCTCAGCGGCTTTCCGGACTGT- 198
*****

21_3 CAGATCCTGGAAGGACAAAAGATCCTGGCTAACTGTTCTTCTCCCTACCAGGTAAGTGTA 288
21_4 CAGATCCTGGAAGGACAAAAGATCCTGGCTAACTGTTCTTCTCCCTACCAGGTAAGTGTA 287
21_1 CAGATCCTGGAAGGACAAAAGATCCTGGCTAACTGTTCTTCTCCCTACCAGGTAAGTGTA 283
reference CAGATCCTGGAAGGACAAAAGATCCTGGCTAACTGTTCTTCTCCCTACCAGGTAAGTGTA 300
21_2 CAGATCCTGGAAGGACAAAAGATCCTGGCTAACTGTTCTTCTCCCTACCAGGTAAGTGTA 258
*****

21_3 AAACAAGCCTGAGCAAATATGGAGAGGGTTTCTTAATCTCTTTATTATCTAGATA----- 343
21_4 AAACAAGCCTGAGCAAATATGGAGAGGGTTTCTTAATCTCTTTATTA----- 334
21_1 AAACAAGCCTGAGCAAATA-GGAGAGGGTTTCTTAATCTCTTTATTATCTAGATAAGCTA 342
reference AAACAAGCCTGAGCAAATATGGAGAGGGTTTCTTAATCTCTTTATTATCTAGATAAGCTA 360
21_2 AAACAAGCCTGAGCAAATATGGAGAGGGTTTCTTAATCTCTTTATTATCTAGATAAGCTA 318
*****

21_3 -----
21_4 -----
21_1 -----
reference TAAAAGCTACTGTTTACTGATACCGACTCCT 391
21_2 TAAAAGCTACTGTTTACTGATACCGACTCCT 349

```



**Exon 22:**

```

reference      -----CTTCCTACCGAAATAAGCTGCCATGGTAGAGGCAGAGAA 39
bub22_4      -----CTTCCTACCGAAATAAGCTGCCATGGTAGAGGCAGAGAA 48
bub22_1      -----CTTCCTACCGAAATAAGCTGCCATGGTAGAGGCAGAGAA 48
bub22_3      -----CTTCCTACCGAAATAAGCTGCCATGGTAGAGGCAGAGAA 39
bub22_2      -----CTTCCTACCGAAATAAGCTGCCATGGTAGAGGCAGAGAA 60
                *****

reference      TTATTTTAGCTGATGGTGCCTTTTGTGATTTTCAGGTAGACCTGTTTGGTATAGCAGATTT 99
bub22_4      TTATTTTAGCTGATGGTGCCTTTTGTGATTTTCAGGTAGACCTGTTTGGTATAGCAGATTT 108
bub22_1      TTATTTTAGCTGATGGTGCCTTTTGTGATTTTCAGGTAGACCTGTTTGGTATAGCAGATTT 108
bub22_3      TTATTTTAGCTGATGGTGCCTTTTGTGATTTTCAGGTAGACCTGTTTGGTATAGCAGATTT 99
bub22_2      TTATTTTAGCTGATGGTGCCTTTTGTGATTTTCAGGTAGACCTGTTTGGTATAGCAGATTT 120
                *****

reference      AGCACATTTACTATTGTTCAAGGAACACCTACAGGTCTTCTGGGATGGGTCTTCTGGAA 159
bub22_4      AGCACATTTACTATTGTTCAAGGAACACCTACAGGTCTTCTGGGATGGGTCTTCTGGAA 168
bub22_1      AGCACATTTACTATTGTTCAAGGAACACCTACAGGTCTTCTGGGATGGGTCTTCTGGAA 168
bub22_3      AGCACATTTACTATTGTTCAAGGAACACCTACAGGTCTTCTGGGATGGGTCTTCTGGAA 159
bub22_2      AGCACATTTACTATTGTTCAAGGAACACCTACAGGTCTTCTGGGATGGGTCTTCTGGAA 180
                *****

reference      ACTTAGCCAAAATATTTCTGAGTAAGTATTGATGAATGTCAGG-TCTCTGCCTGTCCCAA 218
bub22_4      ACTTAGCCAAAATATTTCTGAGTAAGTATTGATGAATGTCAGGGTCTCTGC----- 219
bub22_1      ACTTAGCCAAAATATTTCTGAGTAAGTATTGATGAATGTCAGGGTCTCTGC----- 219
bub22_3      ACTTAGCCAAAATATTTCTGAGTAAGTATTGATGAATGTCAGGGT----- 204
bub22_2      ACTTAGCCAAAATATTTCTGAGTAAGTATTGATGAATGTCAGGGTCT----- 227
                ***** *

reference      TAATTTTCTGTTTCTCTGGGGTGTATCTCT 249
bub22_4      -----
bub22_1      -----
bub22_3      -----
bub22_2      -----

```

**Exon 23:**

```

23_3      -----CACTGAGTTAAACTAAAAGGAATTATAATTTTCATATGCCTAATC 45
23_4      -----CACTGAGTTAAACTAAAAGGAATTATAATTTTCATATGCCTAATC 45
23_2      -----CACTGAGTTAAACTAAAAGGAATTATAATTTTCATATGCCTAATC 45
23_1      -----CACTGAGTTAAACTAAAAGGAATTATAATTTTCATATGCCTAATC 45
reference   GGTGCATAAATGTACCCTGAGTTAAACTAAAAGGAATTATAATTTTCATATGCCTAATC 60
                *****

23_3      TTGATGGAAATGGTTTTATATATTTTTAGGCTAAAAGATGGTGAATTGTGGAATAAATTC 105
23_4      TTGATGGAAATGGTTTTATATATTTTTAGGCTAAAAGATGGTGAATTGTGGAATAAATTC 105
23_2      TTGATGGAAATGGTTTTATATATTTTTAGGCTAAAAGATGGTGAATTGTGGAATAAATTC 105
23_1      TTGATGGAAATGGTTTTATATATTTTTAGGCTAAAAGATGGTGAATTGTGGAATAAATTC 105
reference   TTGATGGAAATGGTTTTATATATTTTTAGGCTAAAAGATGGTGAATTGTGGAATAAATTC 120
                *****

23_3      TTTGTGCGGATTCTGAATGCCAATGATGAGGCCACAGTGTCTGTTCTTGGGGAGCTTGCA 165
23_4      TTTGTGCGGATTCTGAATGCCAATGATGAGGCCACAGTGTCTGTTCTTGGGGAGCTTGCA 165
23_2      TTTGTGCGGATTCTGAATGCCAATGATGAGGCCACAGTGTCTGTTCTTGGGGAGCTTGCA 165
23_1      TTTGTGCGGATTCTGAATGCCAATGATGAGGCCACAGTGTCTGTTCTTGGGGAGCTTGCA 165
reference   TTTGTGCGGATTCTGAATGCCAATGATGAGGCCACAGTGTCTGTTCTTGGGGAGCTTGCA 180
                *****

23_3      GCAGAAATGAATGGGGTTTTTGACACTACATTCCAAAGTCACCTGAACAAAGCCTTATGG 225
23_4      GCAGAAATGAATGGGGTTTTTGACACTACATTCCAAAGTCACCTGAACAAAGCCTTATGG 225
23_2      GCAGAAATGAATGGGGTTTTTGACACTACATTCCAAAGTCACCTGAACAAAGCCTTATGG 225
23_1      GCAGAAATGAATGGGGTTTTTGACACTACATTCCAAAGTCACCTGAACAAAGCCTTATGG 225
reference   GCAGAAATGAATGGGGTTTTTGACACTACATTCCAAAGTCACCTGNACAAAGCCTTATGG 240
                *****

```

23_3	AAGGTAGGGAAGTTAACTAGTCCTGGGGCTTTGCTCTTTTCAGTGAGCTAGGCAATCAAGT	285
23_4	AAGGTAGGGAAGTTAACTAGTCCTGGGGCTTTGCTCTTTTCAGTGAGCTAGGCAATCAAGT	285
23_2	AAGGTAGGGAAGTTAACTAGTCCTGGGGCTTTGCTCTTTTCAGTGAGCTAGGCAATCAAGT	285
23_1	AAGGTAGGGAAGTTAACTAGTCCTGGGGCTTTGCTCTTTTCAGTGAGCTAGGCAATCAAGT	285
reference	AAGGTANNGAAGTTAACTAGTCCTGGGGCTTTGCTCTTTTCAGTGAGCTAGGCAATCAAGT	300
	*****	
23_3	CTCACAGATTGCTGCCTCAGAGCAATGGTTGTATTGTGGAACACTGAAACTGTATGTGCT	345
23_4	CTCACAGATTGCTGCCTCAGAGCAATGGTTGTATTGTGGAACACTGAAACTGTATGTGCT	345
23_2	CTCACAGATTGCTGCCTCAGAGCAATGGTTGTATTGTGGAACACTGAAACTGTATGTGCT	345
23_1	CTCACAGATTGCTGCCTCAGAGCAATGGTTGTATTGTGGAACACTGAAACTGTATGTGCT	345
reference	CTCACAGATTGCTGCCTCAGAGCAATGGTTGTATTGTGGAACACTGAAACTGTATGTGCT	360
	*****	
23_3	GTAATTTAATTTAGGACACATTTAGATGCACTACCATTGCTGTTCTACTTTTTGGTACAG	405
23_4	GTAATTTAATTTAGGACACATTTAGATGCACTACCATTGCTGTTCTACTTTTTGGTACAG	405
23_2	GTAATTTAATTTAGGACACATTTAGATGCACTACCATTGCTGTTCTACTTTTTGGTACAG	405
23_1	GTAATTTAATTTAGGACACATTTAGATGCACTACCATTGCTGTTCTACTTTTTGGTACAG	405
reference	GTAATTTAATTTAGGACACATTTAGATGCACTACCNTTGGCTGTTCTACTTTTTGGTACAG	420
	*****	
23_3	GTATATTTTGACGTCACCTGATATTTTTTATACAGTGATATACTTACTCATGGCCTTGCT	465
23_4	GTATATTTTGACGTCACCTGATATTTTTTATACAGTGATATACTTACTCATGGCCTTGCT	465
23_2	GTATATTTTGACGTCACCTGATATTTTTTATACAGTGATATACTTACTCATGGCCTTGCT	465
23_1	GTATATTTTGACGTCACCTGATATTTTTTATACAGTGATATACTTACTCATGGCCTTGCT	465
reference	GTATATTTTGACGTCACCTGATATTTTTTATACAGTGATATACTTACTCATGGCCTTGCT	480
	*****	
23_3	AACTTTTGTGAAGAACTATTTTATTCTAAACAGACTCATTACAAATGGTTACCTTGTAT	525
23_4	AACTTTTGTGAAGAACTATTTTATTCTAAACAGACTCATTACAAATGGTTACCTTGTAT	525
23_2	AACTTTTGTGAAGAACTATTTTATTCTAAACAGACTCATTACAAATGGTTACCTTGTAT	525
23_1	AACTTTTGTGAAGAACTATTTTATTCTAAACAGACTCATTACAAATGGTTACCTTGTAT	525
reference	AACTTTTGTGAAGAACTATTTTATTCTAAACAGACTCATTACAAATGGTTACCTTGTAT	540
	*****	
23_3	TTAACCCATTTGCTCTACTTTTCCCTGTACTTTTCCCATTTGTAATTTGTAAAATGTTT	585
23_4	TTAACCCATTTGCTCTACTTTTCCCTGTACTTTTCCCATTTGTAATTTGTAAAATGTTT	585
23_2	TTAACCCATTTGCTCTACTTTTCCCTGTACTTTTCCCATTTGTAATTTGTAAAATGTTT	585
23_1	TTAACCCATTTGCTCTACTTTTCCCTGTACTTTTCCCATTTGTAATTTGTAAAATGTTT	585
reference	TTAACCCATTTGCTCTACTTTTCCCTGTACTTTTCCCATTTGTAATTTGTAAAATGTTT	600
	*****	
23_3	TCTTATGATCACCATGTATTTTGTAAATAATAAAAATAGTATCTGTTAAATTTGTGCTTCT	645
23_4	TCTTATGATCACCATGTATTTTGTAAATAATAAAAATAGTATCTGTTAAATTTGTGCTTCT	645
23_2	TCTTATGATCACCATGTATTTTGTAAATAATAAAAATAGTATCTGTTAAATTTGTGCTTCT	645
23_1	TCTTATGATCACCATGTATTTTGTAAATAATAAAAATAGTATCTGTTAAATTTGTGCTTCT	645
reference	TCTTATGATCNCCATGTATTTTGTAAATAATAAAAATAGTATCTGTTAAATTTGTGCTTCT	660
	*****	
23_3	AACATGTCATGTAGTTTTTGCAAATAAAAATAACAGATGGCTTAACTTTGCAGAGATGAA	705
23_4	AACATGTCATGTAGTTTTTGCAAATAAAAATAACAGATGGCTTAACTTTGCAGAGATGAA	705
23_2	AACATGTCATGTAGTTTTTGCAAATAAAAATAACAGATGGCTTAACTTTGCAGAGATGAA	705
23_1	AACATGTCATGTAGTTTTTGCAAATAAAAATAACAGATGGCTTAACTTTGCAGAGATGAA	705
reference	AACATGTCATGTAGTTTTTGCAAATAAAAATAACAGATGGCTTAACTTTGCAGAGATGAA	720
	*****	
23_3	CTATTTTGCCATGGAAATTTATAT-----	729
23_4	CTATTTTGCCATGGAAATTTATAT-----	729
23_2	CTATTTTGCCATGGAAATTTATAT-----	729
23_1	CTATTTTGCCATGGAAATTTATAT-----	729
reference	CTATTTTGCCATGGAAATTTATATATCCTAGACTTCGAATTGTTACAAATAGGGTTGTGAT	780
	*****	
23_3	-----	
23_4	-----	
23_2	-----	
23_1	-----	
reference	GAGACAGAG 789	

Ort	SNP	Kontrolle Nr. 66	Fam11 Nr. 834	Fam11 Nr. 744	Fam9 Nr. 568
Exon 1	rs2277559	A/G	G/G	G/G	A/G
Exon 1	rs7168394	G/G	G/G	G/G	G/G
Intron1	rs3214012	C/C	C/C	C/C	A/C
Intron2	rs17668261	A/A	A/A	?/?	A/A
Intron2	rs16970425	A/A	A/A	A/A	A/A
Exon 4	rs1801389	G/G	G/G	G/G	G/G
Exon 4	rs28989189	T/T	T/T	T/T	T/T
Intron 4	rs11415268	T/T	T/T	T/T	T/T
Exon 5	rs35923791	A/A	A/A	A/A	A/A
Exon 5	rs28989186	C/C	C/C	C/C	C/C
Exon 8	rs1801376	A/G	A/A	A/A	A/G
Exon 9	rs17851677	C/C	C/C	C/C	C/C
Exon 9	rs10417130	G/G	G/A	A/A	G/G
Exon 9	rs1017842	G/G	G/G	G/G	G/G
Exon 9	rs28989188	A/A	A/A	A/A	A/A
Intron 10	rs2172742	A/G	G/G	G/G	A/G
Intron 10	rs8029992	G/G	G/G	G/G	G/G
Intron 12	rs11858983	A/A	A/A	A/A	A/A
Exon 13	rs17411972	T/T	T/T	T/T	T/T
Exon 14	rs2898187	G/G	G/G	G/G	G/G
Intron 14	rs241248	A/T	T/T	T/T	A/T
Intron 14	rs12898804	A/C	C/C	C/C	A/C
Exon 15	rs1801528	T/T	T/T	T/T	T/T
Intron 16	rs116304664	C/T	T/T	T/T	C/T
Intron 17	rs13380241	T/T	T/T	T/T	T/T
Exon 19	rs28989182	G/G	G/G	G/G	G/G
Exon 19	rs34999621	C/C	C/C	C/C	C/C
Exon 19	rs2898181	C/C	C/C	C/C	C/C
Exon 21	rs28989184	T/T	T/T	T/T	T/T
Exon 21	rs28989183	G/G	G/G	G/G	G/G
Exon 22	rs34790429	C/C	C/C	C/C	C/C
Exon 22	rs35549819	-	-	-	-
Exon 23	rs34998711	A/A	A/A	A/A	A/A
Exon 23	rs28989185	T/T	T/T	T/T	T/T
Exon 23	rs34700927	A/A	A/A	A/A	A/A
Exon 23	rs35611758	A/A	A/A	A/A	A/A
Exon 23	rs35008769	G/G	G/G	G/G	G/G
Exon 23	rs8364	A/A	A/A	A/A	A/A
Exon 23	rs1047193	A/A	A/A	A/A	A/A

Tabelle 7.2.1: Allelvarianten der Polymorphismen in *BUB1B*

## Danksagung

Mein Dank geht an Professor Jobst Meyer, für seine Unterstützung und die Möglichkeit meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Des Weiteren geht mein Dank an Professor Claude Muller, für seine Bereitschaft zur Übernahme des Koreferates und der Möglichkeit einige meiner Experimente in seinen Laboren durchführen zu dürfen.

Danken möchte ich auch all meinen Kollegen aus der Verhaltensgenetik, die mich durch die letzten Jahre begleitet haben: Dr. Savira Ekawardhani, Dr. Dirk Moser, Dr. Haukur Palmason, Michelle Lin, Thorsten Kranz, Ulrike Schülter, Rita Reinke, Christian Vogler, Jessica Sigmund, Anne Molitor, Fabian Streit, Henriette Wagner, Julia Herrmann, Frauke Steiger, Jessica Salzig, Katharina Berens und Susanne Weyand.

Neben der fachlichen Unterstützung möchte ich mich nochmals besonders bedanken bei: Dr. Savira Ekawardhani für die stetige Hilfsbereitschaft und Fröhlichkeit, Michelle Lin für die lustige und unterhaltsame Zeit während und auch außerhalb des Laboralltags, Dr. Haukur Palmason für die Einblicke in die isländische Kultur, insbesondere der leckeren Haifisch-Snacks und Anisliköre, Thorsten Kranz für die lebhaftige Zeit und die lustigen Momente im Labor und Dr. Dirk Moser für den interessanten Erfahrungsaustausch über Luci-Assays.

Ganz besonders möchte ich mich auch noch mal bei Fabian Streit und Christian Vogler bedanken, die mir bei allen Fragen zur Statistik tatkräftig zur Seite gestanden haben. Vielen Dank auch an Julia Herrmann für die Unterstützung bei der Assoziationsstudie.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der AG Muller für die wirklich gute Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank geht hierbei an Dr. Jonathan Turner, für die vielen guten Anregungen, Diskussionen und Hilfestellungen während meiner Experimente in Luxemburg. Auch Simone Alt und Dr. Andrea Schote-Frese möchte ich für die stetige Hilfsbereitschaft danken.

Herrn Professor Dirk Hellhammer danke ich für die interessanten Gespräche und die Möglichkeit, einen Teil seiner Laborausstattung mitnutzen zu dürfen. In diesem Zusammenhang auch ein Dankeschön an alle seine Mitarbeiter: Dr. Andrea Gierens, Monika

Rendenbach, Celine Pleimling, Nicole Reinert, Annemie Fritzen, Irmtraud Reinert, Sabine Albertz und Christel Neu.

Herzlichen Dank auch nach Leiden an Melly Oitzel, Yanina Revsin und Maaïke van der Mark, für die Bereitstellung der murinen Gehirngewebe. In diesem Zusammenhang auch vielen Dank an Christian Deuter für die Hilfe bei der Organisation.

Einen herzlichen Dank an Dr. Matthias Eckhardt von der Universität Bonn, für die zur Verfügung Stellung der murinen Astrozytenzelllinie, ohne die ich einen Großteil meiner Experimente nicht hätte durchführen können.

Danke auch an die Deutsche Forschungsgemeinschaft, durch die diese Arbeit finanziell unterstützt wurde.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Silke Appenzeller, Thomas Sorkalla und Andrea Jöhren für fachlich anregende Gespräche, wertvolle Tipps und Informationen, sowie auch für das kritische Durchlesen meiner Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön an meine Eltern, dass sie jederzeit für mich da waren und sind.

Und ein ganz besonderer Dank geht an meinen Freund Mario, der mir die ganze Zeit mit unermüdlicher Geduld fachlich und menschlich zur Seite gestanden hat.

**Danke!**

**Eidesstattliche Erklärung:**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Die Arbeit wurde auch an keiner anderen Universität zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

....., den .....

---

Darja Henseler