

# Genexpressionsanalyse beim X-chromosomalen Dystonie-Parkinson-Syndrom

---

Mária Grznárová

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines **Doktors**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Genexpressionsanalyse**  
**beim X-chromosomalen Dystonie-Parkinson-Syndrom**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Mária Grznárová**

aus Topolčany

Gießen 2011

Aus dem Institut für Humangenetik  
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen  
Leiter: Prof. Dr. U. Müller

Gutachter: Prof. Dr. U. Müller

Gutachter: Prof. Dr. B. Neubauer

Tag der Disputation: 28. 06. 2012

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	8
1.1 Dystonien.....	8
1.1.1 Einteilung von Dystonien.....	8
1.1.2 Primäre Dystonien.....	9
1.1.3 Sekundäre Dystonien .....	11
1.2 Das X-chromosomale Dystonie-Parkinson-Syndrom (XDP).....	11
1.2.1 Phänotyp.....	12
1.2.2 Therapie.....	13
1.2.3 Neuropathologischer Befund.....	13
1.2.4 Prävalenz und Erbgang.....	14
1.2.5 Identifizierung des DYT3-Locus.....	15
1.2.6 TAF1/DYT3 multiples Transkriptsystem.....	18
1.3 Zielsetzung.....	22
2 Materialien.....	23
2.1 Laborgeräte.....	23
2.2 Chemikalien.....	24
2.3 Enzyme.....	26
2.4 Oligonukleotide.....	27
2.5 Kits.....	28
2.6 Lösungen und Puffer .....	29
2.7 Bakterienstämme und humane Zelllinien.....	30
2.8 Medien.....	30
2.9 Plasmide.....	31
3 Methoden.....	33
3.1 Bearbeitung der DNA und RNA.....	33
3.1.1 Isolierung von genomischer DNA .....	33
3.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA.....	33
3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA.....	33
3.1.4 Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration.....	34
3.1.5 Fällung von DNA.....	34
3.1.6 Reverse Transkription .....	34
3.2 PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	35

3.2.1 Design der Primer .....	36
3.2.2 Nested-Primer-PCR.....	37
3.2.3 Quantitative PCR (Real-Time PCR, qPCR, QPCR).....	37
3.3 Gelelektrophorese.....	39
3.3.1 Agarose-Gel.....	39
3.3.2 Agarose-Formaldehyd-Gel.....	39
3.4 Sequenzierung .....	40
3.5 Zellkultur.....	42
3.5.1 Auftauen, Kultivieren und Einfrieren von SK-N-AS-Zellen.....	42
3.6 Klonierung der Expressionsvektoren .....	43
3.6.1 Restriktionsverdau.....	43
3.6.2 Dephosphorylierung.....	44
3.6.3 Amplifikation des DYT3 Exon d3 und Exon d4 Wild-Typ (WT) Inserts.....	44
3.6.4 Transformation und Kultivierung von E.coli .....	45
3.6.5 Mutagenese zur Generierung von DSC3.....	46
3.6.6 Amplifikation der DSC3- und WT-Exon d3 und d4 Inserts aus TOPO-Vektoren ...	47
3.6.7 Ligation.....	48
3.7 Transfektion.....	49
3.8 Microarray-Genexpressionsanalyse.....	50
3.8.1 Analyse Microarray-Daten .....	51
3.8.2 Bestätigung der Microarray-Daten .....	51
4 Ergebnisse.....	52
4.1 Transfektanten.....	52
4.2 Kontrolle der Überexpression.....	53
4.3 Microarray-Genexpressionsanalyse.....	54
4.4 Vergleich der Microarray-Daten mit dem Allen Mouse Brain Reference Atlas.....	57
4.5 Auswahl der XDP-Kandidatengene.....	59
4.6 Bestätigung der Kandidatengene durch Real-Time PCR.....	60
4.6.1 CHGB.....	61
4.6.2 DBH.....	61
4.6.3 CHGA.....	62
4.6.4 NPTX2.....	62
4.6.5 GREM1.....	63
4.6.6 CRH.....	63
4.6.7 ANXA10.....	64

4.7 Analyse mit Hilfe von DAVID.....	64
4.7.1 Functional Annotation Clustering.....	66
5 Diskussion.....	69
5.1 Methoden zur Genexpressionsanalyse.....	70
5.1.1 Microarrayanalyse.....	70
5.1.2 Analyse der Microarray-Daten mit Hilfe des Allen Mouse Brain Reference Atlas.....	71
5.1.3 Real-Time PCR zur Validierung der Microarray-Genexpressionsdaten .....	73
5.2 Die Kandidatengene.....	74
5.2.1 Chromogranin B (Secretogranin 1, CHGB).....	74
5.2.2 Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (Dopamin- $\beta$ -Monooxygenase, DBH) .....	75
5.2.3 Chromogranin A (Parathyroid secretory Protein, CHGA).....	77
5.2.4 Neuronal Pentraxin II (NPTX2).....	78
5.2.5 Gremlin 1 (GREM1) .....	80
5.2.6 Corticotropin-releasing Hormon (CRH, Corticotropin-Releasing Faktor).....	81
5.2.7 Annexin A10 (ANXA10).....	82
5.3 Regulation der Genexpression.....	84
5.4 Functional Annotation Clustering.....	86
5.4.1 Annotation Cluster 1.....	86
5.4.2 Annotation Cluster 2.....	89
5.4.3 Annotation Cluster 3.....	90
5.5 Ausblick.....	90
6 Zusammenfassung.....	92
6.1 Deutsche Zusammenfassung.....	92
6.2 English Summary.....	93
7 Literaturverzeichnis.....	95
8 Abkürzungen.....	118
Anhang.....	121
Erklärung.....	126
Danksagung.....	127
Lebenslauf.....	128

# 1 Einleitung

## 1.1 Dystonien

Das Krankheitsbild der Dystonie zeigt sich durch „unwillkürliche langanhaltende Muskelkontraktionen eines oder mehrerer Körperteile, was sich in drehenden, sich wiederholenden Bewegungen oder in einer abnormalen Körperhaltung äußert“ (Fahn et al., 1987).

### 1.1.1 Einteilung von Dystonien

Es gibt einige Möglichkeiten Dystonien zu klassifizieren. Eine davon ist die Einteilung nach betroffenen Körperteilen. Dies ist sehr hilfreich für die Therapie und die Prognose der Erkrankung. Wir unterscheiden fokale Dystonien, bei denen nur einzelne Körperteile betroffen sind, wie zum Beispiel das Augenlid (Blepharospasmus), der Mund (oromandibuläre Dystonie) oder der Hals (Torticollis spasmodicus) (Németh, 2002) und weiter segmentale Dystonien, die mehrere benachbarte Körperteile betreffen. Bei generalisierten Dystonien sind unterschiedliche Muskelgruppen des ganzen Körpers betroffen: Beide untere Extremitäten und mindestens noch ein Körperteil (Albanese et al., 2006).

Eine weitere Möglichkeit Dystonien zu klassifizieren, ist das Erkrankungsalter. Wenn eine Dystonie in der Kindheit oder Jugend an einer Extremität, insbesondere an einer unteren beginnt, tendiert sie zur Generalisierung und ist häufig genetisch bedingt. Eine Dystonie mit späterem Beginn befällt selten die unteren Extremitäten, bleibt zumeist fokal begrenzt und kommt nur sporadisch vor (Klein et al., 2000).

Eine andere Möglichkeit der Einteilung unterscheidet Dystonien anhand der Ätiologie aber auch anhand genetischer Aspekte in primäre und sekundäre Dystonien (Fahn et al., 1998, Müller und Kupke, 1990).

### 1.1.2 Primäre Dystonien

Primäre Dystonien lassen sich in drei Gruppen unterteilen: Bei primären „puren“ Dystonien ist die Dystonie das Leitsymptom. Sie sind häufig monogen vererbt. Bei den Dystonien-plus, diese sind auch monogen vererbt, wird die Dystonie von anderen Bewegungstörungen wie zum Beispiel Myoklonus oder Parkinsonismus begleitet. Die dritte Gruppe schließt Dyskinesien (paroxysmale Dystonien) ein. Diese sind gekennzeichnet durch kurze dystone Episoden, zwischen denen die Patienten asymptomatisch sind. Eine Übersicht über die monogen-vererbten primären Dystonien bieten die Tabellen 1 und 2 (Müller, 2009). Bei den primären Dystonien ist der neuropathologische Befund häufig unauffällig (Albanese et al., 2006, Müller, 2009).

**Tabelle 1: Autosomal-dominant vererbte primäre Dystonien**

UnterGruppe	Bezeichnung		OMIM Referenz	Chrom. Region	Gen
„Pure“ Dystonie	Dystonie 1	„Early-onset“ Dystonie, Idiopathische Torsionsdystonie, „Dystonia musculorum deformans“	128 100	9q34	TOR1A
	Dystonie 4	Hereditäre „whispering dysphonia“	128 101	-	-
	Dystonie 6	Idiopathische Torsionsdystonie gemischten Typs	602 629	8p11.21	THAP1
	Dystonie 7	Fokale „adult-onset“ Dystonie, idiopathische fokale Dystonie	602 124	18p	-
	Dystonie 13	Primäre Dystonie gemischten Phänotyps	607 671	1p36.13-p36.32	-
Dystonie plus	Dystonie 5a	DRD; Segawa-Syndrom, hereditäre progressive Dystonie mit ausgeprägter tageszeitlicher Fluktuation, HPD	128 230	14q22.1-q22.2	GCH1
	Dystonie 11	M-D, Alkohol-responsive Dystonie	159 900	7q21	SGCE
	Dystonie 12	„Rapid-onset“ Dystonie Parkinson	128 235	19q12-q13.2	ATP1A3
	Dystonie 15	M-D	607 488	18p11	-

## Einleitung

Paroxysmale Dystonie	Dystonie 8	PDC; PNKD1; nicht kinesio gene Choreoathetose, Mount-Reback disease	118 800	2q35	<i>PNKD1/MR1</i>
	Dystonie 9	PDC mit episodischer Ataxie und Spastik ; episodische Choreoathetose/Spastik (CSE)	601 042	1p21-p13.3	-
	Dystonie 10	PKC; paroxysmale familiäre Dystonie; PKD	128 200	16p11.2-q12.1	-
	Dystonie 18	Paroxysmale durch Anstrengung induzierte Dyskinesie; paroxysmale durch Bewegung induzierte Dystonie	612 126	1p31.3-p35	<i>SLC2A1</i>
	(Dystonie 19)	PKD2	611 031	16q13-q22.1	-
	(Dystonie 20)	PNKD2	611 147	2q31	-

ATP1A3=Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-transportierende-ATPase, alpha 3 Polypeptid, DRD=Dopa-responsive-Dystonie, GCH=GTP-Cyclohydroxylase, MR=Myofibrillo-Genese-Regulator, SGCE=ε-Sarcoglycan, PDC=paroxysmale dystone Choreoathetose, PKC=paroxysmale kinesio gene Choreoathetose, PKD=paroxysmale kinesio gene Dyskinesie, PNKD=paroxysmale nicht kinesio gene Dyskinesie, SLC=Solute-Carrier Familie, THAP=Thanatos-assoziertes Protein, TORA=TorsinA, MD=Myoclonusdystonie

**Tabelle 2: Autosomal- und X-chromosomal-rezessiv vererbte primäre Dystonien**

Untergruppe	Bezeichnung		Erbgang	OMIM Referenz	Chrom. Region	Gen
„Pure“ Dystonie	Dystonie 2	Autosomal-rezessive Torsionsdystonie	AR	224 500	-	-
	Dystonie 17	Autosomal-rezessive Torsionsdystonie	AR	612 406	20p11.22-q13.12	-
Dystonia plus	Dystonie 5b	Autosomal-rezessive DRD; Autosomal-rezessives Segawa-Syndrom	AR	128 230	11p15.5	<i>TH</i>
	Dystonie 16	Autosomal-rezessive Dystonie Parkinson	AR	612 067	2q31.3	<i>PRKRA</i>
	Dystonie 3	XDP; „lubag“	XR	314 250	Xq13.1	<i>TAF1/DYT3</i>

AR=autosomal-dominant, DRD=Dopa-responsive-Dystonie, PRKRA=Protein-Kinase, Interferon-induzierbare Doppel-Strang-RNA-abhängiger Aktivator, TAF=TATA-Box-Bindungs-Protein assoziierter Faktor, TH=Tyrosin-Hydroxylase, XDP=X-chromosomale Dystonie-Parkinson-Syndrom, XR=X-chromosomal-rezessiv

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden 17 monogen-vererbte Dystonien mit den entsprechenden Dystonie-Loci *DYT1-4, 5a, b, 6-8, 10-13, 15-18* beschrieben. Die Vererbung erfolgt zum Teil autosomal-dominant wie bei *DYT1, 4, 5a, 6-8, 10-13, 15, 18* (Tabelle 1). Bei *DYT9, DYT19, DYT20* könnte es sich möglicherweise um 3 zusätzliche autosomal-dominant vererbte Formen der Dystonie handeln. Wie Kopplungsanalysen gezeigt haben, befinden sich ihre Loci sehr nah an den bekannten Dystonie-Loci von *DYT18, 10* und *8* oder überlappen mit diesen sogar. Im Gegensatz zu den autosomal-dominant vererbten Dystonien werden *DYT2, 5b, 16* und *17* autosomal-rezessiv und die Dystonie *3 (DYT3)* wird X-chromosomal-rezessiv vererbt (Tabelle 2) (Müller, 2009).

### 1.1.3 Sekundäre Dystonien

Bei sekundären Dystonien tritt die Dystonie als Begleitsymptom einer anderen bekannten, häufig neurologischen Störung (Traumata, vaskuläre Lesionen, Infektionen, Hirntumoren und so weiter) auf, wobei auch Medikamente und Toxine als Auslöser in Frage kommen. Beobachtet wurden sekundäre Dystonien auch bei mehr als 42 hereditären neurodegenerativen Erkrankungen - unter anderem bei Morbus Huntington, juvenilem Morbus Parkinson oder Morbus Wilson. Nicht zu vergessen ist die selten diagnostizierte, weil schwer erkennbare psychogene Dystonie (Breakefield et al., 2008, Thyagarajan, 1999).

## 1.2 Das X-chromosomale Dystonie-Parkinson-Syndrom (XDP)

Zum ersten Mal wurde im Jahre 1976 von einer familiären Torsionsdystonie, die mit einer ungewöhnlich hohen Prävalenz auf der philippinischen Insel Panay auftritt, berichtet. Von der dortigen Bevölkerung wird sie „Lubag“ genannt, was im lokalen Dialekt „verdreht“ bedeutet (Lee et al., 1976). Im medizinischen Umfeld gebräuchlich ist die von Lee et al. in 1991 vorgeschlagene Bezeichnung „X-chromosomales Dystonie-Parkinson-Syndrom“ (X-linked dystonia-parkinsonism syndrom, XDP, OMIM 314 250). Klassifiziert wird XDP als Dystonie-plus.

### 1.2.1 Phänotyp

Das mittlere Erkrankungsalter liegt im Erwachsenenalter bei etwa 35 +/- 8 Jahren (Graeber et al., 1992).

Eine Untersuchung von 373 Patienten hat gezeigt, dass bei 33% der Patienten die Erstmanifestation der Erkrankung in den unteren Extremitäten erfolgt, bei 27% am Kopf (zum Beispiel am Kiefer - oromandibuläre Dystonie, am Lid - Blepharospasmus), bei 25% am Hals (Torticollis) und an den Schultern, bei 14% in den oberen Extremitäten und bei 1% am Rumpf (Lee et al., 2001).

Dabei hat die Lokalisation der Erstsymptome offensichtlich keinen Einfluss auf die Prognose der Erkrankung. Wie die Bezeichnung der Erkrankung vermuten lässt, kann die Dystonie von Parkinsonismus begleitet werden. Die Untersuchungen von *Lee et al.* von 1991 stellten bei 36% der Patienten mindestens eines der Parkinson-Symptome wie Tremor, Bradykinesien, Rigidität, Verlust von Haltungsreflexen und Gangstörungen fest. Bei 14% wurde Parkinsonismus sicher bestätigt. Hierfür müssen zumindest zwei der oben genannten Symptome vorliegen, eines davon Tremor beziehungsweise Bradykinesie (Lee et al., 1991).

Bei Patienten, die zu Anfang der Erkrankung Parkinson-Symptome zeigten und bei denen Dystonie-Symptome erst später hinzu kamen, wurde ein milderer Verlauf beobachtet (Evidente et al., 2002a).

Nach dem Auftreten von fokalen Erstsymptomen generalisiert die Dystonie üblicherweise innerhalb von 2 bis 5 Jahren (Lee et al., 2001).

Im fortgeschrittenen Stadium sind die Patienten auf fremde Hilfe angewiesen. Die Erkrankung führt innerhalb von bis zu 40 Jahren zum Tod durch direkte und indirekte Folgen der Dystonie, wie z. B. Dysphagie, Verhungern oder Infektionen) (Nolte et al., 2003).

Bei keinem der untersuchten Patienten wurde eine Beeinträchtigung der mentalen Leistung beobachtet (Kupke et al., 1990a). Vereinzelt findet man auch betroffene Frauen. Im Vergleich zu den betroffenen Männern treten die ersten Symptome der Erkrankung bei Frauen viel später auf und der Verlauf ist viel milder (Evidente et al., 2004).

### 1.2.2 Therapie

Eine effektive Behandlung der XDP ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht möglich. Eine gewisse Milderung der Dystonie-Symptome bietet die kombinierte Medikation mit Benzodiazepinen (z. B. Klonazepam, Diazepam) und Anticholinergika (z. B. Trihexyphenidyl, Biperiden). Monotherapie mit Zolpidem zeigte sich bei einem Patienten auch sehr effizient. Symptome der fokalen Dystonie, vor allem Torticollis, können durch Botulinum Toxin gemildert werden. Für die Behandlung des zugleich auftretenden Parkinsonismus wird Levodopa eingesetzt (Evidente et al., 2002b).

Eine neuer Therapieansatz für XDP-Patienten ist „deep brain stimulation“, welche bereits bei einem XDP-Fall erfolgreich angewendet wurde (Evidente et al., 2007).

### 1.2.3 Neuropathologischer Befund

Die ersten interessanten Einblicke in die Neuropathologie von XDP brachten PET-Untersuchungen des Gehirns. Dabei wurden Störungen der metabolischen Funktion des Striatums bei XDP-Patienten nachgewiesen. Bildgebende Verfahren, wie Magnetresonanztomographie, zeigten keine Unterschiede zwischen den Patienten und Kontrollen (Eidelberg et al., 1993).

Histopathologische Analysen zeigten einen Neuronenverlust und eine multifokale, mosaikartig geformte Astrozytose, beschränkt auf Nucleus caudatus und Putamen, welche Teil des menschlichen Striatums sind (Waters et al., 1993).

Diese beiden neurologischen Strukturen gehören zu den Basalganglien, die zur Steuerung der autonomen Bewegungen und Haltungsreflexen beitragen. Sie werden weiterhin in der Planungsphase der bewussten Bewegungen aktiviert.

Das Striatum besteht histologisch aus zwei Teilen: Aus der Matrix und aus den Striosomen, die in einer Mosaikstruktur angeordnet sind (Graybiel, 1990, Gerfen, 1992).

Die Matrix bildet den direkten und indirekten Signalweg. Diese funktionieren wie ein „push-pull System“ und können auf diese Weise eine Bewegung beschleunigen oder verlangsamen. Der striosomale Signalweg kontrolliert Bewegungen mittels Anpassung der

dopaminergen Produktion in der Substantia nigra. Dabei ist für eine koordinierte Bewegungssteuerung ein Gleichgewicht zwischen Matrix- und striosomalen Signalwegen notwendig (Graybiel et al., 2000).

*Goto et al.* in 2005 konnten zeigen, dass es im Striatum von XDP-Patienten im frühen Erkrankungsstadium zu einem Verlust vor allem von „Medium Spiny“ Neuronen im Striosomen-Bereich kommt. Die cholinergen Neuronen bleiben intakt. Die Degeneration in der Matrix ist nicht so ausgeprägt, wie im Striosomen-Bereich. Im weiteren Verlauf der Erkrankung, wenn zu den Dystonie-Symptomen Parkinsonismus hinzu kommt, betreffen die pathologischen Veränderungen nicht nur die Striosomen, sondern vermehrt auch den Matrix-Bereich. Der Verlust von Striosomen, welche unter normalen Bedingungen die Aktivität der nigrostriatalen dopaminergen Neuronen hemmen, könnte zu einem Dopamin-Überschuss führen. Dieses Ungleichgewicht könnte sich klinisch als Dystonie manifestieren (Kaji et al., 2005).

Mit Hilfe von <sup>123</sup>I-Iodobenzamid (IBZM)-SPECT konnte weiterhin bei einem XDP-Patienten eine verminderte Dichte der Dopamin D2 Rezeptoren gezeigt werden, was mit der von *Makino et al.* in 2007 beschriebenen verminderten Expression des Dopamin-D2-Rezeptor-Gens bei XDP-Patienten korreliert (Tackenberg et al., 2007).

### 1.2.4 Prävalenz und Erbgang

Die höchste Prävalenz der Erkrankung wurde auf der Philippinischen Insel Panay, in der Provinz Capiz beobachtet (21,94/100 000). Dort ist also etwa einer von 4000 Einwohnern betroffen (Kupke et al., 1990a).

Aufgrund von Migrationsbewegungen konnte sich XDP weltweit verbreiten. Beschrieben wurden auch Fälle in den USA, Kanada, Australien und anderen Ländern (Plummer et al., 2005).

Alle Erkrankten waren jedoch philippinischer Abstammung. Dies bestätigt, dass XDP auf einen Gründereffekt („founder effect“) zurückzuführen ist. Das heisst, dass ein einziger Vorfahre, bei dem die krankheitsauslösende(n) Mutation(en) *de novo* entstanden sind, diese in die Bevölkerung eingeführt hat. Alle Erkrankten sind somit Nachkommen dieses

„founders“.

Bei XDP kann man typische Merkmale eines X-chromosomal-rezessiven Erbgangs beobachten: Betroffen sind praktisch nur Männer, die Übertragung von Männern auf männliche Nachkommen ist nicht möglich. Frauen sind in den allermeisten Fällen asymptotische Überträgerinnen, welche die Erkrankung in 50% der Fälle an ihre Söhne weitergeben (Kupke et al., 1990a, Müller und Graeber, 1991).

Nach dem vollendeten fünften Lebensjahrzehnt erreicht die Penetranz bei männlichen Trägern der XDP-spezifischen Mutationen 100% (Müller et al., 1998).

### 1.2.5 Identifizierung des *DYT3*-Locus

Der X-chromosomal-rezessive Erbgang deutet klar darauf hin, dass sich das „XDP-Gen“ auf dem X-Chromosom befindet. Dies wurde durch weitere Untersuchungen bestätigt. Durch Kopplungsanalysen wurde der XDP-Locus, *DYT3*, auf den proximalen langen Arm des X-Chromosoms eingegrenzt (Kupke et al., 1990b, Wilhelmsen et al., 1991, Kupke et al., 1992).

Durch nachfolgende Assoziationsstudien konnte die XDP-kritische Region in Xq13.1 zwischen den polymorphen Markern *DXS10016* und *DXS559* eingeeengt werden (Graeber et al., 1992, Müller et al., 1994, Haberhausen et al., 1995, Németh et al., 1999).

In diesem ungefähr 400 kbp großen Bereich befinden sich acht Gene, welche als Kandidatengene im Zusammenhang mit der Entstehung von XDP stehen könnten (Nolte et al., 2001, Peters et al., 1997).

*ZMYM3 (DXS6673E)* ist ein Kandidatengenen für die mentale Retardierung (Van der Maarel et al., 1996, Scheer et al., 2000).

*NonO* codiert für ein RNA-Bindeprotein, das sich an der Regulation der Transkription, vor allem an der cAMP vermittelten Transkription beteiligt (Amelio et al., 2007, Shav-Tal et al., 2002).

*ITGB1BP2, Integrin beta 1 Binde-Protein 2*, kodiert für das muskelspezifische Protein Melusin (Brancaccio et al., 1999).

## Einleitung

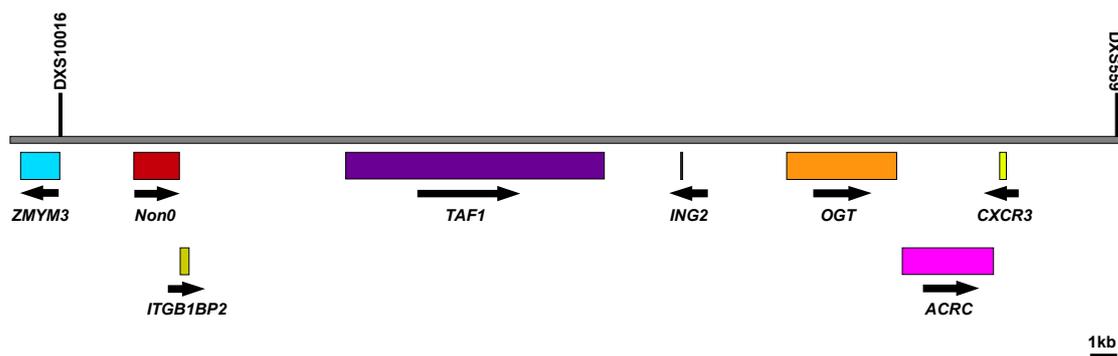
*TAF1*, TATA-Box Binde-Protein assoziierter Faktor 1 ist einer der insgesamt 14 bekannten TATA-Box Binde-Protein assoziierteren Faktoren (TAFs), die gemeinsam mit dem TATA-Box Binde-Protein (TBP) den Transkriptionsfaktor IID (TFIID) bilden. Dieser spielt eine sehr wichtige Rolle bei der polymerase-II-vermittelten Genexpression in eukaryotischen Zellen. *TAF1* besteht aus vier Domänen: Der N-terminalen TBP-Binde-Domäne (TAND), der TAF-TAF-Interaktionsdomäne, der putativen Histon-Acetylase (HAT) Domäne und der Promotor-Erkennungs-Domäne (Irvin und Pugh, 2006, Kokubo et al., 1998, Mal et al., 2004, Kotani et al., 2000, Mencia and Struhl, 2001, Mizzen et al., 1996, Sanders et al., 2002, Singh et al., 2004).

*ING 2* („inhibitor of growth 2“) ist ein putatives Tumor-Suppressor Gen (Pedeux et al., 2005, Sarker et al., 2008).

*OGT* (*O-linked N-Acetyl-D-Glucosamin-Transferase*) katalysiert die Glykosylierung zahlreicher Proteine wie zum Beispiel RNA-Polymerase II, Kern-Porenproteine, Neurofilamente, mikrotubuli-assoziierte Proteine, Onko- und Tumorsuppressor Proteine (Nolte et al., 2002).

*ACRC* („acidic repeat containing“) ist ein Gen mit unbekannter Funktion (Nolte et al., 2001).

*CXCR3*, kodiert für den Chemokin-Receptor 3, der zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört (Colvin et al., 2004).



**Abbildung 1: XDP-kritische Region in Xq13.1.** Zwischen den polymorphen Markern *DXS10016* und *DXS559* befinden sich 8 Gene *ZMYM3*, *NonO*, *ITGB1BP2*, *TAF1*, *ING 2*, *OGT*, *ACRC* und *CXCR3*.

Diese Kandidatengene wurden sequenziert. Es konnten weder im intronischen noch im exonischen Bereich dieser Gene krankheitspezifische Mutationen nachgewiesen werden (Haberhausen et al., 1995, Németh et al., 1999, Nolte et al., 2001, Peters et al, 1997).

Um funktionell relevante Mutationen in regulatorischen Elementen oder in Introns beziehungsweise Exons eines zum Zeitpunkt der Untersuchung noch unbekanntes Gens auszuschließen, wurde die gesamte XDP-Kandidatenregion bei einem Patienten sequenziert. Der anschließende Vergleich mit einer Kontrolle offenbarte folgende patientenspezifische Sequenzunterschiede:

- zwei „single-nucleotide polymorphisms“ (SNPs): SNP 4 und SNP 5,
- fünf „disease-specific single-nucleotide changes“ (DSCs): DSC 1, DSC 2, DSC 3, DSC 10 und DSC 12
- sowie eine 48-bp Deletion.

Um zu bestätigen, dass es sich bei den gefundenen Sequenzunterschieden um krankheitsspezifische Mutationen handelt, wurden Untersuchungen von weiteren 46 XDP-Patienten und bei 178 philippinischen, 180 kaukasischen, 80 japanischen und 60 kubanischen Kontrollen durchgeführt. Die oben genannten DSCs sowie die 48-bp Deletion wurden tatsächlich ausschließlich bei den XDP-Patienten gefunden. Diese bedeutende Entdeckung von krankheitsspezifischen Mutationen ermöglicht heutzutage eine sichere molekulare Diagnostik von XDP.

SNP 4 und SNP 5 waren bei den Patienten polymorph, nicht jedoch bei den Kontrollen. Es ist anzunehmen, dass sie erst später auf dem X-Chromosom eines Patienten (beziehungsweise einer Überträgerin) entstanden sind, nachdem die krankheitsspezifischen Veränderungen bereits aufgetreten waren und mit dem Pathomechanismus der Erkrankung deshalb nicht in Verbindung stehen (Nolte et al., 2003).

Neben den bereits erwähnten Mutationen wurde bei Patienten auch eine 2,627 bp lange SVA (short interspersed nuclear element, variable number of tandem repeats and Alu

composite) Retrotransposon Insertion im Intron 32 des *TAF1* Gens gefunden, deren funktionelle Relevanz noch nicht abschließend geklärt ist (Makino et al., 2007, Müller et al., 2007).

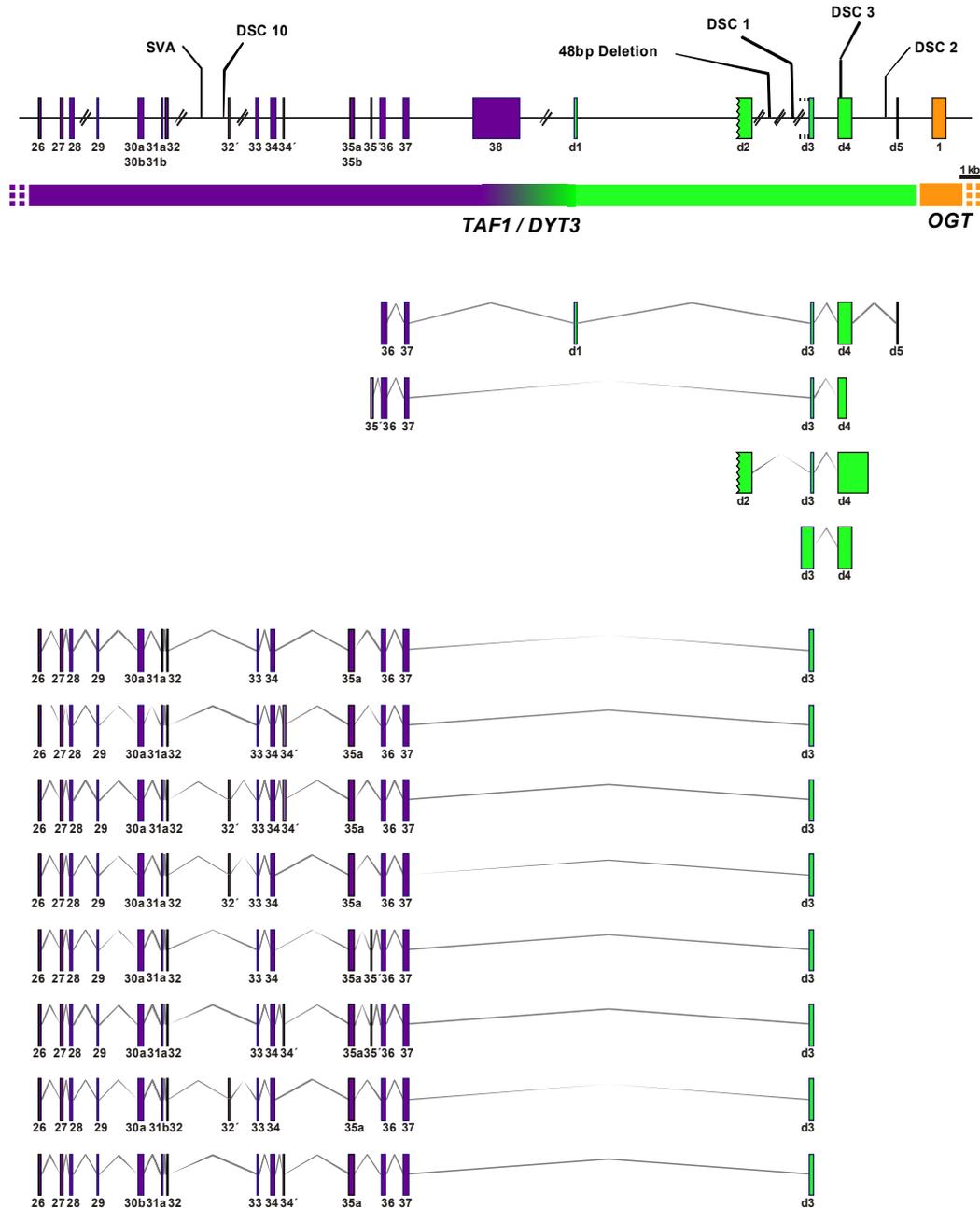
Die Untersuchung der genomischen Umgebung der einzelnen DSCs zeigte, dass bis auf DSC 3 und DSC 12 alle DSCs in repetitiven DNA-Sequenzen lokalisiert sind.

Bei der näheren Analyse der genomischen Region um DSC 3 mit Hilfe von RT-PCR und Phagenbank-Screenings konnten neue, bisher unbekannte Exons identifiziert werden (Herzfeld et al., 2007, Nolte et al., 2003).

### **1.2.6 *TAF1/DYT3* multiples Transkriptsystem**

Fünf der neu entdeckten Exons befinden sich im Bereich zwischen den Genen *TAF1* und *OGT*. Sie werden als *DYT3* "downstream" Exons d1-d5 bezeichnet. Exons d1-d5 bilden gemeinsam mit *TAF1*-Exons ein komplexes Transkriptsystem bislang unbekannter Funktion, welches als *TAF1/DYT3* multiples Transkriptsystem bezeichnet wird (Abbildung 2).

Desweiteren wurden im *TAF1* Intron-Bereich drei neue Exons (32', 34', 35'), sowie Polymorphismen der *TAF1* Exons 30, 31 und 35 identifiziert. d-Exons können entweder unabhängig oder zusammen mit den Exons im *TAF1* Intronbereich und originären *TAF1* Exons exprimiert werden (Herzfeld et al., 2007, Nolte et al., 2003).



**Abbildung 2: *TAF1/DYT3* Region mit krankheitsspezifischen Mutationen (DSC 1, 2, 3, 10, 12, 48 bp Deletion, SVA).** *TAF1/DYT3* multiples Transkriptsystem besteht aus Transkriptvarianten 1, 2, 3, 4. Die Transkriptvariante 2 bildet die Untervarianten 2a-i.

*TAF1/DYT3* Transkripte/Exons werden alternativ gespleißt und bilden so mehrere Transkriptvarianten.

Die “Transkriptvariante 1” setzt sich aus den Exons d1, d3, d4, d5 und *TAF1* Exons zusammen, “Transkriptvariante 2” besteht aus d3, d4 und aus *TAF1* Exons. Sie bildet die

Untervarianten 2a-i, die mit unterschiedlicher Frequenz im menschlichen Gehirn exprimiert werden (Tabelle 3). Die exakten 5' Grenzen der Transkriptvarianten 1 und 2 wurden jedoch noch nicht experimentell ermittelt.

**Tabelle 3: Frequenz der TAF1/DYT3 Transkriptvarianten (Herzfeld et al., 2007)**

Transkriptvariante	Exons	Prozentanteil der Varianten
2c	26, 27, 28, 29, 30a, 31a, 32, 33, 34, 35a, 36, 37, d3	42,6%
2d	26, 27, 28, 29, 30a, 31a, 32, 33, 34, 34', 35a, 36, 37, d3	22,0%
2e	26, 27, 28, 29, 30a, 31a, 32, 32', 33, 34, 34', 35a, 36, 37, d3	11,8%
2f	26, 27, 28, 29, 30a, 31a, 32, 32', 33, 34, 35a, 36, 37, d3	5,8%
2a	26, 27, 28, 29, 30a, 31a, 32, 33, 34, 35a, 35', 36, 37, d3	4,4%
2g	26, 27, 28, 29, 30a, 31a, 32, 33, 34, 34', 35a, 35', 36, 37, d3	4,4%
2h	26, 27, 28, 29, 30a, 31b, 32, 32', 33, 34, 35a, 36, 37, d3	4,4%
2i	26, 27, 28, 29, 30b, 31a, 32, 33, 34, 34', 35a, 36, 37, d3	4,4%

Zur Untersuchung der Frequenz der einzelnen Transkriptvarianten wurde ein Genbank-Screening eingesetzt. Es wurden Primer im *TAF1* Exon 26 und im *DYT3* Exon d3/d4 benutzt. Exon 30b wurde ausschließlich in Transkripten mit Exon 34' und Exon 31b in den Transkripten mit Exon 32' gefunden.

“Transkriptvariante 3” wird unabhängig von den *TAF1* Exons exprimiert und besteht aus den Exons d2, d3 und d4. Die “Transkriptvariante 3” verfügt über einen eigenständigen TATA Box-losen Promotor, der durch den Transkriptionsfaktor „Ikaros“ reguliert wird (Herzfeld et al., 2007). Ikaros spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Lymphozyten. Er wird jedoch ebenfalls in Teilen des Striatums des Maus-Gehirns und des Zebrafisch während der Embryonal-Entwicklung gefunden (Georgopoulos et al., 1992, Willett et al., 2001).

“Transkriptvariante 4” besteht aus den Exons d3 und d4, wobei Exon d3 in 5' Richtung verlängert ist. Auch hier wurde die 5' Grenze des Transkripts noch nicht mit Gewissheit bestätigt (Nolte et al., 2003).

## Einleitung

---

Darüber hinaus wurden von einer Japanischen Arbeitsgruppe zehn weitere Transkriptvarianten beschrieben (TA02-334, TA08-269, TA09-391, TA09-693, TA14-317, TA14-389, TA14-391, TA14-407, TA15-477, TA18-261), die *TAF1*-Exons 3, 4, 16, 18, 19, 20, 21, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 und alternative *TAF1*-Exons 5', 19', 20', 32', 33', 34', 35'', 38d eingeschlossen (Makino et al., 2007).

Bei Eukaryonten sind die Exons des *TAF1* Gens hoch konserviert, was ohne Zweifel auf seine sehr wichtige Rolle hinweist. Die Exons d1-d5 entstanden erst später im Laufe der Evolution und wurden erst bei den Primaten beobachtet (Herzfeld et al., 2007).

Alle Transkripte des *TAF1/DYT3* Transkriptsystems nutzen die Exons d3 und d4. DSC3 befindet sich als einzige patientenspezifische Mutation in einem Exon (Exon d4). Dies deutet trotz der geringen evolutionären Konserviertheit auf eine wichtige Funktion der Exons d3 und d4 hin, sowie auf eine mögliche krankheitsverursachende Bedeutung von DSC3.

Zusätzlich zu den beschriebenen *TAF1/DYT3* Transkripten findet sich auch ein etwa 1 kbp großes intronloses Gegenstrangtranskript überlappend mit Exon d4, welches von einem LTR-Promotor distal Exon d4 reguliert wird (Herzfeld et al., 2007). Der ursprüngliche Verdacht, dass dieses Gegenstrang-Transkript die Expression der restlichen „Sense“-Transkripte beeinträchtigen könnte, hat sich jedoch nicht bestätigt (unveröffentlichte Daten).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht bekannt, wie die krankheitsspezifischen DSCs zur Entstehung des XDP führen. Das Fehlen von proteinkodierenden Leserahmen deuten jedoch eher auf eine regulative Funktion der Exons d3 und d4 hin.

### 1.3 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkung der für XDP krankheitsspezifischen Mutation DSC3 auf das Expressionsprofil Neuroner Zellen zu untersuchen und Gene zu identifizieren, die eine pathogenetische Rolle beim X-chromosomalen Dystonie-Parkinson Syndrom spielen. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist unklar, welche der von Nolte et al., 2003 und Makino et al., 2007 beschriebenen krankheitsspezifischen Mutationen tatsächlich krankheitsauslösend ist. DSC3 befindet sich im Exon d4 des *TAF1/DYT3* multiplen Transkriptionssystem und ist damit die einzige exonische Mutation. Alle *TAF1/DYT3*-Transkriptvarianten beinhalten Exon d3 und Exon d4. Um die Rolle von DSC3 einzugrenzen, sollte eine Neuroblastom-Zelllinie mit dem Expressionvektor pcDNA3.1(+) mit den Exons d3/d4 Wild-Typ, Exons d3/d4 DSC3 und mit dem leeren Vektor als Kontrolle transfiziert werden. Anschliessend wird das Expressionsprofil der unterschiedlich transfizierten Zellen mittels Microarray-Analyse ermittelt und die daraus gewonnenen Daten näher untersucht. Die Expression möglicher Kandidatengene wird anschliessend durch Real-Time-PCR-Experimente verifiziert.

## 2 Materialien

### 2.1 Laborgeräte

Tabelle 4: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Cryo-Einfriergerät	NU-200	NUNC GmbH & Co. KG; 65201 Wiesbaden
DNA/RNA Quantifizierung	GeneQuant II	Amersham Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ 08855 USA
Gradient- Thermocycler	MJ Mini	Bio-rad Laboratories Inc; Hercules, CA 94547 USA
Inkubator	BB-6060	Heraeus Holding GmbH; 63450 Hanau
Mikroskop	ID02	Carl Zeiss MicroImaging GmbH; 37081 Göttingen
Real- Time PCR Gerät	Mx3000P	Stratagene; La Jolla, CA 92037 USA
Sequenzierer	ABI PRISM 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems; Foster City, CA 94404 USA
Thermocycler	ALD-1244	Bio-rad Laboratories Inc; Hercules, CA 94547 USA
Tischzentrifuge	Biofuge Fresco	Heraeus Holding GmbH; 63450 Hanau
UV- Transilluminator	Macro VUE UV-25	Hofer; Holliston, MA 01746 USA
Videoprinter	Video Copy Processor P66E	Mitsubishi Electric Corporation; Tokyo 100-8310 Japan
Zentrifuge	Multifuge 3L-R	Heraeus Holding GmbH; 63450 Hanau

## 2.2 Chemikalien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Katalog Nr.
2-Mercaptoethanol	Fluka Chemie GmbH; 9471 Buchs	63689
1 kBp-DNA Leiter	Carl Roth GmbH & CO. KG, 46185 Karlsruhe	Y014.Z
Agar-Agar	Serva GmbH & CO. KG; 69115 Heidelberg	11393
Agarose	Inno- TRAIN GmbH; 61477 Kronberg	GX04004
Ampicillin	Sigma- Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	A-0166
AQUA-CLEAN	WAK-Chemie Medical GmbH; 61449 Steinbach	WAK-AQ-250
AQUA-STABIL	Julabo Labortechnik GmbH; 77960 Seelbach	Z611662
Bacto-Trypton	BD; Sparks, MD 21152 USA	211705
Bacto Hefeextract	DIFCO (BD); Sparks, MD 21152 USA	212750
Betain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	B-0300
Borsäure	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	1.00165.1000
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	A2153-50g
Cryo-safe	CCPRO GmbH; 67433 Neustadt	KM-11-V
Dulbecco´s PBS (10x)	PAA Laboratories GmbH; 4061 Pasching, Österreich	H15-011
Desinfektionsmittel	Carl Roth GmbH & CO. KG, 46185 Karlsruhe	K354.1
Ethidiumbromid Lösung	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	1.11608.0030
Ethylendiamin- tetraessigsäure Dinatriumsalz (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	E-5134
Ethanol	Carl Roth GmbH & CO. KG, 46185 Karlsruhe	9065.4
Föetales	CCPRO GmbH; 67433 Neustadt	S-10-L

## Materialien

Kälberserum		
Formamid	Carl Roth GmbH & CO. KG, 46185 Karlsruhe	6749.1
Geneticin	Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA 92008 USA	10131035
Glycerin	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	1.04094.1000
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim	I-9516
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	5033.1000
Kanamycin	Serva GmbH & CO. KG; 69115 Heidelberg	26898
L-Glutamin 200mM	CCPRO GmbH; 67433 Neustadt	Z-10-M
Natriumacetat (NaAc)	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	1.01539.0500
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & CO. KG, 46185 Karlsruhe	3957.1
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	1.06498.1000
Nukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	PEQLAB GmbH; 91052 Erlangen	20-2010
Pellet Paint	Novagen Inc; Madison, WI 53719 USA	70748
Penicillin/ Streptomycin Lsg.	CCPRO; 67433 Neustadt	Z-13-M
Tris	Carl Roth GmbH & CO. KG, 46185 Karlsruhe	4855.2
Tris-Cl	USB; Cleveland, Ohio 44128 USA	22676
TrypLE Express	GIBCO BRL; Gaithersburg, MD 20898 USA	12605-010
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA; 64293 Darmstadt	1.09057.1000
Sephadex G-50 Superfine	Amersham Biosciences; Piscataway, NJ 08855-1327 USA	17-0041-01
Sodiumdodecylsulfat	Serva GmbH & CO. KG; 69115 Heidelberg	20783

(SDS)		
-------	--	--

## 2.3 Enzyme

**Tabelle 6: Verwendete Enzyme**

Name	Typ	Hersteller
Antarctic Phosphatase	Phosphatase	New England Biolabs; Ipswich MA 01938-2723 USA
<i>Bgl</i> II, <i>Dpn</i> I, <i>Eco</i> RI, <i>Eco</i> RV, <i>Msp</i> I, <i>Pci</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Pvu</i> II, <i>Sac</i> I, <i>Sca</i> I, <i>Sma</i> I, <i>Sph</i> I, <i>Ssp</i> I, <i>Xho</i> I	Restriktionsendonuklease	New England Biolabs; Ipswich MA 01938-2723 USA
CIP (Calf Intestinal Phosphatase)	Alkalische Phosphatase	New England Biolabs; Ipswich MA 01938-2723 USA
DNA Polymerase (Klenow)	DNA Polymerase/ 3'-5' Exonuklease	New England Biolabs; Ipswich MA 01938-2723 USA
HotStarTaq Plus	DNA Polymerase	Qiagen GmbH; 40724 Hilden
PfuTurbo	DNA Polymerase	Stratagene; La Jolla, CA 92037 USA
PfuUltra	DNA Polymerase	Stratagene; La Jolla, CA 92037 USA
Quick Ligase	Ligase	New England Biolabs; Ipswich MA 01938-2723 USA
T4 DNA Ligase	Ligase	Roche Diagnostics GmbH; 68305 Mannheim
T4 Polynukleotidkinase	Kinase	Amersham Biosciences; Piscataway, NJ 08855 USA
Taq Polymerase	DNA Polymerase	Qiagen GmbH; 40724 Hilden

## 2.4 Oligonukleotide

Zum Primerdesign wurde das Computerprogramm *FastPCR™* benutzt (Kalendar et al., 2009). Alle verwendete Oligonukleotide wurden bei der Firma *Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim* bestellt.

**Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide**

Name	Sequenz (5' → 3')
189510R	GTGAAGGTCCGTGGCTTC
ANXA 10-F	TCCCTGAGGTTAACAATTAC
ANXA 10-R	CTAGCATTGGGCATCCATT
c1259t	GAACCAAGGCTTTGAGTCTCTTTGTCTCATCTCCG
c1259t-antisense	CGGAGATGAGACAAAGAGACTCAAAGCCTTGGTTC
CHGA-F	GCGGTGGAAGAGCCATCAT
CHGA-R	TCTGTGGCTTCACCACTTTT
CHGB-F	GCGGTGGAAGAGCCATCAT
CHGB-R	TCTGTGGCTTCACCACTTTT
CRH-F	ACAACCTCCAGAGAAAGCCC
CRH-R	CCGCATGTTAGGGGCAC
DBH-F	ACTGGCTACTGCACGGACAA
DBH-R	CTTTCTCCCAGTCAGGTGTG
Ex3Start-F	GTACCAATGAACAAGCCATTCAG
Ex4End-R	GTAGCAACCCACTCGGGTC
Ex3Start-F- (P)	(P)- GTACCAATGAACAAGCCATTCAG
Ex4End-R- (P)	(P)- GTAGCAACCCACTCGGGTC
GAPDH-F	AGCCGAGCCACATCGCTCAGACAC
GAPDH-R	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC

## Materialien

GREM1-F	TGCTGGAGTCCAGCCAAGA
GREM1-R	GCACCAGTCTCGCTTCAGGT
hHPRT1-real1	TGACACTGGCAAAACAATGCA
hHPRT1-real2	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
LTR12-F4	GGAGAGCCTGTGCGGCTGCATC
M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
NPTX2-F	TGTGAAGAGTGTGCTCGTTT
NPTX2-R	GCTTGGAGTCACTCAGACAA
SYBR3/4-F	TGCTGACTTCAAGAATGAAGCCGTG
SYBR3/4-R	AGCACACCCTATGGGAGTTCTGC
T7	TAATACGACTCACTATAGG
Template1-R	ACTAGTGAATGTGGAAAAGATGAT

## 2.5 Kits

**Tabelle 8: Verwendete Kits**

Kit	Hersteller	Katalog- Nr.
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems; Foster City, CA 94404 USA	4336917
Effectene Transfection Reagent	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	301425
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	51104
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	27106
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	28706
QIAshredder	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	79656

## Materialien

QuantiTect Reverse Transcription	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	205311
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene; La Jolla, CA 92037 USA	200518
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	79254
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH; 40724 Hilden	74107
SYBR Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific; Surrey, KT19 9AP UK	AB-1166/A
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA 92008 USA	45-0640
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA 92008 USA	45-0245

## 2.6 Lösungen und Puffer

0,5 M EDTA pH 8,0

70 %, 80 % und 99,8 % Ethanol

100 % Glycerin

1 M HCl

0,4 M und 10 M KOH

10x MOPS Running Buffer (0,2 M MOPS; 0,5 M Natriumacetat; 0,01 M EDTA)

3 M Natriumacetat

Ladepuffer für Agarosegele (20 % Ficoll 400; 0,1 M EDTA pH 8,0; 1 % SDS; 0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol)

10x TBE Puffer (890 mM TRIS; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA pH 8,0)

TE Puffer (10 mM TRIS-Cl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0)

1 M TRIS

## 2.7 Bakterienstämme und humane Zelllinien

### Bakterienstamm:

Für Klonierungen wurde der Bakterienstamm *E.coli Top10* benutzt.

### Humane Zelllinien:

Desweiteren wurden *SK-N-AS*-Zelllinien (*Neuroblastom*, ATCC Nr.: CRL 2137) und lymphoblastoide Zelllinien, etabliert aus Blut von XDP-Patienten und Kontrollen, verwendet.

## 2.8 Medien

Zur Kultivierung von *E.coli Top10* wurde *Luria-Bertani-Vollmedium (LB-Medium)* benutzt:

10 g Bacto-Trypton

10 g NaCl

5 g Bacto Hefeextrakt

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

(pH 7,5)

### LB-Agar-Platten:

10 g Bacto- Trypton

10 g NaCl

5 g Bacto Hefeextrakt

15 g Agar-Agar

ad 1000 ml H<sub>2</sub>O

(pH 7,5)

## Materialien

---

Sämtliche Medien wurden bei 121 °C und 2 bar für 20 Minuten autoklaviert. Nach Bedarf wurde dem Medium nach dem Autoklavieren das Antibiotikum Ampicillin bzw. Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml) zugesetzt.

Für die Kultivierung der humanen Zelllinien wurden abhängig von dem Zelltyp folgende Medien von der Firma CCPR0; 67433 Neustadt verwendet:

RPMI 1640, CCPR0, Kat. Nr.: FM-16-L zur Kultivierung lymphoblastoider Zelllinien

DMEM, CCPR0, Kat. Nr. FM-99-L, (4,5 g/l Glukose, 1,5g/l Natriumbicarbonat) zur Kultivierung der Zelllinie SK-N-AS

Vor Gebrauch wurden je 10 % (v/v) fötales Kälberserum (FCS), 1 % (v/v) 200 mM L-Glutamin und das Antibiotikum Penicillin/Streptomycin (1 % v/v Lsg.) zugesetzt. Das fötale Kälberserum wurde zuvor für 30 Minuten bei 56 °C erhitzt, um das Komplement-System zu inaktivieren.

## 2.9 Plasmide

Tabelle 9: Verwendete Plasmide

Plasmid	Vektor	Relevanter Genotyp/ Konstruktion	Quellenangabe
pcDNA 3.1(+)	-	Ampicillin-Resistenz- Gen, Neomycin-Resistenz- Gen	Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA 92008 USA
pcDNA3.1(+) Ex3/4WT	pcDNA 3.1(+)	Ampicillin-Resistenz- Gen, Neomycin-Resistenz-	diese Arbeit

## Materialien

		Gen, Exon d3 und Exon d4 in pcDNA 3.1(+)	
pcDNA3.1(+) <sup>Ex3/4</sup> DSC3	pcDNA 3.1(+)	Ampicillin-Resistenz-Gen, Neomycin-Resistenz-Gen, Exon d3 und Exon d4 mit DSC3 in pcDNA3.1(+)	diese Arbeit
pCR-Blunt II-TOPO	-	Kanamycin-Resistenz-Gen, Klonierungsvektor für „blunt end“ Klonierungen	Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA 92008 USA
pCR 2.1-TOPO	-	Ampicillin-Resistenz-Gen, Kanamycin-Resistenz-Gen, Klonierungsvektor für „sticky ends“ Klonierungen	Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA 92008 USA

## 3 Methoden

### 3.1 Bearbeitung der DNA und RNA

#### 3.1.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung der DNA wurde der Kit: QIAamp DNA Blood Mini Kit von der Firma Qiagen verwendet. DNA wurde aus dem Vollblut männlicher Kontrollpersonen, beziehungsweise aus lymphoblastoiden Zellen (aus Zellkultur) von Patienten mit XDP und von gesunden männlichen Filipinos extrahiert. Alle Schritte erfolgten gemäss den Vorgaben des im Kit beigelegten Handbuches. Die gewonnene genomische DNA wurde entweder direkt zur PCR eingesetzt oder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zum weiteren Gebrauch aufbewahrt.

#### 3.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung der RNA wurde der *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen benutzt. Die Zellpellets der oben genannten Zelllinien wurden in einem mit  $\beta$ -Mercaptoethanol angereicherten Fertigpuffer resuspendiert und mittels *QIAshredder*-Säulchen (Qiagen) homogenisiert. Der Vorgang erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die RNA wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und für weitere Experimente (Reverse Transkription) verwendet.

#### 3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde der Kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) verwendet. Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus 2 ml Übernachtskulturen von *E.coli* TOP 10 in LB Medium, die 5 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert wurden. Anschliessend wurden die Pellets resuspendiert. Die weitere Behandlung erfolgte gemäss des im Kit beigelegten Handbuchs.

### 3.1.4 Bestimmung der DNA/RNA-Konzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte spektrophotometrisch in einem *GeneQuant* der Firma *Amersham Pharmacia Biotech*. Das Prinzip dieser Messung beruht auf der Proportionalität von Lichtabsorption und Konzentration. Hierfür wurde die Absorption bei 260 nm gemessen, was dem Absorptionsmaximum der RNA/DNA entspricht. Die bei 260 nm gemessene Absorption gab die RNA/DNA-Konzentration wieder. Bei 280 nm liegt hingegen das Absorptionsmaximum der meisten Proteine. Der Quotient aus 260/280 nm konnte dann zu einer Beurteilung der Reinheit der Nukleinsäuren benutzt werden. Werte zwischen 1,8 und 2,0 sprachen für eine reine Probe.

### 3.1.5 Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA wurden der Probe 3 M Natriumacetat (1/20 des Probevolumens), Pellet Paint (1,5 µl) und Ethanol abs. (dreifache Menge des Probevolumens) zugegeben. Anschließend wurde für 40 Minuten bei 13 000 rpm und +4 °C zur Pelletierung des Präzipitats zentrifugiert. Zur Erhöhung der Fällungseffizienz wurden niedrig konzentrierte Proben vor dem Pelletieren für eine Stunde bei -80 °C gelagert. Reste von Natriumacetat (die eventuell weitere Experimente unerwünscht beeinflussen könnten) wurden mit einer 70%-igen bei +4 °C gelagerten Ethanol-Lösung entfernt. Nach anschließender Lufttrocknung wurde das Pellet in H<sub>2</sub>O beziehungsweise in einem geeigneten Puffer resuspendiert.

### 3.1.6 Reverse Transkription

RNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA (complementary DNA) umgeschrieben. Hierfür wurde der *QuantiTect* Kit der Firma *Qiagen* benutzt. Die Reaktion wurde gemäß dem Handbuch des Kits angesetzt. Als Template wurden je 750 ng Gesamt-RNA eingesetzt.

### 3.2 PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

PCR ist die zyklische Amplifizierung einer bestimmten DNA-Sequenz aus einem heterogenen Gemisch von DNA-Sequenzen mit Hilfe spezifischer Primer. Dabei dienen die Produkte der vorherigen Zyklen als Matrize für die nächste Reaktion. Hierdurch kommt es zur exponentiellen Multiplikation der gewünschten DNA-Sequenz. Die Selektivität der Reaktion wird durch Oligonukleotidprimer gewährleistet, welche an den Enden der Zielsequenz binden. Deswegen ist die korrekte Auswahl der Primer besonders wichtig.

Es wurden je nach Bedarf unterschiedliche Polymerasen benutzt. Als Standard-Enzym für die meisten PCRs wurde *Taq-Polymerase (Qiagen)* beziehungsweise *HotStarTaq Plus (Qiagen)* verwendet. Diese produzieren 3'-A-Überhänge, was auf die fehlende Proofreading-Fähigkeit dieser Polymerasen zurückzuführen ist. Sollten PCR-Produkte kloniert werden, so wurden die Proofreading-Enzyme *PfuUltra* und *PfuTurbo (Stratagene)* verwendet. Diese produzieren "Blunt Ends".

#### Standard-PCR-Reaktionsansatz:

10 x PCR Puffer	5 µl
Nucleotid-Mix (10mM je Base)	1,5 µl
Vorwärts-Primer F (25 pmol/µl)	1,5 µl
Rückwärts-Primer R (25 pmol/µl)	1,5 µl
Template (cDNA, DNA)	1µl
Polymerase ( <i>Taq/Pfu</i> )	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

#### PCR-Bedingungen:

Die Bedingungen wurden für jeden Versuch hinsichtlich der Schmelztemperatur, der Polymerase und der Länge des PCR-Produktes optimiert.

1 Zyklus:	94/95 °C	2/5 Min
35-45 Zyklen: Denaturierung	95 °C	30 Sek
Annealing	55 – 78 °C	30 Sek

Elongation	72 °C	1Min/1kb
1 Zyklus:	72 °C	10 Min

### 3.2.1 Design der Primer

Zum Primerdesign wurde das Computerprogramm *FastPCR<sup>TM</sup>* benutzt. *FastPCR<sup>TM</sup>* ist ein integriertes Tool zum automatischen und manuellen Primer- Design, Alignment und Suche nach repetitiven Sequenzen (Kalendar et al., 2009).

Bei der Gestaltung der Primer wurde ganz besonders auf folgende Punkte geachtet (nach Strachan und Read, 2005):

- *Repetitive Sequenzen* sind zu vermeiden. Es ist wichtig, die Wahrscheinlichkeit zu verringern, dass die Primer an unerwünschten Stellen an die DNA binden.
- *Basenzusammensetzung*: Der GC-Gehalt sollte zwischen 40 und 60% liegen, mit einer etwa gleichmäßigen Verteilung aller Nukleotide.
- *Schmelztemperatur ( $T_m$ )*: Die berechneten  $T_m$ - Werte für zwei zusammen verwendete Primer sollten sich nicht um mehr als 5 °C unterscheiden und der  $T_m$ - Wert des Amplifizierungsprodukts sollte nicht mehr als 10 °C von dem der Primer abweichen.
- *3'- terminale Sequenzen*: Das 3'-Ende des einen Primers sollte zu keinem Bereich des anderen Primers komplementär sein. Entscheidend ist die korrekte Basenpaarung am 3'-Ende eines Primers, die sich sogar dazu ausnutzen lässt, nur ein spezifisches Allel zu amplifizieren, andere jedoch nicht.
- *Selbstkomplementäre Sequenzen*: Umgekehrte Wiederholungen oder andere

selbstkomplementäre Sequenzen über 3 bp sind zu vermeiden.

### 3.2.2 Nested-Primer-PCR

Nested-Primer-PCR erhöht die Spezifität der PCR erheblich. Das Produkt der ersten PCR wird als Ausgangsmaterial für die Nested-PCR benutzt. Die bei dieser Amplifikation benutzten Primer befinden sich innerhalb der beim ersten Mal amplifizierten Sequenz. Nachteil der Nested-PCR ist eine durch die große Gesamtzyklenanzahl hervorgerufene erhöhte Fehlerwahrscheinlichkeit.

### 3.2.3 Quantitative PCR (Real-Time PCR, qPCR, QPCR)

Genauso wie die qualitative PCR besteht auch die qPCR aus einer Denaturierungs-, Annealing- und Elongations-Phase. Darüber hinaus gibt es hier jedoch die Möglichkeit die Menge des bereits gebildeten PCR-Produktes mit der Hilfe von Fluoreszenz-Messungen bereits während des Laufes quasi in Echtzeit „Real Time“ zu quantifizieren.

Um die Messung zu ermöglichen, wird dem Reaktionsansatz ein Farbstoff zugegeben, welcher DNA-Doppelstränge interkaliert. Hier wurde der Farbstoff SYBR Green benutzt (*SYBR Green Master Mix, Thermo Fisher Scientific*), welcher unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet und in diesem Zustand wesentlich stärker unter Anregung fluoresziert als ungebunden. Die Fluoreszenz-Intensität steigt linear mit der gebildeten Produkt-Menge und kann nach jedem PCR-Zyklus gemessen werden. Übersteigt die Fluoreszenz der Probe einen für alle Reaktionen gleichen Schwellenwert, so kann aus dem Zyklus zu dem dieser Schwellenwert überschritten wird ( $c_t$ -Wert), eine relative Quantifizierung der Ausgangsmenge abgeleitet werden.

Eingesetzt wird eine solche Quantifizierung z. B. um die Expression verschiedener Gene in unterschiedlichen cDNA-Proben zu messen. Ein wichtiger Aspekt für die exakte Quantifizierung ist eine robuste Normalisierung der Daten. Dazu werden sogenannte „House-keeping Gene“ verwendet. Diese Gene sind für grundlegende Prozesse in allen

## Methoden

---

lebenden Körper-Zellen erforderlich und werden in unterschiedlichen Entwicklungsstadien oder beim pathologischen Zustand des Organismus für gewöhnlich kaum reguliert. Die Normalisierung wird durch den Vergleich der Expression des Ziel-Gens bezogen auf ein oder besser mehrere House-keeping Gene ermittelt. Dieses Verfahren wird als Normalisierung bezeichnet. In dieser Arbeit wurden als House-keeping Gene *GAPDH* und *hHPRT* verwendet, deren relative Expression zueinander stets konstant war.

### Standard-QPCR-Reaktionsansatz:

SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific)	10 µl
Primer F (2,5 pmol/µl)	1 µl
Primer R (2,5 pmol/µl)	1 µl
ROX-Referenz Dye	0,3 µl
cDNA-Template	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

### QPCR-Bedingungen:

1 Zyklus:	95 °C	10 Min
40 Zyklen:	95 °C	30 Sek
	60 °C	1 Min
	72 °C	30 Sek
1 Zyklus:	95 °C	1 Min
	55 °C	30 Sek
	95 °C	30 Sek

## 3.3 Gelelektrophorese

### 3.3.1 Agarose-Gel

Agarose-Gele dienen zur Auftrennung von DNA- und RNA-Molekülen nach Molekülgröße und Ladung im elektrischen Feld. Dabei wandern große Moleküle langsamer durch die Agarose-Matrix als kleine Moleküle. Je konzentrierter die Agarose in einem Gel ist, desto kleiner sind die Poren, durch welche die Nukleinsäure wandert. Aus diesem Grunde werden unterschiedliche Agarosekonzentrationen verwendet für unterschiedliche DNA, bzw. RNA-Größen. Zur Herstellung eines Gels wurde Agarose-Pulver mit 100 ml 1x TBE Puffer gemischt und in einem Mikrowellegerät zum Kochen gebracht. Es kamen 0,7%-ige bis 2%-ige Agarosegele zum Einsatz.

Der Lösung wurde nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C 10 µl Ethidiumbromidlösung zugegeben. Danach wurde die Agaroselösung in einen dafür geeigneten Gelträger gegossen. Das Gel sollte mindestens 45 Minuten lang bei Raumtemperatur erkalten um fest zu werden. Nach dem Abkühlen wurde das Gel in eine Gelkammer gelegt und diese mit dem 1x TBE Laufpuffer aufgefüllt. Parallel mit den DNA-Proben wurden Größenstandards (100 bp/1 kbp Leiter) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für etwa eine Stunde. Dabei ist auf richtige Polung zu achten (die negativ geladene DNA wandert zur Anode).

Das Endergebnis der Elektrophorese wurde unter UV-Licht bewertet und anschließend mit einer Photoeinheit dokumentiert. Gegebenenfalls wurden Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) isoliert.

### 3.3.2 Agarose-Formaldehyd-Gel

Die Elektrophorese mit einem Agarose-Formaldehyd-Gel dient zur Größenauftrennung von RNA und wird auch eingesetzt, um die Qualität von Gesamt-RNA zu beurteilen. Im Gegensatz zum „normalen“ Agarosegel soll hier der Puffer die Bildung von

RNA-Sekundärstrukturen verhindern und so die Migration der RNA-Moleküle der Größe entsprechend gewährleisten.

Zur Vorbereitung eines einprozentigen Gels wurden 1g Agarose in 72 ml H<sub>2</sub>O bis zur Lösung erhitzt. Nachdem die Lösung auf 60 °C abgekühlt war, wurden 10 ml 10x MOPS Running-Puffer und 18 ml 37% Formaldehyd zugegeben. Da Formaldehyd toxisch ist, wurde mit dieser Substanz ausschließlich unter dem Abzug gearbeitet. Die Lösung wurde in einen Gelträger mit einem geeigneten Kamm kgegossen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Nachdem das Gel fest wurde, wurde es in eine Gelkammer gelegt und diese mit 1x MOPS Puffer aufgefüllt.

Die RNA-Proben (0,5-10 µg) wurden mit H<sub>2</sub>O bis zum Gesamtvolumen von 6 µl aufgefüllt, danach 5 µl 10x MOPS Running-Puffer, 9 µl 37% Formaldehyd, 25 µl Formamid zugegeben und 15 Min bei 55 °C inkubiert. Bevor die RNA-Proben auf das Gel aufgetragen wurden, wurden jeweils 5 µl Formaldehyd-Ladepuffer zugegeben. Die Elektrophorese wurde bei 80 V über drei Stunden durchgeführt. Nach der Elektrophorese erfolgte das Waschen des Gels für 40 Minuten in 0.5 M Ammoniumazetat mit einem Lösungswechsel nach 20 Minuten, um Formaldehydreste zu entfernen. Anschließend wurde zu der Ammoniumazetatlösung Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml) zugegeben. Nach einer Stunde konnte das Agarose-Formaldehyd-Gel unter UV-Licht begutachtet werden. Die Qualität der RNA wurde anhand der 18S und 28S RNA-Banden beurteilt.

### 3.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Ermittlung der DNA-Nukleotidsequenz. Das Prinzip der hier verwendeten Methode nach Sanger beruht auf der Zugabe von fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Varianten der einzelnen Nukleotide (ddNTPs) in den Reaktionsansatz der PCR-ähnlichen Sequenzierungsreaktion. Bei der Sequenzierung wird im Vergleich zur PCR nur ein Primer eingesetzt. Der wesentlichste Unterschied zwischen der PCR und der Sequenzierreaktion ist aber, dass es durch den Einsatz der ddNTPs bei der Sequenzierreaktion nicht, so wie bei der PCR, zu einer Kettenreaktion kommt, die zur Vermehrung von doppelsträngiger DNA dient.

Da die ddNTPs keine 3'-Hydroxygruppe besitzen, führt ihr Einbau in die DNA-Sequenz zum

## Methoden

---

Abbruch der Polymerisation. Dadurch entsteht eine Mischung von Fragmenten unterschiedlicher Länge, die mittels Kapillarelektrophorese längenabhängig getrennt werden können. Die jeweiligen ddNTPs können anhand individueller Fluorophore unterschieden werden. Ein Detektor erkennt während der Elektrophorese die unterschiedlich fluoreszierenden DNA-Fragmente. Aus der Abfolge dieser Signale kann die Sequenz ermittelt werden. Für die bei dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde das Gerät *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* des Herstellers *Applied Biosystems* verwendet. Zur Auswertung der Sequenzdaten wurde das Computerprogramm *FinchTV* benutzt. Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit Hilfe des *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (*Applied Biosystems*) durchgeführt.

### Sequenzierreaktionsansatz:

Template	x $\mu\text{l}$
Primer (1,6 $\mu\text{mol/l}$ )	1 $\mu\text{l}$
BigDye Terminator v3.1	2 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu\text{l}$

### Sequenzierreaktionsbedingungen:

25 Zyklen:	96 °C	10 Sek
	50 °C	5 Sek
	60 °C	4 Min

Anschließend folgt eine Aufreinigung des Sequenzierproduktes mittels 300  $\mu\text{l}$  Sephadex G-50 Superfine Lösung auf einer 96-Well-Sephadexfilterplatte (*MAHVN 45; Millipore*). Das Sephadex sollte vorher mindestens vier Stunden lang in dd H<sub>2</sub>O gequollen sein. Beim anschließenden Zentrifugieren der Platte (730 G für zwei Minuten) passiert das Sequenzierprodukt die Sephadexmatrix. Primer, Oligonukleotide und weitere Reste des Reaktionsmixes werden zurückgehalten. Dem Durchfluss werden 10  $\mu\text{l}$  Formamid

zugegeben und anschließend in den Sequenzierer geladen.

### 3.5 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die humane Neuroblastom-Zelllinie *SK-N-AS* (*Neuroblastom*, ATCC Nr.: CRL 2137) verwendet.

#### 3.5.1 Auftauen, Kultivieren und Einfrieren von *SK-N-AS*-Zellen

Die *SK-N-AS*-Zellen wurden in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$  aufbewahrt. Zum Auftauen wurde ein Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen, bei  $37\text{ °C}$  im Wasserbad schnellstmöglich aufgetaut und die Zellen dann sofort in ein bereits vorbereitetes Kulturgefäß mit warmem Kulturmedium hinzugegeben. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach etwa 8 Stunden.

Als adhärent wachsende Zellen wurden *SK-N-AS*-Zellen in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm (*Cellstar*, *Greiner Bio-One*) bei  $37\text{ °C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert. Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop beobachtet, und spätestens nach zwei Tagen wurde das Medium (*DMEM*, *CCPRO*) erneuert. Erreichten die Zellen eine Konfluenz von etwa 70-90%, wurden sie passagiert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit 1x PBS (*PAA Laboratories*) gewaschen, vorgewärmtes Trypsin (*TrypLE Express*, *GIBCO*) zugegeben und für 5 Min bei  $37\text{ °C}$  inkubiert. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde die Wirkung des Trypsins gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einer neuen Kulturschale mit vorgewärmtem Kulturmedium 1:4 verdünnt.

Um Zellen einzufrieren, wurden diese beim Erreichen einer Zelldichte von 70-90% mit 1x PBS gewaschen und von der Kulturschale durch Trypsinieren abgelöst. Anschließend wurde bei 600 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Danach wurde das überflüssige Medium abgesaugt, das gewonnene Zellpellet in 1,5 ml Einfriermedium (*Cryo-safe Medium*, *CCPRO*) resuspendiert und in Kryoröhrchen einpipettiert. Um ein langsames Abkühlen der Zellen zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen in einen Einfrierbehälter (*NUNC*) gestellt und bei

-80 °C eingefroren. Der Einfrierbehälter stellt durch die langsame Kühlrate von etwa 1 °C pro Minute sicher, dass sich keine für die Zellen schädlichen Eiskristalle bilden. Nach dem vollständigen Abkühlen auf -80 °C wurden die Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

### 3.6 Klonierung der Expressionsvektoren

Für die Klonierung wurden die durch PCR amplifizierten Exons d3 und d4 in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) der Firma *Invitrogen* ligiert.

Der Vektor pcDNA3.1(+) beinhaltet in seiner Sequenz Resistenz-Gene für Neomycin und Ampicillin und ermöglicht so Selektion in Bakterien und eukaryotischen Zellen. Für die Überexpression des Inserts in Säugetierzellen besitzt er einen CMV-Promotor („cytomegalovirus immediate-early“-Promotor).

#### 3.6.1 Restriktionsverdau

Desweiteren beinhaltet der pcDNA3.1(+)-Vektor stromabwärts des CMV-Promotors Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen. Hier wurde der Vektor mittels *EcoRV* linearisiert, um an dieser Stelle das Insert (die Exons d3, d4) einzufügen.

##### Restriktionsverdauansatz:

pcDNA 3.1(+)-Vektor-DNA (1,9 µg/µl)	2,65 µl (entspricht insgesamt 5 µg DNA)
Puffer NEB 3 (New England Biolabs)	5 µl
BSA	0,5 µl
<i>EcoRV</i> (New England Biolabs)	2 µl
H <sub>2</sub> O	39,85 µl

Die Inkubation des Ansatzes bei 37 °C dauerte zwei Stunden, anschließend wurde das Enzym

20 Minuten lang bei 80 °C inaktiviert.

### 3.6.2 Dephosphorylierung

Um Rezirkularisierung des Vektors während der Ligation zu verhindern, wurden die freien 5'-Enden dephosphoryliert.

Dem zuvor inaktivierten *EcoRV*-Verdau wurden:

5,5 µl Antarctic Phosphatase Puffer (New England Biolabs) und

1 µl Antarctic Phosphatase (New England Biolabs)

zugegeben. Inkubiert wurde zwei Stunden lang bei 37 °C, daraufhin folgte die Inaktivierung für 30 Minuten bei 65 °C.

Das Produkt der Reaktion wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht-Kontrolle ausgeschnitten und anschließend die DNA aus dem Agarose-Gel extrahiert (*QIAquick Gel Extraction Kit*; Qiagen).

### 3.6.3 Amplifikation des *DYT3* Exon d3 und Exon d4 Wild-Typ (WT) Inserts

Für die Amplifikation der Exons d3 und d4 wurde cDNA aus humanem fötalem Gehirn verwendet. Für die Reverse Transkription der RNA in cDNA wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen) verwendet. Die Reaktion erfolgte gemäß Anleitungen des Herstellers. Nach der Reversen Transkription folgte die Polymerase-Kettenreaktion:

#### PCR-Reaktionsansatz:

Puffer Pfu Ultra 5 µl

dNTPs (10 mM) 1,5 µl

## Methoden

---

Primer Ex3StF (25 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Primer Ex4EndR (25 pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
cDNA aus dem menschlichen föetalen Gehirn	1 $\mu$ l (entspricht 10 ng)
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

### PCR-Bedingungen:

1 Zyklus:	95 °C	2 Min
35 Zyklen:	95 °C	30 Sek
	60 °C	30 Sek
	72 °C	1Min:15 Sek
1 Zyklus:	72 °C	10 Min

### **3.6.4 Transformation und Kultivierung von *E.coli***

Als nächster Schritt wurde das Ausgangsprodukt dieser PCR-Reaktion mit Hilfe des Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kits in den pCR-BluntII TOPO Klonierungsvektor kloniert und anschließend in kompetente *E.coli* TOP 10 transformiert. Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Die Bakterien wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit dem Antibiotikum Kanamycin in einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml selektiert. Von resistenten Klonen wurden Übernachtskulturen angefertigt. LB-Flüssigmedium mit Kanamycin (50  $\mu$ g/ml) wurde mit einer Impföse angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet.

Hiernach wurden mittels *EcoRV*-Verdau Klone mit richtiger Insert-Orientierung selektiert.

Es wurde ein Klon ausgewählt und das Insert mit den Sequenzierprimern M13 Forward und M13 Reverse vollständig sequenziert. Nach der Überprüfung der Sequenz wurde der Klon als *pCR-Blunt IITOPOEx3-4WT* bezeichnet und für die weiteren Klonierungsschritte ausgewählt.

### 3.6.5 Mutagenese zur Generierung von DSC3

Trotz zahlreicher Versuche ist die Amplifikation der Exons d3 und d4 aus den lymphoblastoiden Zellen gescheitert. Da sonst keine RNA aus Patientenmaterial zur Verfügung stand, mußte die krankheitsspezifische Mutation DSC3 durch *in vitro* Mutagenese generiert werden. Hierfür wurde der *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)* verwendet. Es wurde nach Hersteller-Protokoll vorgegangen.

#### Mutagenese-PCR-Reaktionsansatz:

Reaction Buffer	5 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
Primer c1259t (100 ng/µl)	1,25 µl
Primer c1259t_antisense (100 ng/µl)	1,25 µl
Template <i>pCR-Blunt IITOPOEx3-4 antisense</i>	1 µl (entspricht 5 ng)
Pfu Ultra Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

#### Mutagenese-PCR-Reaktionsbedingungen:

1 Zyklus:	95 °C	30 Sek
12 Zyklen:	95 °C	30 Sek
	55 °C	1 Min

68 °C

6 Min

Im nächsten Schritt wurde die parentale DNA durch einen *DpnI*-Verdau (*New England Biolabs*) gespalten (2 Stunden bei 37 °C, 20 Minuten bei 80 °C inaktiviert). 5 µl des Ausgangsproduktes des Verdau wurden für die Transformation von *E.coli* TOP 10 eingesetzt. Die Selektion der Bakterien erfolgte auf LB-Agarplatten mit Kanamycin. Anschließend wurden Übernachtskulturen angefertigt. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde *QIAprep Spin Miniprep Kit* benutzt. Bei einem der Klone wurde schließlich das Insert vollständig sequenziert, um Fehler auszuschließen und um die erfolgreiche Mutagenese vom WT hinzu DSC3 nachzuweisen. Dieser Klon wurde *pCR-Blunt IITOPOEx3-4DSC3* benannt.

### 3.6.6 Amplifikation der DSC3- und WT-Exon d3 und d4 Inserts aus TOPO-Vektoren

#### PCR-Reaktionsansatz:

Puffer <i>PFU Ultra</i>	5 µl
dNTPs (10mM)	1,5 µl
Primer Ex3StF-P (25 pmol/µl)	1 µl
Primer Ex4EndR-P (25 pmol/µl)	1 µl
Template pCR-Blunt IITOPOEx3-4WT /pCR-Blunt IITOPOEx3-4DSC3	1 µl (entspricht 10 ng)
Pfu Ultra Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

#### PCR-Bedingungen:

1 Zyklus:	95 °C	2 Min
-----------	-------	-------

## Methoden

---

35 Zyklen:	95 °C	30 Sek
	60 °C	30 Sek
	72 °C	1Min:15 Sek
1 Zyklus:	72 °C	10 Min

Das Produkt der PCR-Reaktion wurde auf ein Agarose-Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese wurden die ca. 2 kb großen Banden unter UV-Licht-Kontrolle ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* aufgereinigt.

### 3.6.7 Ligation

Das Insert bestehend aus Exon d3 und Exon d4 wurde anschließend in den *EcoRV*-verdauten und dephosphorylierten Vektor pcDNA3.1(+) ligiert. Dazu wurde *Quick Ligase (New England Biolabs)* eingesetzt. Hier handelt es sich um ein Enzym, das DNA-Fragmente kovalent verbinden kann.

Vektor pcDNA3.1(+)	3 µl (entspricht 150 ng)
Insert Exon d3/Exon d4 WT oder DSC3	1 µl (entspricht 50 ng)
Quick Ligase Puffer	10 µl
Quick Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Die Inkubation bei Raumtemperatur für 10 Min.

5 µl des Ligationsproduktes wurden für die Transformation in chemisch kompetente *E.coli*

TOP 10 eingesetzt. Die Bakterien wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit Ampicillin einer Konzentration von 50 µg/ml aufplattiert. Nach Selektion der positiven Klone wurden Übernachtskulturen vorbereitet und diese bei 37°C im Schüttelinkubator bis zum nächsten Morgen inkubiert. Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde das *QIAprep Spin Miniprep* Kit verwendet.

Danach folgte ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *SspI*, um nach positiven Klonen zu screenen. Es wurde je ein sense-orientierter Klon ausgewählt und mit den Primern SYBR3/4-F, SYBR3/4-R, T7, Ex3St-F, Ex4End-R, Template1 Reverse, 189510R, LTR12-F4 sequenziert. Durch die Sequenzierung wurde nachgewiesen, dass das Insert fehlerfrei war. Die Expressionsvektoren wurden pcDNA3.1(+)*Ex3/4* WT und pcDNA3.1(+)*Ex3/4* DSC3 genannt.

Für die Transfektion sollten die zirkulären Vektoren schließlich linearisiert werden, um die Rekombination mit der chromosomalen DNA zu erleichtern.

Die Linearisierung erfolgte mittels *ScaI*-Verdau. Die Produkte des *ScaI*-Verdaus wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen, die Banden mit der richtigen Größe unter UV-Licht-Kontrolle ausgeschnitten, aus dem Gel extrahiert und gefällt.

### 3.7 Transfektion

Die Transfektion ist eine Methode, um heterologe DNA in Zellen einzuführen. In der vorliegenden Doktorarbeit wurden mit Hilfe dieses Verfahrens die Vektoren pcDNA3.1(+)*Ex3/4*WT bzw. DSC3 in die Neuroblastom-Zelllinie SK-N-AS erfolgreich eingeschleust. Als Transfektionsreagenz wurde *Effectene* der Firma *Qiagen* verwendet. Desweiteren wurden als Negativkontrolle die Zellen auch mit dem Vektor ohne Insert transfiziert.

Bei der Transfektion komplexiert die DNA zusammen mit dem Transfektionsreagenz spontan zu Micellen, welche über einen endosomalen Weg in die Zelle transportiert werden können.

Die Durchführung der Methode richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Zur Kultivierung der Zellen wurden 6-Well-Kulturplatten (*Cellstar, Greiner Bio-One*) verwendet. Als Kontrolle diente eine Kultur mit nicht-transfizierten SK-N-AS Zellen.

Etwa 8 Stunden nach der Transfektion wurde das Kulturmedium abgenommen, die adhärennten Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und es wurde frisches Medium mit dem Antibiotikum *Geneticin (Invitrogen)* in einer Konzentration von 400 µg/ml zur Selektion erfolgreich transfizierter Zellen zugegeben. Nach 2-3 Wochen Kultivierung mit Antibiotikum wurden ersten *Geneticin*-resistenten Kolonien sichtbar. Nachdem die Kolonien auf der 6-Well-Platte ein Zell-Monolayer gebildet hatten, konnten sie trypsinisiert und auf eine größere Kulturschale mit 10-cm-Durchmesser übertragen werden.

Durch anschließende RNA-Isolierung konnte aus den SK-N-AS-Zellen die Gesamt-RNA für weitere Experimente gewonnen werden.

Nach Überprüfen des Konstruktes durch Real-Time-PCR und anschließende Sequenzierung wurde die RNA-Konzentration und Reinheit im Spektrophotometer gemessen und die Integrität der RNA mittels Agarose-Formaldehyd-Gel überprüft.

### **3.8 Microarray-Genexpressionsanalyse**

Die Microarray-Genexpressionsanalyse ermöglicht die gleichzeitige Messung der Expression einer grossen Anzahl von Genen. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit präsentierte „Whole-Genome Gene Expression Analysis“ wurde in der Abteilung Genomics and Immunoregulation, LIMES Institute, Universität Bonn unter der Leitung von Prof. Dr. J. L. Schultze durchgeführt.

Für die Microarray-Analysen wurden jeweils 500 ng Gesamt-RNA, isoliert aus den transfizierten Neuroblastom-Zellen, eingesetzt. Im ersten Schritt der Microarray-Analyse wurde die RNA durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend erfolgte die Synthese des zweiten komplementären cDNA Stranges. Anschließend erfolgte eine *in vitro* Transkription, während der Biotin-markierte Nukleotide in die neugebildeten

cRNAs eingebaut wurden. Daraufhin wurden die Proben auf *HumanWG-6 v3.0 Expression BeadChips (Illumina)* aufgetragen und hybridisiert.

Nach der Hybridisierung wurde *Streptavidin-Cy3* zugesetzt. Nachdem das nicht-hybridisierte Material aus den Proben ausgewaschen wurde, wurde der Chip mit dem *Illumina BeadArray Reader* gescannt. Je mehr Probe an die jeweilige Sonde hybridisiert wurde, desto intensiver war das Fluoreszenz-Signal und desto höher war zugleich auch die Expression des Gens. Die bioinformatische Auswertung der Daten erfolgte ebenfalls durch die Mitarbeiter der Abteilung Genomics and Immunoregulation in LIMES Institut an der Universität Bonn.

### **3.8.1 Analyse Microarray-Daten**

Zur Analyse der Microarray-Daten wurde der *Allen Mouse Brain Reference Atlas* verwendet. Der *Allen Mouse Brain Reference Atlas* enthält Daten zur Genexpression von mehr als 21 000 Genen im murinen Gehirn. Er ermöglicht die Analyse des Genexpressionsmusters in einzelnen neuroanatomischen Strukturen. Das Gehirn der Maus dient als ein gutes Model für menschliche Hirnfunktionen und neurologische Erkrankungen. Die Daten für den *Allen Mouse Brain Reference Atlas* wurden generiert mit der Hilfe von In-Situ-Hybridisierung.

Desweiteren wurde die Analyse der Microarray-Daten mithilfe des Computerprogramms *DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)* durchgeführt. Dies ermöglichte eine funktionelle Analyse der durch die DSC3-Mutation über- und unterexprimierten Gene.

### **3.8.2 Bestätigung der Microarray-Daten**

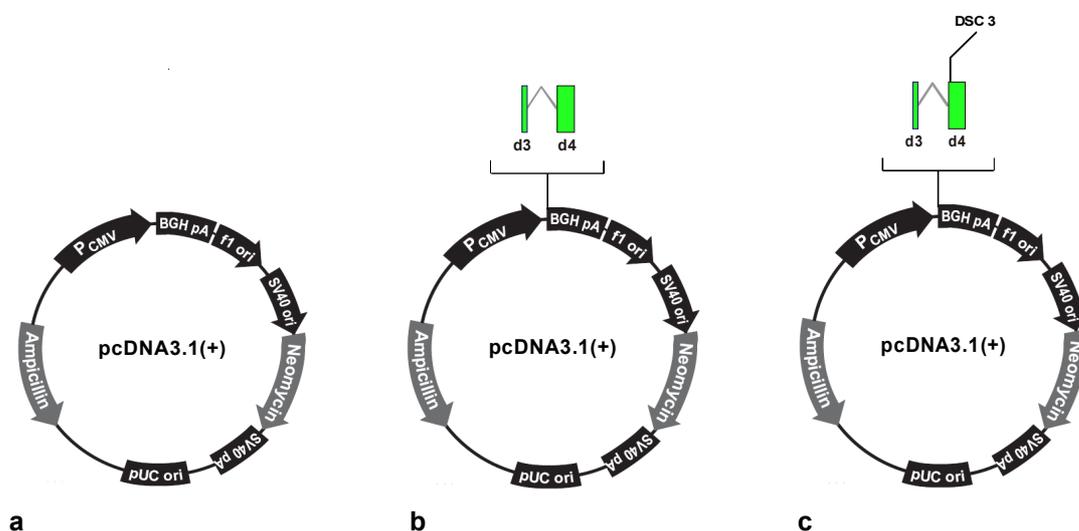
Um die Ergebnisse der Microarrayanalysen zu bestätigen, wurden Real-Time-PCR-Experimente für ausgewählte Gene durchgeführt. Mit deren Hilfe konnte die Genexpression in den RNA-Proben erneut überprüft werden. Dazu wurden die Primer ANXA 10-F, ANXA 10-R, CHGA-F, CHGA-R, CHGB-F, CHGB-R, CRH-F, CRH-R, DBH-F, DBH-R, GREM1-F, GREM1-R, NPTX2-F, NPTX2-R verwendet. Für Ansatz und Bedingungen der Reaktion siehe 3.2.3.

## 4 Ergebnisse

Der Ergebnisteil der vorliegenden Doktorarbeit setzt sich aus drei Hauptteilen zusammen. Der erste Teil besteht aus den Ergebnissen der Microarrays-Analyse und ihrer Auswertung (4.3 – 4.5). Im zweiten Teil werden qPCR Experimente von Genen, die nach der Microarray-Analyse dysreguliert erschienen, beschrieben (4.6). Der dritte Teil (4.7) zeigt das Ergebnis der *in silico* Analyse zur Funktion der dysregulierten Gene mit Hilfe der DAVID-Datenbank.

### 4.1 Transfektanten

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen der humanen Neuroblastom-Zelllinie SK-N-AS mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1(+), welcher die Exons d3 und d4 des *TAF1/DYT3*-Transkriptionssystems überexprimiert (Abbildung 3), transfiziert. Die Selektion der stabilen Zelllinien wurde mit Hilfe von *Geneticin* (*Invitrogen*) durchgeführt. Die aus den transfizierten Zelllinien gewonnene RNA wurden durch Microarray analysiert.



**Abbildung 3: Die Konstrukte verwendeten für die Transfektion.**

**a) pcDNA3.1(+)**VECTOR ONLY: Der für die Experimente verwendete Expressionsvektor. **b)** Das Konstrukt **pcDNA3.1(+)**Ex3/4WT beinhaltet den pcDNA3.1(+)-Vektor mit einem Insert bestehend aus der Exons d3 und d4 des *TAF1/DYT3*-Transkriptionssystems, ohne die krankheitsspezifische Mutation. **c)** **pcDNA3.1(+)**Ex3/4DSC3: Das selbe Konstrukt mit der krankheitsspezifischen Mutation DSC3.

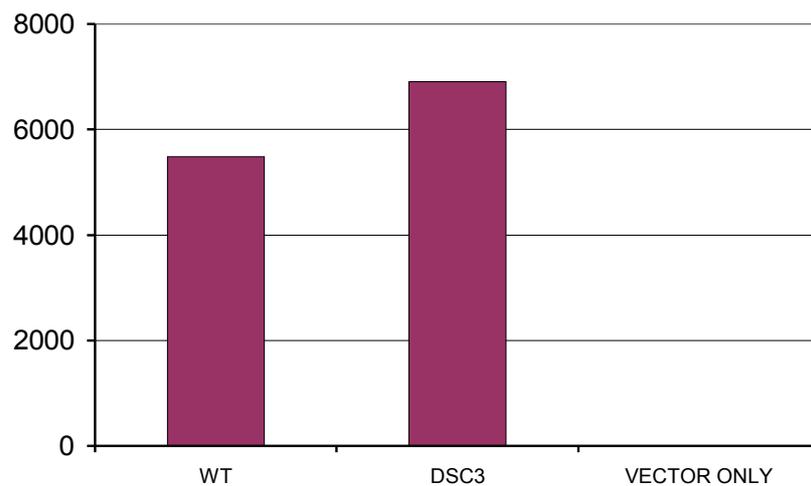
Die Entscheidung, für die Experimente das Konstrukt bestehend aus Exon d3 und Exon d4 des *TAF1/DYT3*-Transkriptsystems anzuwenden, wurde aus folgenden Gründen getroffen:

- Alle Transkripte des *TAF1/DYT3*-Transkriptsystems nutzen die Exons d3 und d4
- *DSC3* befindet sich als einzige krankheitsspezifische Mutation in einem Exon (Exon d4).

Dies deutet auf eine wichtige Funktion der Exons d3 und d4 hin, sowie auf eine mögliche krankheitsverursachende Bedeutung von *DSC3*.

## 4.2 Kontrolle der Überexpression

Um zu überprüfen, ob Exons d3 und d4 tatsächlich überexprimiert werden, wurden Real-Time-PCR-Experimente mit den Primern SYBR3/4-F und SYBR3/4-R durchgeführt. Diese haben Überexpression des Inserts in den transfizierten Zellen bestätigt. Die 282 bp langen Produkte der Real-Time-PCR-Reaktion wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen, die Banden nach dem Lauf ausgeschnitten und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen)* isoliert. Anschließend wurde das Amplifikat mit den Primern SYBR3/4-F und SYBR3/4-R sequenziert. Dies konnte bestätigen, dass es sich bei beiden transfizierten Zelllinien um das richtige überexprimierte Insert handelt und es nicht zu einer Kreuzkontamination gekommen war.

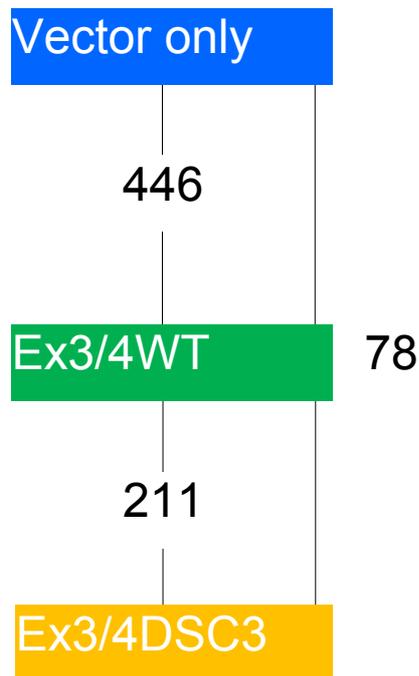


**Abbildung 4: Kontrolle der Überexpression in den transfizierten Zelllinien mit Hilfe von Real-Time-PCR.** WT steht für die Expression des Inserts mit den Exons d3, d4-Wild-Typ relativiert auf die Genexpression der VECTOR ONLY-Transfektanten ohne Insert, DSC3 steht für die Expression des Inserts mit den Exons d3, d4 mit der krankheitsspezifischen Mutation DSC3 relativiert auf die Expression mit dem leeren Vektor pcDNA3.1(+). VECTOR ONLY gleicht dann dementsprechend bei dieser Darstellung  $2^0=1$ .

### 4.3 Microarray-Genexpressionsanalyse

Für die Microarray-Genexpressionsanalyse wurden *HumanWG-6 v3.0 Expression BeadChips* (Illumina) eingesetzt. Diese „Whole-Genome“ Genexpressionsanalyse diente als Screening-Untersuchung, um den Einfluss von DSC3 auf die Expression der mehr als 48000 nachweisbaren Transkripte zu beurteilen.

Die Genexpressionsprofile der mit den Vektoren pcDNA3.1(+)*Ex3/4WT*, pcDNA3.1(+)*Ex3/4DSC3* und mit pcDNA3.1(+)*VECTOR ONLY* transfizierten Neuroblastom-Zellen wurden verglichen und signifikant dysregulierte Gene mit einem Expressionsunterschied von mindestens Faktor 2 identifiziert.

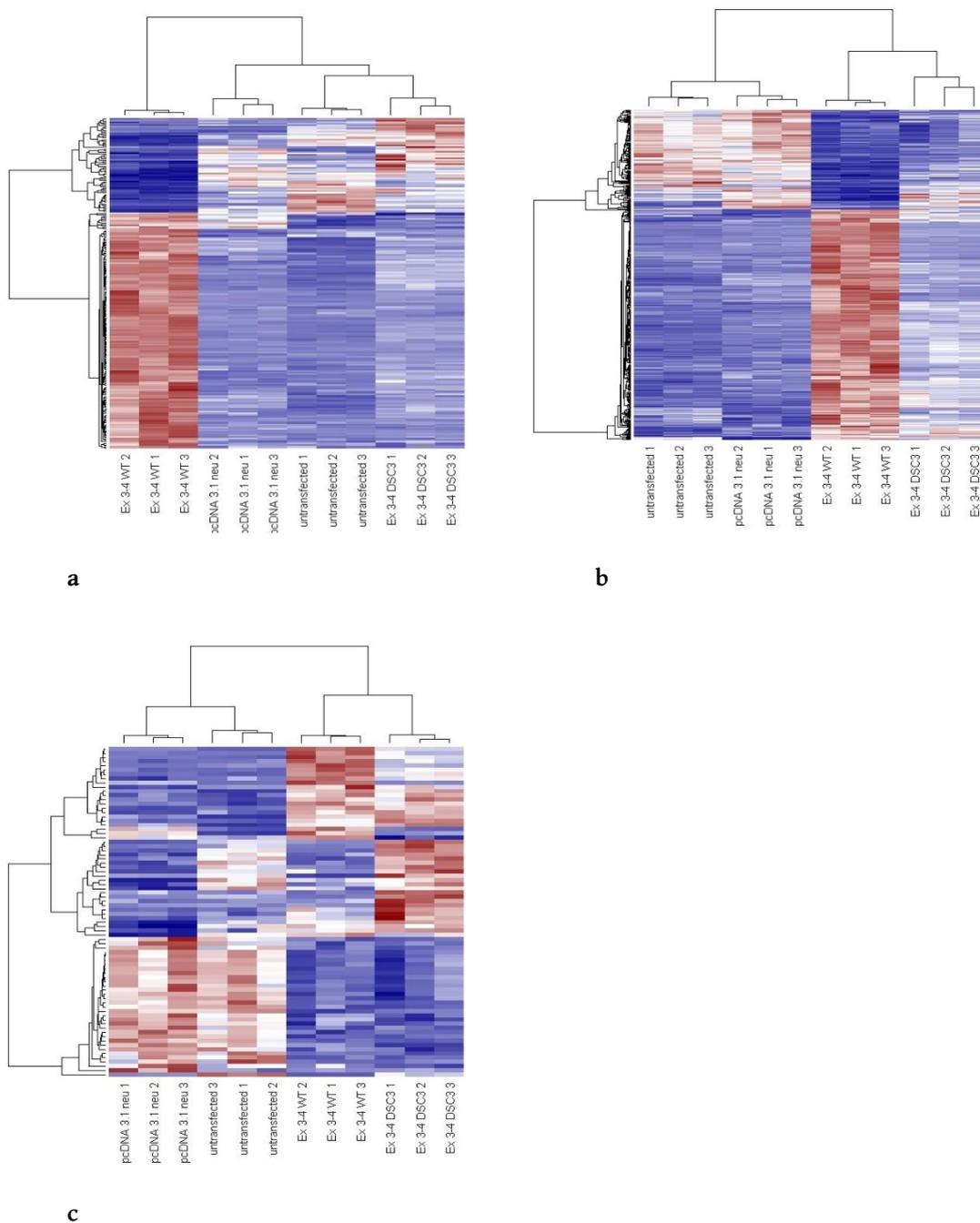


**Abbildung 5: Vergleich der signifikant dysregulierten Gene zwischen den mit Vektoren pcDNA3.1(+)*Ex3/4WT*, pcDNA3.1(+)*Ex3/4DSC3* und pcDNA3.1(+)*VECTOR ONLY* transfizierten Zellen.** Die Abbildung zeigt die Zahl der dysregulierten Gene im Vergleich der einzelnen Transfektanten.

Als ein Ergebnis der Clusteranalyse zeigte sich, dass die Zellen mit DSC3 ein ähnliches Genexpressionsprofil zu den Zellen mit VECTOR ONLY aufweisen. Hier wurden 78 Gene identifiziert, die den vorher festgelegten Kriterien (Expressionsunterschied von mindestens Faktor 2) entsprachen. Der Vergleich zwischen WT-Zellen und Zellen mit DSC3 ergab hingegen 211 Gene die dysreguliert waren. Der Vergleich zwischen WT-Zellen und VECTOR ONLY ergab 446 dysregulierte Gene (Abbildung 5).

Eine Auflistung aller dysregulierten Gene findet sich im Anhang dieser Doktorarbeit.

Die Abbildung 6 stellt die hierarchische Cluster-Analyse aus den Daten der Microarray-Analyse dar. Hochregulierte Gene wurden rot dargestellt, herunterregulierte Gene blau. Die Farbe Weiss bedeutet, dass keine signifikante Regulation statt fand.



**Abbildung 6: Hierarchische Cluster-Analysen der unterschiedlich exprimierten Gene in SK-N-AS-Zellen (Gentleman et al., 2004). a) Vergleich zwischen den Neuroblastom-Zellen transfiziert mit dem Konstrukt pcDNA3.1(+)*Ex3/4WT* und pcDNA3.1(+)*Ex3/4DSC3*, sowie pcDNA3.1(+)*Ex3/4WT* und pcDNA3.1(+)*VECTOR ONLY* (b) und pcDNA3.1(+)*Ex3/4WT* und pcDNA3.1(+)*VECTOR ONLY* (c).**

Sehr deutlich zu erkennen ist in der Abbildung 6a) die Gruppe der rot gefärbten hochregulierten Gene bei den mit dem Wild Typ-Konstrukt transfizierten Zellen. Dieser

Effekt tritt unter dem Einfluss der Punktmutation DSC3 nicht mehr auf. Eine Liste der 211 zwischen WT und DSC3 differenziell exprimierten Gene findet sich im Anhang.

#### 4.4 Vergleich der Microarray-Daten mit dem *Allen Mouse Brain Reference Atlas*

Anhand der Microarray-Ergebnisse wurden weitere Analysen zur Expression der dysregulierten Gene in murinem Gehirn gemacht. Hierfür wurde der *Allen Mouse Brain Reference Atlas* verwendet, welcher eine Übersicht des Genexpressionsmusters in einzelnen neuroanatomischen Strukturen gibt. Aufgrund der Tatsache, dass 90% der Gene in murinem und humanem Gehirn homolog sind, dient das Gehirn der Maus als beste verfügbare Datengrundlage. Die Daten für den *Allen Mouse Brain Reference Atlas* wurden mit der Hilfe von In-Situ-Hybridisierung generiert (Lein et al., 2007).

Bei den Analysen der Microarray-Daten mit Hilfe des *Allen Mouse Brain Reference Atlas* war in erster Linie die Genexpression im murinen Striatum interessant, weil diese Hirnstruktur bei XDP-Patienten erheblichen neuropathologischen Veränderungen unterliegt (Eidelberg et al., 1993, Goto et al., 2005, Waters et al., 1993).

Aus der Liste der 211 dysregulierten Gene (Ex3/4WT gegen Ex3/4DSC3) wurden diejenigen Gene selektiert, die in murinem Striatum hoch exprimiert sind. Es handelte sich um eine Gruppe von 43 Genen (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Unterschiedlich exprimierte Gene mit einer hohen Expression im murinen Striatum**

<i>Gen-Symbol</i>	<i>Gen-Name</i>	Entrez Gen ID	Mittelwert Ex3/4WT	Mittelwert Ex3/4DSC3	Fold-Change	p-Wert	Differenz
<i>INSM2</i>	<i>insulinoma-associated 2</i>	84684	156,28	2242,45	-14,35	0	2086,17
<i>CHGB</i>	<i>chromogranin B (secretogranin 1)</i>	1114	115,83	1115,64	-9,63	0	999,81
<i>CHGA</i>	<i>chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)</i>	1113	4703,39	18385,16	-3,91	0	13681,77
<i>NPTX2</i>	<i>neuronal pentraxin II</i>	4885	95,72	352,86	-3,69	0	257,14
<i>SUSD2</i>	<i>sushi domain containing 2</i>	56241	140,15	465,09	-3,32	3,00E-04	324,94
<i>TAC1</i>	<i>tachykinin, precursor 1</i>	6863	76,38	198,71	-2,6	0,0444	122,33

## Ergebnisse

TRIM9	<i>tripartite motif-containing 9</i>	114088	250,48	650,46	-2,6	0	399,98
PLEKHA6	<i>pleckstrin homology domain containing, family A member 6</i>	22874	187,07	450,52	-2,41	0	263,45
NEFH	<i>neurofilament, heavy polypeptide</i>	4744	89,24	211,18	-2,37	4,00E-04	121,95
RGS4	<i>regulator of G-protein signaling 4</i>	5999	551,56	1295,67	-2,35	0	744,1
HES6	<i>hairy and enhancer of split 6 (Drosophila)</i>	55502	685,51	1499,34	-2,19	6,00E-04	813,83
ACCN2	<i>amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal</i>	41	223,14	478,67	-2,15	0	255,53
SNAP25	<i>synaptosomal-associated protein, 25kDa</i>	6616	335,62	697,21	-2,08	0	361,59
DACH1	<i>dachshund homolog 1 (Drosophila)</i>	1602	480,26	987,66	-2,06	0	507,39
OCIAD2	<i>OCIA domain containing 2</i>	132299	844,83	1729,61	-2,05	0	884,78
RIMS3	<i>regulating synaptic membrane exocytosis 3</i>	9783	644,14	1322,52	-2,05	0	678,39
OCIAD2	<i>OCIA domain containing 2</i>	132299	543,62	1101,99	-2,03	0	558,37
NPC2	<i>Niemann-Pick disease, type C2</i>	10577	12106,42	6049,48	2	0	6056,94
COL6A1	<i>collagen, type VI, alpha 1</i>	1291	566,99	280,07	2,02	0	286,92
MYH9	<i>myosin, heavy chain 9, non-muscle</i>	4627	731,66	360,63	2,03	0	371,02
NPAS2	<i>neuronal PAS domain protein 2</i>	4862	253,72	123,85	2,05	0	129,86
SLC44A1	<i>solute carrier family 44, member 1</i>	23446	2113,03	1027,28	2,06	0	1085,76
ST3GAL5	<i>ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 5</i>	8869	437,8	213,04	2,06	0	224,77
TIMP2	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 2</i>	7077	2508,33	1195,09	2,1	0	1313,24
NCALD	<i>neurocalcin delta</i>	83988	995,2	451,63	2,2	0	543,58
CEBPD	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta</i>	1052	850,44	379,95	2,24	0	470,49
F2RL1	<i>coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1</i>	2150	214,7	93,38	2,3	0	121,32
ACOT7	<i>acyl-CoA thioesterase 7</i>	11332	209,77	89,52	2,34	0	120,26
NQO1	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1</i>	1728	2654,63	1071,94	2,48	0	1582,69
SPARC	<i>secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)</i>	6678	4100,62	1653,15	2,48	0	2447,47
RAB27B	<i>RAB27B, member RAS oncogene family</i>	5874	1547,74	614,75	2,52	0	933
FEZ1	<i>fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I)</i>	9638	338,55	115,16	2,94	0	223,39
BDKRB1	<i>bradykinin receptor B1</i>	623	462,41	156,77	2,95	0	305,64
GNPMB	<i>glycoprotein (transmembrane) nmb</i>	10457	397,08	128,47	3,09	0	268,6
IL1RAP	<i>interleukin 1 receptor accessory protein</i>	3556	183,33	56,12	3,27	0	127,21
KIF1A	<i>kinesin family member 1A</i>	547	383,69	107,17	3,58	0	276,52

## Ergebnisse

<i>FRMD4A</i>	<i>FERM domain containing 4A</i>	55691	518,22	135,58	3,82	0	382,64
<i>GREM1</i>	<i>gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)</i>	26585	451,85	102,56	4,41	0	349,3
<i>SPOCK1</i>	<i>sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1</i>	6695	345,94	73,42	4,71	0	272,53
<i>PRNP</i>	<i>prion protein</i>	5621	1953,32	384,15	5,08	0	1569,17
<i>PRNP</i>	<i>prion protein</i>	5621	9770,37	1915,54	5,1	0	7854,83
<i>GREM1</i>	<i>gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)</i>	26585	770,77	131,51	5,86	0	639,26
<i>ACTA2</i>	<i>actin, alpha 2, smooth muscle, aorta</i>	59	3997,66	510,72	7,83	0	3486,94

## 4.5 Auswahl der XDP-Kandidatengene

Von den in Tabelle 10 dargestellten Genen wurden anschließend sieben XDP-Kandidatengene für weitere Analysen ausgewählt (Tabelle 11).

Dabei wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

- Funktion der Gene
- ihr Zusammenhang mit wichtigen physiologischen Prozessen im Gehirn
- ihr Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen wie zum Beispiel Dystonie und Morbus Parkinson

Aufgrund dieser Überlegung wurden weiterhin die Gene *DBH*, *ANXA 10* und *CRH* ausgewählt, die trotz einer nicht so starken Expression im murinen Striatum eine wichtige physiologische Rolle im Gehirn spielen und in unseren Experimenten sehr stark dysreguliert waren.

**Tabelle 11: XDP-Kandidatengene**

Gen-Symbol	Gen-Name	Entrez Gen ID	Mittelwert Ex3/4WT	Mittelwert Ex3/4DSC3	Fold-Change	p-Wert	Differenz
<i>CHGB</i>	<i>chromogranin B (secretogranin 1)</i>	1114	115,83	1115,64	-9,63	0	999,81
<i>DBH</i>	<i>dopamine beta-hydroxylase (dopamine beta-monoxygenase)</i>	1621	168,25	877,67	-5,22	0	709,42
<i>CHGA</i>	<i>chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)</i>	1113	4703,39	18385,16	-3,91	0	13681,77

## Ergebnisse

---

<i>NPTX2</i>	<i>neuronal pentraxin II</i>	4885	95,72	352,86	-3,69	0	257,14
<i>GREM1</i>	<i>gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)</i>	26585	770,77	131,51	5,86	0	639,26
<i>CRH</i>	<i>corticotropin releasing hormone</i>	1392	1463,74	182,83	8,01	0	1280,92
<i>ANXA10</i>	<i>annexin A10</i>	11199	1453,81	145,73	9,98	0	1308,08

---

### 4.6 Bestätigung der Kandidatengene durch Real-Time PCR

Die Expressionsunterschiede der Kandidatengene in den Zellen transfiziert mit pcDNA3.1(+)*Ex3/4DSC3* verglichen mit den Transfektanten mit Wild-Typ wurden durch Real-Time PCR untersucht. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgte über die sogenannte  $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001, Peirson et al., 2003):

$$\Delta Ct_{(Kandidatengen)} = Ct_{(Kandidatengen)} - Ct_{(Housekeeping-Gen)}$$

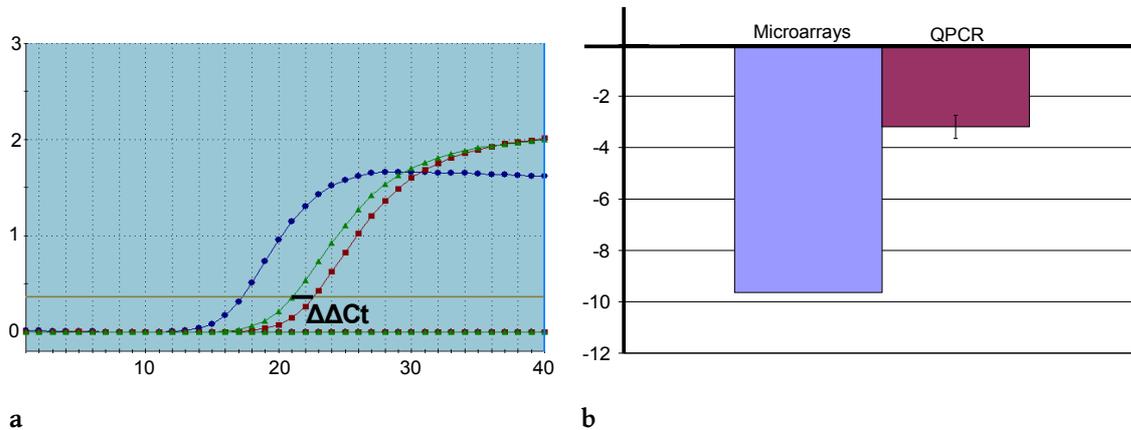
Nach dieser Normalisierung wurde für jedes Kandidatengen die Differenz zwischen den *Ex3/4DSC3*- und *Ex3/4WT*-Transfektanten berechnet.

$$\Delta\Delta Ct_{(Kandidatengen)} = \Delta Ct_{(Kandidatengen-WT)} - Ct_{((Kandidatengen-DSC3)}$$

Die Erhöhung/Senkung der Expression eines Kandidatengens ergibt sich dann direkt aus der Potenz mit der Basis 2 und dem  $\Delta\Delta Ct$  als Exponenten ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ).

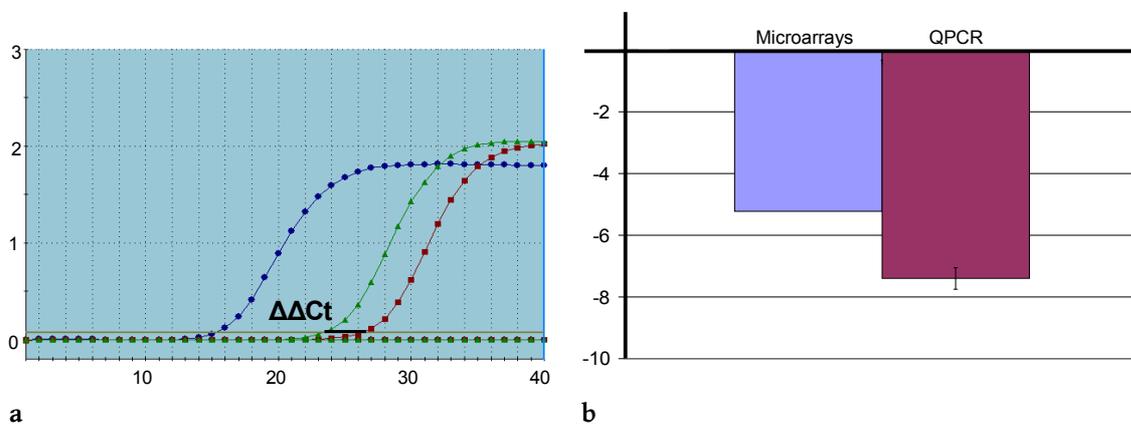
Im Folgenden werden die Ergebnisse aus Real-Time-PCR jedes Kandidatengen separat dargestellt.

### 4.6.1 CHGB



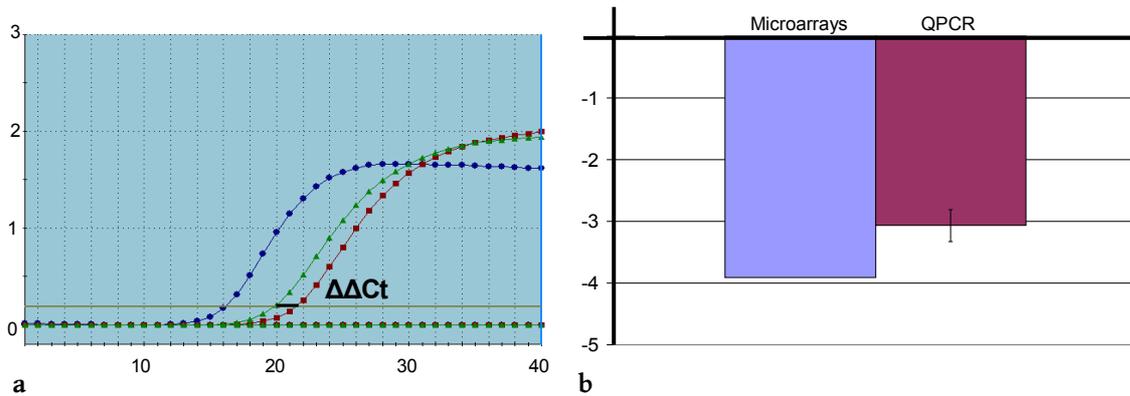
**Abbildung 7: CHGB (Chromogranin B)** a) Die Genexpressionsunterschiede zwischen den Transfektanten mit Ex3/4WT und Ex3/4DSC3: Die Achse x entspricht der Zyklanzahl, die Achse y der Fluoreszenz. Die blaue Standardkurve steht für das Housekeeping-Gen *GAPDH*, rot für die Expression von *CHGB* in WT-transfizierten Zellen und grün für die Expression in DSC3-transfizierten Zellen. Die Differenz ( $\Delta\Delta C_t$ ) zwischen WT und DSC3 entspricht ca. 1,6 Zyklen. b) Der Vergleich der Microarray- und Real-Time-PCR-Daten (QPCR): Die blaue Säule zeigt den Fold Change aus der Microarrayanalyse, die violette steht für den  $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Wert der Real-Time-PCR-Analyse. Die Daten der Real-Time-PCR bestätigen die Microarray-Analyse grundsätzlich.

### 4.6.2 DBH



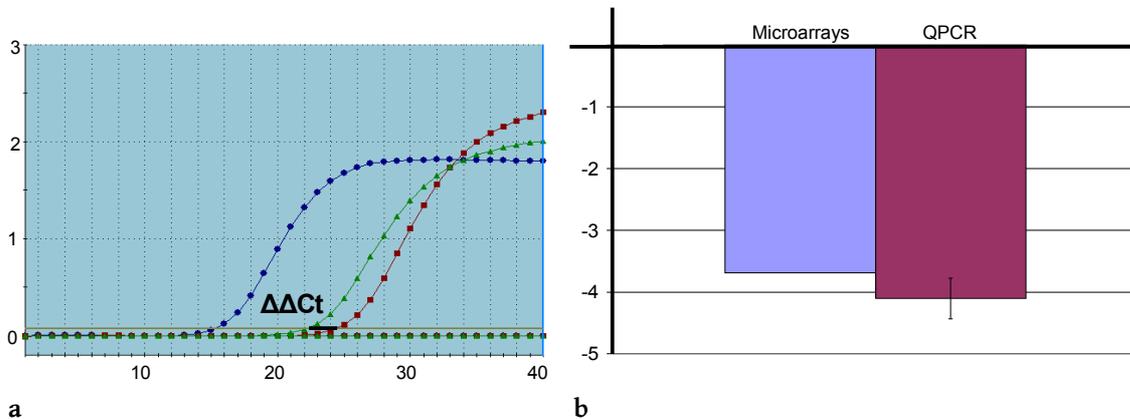
**Abbildung 8: DBH (Dopamin Beta-Hydroxylase)** a) Die Genexpressionsunterschiede zwischen den Transfektanten mit Ex3/4WT und Ex3/4DSC3: Die Achse x entspricht der Zyklanzahl, die Achse y der Fluoreszenz. Die blaue Standardkurve steht für das Housekeeping-Gen *GAPDH*, rot für die Expression von *DBH* in WT-transfizierten Zellen und grün für die Expression in DSC3-transfizierten Zellen. Die Differenz ( $\Delta\Delta C_t$ ) zwischen WT und DSC3 entspricht ca. 3 Zyklen. b) Der Vergleich der Microarray- und Real-Time-PCR-Daten (QPCR): Die blaue Säule zeigt den Fold Change aus der Microarrayanalyse, die violette steht für den  $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Wert der Real-Time-PCR-Analyse. Die Daten der Real-Time-PCR bestätigen die Microarray-Analyse grundsätzlich.

### 4.6.3 CHGA

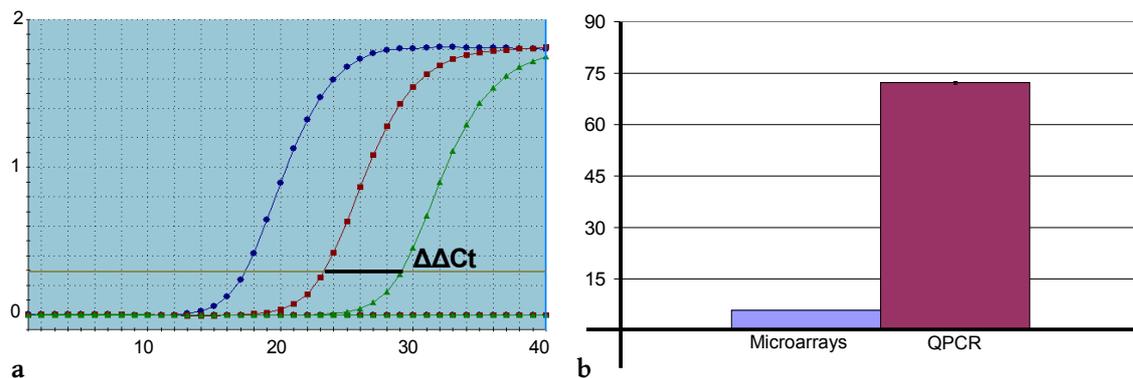


**Abbildung 9: CHGA (Chromogranin A)** a) Die Genexpressionsunterschiede zwischen den Transfektanten mit Ex3/4WT und Ex3/4DSC3: Die Achse x entspricht der Zyklusanzahl, die Achse y der Fluoreszenz. Die blaue Standardkurve steht für das Housekeeping-Gen *GAPDH*, rot für die Expression von *CHGA* in WT-transfizierten Zellen und grün für die Expression in DSC3-transfizierten Zellen. Die Differenz ( $\Delta\Delta C_t$ ) zwischen WT und DSC3 entspricht ca. 1,6 Zyklen. b) Der Vergleich der Microarray- und Real-Time-PCR-Daten (QPCR): Die blaue Säule zeigt den Fold Change aus der Microarrayanalyse, die violette steht für den  $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Wert der Real-Time-PCR-Analyse. Die Daten der Real-Time-PCR bestätigen die Microarray-Analyse grundsätzlich.

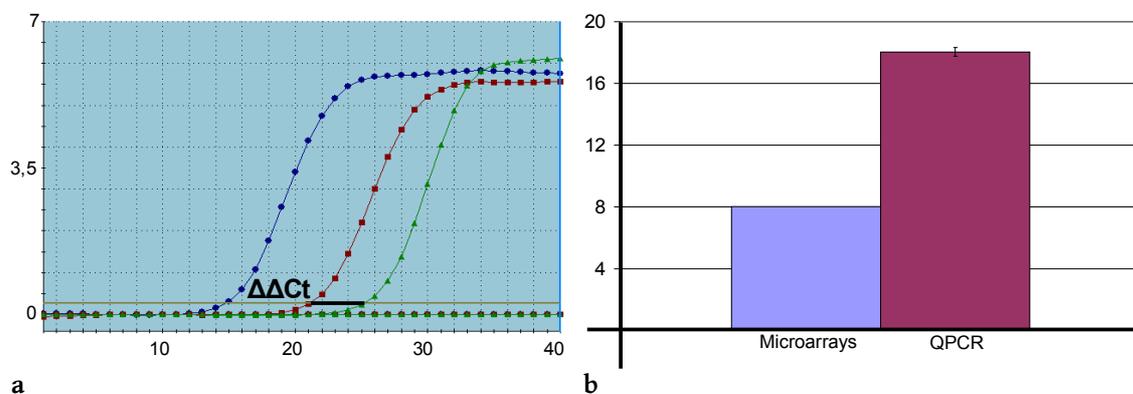
### 4.6.4 NPTX2



**Abbildung 10: NPTX2 (Neuronal Pentraxin II)** a) Die Genexpressionsunterschiede zwischen den Transfektanten mit Ex3/4WT und Ex3/4DSC3: Die Achse x entspricht der Zyklusanzahl, die Achse y der Fluoreszenz. Die blaue Standardkurve steht für das Housekeeping-Gen *GAPDH*, rot für die Expression von *NPTX2* in WT-transfizierten Zellen und grün für die Expression in DSC3-transfizierten Zellen. Die Differenz ( $\Delta\Delta C_t$ ) zwischen WT und DSC3 entspricht ca. 2 Zyklen. b) Der Vergleich der Microarray- und Real-Time-PCR-Daten (QPCR): Die blaue Säule zeigt den Fold Change aus der Microarrayanalyse, die violette steht für den  $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Wert der Real-Time-PCR. Die Daten der Real-Time-PCR bestätigen die Microarrayanalyse grundsätzlich.

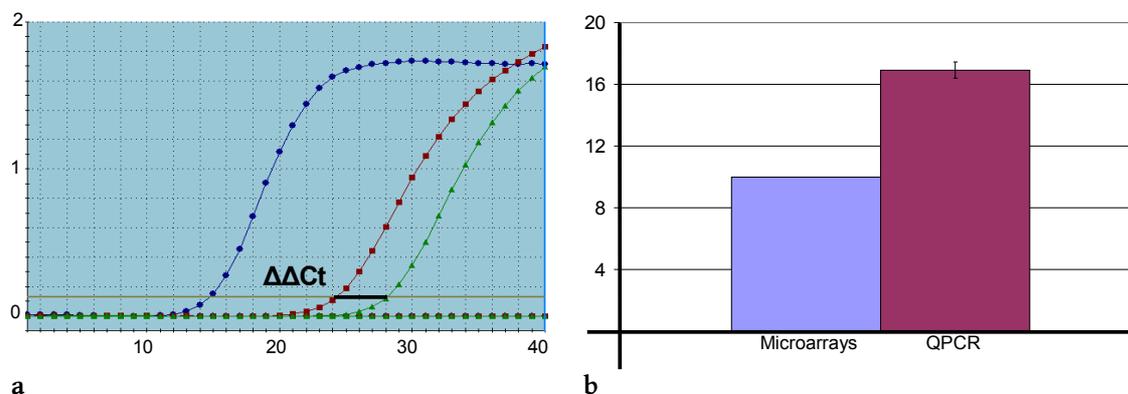
4.6.5 *GREM1*

**Abbildung 11: *GREM1* (Gremlin 1)** a) Die Genexpressionsunterschiede zwischen den Transfektanten mit Ex3/4WT und Ex3/4DSC3: Die Achse x entspricht der Zyklenanzahl, die Achse y der Fluoreszenz. Die blaue Standardkurve steht für das Housekeeping-Gen *GAPDH*, rot für die Expression von *GREM1* in WT-transfizierten Zellen und grün für die Expression in DSC3-transfizierten Zellen. Die Differenz ( $\Delta\Delta Ct$ ) zwischen WT und DSC3 entspricht ca. 6 Zyklen. b) Der Vergleich der Microarray- und Real-Time-PCR-Daten (QPCR): Die blaue Säule zeigt den Fold Change aus der Microarrayanalyse, die violette steht für den  $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Wert der Real-Time-PCR-Analyse. Die Real-Time-PCR-Ergebnisse ergaben 12-fach höhere Werte der *GREM1*-Expression als die Microarrays.

4.6.6 *CRH*

**Abbildung 12: *CRH* (Corticotropin-releasing Hormon)** a) Die Genexpressionsunterschiede zwischen den Transfektanten mit Ex3/4WT und Ex3/4DSC3: Die Achse x entspricht der Zyklenanzahl, die Achse y der Fluoreszenz. Die blaue Standardkurve steht für das *GAPDH*, rot für die Expression von *CRH* in WT-transfizierten Zellen und grün für die Expression in DSC3-transfizierten Zellen. Die Differenz ( $\Delta\Delta Ct$ ) zwischen WT und DSC3 entspricht ca. 4 Zyklen. b) Der Vergleich der Microarray- und Real-Time-PCR-Daten (QPCR): Die blaue Säule zeigt den Fold Change aus der Microarrays, die violette steht für den  $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Wert der Real-Time-PCR. Die *CRH*-Expression untersucht mit Real-Time-PCR war mehr als 3-fach höher.

#### 4.6.7 ANXA10



**Abbildung 13: ANXA10 (Annexin A10)** a) Die Genexpressionsunterschiede zwischen den Transfektanten mit Ex3/4WT und Ex3/4DSC3: Die Achse x entspricht der Zyklenanzahl, die Achse y der Fluoreszenz. Die blaue Standardkurve steht für das Housekeeping-Gen *GAPDH*, rot für die Expression von ANXA10 in WT-transfizierten Zellen und grün für die Expression in DSC3-transfizierten Zellen. Die Differenz ( $\Delta\Delta Ct$ ) zwischen WT und DSC3 entspricht ca. 4 Zyklen. b) Der Vergleich der Microarray- und Real-Time-PCR-Daten (QPCR): Die blaue Säule zeigt den Fold Change aus der Microarrayanalyse, die violette steht für den  $2^{\Delta\Delta Ct}$ -Wert der Real-Time-PCR-Analyse. Die Expression von *Annexin A10*, untersucht mit Real-Time-PCR, war fast 2-mal höher als bei den Microarrays.

Von 211 Genen, die nach Microarray-Analyse dysreguliert waren, wurden sieben Gene durch qPCR überprüft. Es fand sich eine Herunterregulierung bei vier und eine Hochregulierung bei drei von ihnen, wodurch die Microarray-Daten bestätigt wurden.

#### 4.7 Analyse mit Hilfe von DAVID

DAVID (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) ermöglicht eine funktionelle Interpretation von Microarray-Daten. Die unterschiedlich exprimierten Gene werden gemäß ihrer biologischen Funktionen in kleineren Gruppen, den sogenannten „Annotation Clusters“, geordnet (Tabelle 12). Hier erfolgt auch eine Gewichtung hinsichtlich der statistischen Häufung bestimmter Gruppen. Dank diesem Ansatz ist es möglich, sich einen besseren Überblick über die Funktion einer größeren Anzahl von Genen zu verschaffen und die biologische Relevanz der Daten zu beurteilen. Das Ausmaß der Über-/Unterrepräsentation der Gene eines Clusters wird als „Enrichment Score“ definiert (Dennis et al., 2003, Huang et al., 2009a, Huang et al., 2009b).

**Tabelle 12: Functional Annotation Clustering**

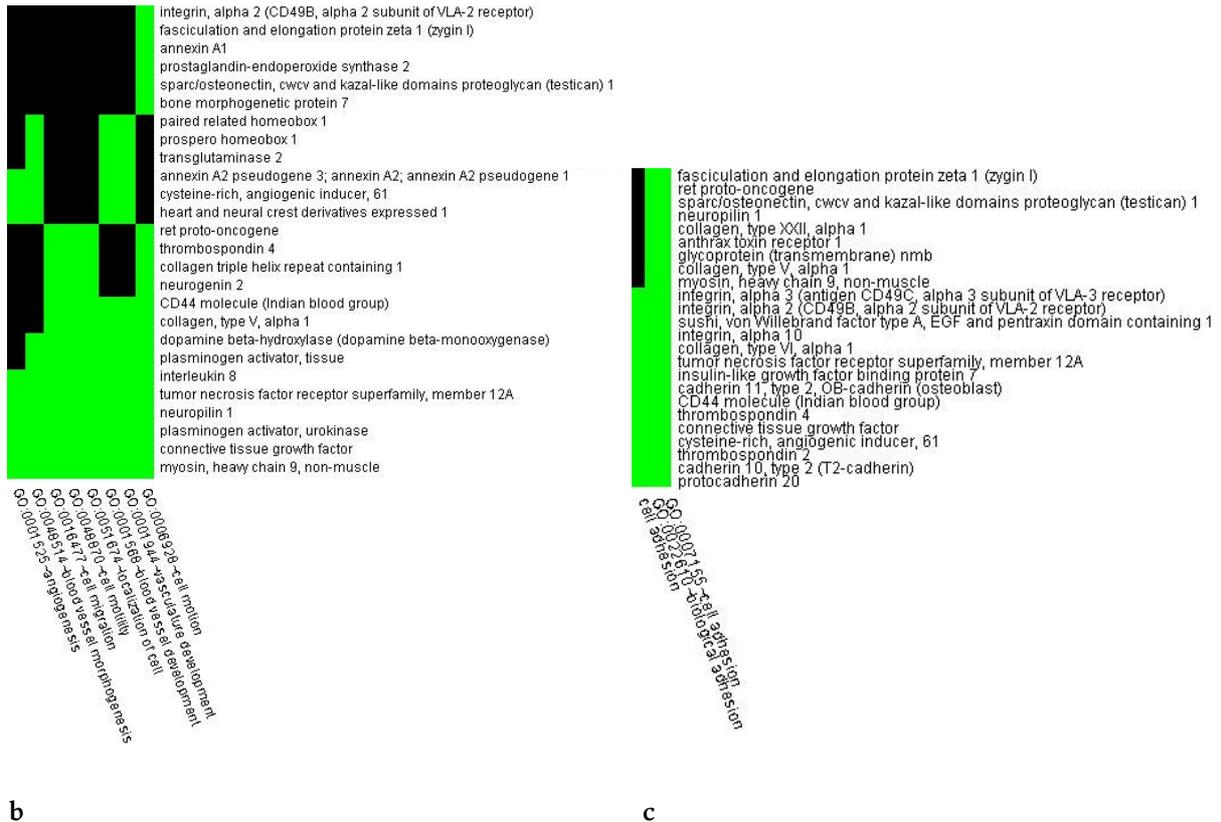
<b>Annotation Cluster 1</b>	<b>Enrichment Score: 13,9</b>	<b>Anzahl der Gene</b>	<b>p-Wert</b>
	Signal	85	2.1E-20
	Signal-Peptid	85	2.5E-20
	Sekretion	53	8.3E-15
	Glykoprotein	89	1.2E-14
	Glykosylierung-Site: N-linked (GlcNAc...)	82	3.0E-12
	Disulfid-Bindung	64	6.9E-12
	Disulfid-Bindung	65	1.0E-11
	Extrazelluläre Region	56	5.7E-11
<b>Annotation Cluster 2</b>	<b>Enrichment Score: 5,83</b>	<b>Anzahl der Gene</b>	<b>p-Wert</b>
	Entwicklung der Blutgefäße	16	3.0E-8
	Entwicklung der Vaskulatur	16	4.2E-8
	Morphogenese der Blutgefäße	14	2.5E-7
	Zellen-Bewegung	20	3.8E-7
	Zellen-Migration	14	5.3E-6
	Zellen-Motilität	14	1.7E-5
	Zellen-Lokalisierung	14	1.7E-5
	Angiogenese	9	1.4E-4
<b>Annotation Cluster 3</b>	<b>Enrichment Score: 5,54</b>	<b>Anzahl der Gene</b>	<b>p-Wert</b>
	Zell-Adhäsion	24	6.1E-7
	Biologische Adhäsion	24	6.2E-7
	Zell-Adhäsion	15	6.5E-5

#### 4.7.1 Functional Annotation Clustering

Mit Hilfe von „Functional Annotation Clustering“ können die Gene innerhalb eines „Annotation Clusters“ zusätzlich in noch kleinere Kategorien anhand ihrer Eigenschaften geordnet werden und zwar auf einer gut übersichtlichen zweidimensionalen „genes-to-terms“ Abbildung (Abbildung 14). Dank dieser Anwendung ist es möglich, lange Gen-Listen in kleinere Gruppen funktionell verwandter Gene zu komprimieren. Die Auswertung beruht auf der Gen-Ontologie. Weitere berücksichtigte Aspekte sind Protein-Protein Interaktionen, die funktionelle Domäne der Proteine, Assoziationen mit Krankheiten, „Pathways“, Sequenzen-Merkmale, Homologien und so weiter. Auf diese Weise werden viele unterschiedliche biologische Aspekte auf einem engen Raum analysiert. Üblicherweise erfolgt ein biologischer Prozess durch Kooperation eines Sets von Genen. Functional Annotation Clustering basiert auf der Vorstellung, dass eine Änderung der Expression mehrerer Mitglieder einer Gen-Gruppe physiologisch relevant ist (Huang et al., 2009a, Huang et al., 2009b).

Die Experimente in dieser Arbeit zeigten vor allem einen Einfluss der DSC3-Mutation auf die Expression der Gruppe von Genen, die sich an der Signalübertragung beteiligen. Sehr interessant scheint auch der Zusammenhang dieser Gene mit der N-Glykosylierung.





**Abbildung 14: Functional Annotation Clustering (2-D Ansicht) a) Annotation cluster 1, b) Annotation cluster 2, c) Annotation cluster 3.** Die zweidimensionale „genes-to-terms“ Ansicht zeigt die Gene der „Annotation Clusters“ mit dem höchsten „Enrichment score“. Jedes der Gene ist mit einer oder mehreren „annotation terms“ assoziiert. Teilen sich mehrere Gene ein ähnliches Set von „annotation terms“, ist es sehr wahrscheinlich, dass sie in ähnlichen biologischen Mechanismen involviert sind. Die grüne Farbe steht für positive Korrelation, schwarz steht für keine bisher bekannte Korrelation. Die vertikale Achse steht für die Gene, die horizontale Achse steht für ihre Funktion.

## 5 Diskussion

Das X-chromosomale Dystonie-Parkinson-Syndrom ist eine X-chromosomal-rezessive primäre Dystonie (Müller, 2009), die ihren Ursprung auf der philippinischen Insel Panay hat (Kupke et al., 1990a, Lee et al., 1976, Müller und Graeber, 1991).

Die Vererbung bei männlichen Trägern des XDP-Haplotyps erfolgt mit 100%-iger Penetranz (Müller et al., 1998). In der Regel sind nur Männer betroffen, die das mutierte Gen von nicht betroffenen Müttern erhalten haben. In seltenen Fällen finden sich auch bei weiblichen Genträgern Symptome (Evidente et al., 2004).

Die Entdeckung der krankheitsspezifischen Genveränderungen ermöglicht schon jetzt einen zuverlässigen molekulargenetischen Nachweis der Erkrankung bei Betroffenen und zugleich eine präsymptomatische Diagnostik bei Angehörigen von Risikofamilien (Nolte et al., 2003).

Die Pathogenese des XDP ist bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar. In dieser Doktorarbeit wurde eine mögliche Beteiligung von DSC3 bei der Entstehung der Erkrankung näher untersucht. Hierfür wurden Neuroblastom-Zellen mit einem Konstrukt bestehend aus den Exons d3 und d4 des *TAF1/DYT3*-Transkriptsystem mit und ohne DSC3 transfiziert, um die Auswirkung dieser Punktmutation auf die Genexpression zu untersuchen.

Unterschiede im Genexpressionsmuster zwischen Wild-Typ- und DSC3-Transfektanten wurden mit Hilfe der Microarray-Technologie erfasst. Anhand dieser Versuche konnte eine Liste von 211 putativen Target-Genen, die durch DSC3 dysreguliert werden erstellt werden.

## 5.1 Methoden zur Genexpressionsanalyse

### 5.1.1 Microarrayanalyse

In der Molekularbiologie kann mit Hilfe der Microarray-Technologie die Expression tausender Gene gleichzeitig gemessen werden, was einen Überblick über zelluläre Regulationsmechanismen ermöglicht. Die durch eine Microarray-Analyse gewonnenen Genexpressionsdaten sollten stichprobenartig mit anderen Methoden überprüft werden, um die Qualität und Aussagekraft der Analyse zu verifizieren. Da es sich um ein sehr sensitives aber auch empfindliches Verfahren handelt, müssen Fehlerquellen bestmöglichst ausgeschlossen werden.

Ein wichtiger Faktor, der die Genauigkeit eines Microarray-Experimentes beeinflusst, ist die Qualität der RNA-Proben. Die mRNA-Moleküle sind fragil und degradieren innerhalb von relativ kurzer Zeit sogar bei äußerst vorsichtiger Handhabung. Eine Kontamination der Proben durch RNAsen muss unter allen Umständen ausgeschlossen werden. Teilweise degradierte Proben führen zu einer geringeren Signalintensität und können zu einer Verfälschung des Expressionsmusters führen (Simon et al., 2002).

Zu weiteren potenziellen Fehlerquellen gehören falsch annotierte Gen-Klone in den kommerziell erworbenen cDNA-Bibliotheken, Artefakte und Querhybridisierung ähnlicher Sequenzen (Koizumi, 2004).

Die wahrscheinlich bedeutendste Fehlerquelle aber ist die Zellkultur. Eine unterschiedliche Handhabung der Zellen kann innerhalb des Stoffwechsels zu Anpassungsreaktionen führen, was dementsprechend das Genexpressionmuster deutlich verändern kann. Deshalb muss hier auf exaktes Arbeiten besonders Wert gelegt werden und das Verwenden mehrerer unabhängiger Replikate ist unabdingbar.

### 5.1.2 Analyse der Microarray-Daten mit Hilfe des *Allen Mouse Brain Reference Atlas*

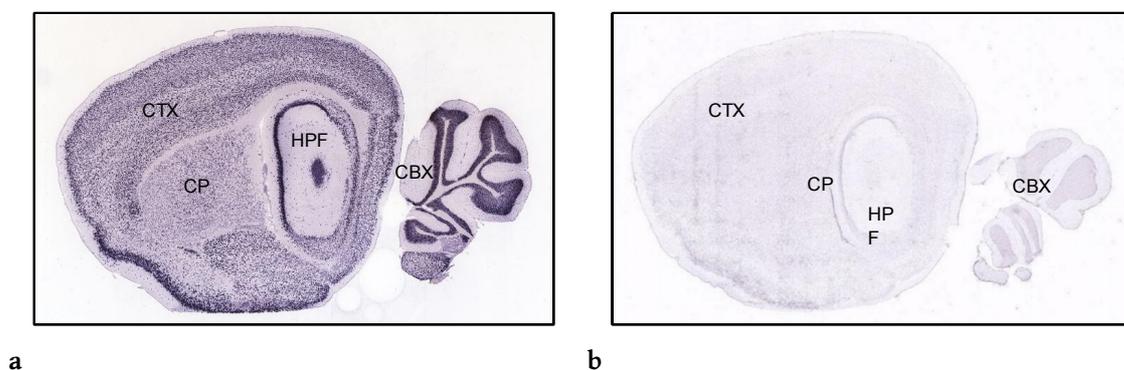
Das wohl wichtigste Kriterium für die Auswahl der Kandidatengene war die Expression der Gene im Striatum, das bei XDP-Patienten erheblichen neuropathologischen Veränderungen unterliegt.

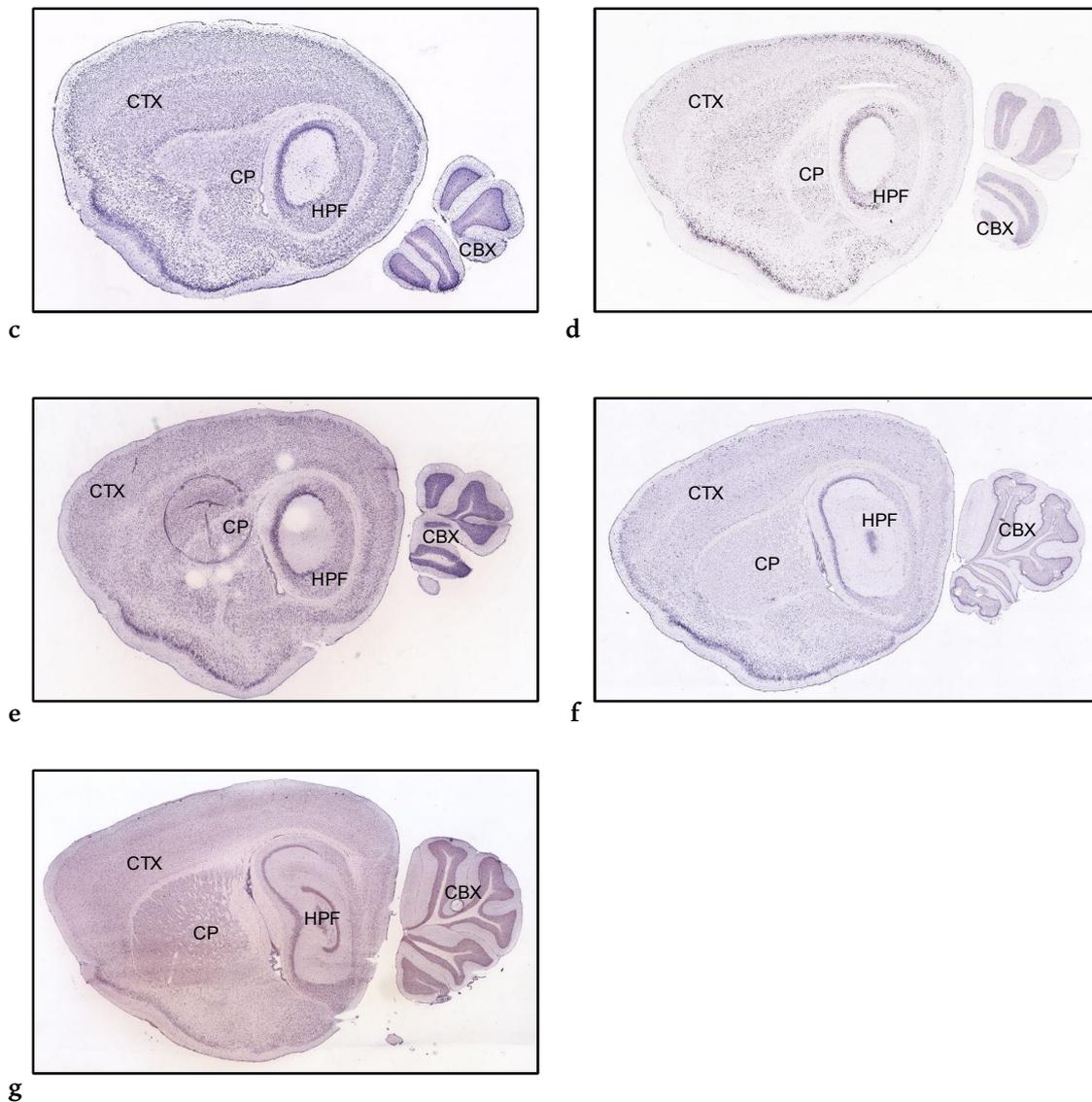
Im Verlauf der Erkrankung kommt es allmählich zur Atrophie von Nucleus caudatus und Putamen. Histopathologische Untersuchungen zeigten weiterhin, dass diese Hirnstrukturen einen Neuronenverlust und eine multifokale, mosaikartig geformte Astrozytose aufweisen (Lee et al., 2001, Waters et al., 1993).

Im Anfangsstadium der Erkrankung kommt es vor allem zu einem Verlust von „Medium Spiny“ Neuronen im Striosomen-Bereich. Im späteren Verlauf, wenn zu den Dystonie-Symptomen Parkinsonismus hinzu kommt, betreffen die pathologischen Veränderungen nicht nur die Striosomen, sondern vermehrt auch den Matrix-Bereich (Goto et al., 2005).

Da 90% der Gene in murinem und humanem Gehirn homolog sind, dient das Gehirn der Maus als bestes verfügbares Modell. Zu diesem Zweck wurde das Computerprogramm *Allen Mouse Brain Reference Atlas* verwendet.

Die Expression der einzelnen Gene im murinen Striatum zeigt die Abbildung 15.





**Abbildung 15:** Die Expression der einzelnen Gene in murinem Gehirn nach *Allen Mouse Brain Reference Atlas*, Nissl-Färbung, Sagittaler Schnitt, HPF - Hippocampus-Formation, CP - Caudato-Putamen, CTX - Zerebraler Kortex, CBX - Kleinhirn-Kortex. a) *Chromogranin B*, b) *Dopamin Beta-Hydroxylase*, c) *Chromogranin A*, d) *Neuronal Pentraxin II*, e) *Gremlin 1*, f) *Corticotropin-releasing Hormon*, g) *Annexin A10*

Weiterhin wurden bei der Genauswahl die Funktion der Gene, ihr Zusammenhang mit wichtigen physiologischen Prozessen im Gehirn und ihr Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen berücksichtigt. Aufgrund dieser Überlegung wurden auch die Gene *DBH*, *ANXA 10* und *CRH* ausgewählt, die trotz einer nicht so starken Expression im murinen Striatum eine wichtige Rolle in der Physiologie des Gehirnes spielen und in unseren Experimenten eine sehr starke Dysregulierung ausgewiesen haben.

### 5.1.3 Real-Time PCR zur Validierung der Microarray-Genexpressionsdaten

Für die Validierung von Microarray-Daten ist ein Verfahren mit hoher Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit erforderlich. Diesen Anforderungen genügt die Real-Time PCR zweifellos. Gegenüber den anderen mRNA-Quantifizierungsmethoden erfüllt sie alle Anforderungen an Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit (Ginzinger, 2002).

Im Vergleich zur Microarray-Analyse genügt für die Real-Time PCR eine bis zu 1000-fach kleinere mRNA-Menge. Desweiteren sind auch die hohe Geschwindigkeit und ein verhältnismäßig geringer Arbeitsaufwand als Vorteil zu nennen. Bei einer Real-Time PCR sind falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse zwar recht selten, aber natürlich nicht auszuschließen. Sie können durch den Einsatz von Kontrollproben und eine genaue Analyse der Schmelzkurve vermieden werden. Zusätzlich sollten die PCR-Produkte mit Hilfe eines Agarose-Gels auf die korrekte Größe hin untersucht werden. Alle diese Aspekte machen die Real-Time PCR zur Methode der Wahl für die Microarray-Verifizierung und daher wurde sie auch in dieser Doktorarbeit verwendet.

Nach der Analyse der Microarray-Daten wurden nach oben genannten Kriterien (siehe 5.1.2) aus der Liste der 211 differentiell exprimierten sieben interessant erscheinende Gene ausgewählt und validiert.

Mittels Real-Time PCR konnte eine Überexpression bei *GREM1*, *CRH* und *ANXA10* und eine Repression bei *CHGB*, *DBH*, *CHGA* und *NPTX2* bestätigt werden. Die Ergebnisse der beiden Genexpressionsanalysen stimmten grundsätzlich überein, deutlichere Unterschiede erschienen bei den Genen *CHGB* (3,01-facher Unterschied), *CRH* (2,25-facher Unterschied) und *ANXA10* (1,69-facher Unterschied). Bei *GREM1* fand sich sogar ein 12,32-facher Unterschied. Diese Differenzen könnten sich durch obengenannte Ursachen erklären lassen, zum Beispiel durch Schwankungen der mRNA-Qualität.

Im nachfolgenden soll die mögliche Rolle der einzelnen Kandidatengene bei der Pathogenese des X-chromosomalen Dystonie-Parkinsonismus diskutiert werden:

## 5.2 Die Kandidatengene

### 5.2.1 *Chromogranin B (Secretogranin 1, CHGB)*

Laut unserer Daten lag bei den Zellen, die das Exon d3/d4-Konstrukt mit DSC3-Mutation überexprimieren eine Überexpression des *CHGB*-Gens vor.

Bei dem Produkt des Gens handelt es sich um ein Protein, das zu den Secretograninen (Chromograninen) gehört. Es ist eine Familie von azidischen Proteinen, die in sekretorischen Granulae mit Hormonen, Transmittern und Neuropeptiden überall im Nervensystem gespeichert werden (Taupenot et al., 2003).

*Chromogranin B*, das bedeutendste Mitglied dieser Familie, dient als ein Vorläufer mehrerer regulatorischer Peptide und wird differenziell bei mehreren neurologischen Erkrankungen reguliert, wie zum Beispiel bei der multiplen Sklerose (Mattsson et al., 2007) oder der Alzheimer-Krankheit (Lechner et al., 2004, Marksteiner et al., 2000).

Interessant ist vor allem die veränderte Expression von *Chromogranin B* im experimentellen murinen Modell der Parkinson-Krankheit. Im Striatum der mit 6-OHDA-behandelten Maus wurde die Expression von *Chromogranin B* abstammenden Neuropeptide signifikant beeinträchtigt, in den meisten Fällen wurde eine Hochregulation beobachtet. Dies lässt vermuten, dass Expressionsunterschiede von *CHGB* eine Rolle bei der Entstehung der abnormalen Aktivität der Basalganglien und Parkinson-Symptome spielen könnten (Nilsson et al., 2009).

Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch bei der Pathogenese des X-chromosomalen Dystonie-Parkinson-Syndroms eine Rolle spielen, da auch hier bei XDP-Patienten erhebliche neuropathologische Veränderungen im Striatum nachweisbar sind (Eidelberg et al., 1993, Goto et al., 2005, Waters et al., 1993).

Ein verminderter Spiegel des Chromogranin B wurde zudem in der Gehirnflüssigkeit von Patienten mit chronischer Schizophrenie beobachtet. Weitere Studien an japanischen und chinesischen Patienten, sowie gesunden Kontrollgruppen entdeckten ebenfalls *CHGB*-Polymorphismen, die im Zusammenhang mit Schizophrenie stehen könnten (Iijima et al., 2004, Landen et al., 1999).

Die Biosynthese und Freisetzung von Chromogranin B erfolgt unter der Kontrolle des efferenten Sympathicus. Polymorphismen des *CHGB*-Gens, insbesondere in der Promotorregion, beeinflussen die Sekretion der Katecholamine. Aufgrund dieses Pathomechanismus und seines Effekts auf das Herz-Kreislauf-System wurde *Chromogranin B* als einer der Kandidatengene für die essentielle Hypertonie eingestuft (Mahapatra et al., 2000, Zhang et al., 2009).

### **5.2.2 Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase (Dopamin- $\beta$ -Monoxygenase, DBH)**

Die Microarrays- und Real-Time-PCR-Daten zeigten eine Hochregulation von *DBH* bei den DSC3-Transfektanten.

Dieses Gen kodiert für das Enzym Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase. Dies ist ein Glykoprotein, bestehend aus vier identischen Untereinheiten. Es katalysiert die Oxidation von Dopamin zu Norepinephrin, wozu die Anwesenheit von Ascorbinsäure erforderlich ist. Das Enzym findet sich in norepinergeren und epinergeren Neuronen im zentralen Nervensystem, in den sympathischen Ganglien und in adrenomedullären Zellen im peripheren Nervensystem. Intrazellulär wird die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase in den sekretorischen Vesikeln gelagert, wo sie in zwei Formen vorkommt: In der löslichen und membran-gebundenen Form. Die lösliche Form wird bei der Katecholaminexozytose ausgeschüttet, während die Membran-gebundene Form in den Vesikeln wiederverwendet wird. Die strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Formen entstehen vermutlich aufgrund eines differentiellen post-translationalen Mechanismus (Bellgrove et al., 2006, Kobayashi et al., 1994, Stewart und Klinman, 1988).

*Healy et al.* zeigten, dass ein Single-Nukleotid Polymorphismus (*DBH* -1021C>T) im Promotor-Bereich der *Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase* die plasmatische Aktivität dieses Enzyms beträchtlich beeinflusst. Es kommt zu deren Senkung. Dieser Effekt könnte eine protektive Wirkung gegen Morbus Parkinson haben (Healy et al., 2004, Zabetian et al., 2001, Zabetian et al., 2003).

Aus diesem Grund kam *Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase* als ein Kandidatengen für Morbus Parkinson in Betracht und wurde somit auch im Zusammenhang mit XDP interessant. Die potenzielle Rolle des *DBH* -1021C>T Polymorphismus wurde in Assoziationsstudien mit Parkinson-

Patienten und Kontrollen untersucht. Diese Studien haben gezeigt, dass *DBH* -1021C>T die Suszeptibilität der Erkrankung zwar nicht dramatisch vermindert, aber mit einem späteren Erkrankungsalter beim Morbus Parkinson assoziiert ist. Diese Untersuchungen beschränkten sich allerdings nur auf diesen einen Polymorphismus des *DBH*-Gens. Möglicherweise gibt es auch andere Varianten, die im Zusammenhang mit Morbus Parkinson, beziehungsweise mit dem X-chromosomalen Dystonia-Parkinson stehen könnten (Ross et al., 2008).

Hinweise auf eine mögliche Relevanz von *DBH* bei Dystonien ergaben Studien, die einen erhöhten Plasma-Spiegel des Enzyms bei Patienten mit einer autosomal-dominant vererbten Idiopathischen Torsionsdystonie zeigten (Wooten et al., 1973).

Die Microarrayanalysen in dieser Doktorarbeit zeigten ebenso eine Überexpression des *DBH*-Gens. Ein direkter Zusammenhang des *DBH*-Gens mit den hereditären Dystonien „Early-onset Dystonie“ (Idiopathischer Torsionsdystonie, Dystonie 1), Dopa-responsive-Dystonie (DRD, Dystonie 5a) und Myoclonus-Dystonie (M-D, Dystonie 11) wurde durch Kopplungsanalysen ausgeschlossen. Das X-chromosomale Dystonie-Parkinson Syndrom wurde in dieser Studie nicht eingeschlossen. Diese molekulargenetischen Analysen konzentrierten sich allerdings nur auf den bekannten Locus des *DBH*-Gens auf 9q34. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein anderes Gen an einem anderen bisher unbekanntem Genort Einfluss auf den Plasma-Spiegel des Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase-Enzyms hat und somit am Pathomechanismus von XDP beteiligt sein könnte (Schuback et al., 1991).

Die Funktion der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase im Gehirn ist äußerst wichtig für die Regulation des Katecholamin-Stoffwechsels im Gehirn. Die Signalübertragung durch Katecholamine im präfrontalen und parietalen Cortex beeinflusst unterschiedliche Aspekte der Aufmerksamkeit (Aston-Jones et al., 1998, Posner und Peterson, 1990, Witte und Marrocco, 1997).

Eine verminderte plasmatische Aktivität der Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase ist mit der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) verbunden (Rogeness et al., 1989).

Als Ursache dieser Aktivitätsschwankungen könnten Mutationen des *DBH*-Gens in Betracht gezogen werden, die zu einer verminderten Expression der *Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase* und so zu Störungen des Dopamin-Metabolismus führen. Mehrere Studien beschreiben Assoziationen zwischen der ADHS und Polymorphismen des *DBH*-Gens. Funktionelle Folgen dieser

Veränderungen bleiben bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar (Bellgrove et al., 2006, Daly et al., 1999, Roman et al., 2002, Smith et al., 2003).

*Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase* wurde außerdem im Zusammenhang mit unterschiedlichen psychiatrischen Störungen, wie zum Beispiel mit affektiven Störungen und Schizophrenie mit widersprüchlichen Ergebnissen untersucht (Hornykiewicz, 1982, Kobayashi et al., 1994).

### **5.2.3 Chromogranin A (Parathyroid secretory Protein, CHGA)**

Chromogranin A gehört genauso wie Chromogranin B in die Familie der Secretograninen (Chromograninen), die in sekretorischen Granula im Hormon- und Nervensystem gespeichert werden (Taupenot et al., 2003).

Bei unseren Analysen lag eine Überexpression dieses Gens vor. Intrazellulär kontrolliert *Chromogranin A* die Biogenese der Neurotransmitter und Neuropeptide in den sekretorischen Granullen, extrazellulär reguliert es die Hormonsekretion durch die aus dem CHGA-Prekursor entstandenen Peptide. Zu diesen gehört zum Beispiel Pancreastatin (Ishizuka et al., 1989, Tatemoto et al., 1986), Parastatin (Fasciotto et al., 1993), oder Catestatin (Mahata et al., 1997), das die Sekretion der Katecholamine aus chromaffinen Zellen kontrolliert.

Einige dieser Peptide weisen eine antibakterielle Wirkung auf, was für ihre potenzielle Rolle bei der Abwehr mikrobieller Infektionen spricht. Vasostatine enthalten ebenfalls die N-terminale Domäne des *CHGA*-Gens (Aardal et al., 1993, Strub et al., 1996).

Der Nachweis von *CHGA*-Transkripten in einer Vielzahl von Neuronen und Glia-Zellen im zentralen Nervensystem deutet auf eine wichtige Rolle des *Chromogranins A* in diesen Zelltypen hin (Munoz et al., 1990, Mahata et al., 1991).

*CHGA* beeinflusst die Aktivität des Sympathicus direkt, was die Ausschüttung des Dopamins hemmen könnte (Brudzynski und Munoz, 1994).

*CHGA* wird in Hirn-Regionen mit neurodegenerativen Veränderungen akkumuliert: In den Lewy-Körperchen bei Patienten mit Morbus Parkinson, in den Pick-Körperchen bei der Pick-Krankheit (Nishimura et al., 1994, Yasuhara et al., 1994) und in senilen und prä-amyloiden Plaques genauso wie im Liquor von Patienten mit Morbus Alzheimer (Munoz,

1991).

Die Untersuchungen bestätigten die Toxizität des Chromogranin A auf Neuronen in der Zellkultur. CHGA verursachte eine erhebliche Beschädigung der Neurofilamente und der GABA-Aufnahme, was die Funktion und Überlebenslänge der Zellen erheblich beeinträchtigte. Um den vollen neurotoxischen Effekt des CHGA zu entwickeln, war allerdings die gleichzeitige Anwesenheit von Mikroglia-Zellen erforderlich. Diese dienen im Nervensystem als Schutz-System gegen Infektionen und Beschädigungen. Eine andauernde Aktivierung der Mikroglia hat jedoch eine negative Wirkung und führt durch die Freisetzung von neurotoxischen Mediatoren zur Progression der neuronalen Dysfunktion. Gefunden wurde auch eine hohe Akkumulation von Nitrit, eines Metabolits des Nitritoxids (NO) in Neuronen-Zellkultur. NO gilt als einer der für die Neurodegeneration verantwortlichen Faktoren. CHGA beeinflusst die Produktion von NO durch die Induktion von iNOS. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass Chromogranin A einer der proentzündlichen Faktoren sein könnte, die Mikrogliazellen aktivieren und sich auf diese Weise am Pathomechanismus neurodegenerativer Prozesse beteiligt (Chao et al., 1995, Ciesielski-Treska et al., 1998, Giulian et al., 1993, Taupenot et al., 1996).

Dieser Mechanismus könnte auch bei der Pathogenese von XDP eine Rolle spielen.

In weiteren Untersuchungen zur funktionellen Bedeutung des Chromogranin A erwies sich der salivatorische CHGA-Spiegel als ein empfindlicher und zuverlässiger biochemischer Marker, der mit dem psychologischen Stress korrespondiert. Der Stress bei Studenten vor der Prüfung führte zu einer Erhöhung des salivatorischen CHGA (Takatsuji et al., 2008). Bei den Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose korreliert die CHGA-Konzentration mit dem Ausmaß der Depression. Eine negative emotionale Verfassung der Patienten verbunden mit Angst und Depressionen geht mit einem höheren CHGA-Spiegel einher (Obayashi et al., 2008).

### **5.2.4 Neuronal Pentraxin II (NPTX2)**

Neuronal Pentraxin II (NPTX2) gehört in die Familie der neuronalen Pentraxine, das sind synaptische Proteine, die mit dem C-reaktiven Protein verwandt sind. NPTX2 beteiligt sich an der Formation von exzitatorischen Synapsen (Bjartmar et al., 2006).

Außerdem gilt Neuronal Pentraxin II als eines der synaptischen Proteine, welche an das Schlangentoxin Taipoxin binden, was präsynaptisch zu einer Blockade der Neurotransmission führt (Kirkpatrick et al., 2000).

Das Rattenhomolog von Neuronal Pentraxin II, „Neuronal activity-regulated Pentraxin“ (Narp), beteiligt sich außer an der Synapsen-Formierung auch an der neuronalen Entwicklung, der Migration und an der Neuriten-Bildung (Bjartmar et al., 2006, Fox und Umemori, 2006, Tsui et al., 1996).

Dabei wird die Expression von Narp durch die synaptische Aktivität reguliert, was die Bildung neuer Synapsen induziert. Außerdem spielt Narp eine Rolle beim Clustering des AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)-Typ des Glutamat-Rezeptors an bereits formierten Synapsen (Fong und Craig, 1999, O'Brien et al., 1999, O'Brien et al., 2002).

AMPA ist ein Mediator für den selektiven Zelltod dopaminergener Neuronen, welche auch durch neurodegenerative Prozesse bei Morbus Parkinson in erheblichem Ausmaß betroffen sind. Der AMPA-vermittelte Zelltod ist allerdings Caspase-unabhängig und weist andere morphologische Veränderungen auf als die klassische Apoptose. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Neuronen der Substantia nigra wahrscheinlich nicht durch klassische Apoptose, sondern durch die sogenannte „Aposkese“ oder „Schwelken“ absterben (Graeber et al., 1999, Graeber und Moran, 2002).

In der Studie von Moran wies *NPTX2* eine deutliche Hochregulierung in der Substantia Nigra bei den Parkinson-Patienten auf (Moran et al., 2006).

Eine Hochregulation findet sich auch in den Microarray- und Real-Time-PCR-Ergebnissen dieser Doktorarbeit. Dies könnte auf eine mögliche Beteiligung von *NPTX2* bei der Pathogenese des X-chromosomalen Parkinson-Dystonia Syndrom hinweisen.

Immunohistochemische Analysen zeigten, dass *NPTX2* auch in Lewy-Körperchen akkumuliert. Bei näheren Untersuchungen stellte sich heraus, dass es sich hier um eine kleinere Subgruppe von Lewy-Körperchen mit einer „zinnenartig“ veränderten Oberfläche handelt. Zwischen den einzelnen Lewy-Körperchen bilden sich *NPTX2*-immunreaktive Anlagerungen, die diese verbinden. Das deutet auf eine mögliche Rolle des *NPTX2* bei der Entstehung der Lewy-Körperchen hin. Weshalb sich Neuronal Pentraxin II in Lewy-

Körperchen ansammelt ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt. Es ist anzunehmen, dass *NPTX2* an der Aufnahme synaptischen Materials beteiligt ist (Moran et al., 2008).

Da Neuronal Pentraxin II an einigen wichtigen Prozessen, wie der Synapsen-Formierung und der Neuriten-Bildung beteiligt ist, könnte seine Dysregulierung zur Störung der Funktion der Synapsen beziehungsweise der Neuronen und schließlich zum Zelltod führen. So könnte *NPTX2* nicht nur in die Pathogenese von Parkinson, sondern auch in die des X-chromosomalen Dystonie-Parkinson involviert sein.

### **5.2.5 Gremlin 1 (*GREM1*)**

Gremlin 1 ist ein Mitglied der BMP (“bone morphogenic Protein”)-Antagonisten Familie und wird in mindestens drei unterschiedliche Varianten alternativ gespleißt. Die BMPs gehören zur TGF- $\beta$ -Superfamilie von Wachstumsfaktoren und waren zunächst als osteoinduktive Zytokine beschrieben. Gremlin 1 enthält eine cystinreiche Region und ein Cystin-Knoten-Motiv, dessen Struktur die gleiche wie bei anderen Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Superfamilie ist. *GREM1* kann direkt an die BMP-Faktoren binden und mit ihnen Heterodimere bilden. Auf diese Weise kommt es zu ihrer Inaktivierung. Dieser Vorgang spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Gliedmaßen und der Netzhaut. Die immunohistochemischen Untersuchungen zeigten, dass *GREM1* in der Maus-Netzhaut in der Nervenfaserschicht, der Ganglienzellschicht und in der inneren plexiformen Schicht exprimiert wird. Post-translationell wird *GREM1* durch N-Glykosylierung und Phosphorylierung modifiziert (Wordinger et al., 2008).

Damit gehört Gremlin 1 zur großen Gruppe von Genen, die unter dem Einfluss von *DSC3* dysreguliert werden und ebenfalls glykosyliert werden können (siehe 5.4). Dabei wird die glykosylierte Form sekretiert, während die nicht-glykosylierte Form membrangebunden vorliegt. BMP-Antagonisten wie Gremlin 1 spielen eine wichtige regulatorische Rolle bei der frühen Organogenese und der Gewebe-Differenzierung, aber auch im erwachsenen Organismus bei der Zell-Proliferation und Stammzellendifferenzierung. Experimente an *GREM1*-Knock-out-Mäusen zeigten, dass diese kurz nach der Geburt aufgrund von Nieren- und Lungendefekten versterben. Gremlin 1 spielt eine Rolle bei der Entstehung fibrotischer Veränderungen der Nieren, der Lunge, der Leber und bei der Osteoarthritis. Zahlreiche

Studien konnten zeigen, dass unter erhöhtem Glukosespiegel die *GREM1*-Expression in den Nieren und in der Netzhaut steigt. Dieser Prozess wird moduliert durch TGF- $\beta$ . Dies weist darauf hin, dass *GREM1* sich an der Entstehung der diabetischen Retinopathie und Nephropathie beteiligen könnte (Kane et al., 2005, Lee et al., 2007, Wordinger et al., 2008).

Eine regulatorische Wirkung von *GREM1* bei der Zell-Differenzierung und bei der Zell-Proliferation könnte auch hinsichtlich der neuronalen Entwicklung interessant sein. Seine potenzielle Rolle im zentralen Nervensystem ist bislang jedoch weitgehend unerforscht.

### **5.2.6 Corticotropin-releasing Hormon (CRH, Corticotropin-Releasing Faktor)**

Corticotropin-releasing Hormon, welches bei den DSC3-Transfektanten herunterreguliert wurde, gehört zur Familie von endogenen, im zentralen und peripheren Nervensystem aktiven Peptide. CRH wird im Nucleus paraventricularis im Hypothalamus bei Stress-Reaktionen ausgeschüttet. Eine Reduzierung der CRH-Synthese wurde in Verbindung mit der Alzheimer-Krankheit beobachtet. Autosomal-rezessiv vererbte, hypothalamische Kortitropin-Insuffizienz führt zum Tod, verursacht unter anderen durch Hypoglykämie und Hepatitis. Das Corticotropin-releasing Hormon wurde außerdem als ein Regulator der basalen und stressinduzierten Ausschüttung von ACTH innerhalb der Hypothalamo-Hypophysären-Nebennierenachse (HHNA) beschrieben (Gallagher et al., 2008).

Neuere Studien liefern darüberhinaus Hinweise, dass CRH und ihm ähnliche endogene Peptide und Rezeptor-Liganden auch die synaptische Übertragung außerhalb dieser Achse regulieren können (Orozco-Cabal et al., 2008).

Diese neuronale Beteiligung von *CRH* verdient im Zusammenhang mit XDP Beachtung, da die vorliegenden Ergebnisse eine Dysregulation unter Einfluss von DSC3 zeigen.

Im zentralen Nervensystem wird das Corticotropin-releasing Hormon synthetisiert und in Synapsen gespeichert. Es kann bei Bedarf separat oder mit anderen klassischen Neurotransmittern ausgeschüttet werden. Im Hippocampus wurde CRH in den GABAergen Neuronen ausgeschüttet (Yan et al., 1998).

Bei Patienten mit Morbus Alzheimer ist der Corticotropin-releasing-Hormon-Spiegel in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit und im Plasma erniedrigt (Bissette et al., 1985). Dies deckt

sich mit den Daten der Expressionsanalysen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden. Hier war die Expression des *CRH*-Gens in den Transfektanten mit DSC3 acht mal niedriger als bei den Wild-Typ-Transfektanten. Das X-chromosomale Dystonie-Parkinson Syndrom und die Alzheimer-Krankheit gehören beide zu den neurodegenerativen Erkrankungen, deren Pathogenese bisher nicht vollständig geklärt wurde.

Eine andere Funktion, die *CRH* zugewiesen wurde, ist die Neuromodulation (Merchenthaler, 1984, Radulovic et al., 1999). Neuromodulatoren können dank ihrer exzitatorischen oder inhibitorischen Wirkung an Synapsen eine bestimmte Nervenbahn regulieren. *CRH* und Dopamin funktionieren möglicherweise als stressensitive Modulatoren der synaptischen Übertragung in der Nervenbahnen des limbischen Systems (Koob und Heinrichs, 1999, Sarnyai, 1998).

Experimente mit den Ratten zeigten unter Gabe des chronischen Stressors (Kokain) eine Änderung der exzitatorischen Signal-Übertragung an den Synapsen, welche die Amygdala mit dem prefrontalem Kortex verbinden (Liu et al., 2005). Dopamin unterdrückte die glutamaterge Transmission durch die Aktivierung der D1-like Rezeptoren (Orozco-Cabal et al., 2008).

Diese reprimierende Wirkung von Dopamin wurde durch Corticotropin-releasing Hormon potenziert, obwohl *CRH* alleine scheinbar keinen direkten Effekt auf die glutamaterge Transmission hatte (Gallagher et al., 2008).

Diese Studien deuten auf eine enge Zusammenwirkung des Corticotropin-releasing Hormons und des Dopamins hin, was eventuell auch eine Rolle bei der Signal-Transmission bei XDP-Patienten spielen könnte.

### **5.2.7 Annexin A10 (ANXA10)**

Annexin A10 ist ein Mitglied der Annexin-Familie, unsere Experimente zeigten eine Herunterregulierung bei den DSC3-Mutanten.

- I. Annexine gehören zu einer Superfamilie strukturell verwandter Proteine, die unter Anwesenheit von Calcium Phospholipide binden können. Sie beteiligen sich an der

Regulation des Zellenwachstums und der Signal-Transduktion. Die N-terminale Sequenz jedes Annexins ist einzigartig und sorgt für die Spezifität des jeweiligen Proteins, während die C-terminale Domäne hoch konserviert ist und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle enthält (Gerke und Moss, 2002).

II. In der  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen Form sind Annexine aufgrund ihrer Kern-Struktur in der Lage, sich an die negativ-geladene Zell-Membran anzulegen. Dank dieser Eigenschaft können sich die Annexine an an der Membran verlaufenden Prozessen, wie zum Beispiel an der Organisierung von Membran-Domänen, des Membran-Skeletts, an der Regulierung des Ionenflusses und an der Exo- und Endozytose beteiligen (Gerke et al., 2005, Hayes et al., 2004, Rescher und Gerke, 2004).

III. Die genaue Funktion der einzelnen Annexine, also auch die Funktion von Annexin A10, ist trotz vieler umfangreicher Studien bis zum jetzigen Zeitpunkt unbekannt. Einige Mitglieder der Annexin-Familie (A1, A2, A3, A6, A7 und A11) beteiligen sich an der Exozytose der chromaffinen Granula in den adrenergen Zellen, außerdem wurden diese Proteine in zahlreichen endokrinen Organen gefunden (Kawaminami et al., 2002, Mittag et al., 2007, Traverso et al., 1999).

Annexin A10 unterscheidet sich allerdings von den anderen Annexinen durch den Verlust der Calcium-Bindungsstelle des Typs II. Diese Abweichung von der hoch-konservierten Struktur der anderen Annexine hat erhebliche funktionelle Konsequenzen für die Verbindung mit der Zell-Membran (Bitto und Cho, 1998).

Einige Annexine beteiligen sich auch an der Tumorgenese. *ANXA10* wird in der Leber exprimiert und ist im hepatozellulären Karzinom dysreguliert. Seine Herunterregulation korreliert mit der ausgeprägten vaskulären Invasion, der Progression des Karzinoms und so mit einer schlechteren Prognose. Dies deutet darauf hin, dass *ANXA10* als ein Tumorsuppressorgen fungieren könnte (Liu et al., 2002).

In unseren Experimenten erwies sich die Expression des *Annexins A10* unter der Einwirkung von DSC3 stark abgesenkt.

Wenn wir davon ausgehen, dass die meisten untersuchten Kandidatengene eine wichtige Rolle beim Überleben der neuronalen Zellen spielen, könnte eine Genexpressionsveränderung zur Dysfunktion dieser Gene führen und so den Zelltod verursachen. Dies würde bei XDP vor allem die Bereiche Nucleus caudatus und Putamen des Gehirns betreffen. In diesen Hirnstrukturen kommt es bei XDP-Patienten zur Atrophie und zum Neuronenverlust. Im Anfangsstadium der Erkrankung sind vor allem Neuronen im Striosomen-Bereich betroffen. Im späteren Stadium folgen die pathologischen Veränderungen auch im Matrix-Bereich (Goto et al., 2005, Lee et al., 2001, Waters et al., 1993). Auf welche Weise es zum neuronalen Zelltod bei XDP-Patienten kommt, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Ein Zusammenhang mit der Gendysregulation wäre möglich.

### 5.3 Regulation der Genexpression

Durch welchen Mechanismus unsere Genkandidaten dysreguliert werden, ist bislang unklar. Die Genexpression unterliegt einer strengen Regulation auf unterschiedlichen Ebenen. Auf der Ebene der Transkription kann die Genregulation durch die Umstrukturierung des Chromatins, durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren, Hormonen und Wachstumsfaktoren oder durch die Verwendung von alternativen Promotoren eingreifen (Strachan und Read, 2005).

Da das X-chromosomale Dystonie-Parkinson Syndrom möglicherweise durch eine XDP-spezifische Punktmutation DSC3 im Exon d4 verursacht wird, welche nicht Teil eines Protein-kodierenden Leserahmens ist, geschieht die Genregulation vermutlich auf RNA-Ebene. Diese Annahme wird durch die Entdeckung eines ca. 1,1 kb langen Gegenstrang-Transkriptes am Ende des Exon d4 des *TAF1/DYT3*-Transkriptsystems gestützt (Herzfeld et al., 2007).

Die Regulation durch Antisense-RNA wurde bereits bei einer Vielzahl von Genen nachgewiesen. Die Wirkung der Antisense-Regulation korreliert mit dem Level des Antisense-Transkriptes, das mit dem zuständigen Sense-Transkript interagiert. Überwiegt das Gegenstrang-Transkript, so führt dies zu einer Repression des Proteins und umgekehrt (Kimelman und Kirschner, 1989).

Die DSC3-Mutation in Exon d4 könnte Auswirkungen auf die Bildung eines pathologischen

Gegenstrang-Transkriptes haben, so dass sie die Funktion anderer, mit der XDP-Pathogenese verbundenen Gene beeinflussen kann.

Seit einiger Zeit sorgt die Entdeckung kleiner regulatorischer RNAs für viel Aufsehen. Eine Art dieser nichtkodierender RNAs sind die sogenannten microRNA (miRNA). Im menschlichen Genom befinden sich wenigstens 200-255 miRNA-kodierende Gene.

Dabei bildet das primäre Transkript eine Haarnadelstruktur aus, an deren Stamm ein RNA-Doppelstrang vorliegt. Im Bereich dieses Doppelstranges wird das Primärtranskript enzymatisch geschnitten und zur fertigen miRNA prozessiert. Diese etwa 22 bp langen Oligonukleotide wirken in erster Linie durch die Kontrolle ihrer Stabilität und ihrer Translation als Antisense-Regulatoren auf andere RNAs (Lim et al., 2003).

Das bemerkenswerte an dieser Art der Regulation ist jedoch, dass einzelne miRNAs nicht nur auf eine einzige Zielsequenz gerichtet sein müssen, sondern dass sie ein ganzes Spektrum unterschiedlichster mRNAs regulieren können. Dabei genügt es, wenn die miRNA nur teilweise komplementär zur Zielsequenz ist. Obwohl miRNAs nur eine geringe Länge aufweisen, sind oftmals mehrere Fehlpaarungen (Mismatches) zwischen miRNA und Ziel-mRNA (target-mRNA) zu beobachten. Die genauen Mechanismen der Targetauswahl sind bislang jedoch unbekannt, was eine Vorhersage putativer Ziel-mRNA schwierig macht. Es ist jedoch bekannt, dass sich bis zu 40% der Zielsequenzen im 3'-UTR-Bereich der mRNAs befinden (Alberts et al., 2010, Majoros and Ohler, 2007).

Neben den recht kurzen miRNAs gibt es einen weiteren Regulationsmechanismus, bei dem doppelsträngige RNA-Moleküle eine Rolle spielen: Die RNA-Interferenz (RNAi). Hier kommt es zur Doppelstrangbindung längerer komplementärer RNA-Moleküle, welche von Dicer in kurze interferierende RNAs (small interfering RNAs, siRNAs) von ca. 23 bp Länge gespalten werden. Diese siRNAs komplexieren, ähnlich wie miRNAs zu RISC. RISC degradiert einen Strang des siRNA-Doppelstrangs und kann so dank der übrigen einzelsträngigen siRNA an weitere komplementäre RNA-Moleküle im Zytoplasma binden und diese degradieren. Man nimmt an, dass dieser Mechanismus ein Schutz vor pathogenen Nukleinsäuren darstellt (Alberts et al., 2010, Martens und Nellen, 2002, Passarge, 2004).

Angenommen, dass das X-chromosomale Dystonie-Parkinson-Syndrom auch durch die Bildung eines pathologischen Transkriptes verursacht ist, könnten sich in Zukunft therapeutische Möglichkeiten durch die Gabe der spezifischen Oligonukleotiden auch bei

der Behandlung dieser Erkrankung ergeben.

## 5.4 Functional Annotation Clustering

Die funktionelle Interpretation der durch die DSC3-Mutation über- und unterexprimierten Gene geschah mit Hilfe des Computerprogramms *DAVID* (the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery).

Die unterschiedlich exprimierten Gene wurden aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften beziehungsweise Funktionen in sogenannte „Annotation Clusters“ geordnet (Huang et al., 2009a, Huang et al., 2009b).

### 5.4.1 Annotation Cluster 1

Im Annotation Cluster 1 finden sich Gene, die im Zusammenhang mit N-Glykosylierung, vor allem mit N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc), sowie mit der Signalübertragung in Verbindung stehen, deutlich überrepräsentiert. Diese zwei teilweise überlappenden Gen-Untergruppen sind funktionell sehr eng verbunden, da das Glykosylierungsmuster der Proteine eine wichtige Rolle bei vielen biologischen Signalprozessen darstellt.

Glykosylierung, die enzymatische Bindung der Saccharide an Proteine beziehungsweise Lipide, gehört zusammen mit der Phosphorylierung zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen der Proteine. Nach Schätzungen werden mehr als 50% aller eukaryotischen Proteine glykosyliert. Dies geschieht mit Hilfe von spezifischen Enzymen – den Glykosyltransferasen (Apweiler et al., 1999, Lowe und Marth, 2003, Wopereis et al., 2006).

Die humanen Glykoproteine werden durch folgende Vorgänge synthetisiert:

Die N-Glykosylierung steht für die Bindung des Saccharides an den Stickstoff der freien Säureamidgruppe von Asparagin und findet im endoplasmatischen Retikulum der Zelle statt. Bei der O-Glykosylierung erfolgt die Bindung des Zuckers an die Hydroxygruppe von Serin, Threonin oder Hydroxylysin im Golgi-Apparat. Bei der C-Glykosylierung, der letzten Art der Glykosylierung, bindet die Kohlenhydratgruppe an die Carboxygruppe von Tryptophan (Hofsteenge et al., 1994, Wopereis et al., 2006).

Eine Rolle spielt N-Glykosylierung auch bei monogen vererbten Dystonien (Bragg et al., 2004).

So führt bei der autosomal-dominant vererbten Dystonie 1 eine 3 bp große Deletion im *DYT1*-Gen zum Verlust einer Glutaminsäure im Carboxy-Terminalem Ende des Proteins TorsinA (Ozelius et al., 1997).

Bei der Überexpression in Zellkultur war Wild-Typ-TorsinA gleichmäßig überall im Endoplasmatischen Retikulum verteilt. Das deletierte Protein hingegen akkumulierte in Inklusionen rund um den Nukleus (Hewett et al., 2000).

Voraussetzung für die Bildung dieser Inklusionen ist die N-Glykosylierung mindestens eines Asparagins in der ATP-bindenden Domäne des mutierten TorsinA-Proteins. Wild-Typ-TorsinA zeigte dagegen keine Änderungen seiner intrazellulären Verteilung. Dieser Effekt war also Mutations-spezifisch (Bragg et al., 2004).

Die funktionelle Bedeutung dieses Effekts bleibt unklar, zeigt jedoch einen Einfluss der Glykosylierung auf den Zell-Metabolismus und möglicherweise auch auf den Pathomechanismus der Dystonie 1.

Sehr interessant scheint der mögliche Zusammenhang des X-chromosomalen Dystonia-Parkinson Syndroms mit der O-Glykosylierung zu sein. Das Gen *OGT* (O-linked N-Acetyl-D-Glucosamin-Transferase) befindet sich in der *DYT3*-kritischen Region Xq13.1, direkt stromabwärts der klonierten Exons d3/d4. *OGT* kodiert für eine funktionell äußerst wichtige O-Glykosyltransferase, die N-Acetyl-D-Glucosamin auf zahlreiche nukleäre und zytoplasmatische Proteine überträgt (Hart et al., 2007).

Eine Mutation im protein-kodierenden Bereich konnte ausgeschlossen werden, jedoch befinden sich die XDP-spezifischen Veränderungen DSC1, DSC2 und das als Gegenstand dieser Doktorarbeit untersuchte DSC3, genauso wie die 48 bp Deletion in der putativen regulatorischen Region des *OGT*-Gens und könnten sich auf die Expression dieses Gens auswirken (Nolte et al., 2003).

Der Abstand von mehrerer Tausend Basen vom Transkriptionsstart ließ eine Beteiligung von *OGT* jedoch zunächst etwa unwahrscheinlich erscheinen. Erst das Functional Annotation Clustering dieser Arbeit rückt *OGT* wieder in den Fokus der Forschung.

Studien von Mazars et al. aus dem Jahre 2010 zeigten eine neue, bisher unbekannt

Funktion von OGT. Dieses Enzym, zusammen mit HCF-1 (Host-Cell-Factor-1), einem starken transkriptionellen Koaktivator und Regulator des Zell-Zyklus, fungiert als der wichtigste und bedeutendste zelluläre Partner des THAP3 (THAP domain containing, apoptosis associated protein 3). Die Bindung von THAP3 mit HCF-1 wird durch das Konsensus HCF-1-Motiv vermittelt, welches auch bei THAP1 (THAP domain containing, apoptosis associated protein 1) vorhanden ist. THAP1 ist ein sequenzspezifischer Bindungsfaktor, der sich an der Regulierung der Zell-Proliferation beteiligt (Cayrol et al., 2007).

Mutationen der Zink-Finger-DNA-Bindungsdomäne von THAP1 werden als Ursache für die Dystonie 6, eine autosomal-dominant vererbte primäre Torsionsdystonie beschrieben (Bressman et al. 2009, Djarmati et al., 2009, Fuchs et al., 2009).

THAP1 und THAP3, beides Mitglieder der THAP-Zink-Finger-Protein-Familie, weisen eine ähnliche primäre Struktur, ähnliche Expressionsmuster und zelluläre Partner auf. THAP1 bindet mit HCF-1 *in vitro* und assoziiert mit HCF-1 und OGT. Diese bemerkenswerten Ähnlichkeiten der beiden THAP-Proteine deuten auf eine Verbindung zwischen XDP (Dystonie 3) und Dystonie 6 hin. Da krankheitsspezifische Mutationen der DYT3-Region einen Einfluss auf die Expression des OGT-Gens ausüben könnten, wäre es möglicherweise die Störung des Glukose-Stoffwechsels, die sich an dem Pathomechanismus des X-chromosomalen Dystonia-Parkinson beteiligen könnte (Mazars et al., 2010).

Um diese Hypothese zu unterstützen, wären allerdings weitere Expressionsanalysen vor allem am Hirngewebe der XDP-Patienten erforderlich.

Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen den Krankheitsbildern von Dystonie 1 und Dystonie 6 wurden von Kaiser et al. und Gavarini et al. weiterführende Analysen des TOR1A-Promotors (Dystonie 1) für THAP-Domäne-Binde-Sequenzen (THABS) durchgeführt. Beide Arbeitsgruppen konnten invertierte THABS im TOR1A-Promotor finden und bestätigten eine Bindung *in vitro* zwischen THABS und dem TOR1A-Promotor. Kaiser et al. konnte zeigen, dass die Überexpression von THAP1 in HeLa- und SH-SY5Y-Zelllinien mit einem Plasmid mit TOR1A-Promoter/Exon 1-Fragment eine reduzierte Aktivität des TOR1A-Promoter-Konstruktes bewirkt. Weitere Experimente der beiden Arbeitsgruppen an Lymphoblasten und Fibroblasten der Patienten mit Dystonie 6 zeigten allerdings keine Beeinträchtigung der TOR1A-Expression (Kaiser et al, 2010, Gavarini et al., 2010).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich hier nicht um eine einfache Interaktion

zwischen THAP1 und dem *TOR1A*-Promotor handelt, sondern in der Pathogenese einige andere bisher unbekannte Gene involviert sind. Da THAP1 auch unter anderem im Promotor-Bereich eines *TAF1*-Transkripts bindet (Mazars et al., 2010), sollte dieser Ansatz auch in Hinsicht auf das X-chromosomale Dystonie-Parkinson-Syndrom in Betracht gezogen werden (Müller, 2010).

Es wäre interessant zu erfahren, welche Auswirkung eine potenzielle Bindung von THAP1 an die Pathogenese von XDP haben könnte.

### 5.4.2 Annotation Cluster 2

In dem Annotation Cluster 2, dessen „Enrichment Score“ und somit auch dessen funktionelle Spezifität wesentlich geringer ist, sind die Gene vertreten, die an der Angiogenese und Entwicklung des Blutgefäßsystems beteiligt sind.

Die Angiogenese ist ein lebenswichtiger Prozess, während dessen neue Blutgefäße gebildet werden. Während der Entwicklung, Fortpflanzung und Wundheilung ist dieser Prozess üblicherweise hochreguliert. Die Angiogenese kann allerdings auch an pathologischen Prozessen beteiligt sein, unter anderem an der Entwicklung maligner Tumoren (Nussenbaum und Herman, 2010).

Der mögliche Zusammenhang der pathologischen Angiogenese mit dem XDP-Syndrom bleibt allerdings unklar. Die Expressionsanalysen dieser Doktorarbeit wurden an einer Tumorzelllinie (Neuroblastom-Zellen) durchgeführt. Es ist anzunehmen, dass die Regulierung der Angiogenese hier nicht wie unter physiologischen Bedingungen im Gehirn verläuft. Die Interpretation der Daten sollte dementsprechend vorsichtig erfolgen.

Um sicher zu sein, dass die Änderungen der Genexpression der in dieser Doktorarbeit untersuchten Transfektanten auf die DSC3-Mutation und nicht auf die tumorspezifische Dysregulation des Stoffwechsels von Neuroblastom-Zellen zurückzuführen sind, wurden gleichzeitig Kontrollversuche durchgeführt. Als Kontrolle dienten Neuroblastom-Zellen, transfiziert mit dem pcDNA3.1(+)-Vektor ohne Insert. Diese Kontrollversuche bestätigten jedoch, dass der Effekt der DSC3-Punktmutation spezifisch war. Der mögliche Zusammenhang zwischen Angiogenese und XDP bleibt jedoch unklar.

### 5.4.3 Annotation Cluster 3

Das Annotation Cluster 3 besteht aus einer eher kleinen Gruppe von Genen, die sich an der Zelladhäsion, das heißt an den interzellulären Kontakten und an den Kontakten zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix beteiligen.

Im neuronalen System sind das vor allem die Synapsen, deren Funktion von einer einwandfreien Zelladhäsion abhängig ist. Synapsen sind asymmetrische interzelluläre Verbindungen, die interneuronale Kommunikation vermitteln. Ihre Anzahl, Typ und ihr Konnektivitätsmuster bestimmen die Ausbildung und richtige Funktion der neuronalen Bahnen.

Die Regulation der synaptischen Adhäsivität beeinflusst die Bildung, Reifung und die funktionelle Plastizität der Synapsen. Eine Störung der Adhäsion kann zu einem strukturellen und funktionellen Ungleichgewicht führen, was oftmals Auslöser für eine Vielzahl von neuronalen Entwicklungsstörungen und neurodegenerativen Erkrankungen ist (Giagtzoglou et al., 2009).

In Verbindung mit dem X-chromosomalen Dystonie-Parkinson Syndrom bietet sich die Hypothese an, dass eine beeinträchtigte Expression eines oder mehrerer an der Adhäsion beteiligter Gene zu einer Funktionsstörung im Bereich der striatalen Synapsen führt, und so die Krankheit verursacht. Welche Gene dies genau sein könnten ist unbekannt, ebenso wie ein dahingehendes Modell zur Pathogenese. Weitere Experimente sind nötig, um diese Hypothese zu stützen oder zu widerlegen.

## 5.5 Ausblick

Das X-chromosomale Dystonie-Parkinson Syndrom (XDP) ist eine neurodegenerative, X-chromosomal-rezessiv vererbte Erkrankung. Das Krankheitsgen bildet das multiple Transkript-System *TAF1/DYT3*, bestehend aus *TAF1*-Exons und „downstream“ Exons d1-d5. Alle Transkriptvarianten dieses Transkript-Systems beinhalten die Exons d3 und d4. Im Exon d4 befindet sich die Punktmutation DSC3 (disease-specific single-nucleotide change 3), die in dem *TAF1/DYT3* Transkript-System die einzige krankheitsspezifische Mutation innerhalb eines Exons darstellt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten

Expressionsanalysen zeigten eine Vielzahl differentiell exprimierter Gene, die im Zusammenhang mit der Punktmutation DSC3 stehen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Funktion von DSC3 und ihren Einfluss auf die Regulation des *TAF1/DYT3*-Transkriptsystems beziehungsweise auf den Pathomechanismus des XDP klären zu können.

Wenn wir davon ausgehen, dass die meisten dieser Gene im Gehirn exprimiert werden und diese für eine richtige Funktion der Neuronen-Zellen essentiell sind, könnte bereits eine geringe Expressionsänderung dieser Gene gravierende Folgen für die neuronalen Funktionen haben und sogar zum Tod der Neuronen im Striatum führen. Die Expressionsänderung könnte dabei so gering ausfallen, dass funktionell wichtige Gene durch das Raster der Microarray-Analyse gefallen sein könnten.

Ein neuer Ansatzpunkt für künftige Versuche wäre eine nähere Analyse des *OGT*-Gens. *OGT*, das in der *DYT3*-kritischen Region lokalisiert ist und dessen Funktion durch die XDP-krankheitsspezifischen Veränderungen in seiner regulatorischen Region beeinträchtigt werden könnte, beteiligt sich an der Glykosylierung. Das in dieser Doktorarbeit durchgeführte funktionelle Clustering erwies eine potenzielle Rolle der unter dem Einfluss von DSC3 dysregulierten Gene auf diesen Prozess.

Nicht zu vernachlässigen ist die Auswirkung der Gegenstrang-Transkription auf eine mögliche Regulation des *TAF1/DYT3*-Transkript-Systems, was überprüft werden sollte.

Die Experimente wurden *in vitro* an einer Tumor-Zelllinie und nicht *in vivo* durchgeführt. Es ist davon auszugehen, dass die Regulation der Expression in den Zellen nicht vollständig physiologisch wie im Striatum verläuft, sondern dass auch andere Pathways angesteuert werden, was bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden sollte.

Zur Bestätigung der Ergebnisse dieser Doktorarbeit wären deshalb immunohistochemische Untersuchungen am post mortem Hirngewebe von XDP-Patienten sinnvoll.

Trotz vieler bisher nicht beantworteter Fragen, liefern unsere Genexpressionsanalysen neue Einblicke in den Pathomechanismus des X-chromosomalen Dystonie-Parkinson Syndroms und zeigen neue Ansatzpunkte für weitere Experimente.

## 6 Zusammenfassung

### 6.1 Deutsche Zusammenfassung

Das X-chromosomale Dystonie-Parkinson-Syndrom (XDP) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die im Erwachsenenalter einsetzt. Die Erkrankung ist durch einen Neuronenverlust und eine multifokale, mosaikartig geformte Astrozytose gekennzeichnet, die Nucleus caudatus und Putamen, welche Teil des menschlichen Striatums sind, betreffen. Im Anfangsstadium kommt es vor allem zu einem Verlust von "Medium Spiny" Neuronen im Striosomen-Bereich, später wird auch der Matrix-Bereich betroffen. Der Erbgang erfolgt X-chromosomal-rezessiv. Die Pathogenese vom XDP ist bisher unbekannt. Das Krankheitsgen bildet ein multiples Transkript-System *TAF1/DYT3*, bestehend aus *TAF1*-Exons und "downstream" Exons d1-d5. Alle Spleißvarianten sind polymorph und bestehen aus d Exons und aus mindestens 12 *TAF1*-Exons. Alle Transkriptvarianten beinhalten die Exons d3 und d4, was auf ihre wichtige Rolle innerhalb des Transkript-Systems hindeutet. Im Exon d4 befindet sich die Punktmutation DSC3, die im *TAF1/DYT3* Transkript-System die einzige krankheitsspezifische Mutation innerhalb eines Exons ist. Um den Einfluss von DSC3 auf die Genexpression genomweit zu überprüfen, wurde eine Neuroblastom-Zelllinie (SK-N-AS) mit dem Expressionvektor pcDNA3.1(+), der ein Insert aus den Exons d3/d4 Wild-Typ und d3/d4 DSC3 beinhaltet, sowie mit dem leeren Expressionsvektor als Kontrolle transfiziert. Anschließend wurde die Genexpression mittels Whole-Genome-Microarrays analysiert. Es zeigten sich erhebliche Expressionsunterschiede zwischen den Wild-Typ Exon d3/d4 und den DSC3 Exon d3/d4 überexprimierten Zellen. Aus der Vielzahl der differenziell exprimierten Gene wurden anhand hoher Expressionsunterschiede und gleichzeitiger Expression im Maus-Striatum sieben Kandidatengene ausgewählt und anschließend per Real-Time PCR bestätigt. In drei Fällen (*Annexin A10*, *Corticotropin-releasing Hormone*, *Gremlin 1*) wurde eine suppressive Wirkung der DSC3-Mutation auf die Genexpression nachgewiesen. Vier Gene (*Chromogranin B*, *Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase*, *Chromogranin A*, *Neuronal Pentraxin II*) dagegen wiesen eine Hochregulierung auf. Die Microarray-Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms DAVID weiter analysiert. Diese Analyse zeigte unter den dysregulierten Genen eine hohe Anreicherung ("Enrichment score") von Genen, die im

Zusammenhang mit der N-Glykosylierung stehen. Dies scheint sehr interessant zu sein, da sich in der DYT3-kritischen Region Xq13.1, direkt stromabwärts der klonierten Exons d3/d4 das Gen *OGT* (*O-linked N-Acetyl-D-Glucosamin-Transferase*) befindet. Da krankheitsspezifische Mutationen der DYT3-Region einen Einfluss auf die Expression des *OGT*-Gens ausüben könnten, wäre es möglicherweise die Störung der Glykosylierung, die sich an dem Pathomechanismus des X-chromosomalen Dystonia-Parkinson beteiligen könnte.

## 6.2 English Summary

The X-linked dystonia-parkinsonism syndrome (XDP) is a neurodegenerative adult-onset disease. The disorder is characterized by neuronal loss and multifocal mosaic-like astrocytosis in the caudate nucleus and putamen. During the early stages primarily "medium spiny" neurons are lost in the striosome-area. During disease progression the matrix-area is also affected. The pathogenesis of XDP is still unknown. The disease gene forms a multiple transcript system *TAF1/DYT3*, consisting of *TAF1*-exons and "downstream" exons d1-d5. All splice variants are polymorphic and consist of exon d and at least 12 *TAF1*-exons. All transcript variants contain exon d3 and d4. This indicates an important role within the transcript system. A point mutation, designated as DSC3, is located in exon d4. DSC3 is the only disease-specific mutation within an exon in the transcript system *TAF1/DYT3*. To examine the influence of DSC3 on gene expression at a genome-wide level, a neuroblastoma cell line (SK-N-AS) was transfected with the expression vector pcDNA3.1(+) containing exons d3/d4. Cells were transfected with vector containing both wild-type and mutant exon d4. Cells transfected with vector only were also investigated. The expression profile of the three cell lines was analyzed using expression microarrays. Significant expression differences between wild-type exon d3/d4 and the DSC3 exon d3/d4 overexpressing cells were found. Out of the large number of differentially expressed genes seven candidate genes were selected based on highly significant expression differences and expression in the mouse striatum. Expression differences between cell lines containing wild-type and DSC3 exons d3/d4 were confirmed by Real-Time PCR. In three cases (*annexin A10*, *corticotropin releasing hormone*, *gremlin 1*) a suppressive effect of DSC3 mutation on gene expression was detected. Four genes (*chromogranin B*, *dopamine beta-hydroxylase*, *chromogranin A*, *neuronal pentraxin II*) were upregulated. The microarray data were analyzed

## Zusammenfassung

---

using the computer program DAVID. The analysis of the differentially expressed genes showed a high "Enrichment score" of the genes associated with N-glycosylation. The disease-specific mutations in the DYT3-region could affect the expression of the *OGT*-gene. Defect of glycosylation caused by *OGT* might possibly be involved in the pathogenesis of X-linked dystonia-parkinsonism.

## 7 Literaturverzeichnis

Aardal S, Helle KB, Elsayed S, Reed RK, Serck-Hanssen G. Vasostatins, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments. *J Neuroendocrinol* 1993; 5(4): 405-12

Albanese A, Barnes MP, Bhatia KP, Fernandez-Alvarez E, Filippini G, Gasser T, Krauss JK, Newton A, Rektor I, Savoiaro M, Valls-Solè J. A systematic review on the diagnosis and treatment of primary (idiopathic) dystonia and dystonia plus syndromes: report of an EFNS/MDS-ES Task Force. *Eur J Neurol* 2006; 13: 433-4

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Essential cell biology*. Garland Science 2010; 3<sup>rd</sup> edition

Amelio AL, Miraglia LH, Conkright JJ, Mercer BA, Batalov S, Cavett V, Orth AP, Busby J, Hogenesch JB, Conkright MD. A coactivator trap identifies NONO (p54nrb) as a component of the cAMP-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 20314-9

Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1473: 4-8

Aston-Jones G, Rajkowski J, Ivanova S, Usher M, Cohen J. Neuromodulation and cognitive performance: Recent studies of noradrenergic locus ceruleus neurons in behaving monkeys. *Adv Pharmacol* 1998; 42: 755-759

Bellgrove MA, Mattingley JB, Hawi Z, Mullins C, Kirley A, Gill M, Robertson IH. Impaired Temporal Resolution of Visual Attention and Dopamine Beta Hydroxylase Genotype in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* 2006; 60(10): 1039-45

Bissette G, Reynolds GP, Kilts CD, Widerlov E, Nemeroff CB. Corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in senile dementia of the Alzheimer type. Reduced cortical and striatal concentrations. *JAMA* 1985; 254: 3067–3069

Bitto E, Cho W. Roles of individual domains of annexin I in its vesicle binding and vesicle aggregation: a comprehensive study. *Biochemistry* 1998; 37: 10231-10237

Bjartmar L, Huberman AD, Ullian EM, Renteria RC, Liu X, Xu W, Prezioso J, Susman MW, Stellwagen D, Stokes CC, Cho R, Worley P, Malenka RC, Ball S, Peachey NS, Copenhagen D, Chapman B, Nakamoto M, Barres BA, Perin MS. Neuronal pentraxins mediate synaptic refinement in the developing visual system. *J Neurosci* 2006; 26: 6269–6281

Breakefield XO, Blood AJ, Li Y, Hallett M, Hanson PI, Standaert DG. The pathophysiological basis of dystonias. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 222-34

Bragg DC, Kaufman CA, Kock N, Breakefield XO. Inhibition of N-linked glycosylation prevents inclusion formation by the dystonia-related mutant form of torsinA. *Mol Cell Neurosci* 2004; 27: 417– 426

Brancaccio M, Guazzone S, Menini N, Sibona E, Hirsch E, De Andrea M, Rocchi M, Altruda F, Tarone G, Silengo L. Melusin is a new muscle-specific interactor for beta(1) integrin cytoplasmic domain. *Journal Of Biological Chemistry* 1999; 274: 29282-8

Bressman SB, Raymond D, Fuchs T, Heiman GA, Ozelius LJ, Saunders-Pullman R. Mutations in THAP1 (DYT6) in early-onset dystonia: a genetic screening study. *Lancet Neurol* 2009; 8(5): 441-6

Brudzynski SM, Munoz DG. Chromogranin A applied to the nucleus accumbens decreases locomotor activity induced by activation of the mesolimbic dopaminergic system in the rat. *Brain Res Bull* 1994; 35(3): 211-6

Cayrol C, Lacroix C, Mathe C, Ecochard V, Ceribelli M, Loreau E, Lazar V, Dessen P, Mantovani R, Aguilar L, Girard JP. The THAP-zinc finger protein THAP1 regulates endothelial cell proliferation through modulation of pRB/E2F cell-cycle target genes. *Blood* 2007; 109: 584-594

Chao CC, Hu S, Peterson PK. Glia, cytokines, and neurotoxicity. *Crit Rev Neurobiol* 1995; 9(2-3): 189-205. Review

Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Taupenot L, Chasserot-Golaz S, Corti A, Aunis D, Bader MF. Chromogranin A Induces a Neurotoxic Phenotype in Brain Microglial Cells. *J Biol Chem* 1998; 273(23): 14339-46

Colvin RA, Campanella GSV, Sun J, Luster AD. Intracellular Domains of CXCR3 That Mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 Function. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 30219-227

Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M, Gill M. Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: Preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Mol Psychiatry* 1999; 4: 192-196

Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003; 4(5): P3

Djarmati A, Schneider SA, Lohmann K, Winkler S, Pawlack H, Hagenah J, Brüggemann N, Zittel S, Fuchs T, Raković A, Schmidt A, Jabusch HC, Wilcox R, Kostić VS, Siebner H,

Altenmüller E, Münchau A, Ozelius LJ, Klein C. Mutations in THAP1 (DYT6) and generalised dystonia with prominent spasmodic dysphonia: a genetic screening study. *Lancet Neurol* 2009; 8(5): 447-52

Eidelberg D, Takikawa S, Wilhelmsen K, Dhawan V, Chaly T, Robeson W, Dahl R, Margouleff D, Greene P, Hunt A, Przedborski S, Fahn S. Positron emission tomographic findings in Filipino X-linked dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 1993; 34: 185–91

Evidente VGH, Gwinn-Hardy K, Hardy J, Hernandez D, Singleton A. X-Linked Dystonia (“Lubag”) Presenting Predominantly with Parkinsonism: A More Benign Phenotype? *Mov Disord* 2002a; 17(1): 200-202

Evidente VGH, Advincula J, Esteban R, Pasco P, Alfon JA, Natividad FF, Cuanang J, San Luis A, Gwinn-Hardy K, Hardy J, Hernandez D, Singleton A. Phenomenology of “Lubag” or X-Linked Dystonia–Parkinsonism. *Mov Disord* 2002b; 17(6): 1271-1277

Evidente VGH, Nolte D, Niemann S, Advincula J, Mayo MC, Natividad FF, Müller U. Phenotypic and Molecular Analyses of X-linked Dystonia-Parkinsonism (“Lubag”) in Women. *Arch Neurol*. 2004; 61: 1956-1959

Evidente VGH, Lyons MK, Wheeler M, Hillman R, Helepolelei L, Beynen F, Nolte D, Müller U, Starr PA. First Case of X-Linked Dystonia-Parkinsonism (“Lubag”) to Demonstrate a Response to Bilateral Pallidal Stimulation. *Mov Disord* 2007; 22(12): 1790-1828

Fahn S, Bressman SB, Marsden CD. Classification of dystonia. *Adv Neurol* 1998; 78: 1–10

Fahn S, Marsden CD, Calne B. Classification and investigation of dystonia. In: Marsden CD, Fahn S, editors. *Movement disorders 2*. London: Butterworth; 1987. p. 332–58

Fasciotto BH, Trauss CA, Greeley GH, Cohn DV. Parastatin (porcine chromogranin A347-419), a novel chromogranin A-derived peptide, inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology* 1993; 133(2): 461-6

Fong DK, Craig AM. The Narp hypothesis? *Neuron* 1999; 23: 195-197

Fox MA, Umemori H. Seeking long-term relationship: axon and target communicate to organize synaptic differentiation. *J Neurochem* 2006; 97: 1215-1231

Fuchs T, Gavarini S, Saunders-Pullman R, Raymond D, Ehrlich ME, Bressman SB, Ozelius LJ. Mutations in the THAP1 gene are responsible for DYT6 primary torsion dystonia. *Nat Genet* 2009; 41, 286-288

Gallagher JP, Orozco-Cabal LF, Liu J, Shinnick-Gallagher P. Synaptic physiology of central CRH system. *Eur J Pharmacol.* 2008; 583(2-3): 215-25. Review

Gavarini S, Cayrol C, Fuchs T, Lyons N, Ehrlich ME, Girard JP, Ozelius LJ. Direct interaction between causative genes of DYT1 and DYT6 primary dystonia. *Ann Neurol* 2010; 68(4): 549-53

Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; 5(10): R80

Georgopoulos K, Moore D D, Derfler B. Ikaros, an early lymphoid-specific transcription

factor and a putative mediator for T cell commitment. *Sci Total Environ science* 1992; 258: 808-12

Gerfen CR. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci* 1992; 15: 285-320

Gerke V, Creutz CE, Moss SE. Annexins: linking  $Ca^{2+}$  signalling to membrane dynamics. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2005; 6: 449-461

Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiological Reviews* 2002; 82: 331-371

Giagtzoglou N, Ly CV, Bellen HJ. Cell Adhesion, the Backbone of the Synapse: “Vertebrate” and “Invertebrate” Perspectives. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(4): a003079

Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 2002; 30(6): 503-12. Review

Giulian D, Corpuz M, Chapman S, Mansouri M, Robertson C. Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system. *J Neurosci Res* 1993; 36(6): 681-93

Goto S, Lee LV, Munoz EL, Tooyama I, Tamiya G, Makino S, Ando S, Dantes MB, Yamada K, Matsumoto S, Shimazu H, Kuratsu J, Hirano A, Kaji R. Functional anatomy of the basal ganglia in X-linked recessive dystonia-parkinsonism. *Ann Neurol* 2005; 58: 7-17

Graeber MB, Grasbon-Frodl E, Abell-Aleff P, Kosel S. Nigral neurons are likely to die of a

mechanism other than classical apoptosis in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 1999; 5: 187–192

Graeber MB, Kupke KG, Müller U. Delineation of the dystonia-parkinsonism syndrome locus in Xq13. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 8245–8

Graeber MB, Moran LB. Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: fashion, fiction, and facts. *Brain Pathol* 2002; 12: 385–390

Graybiel AM. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 1990; 13: 244 –254

Graybiel AM, Canales JJ, Capper-Loup C. Levodopa-induced dyskinesias and dopamine-dependent stereotypies: a new hypothesis. *Trends Neurosci* 2000; 23(suppl): S71–S77

Haberhausen G, Schmitt I, Köhler A, Peters U, Rider S, Chelly J, Terwilliger JD, Monaco AP, Müller U. Assignment of the dystonia-parkinsonism syndrome locus, DYT3, to a small region within a 1.8-Mb YAC contig of Xq13.1. *Am J Hum Biol.american Journal Of Human Genetics* 1995; 57: 644-50

Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 2007; 446(7139): 1017-22. Review

Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE. Annexin–actin interactions. *Traffic* 2004; 5: 571–576

Healy DG, Abou-Sleiman PM, Ozawa T, Lees AJ, Bhatia K, Ahmadi KR, Wullner U, Berciano J,

Moller JC, Kamm C, Burk K, Barone P, Tolosa E, Quinn N, Goldstein DB, Wood NW. A functional polymorphism regulating dopamine beta-hydroxylase influences against Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; 55: 443-6

Herzfeld T, Nolte D, Müller U. Structural and functional analysis of the human TAF1/DYT3 multiple transcript system. *Mamm Genome* 2007; 18: 787-95

Hewett J, Gonzalez-Agosti C, Slater D, Li S, Ziefer P, Bergeron D, Jacoby DJ, Ozelius LJ, Ramesh V, Breakefield XO. Mutant torsinA, responsible for early onset torsion dystonia, forms membrane inclusions in cultured neural cells. *Hum Mol Genet* 2000; 22, 1403- 1413

Hofsteenge J, Muller DR, de Beer T, Loffler A, Richter WJ, Vliegenthart JF. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us *Biochemistry* 1994; 33: 13524-13530

Hornykiewicz O. Brain catecholamines in schizophrenia -- a good case for noradrenaline. *Nature* 1982; 299(5883): 484-6

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc* 2009a; 4(1): 44-57

Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 2009b; 37(1): 1-13b

Iijima Y, Inada T, Ohtsuki T, Senoo H, Nakatani M, Arinami T. Association between chromogranin b gene polymorphisms and schizophrenia in the Japanese population. *Biol Psychiatry* 2004; 56(1): 10-7

Irvin JD, Pugh BF. Genome-wide Transcriptional Dependence on TAF1 Functional Domains. *J*

Biol Chem 2006; 281: 6404–12

Ishizuka J, Asada I, Poston GJ, Lluís F, Tatemoto K, Greeley GH Jr, Thompson JC. Effect of pancreastatin on pancreatic endocrine and exocrine secretion. *Pancreas* 1989; 4(3): 277-81

Juven-Gershon T, Hsu JY, Theisen JWM, Kadonaga JT. The RNA Polymerase II Core Promoter – the Gateway to Transcription. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20: 253-9

Kaiser FJ, Osmanovic A, Rakovic A, Eroglu A, Uflacker N, Braunholz D, Lohnau T, Orolicki S, Albrecht M, Gillessen-Kaesbach G, Klein C, Lohmann K. The dystonia gene DYT1 is repressed by the transcription factor THAP1 (DYT6). *Ann Neurol*. 2010; 68(4): 554-9

Kaji R, Goto S, Tamiya G, Ando S, Makino S, Lee LV. Molecular dissection and anatomical basis of dystonia: X-linked recessive dystonia-parkinsonism (DYT3). *J Med Invest* 2005; 52: 280–283

Kalendar R, Lee D, Schulman AH. FastPCR Software for PCR Primer and Probe Design and Repeat Search. *Genes, Genomes and Genomics* 2009; 3(1). Invited Review

Kane R, Stevenson L, Godson C, Stitt AW, O'Brien CO. Gremlin gene expression in bovine retinal pericytes exposed to elevated glucose. *Br J Ophthalmol*. 2005; 89: 1638–1642

Kawaminami M, Etoh S, Miyaoka H, Sakai M, Nishida M, Kurusu S, Hashimoto I. Annexin 5 messenger ribonucleic acid expression in pituitary gonadotropes is induced by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and modulates GnRH stimulation of gonadotropin release. *Neuroendocrinology* 2002; 75: 2–11

Kimelman D, Kirschner MW. An antisense mRNA directs the covalent modification of the transcript encoding fibroblast growth factor in *Xenopus* oocytes. *Cell* 1989; 59(4): 687-96

Kirkpatrick LL, Matzuk MM, Dodds DC, Perin MS. Biochemical interactions of the neuronal pentraxins. Neuronal pentraxin (NP) receptor binds to taipoxin and taipoxin-associated calcium-binding protein 49 via NP1 and NP2. *J Biol Chem* 2000; 275: 17786–17792

Klein CH, Kann M, Kis B, Pramstaller PP, Breakefield XO, Ozelius LJ, Vieregge P. Genetik der Dystonien. *Nervenarzt* 2000; 71: 431–41

Kobayashi K, Morita S, Mizuguchi T, Sawada H, Yamada K, Nagatsu I, Fujita K, Nagatsu T. Functional and High Level Expression of Human Dopamine P-Hydroxylase in Transgenic Mice. *J Biol Chem* 1994; 269(47): 29725–31

Koizumi S. Application of DNA Microarrays in Occupational Health Research. *J Occup Health* 2004; 46: 20–25

Kokubo T, Swanson M J, Nishikawa J I, Hinnebusch AG, Nakatani Y. The yeast TAF145 inhibitory domain and TFIIA competitively bind to TATA-binding protein. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 1003–12

Koob GF, Heinrichs SC. A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral responses to stressors. *Brain Res* 1999; 848: 141–152

Kotani T, Banno K, Ikura M, Hinnebusch AG, Nakatani Y, Kawaichi M, Kokubo T. A role of transcriptional activators as antirepressors for the autoinhibitory activity of TATA box binding of transcription factor IID. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7178–83

Kupke, K G; Graeber, M B; Müller, U. Dystonia-parkinsonism syndrome (XDP) locus: flanking markers in Xq12–q21.1. *Am. J. Hum. Biol. American Journal Of Human Genetics* 1992; 50: 808–

Kupke, KG; Lee, LV, Müller, U. Assignment of the X-linked torsion dystonia gene to Xq21 by linkage analysis. *Neurology* 1990b; 40: 1438-42

Kupke KG, Lee LV, Viterbo GH, Arancillo J, Donlon T, Müller U. X-Linked Recessive Torsion Dystonia in the Philippines. *Am J Hum Genet* 1990a; 36: 237-242

Landén M, Grenfeldt B, Davidsson P, Stridsberg M, Regland B, Gottfries CG, Blennow K. Reduction of chromogranin A and B but not C in the cerebrospinal fluid in subjects with schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 1999 ; 9(4): 311-5

Lechner T, Adlassnig C, Humpel C, Kaufmann WA, Maier H, Reinstadler-Kramer K, Hinterholz J, Mahata SK, Jellinger KA, Marksteiner J. Chromogranin peptides in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 2004; 39: 101-113

Lee H, O'Meara SJ, O'Brien C, Kane R. The role of gremlin, a BMP antagonist and epithelial-to-mesenchymal transition in proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 4291-4299

Lee LV, Kupke KG, Caballar-Gonzaga F, Hebron-Ortiz M, Müller U. The Phenotype of the X-Linked Dystonia-Parkinsonism Syndrom. *Medicine* 1991; 70: 179-187

Lee LV, Munoz EL, Tan KT, Rezes MT. Sex linked recessive dystonia parkinsonism of Panay, Philippines (XDP). *Mol Pathol* 2001; 54(6): 362-8. Review

Lee LV, Pascasio FM, Fuentes FD, Viterbo GH. Torsion dystonia in Panay, Philippines. *Adv Neurol* 1976; 14: 137-51

Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, Ayres M, Bensinger A, Bernard A, Boe AF, Boguski MS, Brockway KS, Byrnes EJ, Chen L, Chen L, Chen TM et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature* 2007; 445(7124): 168-76

Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science* 2003; 299: 1540

Liu SH, Lin CY, Peng SY, Jeng YM, Pan HW, Lai PL, Liu CL, Hsu HC. Down-Regulation of Annexin A10 in Hepatocellular Carcinoma Is Associated with Vascular Invasion, Early Recurrence, and Poor Prognosis in Synergy with p53 Mutation. *Am J Pathol.* 2002; 160(5): 1831-1837

Liu J, Yu B, Orozco-Cabal L, Grigoriadis DE, Rivier J, Vale WW, Shinnick-Gallagher P, Gallagher J. Chronic cocaine administration switches corticotropin-releasing factor<sub>2</sub> receptor-mediated depression to facilitation of glutamatergic transmission in the lateral septum. *J Neurosci* 2005; 25: 577-583

Liu QS, Pu L, Poo MM. Repeated cocaine exposure in vivo facilitates LTP induction in midbrain dopamine neurons. *Nature* 2005; 437(7061): 1027-31

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8

Lowe JB, Marth JD. A genetic approach to mammalian glycan function. *Annu Rev Biochem* 2003; 72: 643-691

Mahata SK, Mahata M, Marksteiner J, Sperk G, Fischer-Colbrie R, Winkler H. Distribution of

mRNAs for Chromogranins A and B and Secretogranin II in Rat Brain. *Eur J Neurosci* 1991; 3(9): 895-904

Mahata SK, O'Connor DT, Mahata M, Yoo SH, Taupenot L, Wu H, Gill BM, Parmer RJ. Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J Clin Invest* 1997; 100(6): 1623-33

Mahapatra NR, Mahata M, Datta AK, Gerdes HH, Huttner WB, O'Connor DT, Mahata SK. Neuroendocrine cell type-specific and inducible expression of the chromogranin B gene: crucial role of the proximal promoter. *Endocrinology* 2000; 141: 3668–3678

Majoros WH, Ohler U. Spatial preferences of microRNA targets in 3' untranslated regions. *BMC Genomics* 2007; 8: 152

Makino S, Kaji R, Ando S, Tomizawa M, Yasuno K, Goto S, Matsumoto S, Tabuena D, Maranon E, Dantes M, Lee LV, Ogasawara K, Tooyama I, Akatsu H, Nishimura M, Tamiya G. Reduced neuron-specific expression of the TAF1 gene is associated with X-linked dystonia-parkinsonism. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 393–406

Mal TK, Masutomi Y, Zheng L, Nakata Y, Ohta H, Nakatani Y, Kokubo T, Ikura M. Structural and Functional Characterization on the Interaction of Yeast TFIID Subunit TAF1 with TATA-binding Protein. *J Mol Biol* 2004; 339: 681–93

Marksteiner J, Lechner T, Kaufmann WA, Gurka P, Humpel C, Nowakowski C, Maier H, Jellinger KA. Distribution of chromogranin B-like immunoreactivity in the human hippocampus and its changes in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2000; 100: 205–212

Martens H, Nellen W. Epigenetisches Genesilencing: RNA Interferenz und Antisense RNA.

Biospektrum 2002; 8: 351-4

Mattsson N, Ruetschi U, Podust VN, Stridsberg M, Li S, Andersen O, Haghghi S, Blennow K, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid concentrations of peptides derived from chromogranin B and secretogranin II are decreased in multiple sclerosis. *J Neurochem* 2007; 103: 1932–1939

Mazars R, Gonzalez-de-Peredo A, Cayrol C, Lavigne AC, Vogel JL, Ortega N, Lacroix C, Gautier V, Huet G, Ray A, Monsarrat B, Kristie TM, Girard JP. The THAP-zinc finger protein THAP1 associates with coactivator HCF-1 and O-GlcNAc transferase: a link between DYT6 and DYT3 dystonias. *J Biol Chem* 2010; 285(18): 13364–71

Mencia M, Struhl K. Region of yeast TAF 130 required for TFIID to associate with promoters. *Mol. Cell. Biol* 2001; 21: 1145–1154

Merchenthaler I. Corticotropin releasing factor (CRF)-like immunoreactivity in the rat central nervous system. Extrahypothalamic distribution. *Peptides* 1984; 5 Suppl 1: 53–69

Mittag J, Oehr W, Heuer H, Hämäläinen T, Brachvogel B, Pöschl E, Bauer K. Expression and thyroid hormone regulation of annexins in the anterior pituitary. *Journal of Endocrinology* 2007; 195: 385–392

Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, Nakatani Y, Allis CD. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell* 1996; 87: 1261–70

Moran LB, Duke DC, Deprez M, Dexter DT, Pearce RK, Graeber MB. Whole genome expression profiling of the medial and lateral substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurogenetics* 2006; 7: 1–11

Moran LB, Hickey L, Michael GJ, Derkacs M, Christian LM, Kalaitzakis ME, Pearce RKB, Graeber MB. Neuronal pentraxin II is highly upregulated in Parkinson's disease and a novel component of Lewy bodies. *Acta Neuropathol* 2008; 115(4): 471-478

Müller U. The monogenic primary dystonias. *Brain* 2009; 132(Pt 8): 2005-25. Review

Müller U. A molecular link between dystonia 1 and dystonia 6? *Ann Neurol* 2010; 68(4): 418-20.

Müller U, Graeber MB. Dystonie-Parkinson-Syndrom. *Münchener Medizinische Wochenschrift* 1991; 133(30): 456-60

Müller U, Haberhausen G, Wagner T, Fairweather ND, Chelly J, Monaco AP. DXS106 and DXS559 flank the X-linked dystonia-parkinsonism syndrome locus (DYT3). *Genomics* 1994; 23(1): 114-7

Müller U, Herzfeld T, Nolte D. The TAF1/DYT3 multiple transcript system in X-linked dystonia-parkinsonism. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 415-7

Müller U, Kupke KG. The genetics of primary torsion dystonia. *Hum Genet* 1990; 84(2): 107-15. Review

Müller U, Steinberger D, Németh AH. Clinical and molecular genetics of primary dystonias. *Neurogenetics* 1998; 1: 165-77

Munoz DG. Chromogranin A-like immunoreactive neurites are major constituents of senile plaques. *Lab Invest* 1991; 64(6): 826-32

Munoz DG, Kobylinski L, Henry DD, George DH. Chromogranin A-like immunoreactivity in the human brain: distribution in bulbar medulla and cerebral cortex. *Neuroscience* 1990; 34(3): 533-43

Németh AH. The genetics of primary dystonias and related disorders. *Brain* 2002; 125: 695-721

Németh AH, Nolte D, Dunne E, Niemann S, Kostrzewa M, Peters U, Fraser E, Bochukova E, Butler R, Brown J, Cox RD, Levy ER, Ropers HH, Monaco AP, Müller U. Refined linkage disequilibrium and physical mapping of the gene locus for X-linked dystonia-parkinsonism (DYT3). *Genome Res.genomics* 1999; 60: 320-9

Nilsson A, Fälth M, Zhang X, Kultima K, Sköld K, Svenningsson P, Andrén PE. Striatal alterations of secretogranin-1, somatostatin, prodynorphin, and cholecystokinin peptides in an experimental mouse model of Parkinson disease. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8(5): 1094-104

Nishimura M, Tomimoto H, Suenaga T, Nakamura S, Namba Y, Ikeda K, Akiguchi I, Kimura J. Synaptophysin and chromogranin A immunoreactivities of Lewy bodies in Parkinson's disease brains. *Brain Res* 1994; 634(2): 339-44

Nolte D, Müller U. Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. *Mamm Genome* 2002; 13: 62-4

Nolte D, Niemann S, Müller U. Specific sequence changes in multiple transcript system DYT3 are associated with X-linked dystonia parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10347-52

Nolte D, Ramser J, Niemann S, Lehrach H, Sudbrak R, Müller U. ACRC codes for a novel nuclear protein with unusual acidic repeat tract and maps to DYT3 (dystonia parkinsonism) critical interval in xq13.1. *Neurogenetics* 2001; 3: 207-13

Nussenbaum F, Herman IM. Tumor Angiogenesis: Insights and Innovations. *J Oncol* 2010; 2010: 132641

Obayashi K, Sato K, Shimazaki R, Ishikawa T, Goto K, Ueyama H, Mori T, Ando Y, Kumamoto T. Salivary chromogranin A: useful and quantitative biochemical marker of affective state in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Intern Med* 2008; 47(21): 1875-9

O'Brien R, Xu D, Mi R, Tang X, Hopf C, Worley P. Synaptically targeted narp plays an essential role in the aggregation of AMPA receptors at excitatory synapses in cultured spinal neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 4487-4498

O'Brien RJ, Xu D, Petralia RS, Steward O, Huganir RL, Worley P. Synaptic clustering of AMPA receptors by the extracellular immediate-early gene product Narp. *Neuron* 1999; 23: 309-323

Orozco-Cabal L, Liu J, Pollandt S, Schmidt K, Shinnick-Gallagher P, Gallagher JP. Dopamine and corticotropin-releasing factor synergistically alter basolateral amygdala-to-medial prefrontal cortex synaptic transmission: functional switch after chronic cocaine administration. *J Neurosci* 2008; 28(2): 529-42

Ozelius LJ, Hewett J, Page C, Bressman S, Kramer P, Shalish C, de Leon D, Brin M, Raymond D, Corey DP, Fahn S, Risch N, Buckler A, Gusella JF, Breakefield XO. The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. *Nat Genet* 1997; 17, 40-48

Passarge E. Taschenatlas der Genetik. Thieme, 2004; 2. Auflage

Pedoux R, Sengupta S, Cheng Shen J, Demidov ON, Saito S, Onogi H, Kumamoto K, Wincovitch S, Garfield SH, McMenamin M, Nagashima M, Grossman SR, Appella E, Harris CC. ING2 Regulates the Onset of Replicative Senescence by Induction of p300-Dependent p53 Acetylation. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 6639–48

Peirson SN, Butler JN, Foster RG. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(14): e73

Peters U, Haberhausen G, Kostrzewa M, Nolte D, Müller U. AFX1 and p54nrb: fine mapping, genomic structure, and exclusion as candidate genes of X-linked dystonia parkinsonism. *Hum Genet* 1997; 100: 569–72

Plummer C, Bradfield J, Singleton AB, Hernandez D, Singleton AA, O'sullivan J. First case report of X linked dystonia parkinsonism (XDP) or 'lubag' in Australia. *J Clin Neurosci* 2005; 12: 945-6

Posner MI, Peterson SE. The attention system of the human brain. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13: 35– 42

Radulovic J, Ruhmann A, Liepold T, Spiess J. Modulation of learning and anxiety by corticotropin-releasing factor (CRF) and stress: differential roles of CRF receptors 1 and 2. *J Neurosci* 1999; 19: 5016–5025

Rescher U, Gerke V. Annexins – unique membrane binding proteins with diverse functions. *Journal of Cell Science* 2004; 117: 2631–2639

Rogeness GA, Crawford L, McNamara A. Plasma dopamine-beta-hydroxylase and preschool behavior in children with conduct disorder. *Child Psychiatry Hum Dev* 1989; 20(2): 149-56

Roman T, Schmitz M, Polanczyk GV, Eizirik M, Rohde LA, Hutz MH. Further evidence for the association between attention-deficit/hyperactivity disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene. *Am J Med Genet* 2002; 114: 154–158

Ross OA, Heckman MG, Soto AI, Diehl NN, Haugarvoll K, Vilariño-Güell C, Aasly JO, Sando S, Gibson JM, Lynch T, Krygowska-Wajs A, Opala G, Barcikowska M, Czyzewski K, Uitti RJ, Wszolek ZK, Farrer MJ. Dopamine beta-hydroxylase -1021C>T association and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2008; 14(7): 544-7

Sanders SL, Garbett KA, Weil PA. Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* TFIID. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 6000–13

Sarker KP, Kataoka H, Chan A, Netherton SJ, Pot I, Huynh MA, Feng X, Bonni A, Riabowol K, Bonni S. ING2 as a Novel Mediator of Transforming Growth Factor- $\beta$ -dependent Responses in Epithelial Cells. *J Biol Chem* 2008; 283: 13269–79

Sarnyai Z. Neurobiology of stress and cocaine addiction. Studies on corticotropin-releasing factor in rats, monkeys, and humans. *Ann NY Acad Sci* 1998; 851: 371–387

Shav-Tal, Y, Zipori D. PSF and p54(nrb)/NonO--multi-functional nuclear proteins. *FEBS Letters* 2002; 531: 109-14

Scheer MP, van der Maarel S, Kübart S, Schulz A, Wirth J, Schweiger S, Ropers HH, Nothwang HG, DXS6673E Encodes a Predominantly Nuclear Protein, and Its Mouse Ortholog

DXHXS6673E Is Alternatively Spliced in a Developmental- and Tissue-Specific Manner. *Genomics* 2000; 63: 123–32

Schuback D, Kramer P, Ozelius L, Holmgren G, Forsgren L, Kyllerman M, Wahlström J, Craft CM, Nygaard T, Brin M, et al. Dopamine beta-hydroxylase gene excluded in four subtypes of hereditary dystonia. *Hum Genet* 1991; 87(3): 311-6

Simon R, Radmacher MD, Dobbin K. Design of studies using DNA microarrays. *Genet Epidemiol* 2002; 23(1): 21-36. Review

Singh MV, Bland CE, Weil PA. Molecular and genetic characterization of a Taf1p domain essential for yeast TFIID assembly. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 4929–42

Smith KM, Daly M, Fischer M, Yiannoutsos CT, Bauer L, Barkley R, et al ( ): Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit hyperactivity disorder: Genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003; 119: 77– 85

Stewart LC, Klinman JP. Dopamine beta-hydroxylase of adrenal chromaffin granules: structure and function. *Annu Rev Biochem* 1988; 57: 551-92. Review

Strachan T, Read AP. *Molekulare Humangenetik*. Elsevier, 2005; 3. Auflage

Strub JM, Goumon Y, Lugardon K, Capon C, Lopez M, Moniatte M, Van Dorsselaer A, Aunis D, Metz-Boutigue MH. Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *J Biol Chem* 1996; 271(45): 28533-40

Tackenberg B, Metz A, Unger M, Schimke N, Passow S, Hoeffken H, Hoffmann GF, Müller U, Nolte D, Oertel WH, Eggert K, Möller JC. Nigrostriatal dysfunction in X-linked dystonia-parkinsonism (DYT3). *Mov Disord* 2007; 22: 900–2

Takatsuji K, Sugimoto Y, Ishizaki S, Ozaki Y, Matsuyama E, Yamaguchi Y. The effects of examination stress on salivary cortisol, immunoglobulin A, and chromogranin A in nursing students. *Biomed Res* 2008; 29(4):221-4

Tatemoto K, Efendić S, Mutt V, Makk G, Feistner GJ, Barchas JD. Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature* 1986; 324(6096): 476-8

Taupenot L, Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Chasserot-Golaz S, Aunis D, Bader MF. Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells. *Neuroscience* 1996; 72(2): 377-89

Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT. The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 2003; 348: 1134–1149

Thyagarajan D. Dystonia: recent advances. *J Clin Neurosci* 1999; 6: 1-8

Traverso V, Christian HC, Morris JF, Buckingham JC. Lipocortin 1 (annexin 1): a candidate paracrine agent localized in pituitary folliculo-stellate cells. *Endocrinology* 1999; 140: 4311–4319

Tsui CC, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Barnes C, Worley PF. Narp, a novel member of the pentraxin family, promotes neurite outgrowth and is dynamically regulated by neuronal activity. *J Neurosci* 1996; 16: 2463–2478

Van der Maarel SM, Scholten IH, Huber I, Philippe C, Suijkerbuijk RF, Gilgenkrantz S, Kere J, Cremers FP, Ropers HH. Cloning and characterization of DXS6673E, a candidate gene for X-linked mental retardation in Xq13.1. *Hum. Immunol.human Molecular Genetics* 1996; 5: 887-97

Waters CH, Faust PL, Powers J, Vinters H, Moskowitz C, Nygaard T, Hunt AL, Fahn S. Neuropathology of lubag (X-linked dystonia parkinsonism). *Mov Disord* 1993; 8: 387-90

Wilhelmsen, KC; Weeks, DE; Nygaard, TG; Moskowitz, CB; Rosales, RL; Dela Paz, DC; Sobrevega, EE; Fahn, S; Gilliam, TC. Genetic mapping of Lubag (X-linked dystonia-parkinsonism) in a Filipino kindred to the pericentromeric region of the X chromosome. *Annals Of Neurology* 1991; 29: 124-31

Willett CE, Kawasaki H, Amemiya CT, Lin S, Steiner LA. Ikaros expression as a marker for lymphoid progenitors during zebrafish development. *Dev Dyn* 2001; 222: 694-98

Witte EA, Marrocco RT. Alteration of brain noradrenergic activity in rhesus monkeys affects the alerting component of covert orienting. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 132: 315-323

Wooten GF, Eldridge R, Axelrod J, Stern RS. Elevated plasma dopamine-beta-hydroxylase activity in autosomal dominant torsion dystonia. *N Engl J Med* 1973; 288: 284-287

Wopereis S, Lefeber DJ, Morava É, Wevers RA. Mechanisms in Protein O-Glycan Biosynthesis and Clinical and Molecular Aspects of Protein O-Glycan Biosynthesis Defects: A Review. *Clinical Chemistry* 2006; 52: 574-600

Wordinger RJ, Zode G, Clark AF. Focus on Molecules: Gremlin. *Exp Eye Res* 2008; 87(2): 78-9. Review

Yan XX, Toth Z, Schultz L, Ribak CE, Baram TZ. Corticotropin-releasing hormone (CRH)-containing neurons in the immature rat hippocampal formation: light and electron microscopic features and colocalization with glutamate decarboxylase and parvalbumin. *Hippocampus* 1998; 8: 231–243

Yasuhara O, Kawamata T, Aimi Y, McGeer EG, McGeer PL. Two types of dystrophic neurites in senile plaques of Alzheimer disease and elderly non-demented cases. *Neurosci Lett* 1994; 171(1-2): 73-6

Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG, Elston RC, Ichinose H, Nagatsu T, Kim KS, Kim CH, Malison RT, Gelernter J, Cubells JF. A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine beta-hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am J Hum Genet.* 2001; 68: 515–22

Zabetian CP, Buxbaum SG, Elston RC, Kohnke MD, Anderson GM, Gelernter J, Cubells JF. The structure of linkage disequilibrium at the DBH locus strongly influences the magnitude of association between diallelic markers and plasma dopamine beta-hydroxylase activity. *Am J Hum Genet.* 2003; 72: 1389–1400

Zhang K, Rao F, Rana BK, Gayen JR, Calegari F, King A, Rosa P, Huttner WB, Stridsberg M, Mahata M, Vaingankar S, Mahboubi V, Salem RM, Rodriguez-Flores JL, Fung MM, Smith DW, Schork NJ, Ziegler MG, Taupenot L, Mahata SK, O'Connor DT. Autonomic function in hypertension: Role of genetic variation at the catecholamine storage vesicle protein chromogranin B (CHGB). *Circ Cardiovasc Genet* 2009; 2(1): 46-56

## 8 Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ACRC	„acidic repeat containing“
AD	autosomal-dominant
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung
ANXA10	Annexin A 10
AR	autosomal rezessiv
BMP	„Bone morphogenic Protein“
cDNA	„complementary DNA“, komplementäre DNA
CBX	Kleinhirn-Kortex
CHGA	Chromogranin A
CHGB	Chromogranin B
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
CTX	Zerebraler Kortex
Ct	„Threshold Cycle“
GlcNAc	N-Acetyl-D-Glucosamin
GREM 1	Gremlin 1
HCF-1	„Host-Cell-Factor-1“
HHNA	Hypothalamo-hypophysären-Nebennierenachse
HPF	Hippocampus-Formation
CP	Caudato-Putamen
DBH	Dopamin beta-Hydroxylase
ddNTP	didesoxynukleotid

DRD	Dopa-responsive-Dystonie
DSC	„disease-specific single-nucleotid change“
ING 2	„inhibitor of growth 2“
iNOS	„inducible Nitric oxide synthase“
ITGB1BP2	Integrin beta 1 Binde-Protein 2
M-D	Myoclonus-Dystonie
miRNA	„microRNA“
MP	Morbus Parkinson
Narp	„neuronal activity-regulated Pentraxin“
NO	Nitritoxid
NPTX2	Neuronal Pentraxin II
OGT	O-linked N-Acetyl-D-Glucosamin-Transferase
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
OMIM	„Online Mendelian Inheritance in Man“, Datenbank humaner Gene und nach Mendelscher Regeln vererbten Erkrankungen
PET	Positron Emissionstomographie
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RNAi	RNA-Interferenz
QPCR	„quantitative PCR“, Real-Time PCR, Real-Time-quantitative-PCR
RISC	RNA-induzierter „Silencing Complex“
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
siRNA	„small interfering RNA“
SNP	„single-nucleotid polymorphism“

SPECT	„Single Photon Emission Computed Tomography”
SVA	„short interspersed nuclear element, variable number of tandem repeats and <u>A</u> lu composite”
TAF	„TATA box-binding protein associated factor”, TATA-Box Binde-Protein assoziierter Faktor, TBP, „TATA-binding protein”, TATA-Box-bindende Protein
TGF- $\beta$	„Transforming growth Factor- $\beta$ “
THABS	THAP-Domäne-Binde-Sequenzen, “THAP-domain-binding-sequences”
THAP1	„THAP domain containing, apoptosis associated protein 1”
THAP3	„THAP domain containing, apoptosis associated protein 3”
3'-UTR	„3'-untranslated region“, 3'-UTR-Bereich
WT	Wildtyp
XDP	„X-linked Dystonia-Parkinson”, X-chromosomales Dystonie-Parkinson- Syndrom
XR	X-chromosomal-rezessiv

# Anhang

## Liste der differentiell exprimierten Gene (Ex3/4WT gegen Ex3/4DSC3)

Symbol	Refseq	EntrezGene	mean_WT_3-4	mean_DSC3_3-4	FC	pvalue	diff
INSM2	NM_032594	84684	156,28	2242,45	-14,4	0	2086
CHGB	NM_001819	1114	115,83	1115,64	-9,63	0	999,8
NA	NA	NA	55,27	304,33	-5,51	0	249,1
DBH	NM_000787	1621	168,25	877,67	-5,22	0	709,4
NHP2L1	NM_001003796	4809	76,69	366,19	-4,77	0	289,5
CHGA	NM_001275	1113	4703,39	18385,2	-3,91	0	13682
NPTX2	NM_002523	4885	95,72	352,86	-3,69	0	257,1
HAND1	NM_004821	9421	191,25	677,62	-3,54	3,00E-04	486,4
RBP1	NM_001130992	5947	646,06	2187,55	-3,39	0	1541
SUSD2	NM_019601	56241	140,15	465,09	-3,32	3,00E-04	324,9
C20orf103	NM_012261	24141	217,3	695,56	-3,2	0	478,3
BMP7	NM_001719	655	67,2	204,81	-3,05	2,00E-04	137,6
PUNC	NM_004884	9543	98,64	294,63	-2,99	0	196
RET		5979	236,4	684,59	-2,9	0	448,2
KCNQ2	NM_004518	3785	161,23	446,07	-2,77	3,00E-04	284,8
RET		5979	331,69	904,4	-2,73	0	572,7
ESRRG	NM_001134285	2104	180,84	490,49	-2,71	1,00E-04	309,7
MAGEA12	NM_005367	4111	69,76	187,62	-2,69	0	117,9
MEG3	NR_002766	55384	203,07	546,96	-2,69	0	343,9
H19	NR_002196	283120	112,39	296,22	-2,64	0	183,8
TAC1	NM_003182	6863	76,38	198,71	-2,6	0,0444	122,3
TRIM9	NM_015163	114088	250,48	650,46	-2,6	0	400
COX17	NM_005694	10063	269,84	697,43	-2,58	0	427,6
KIAA0644	NM_014817	9865	215,34	547,28	-2,54	0	331,9
NA	NA	NA	234,02	588,29	-2,51	1,00E-04	354,3
CABP7	NM_182527	164633	164,91	412,7	-2,5	0,0266	247,8
NEUROG2	NM_024019	63973	1770,73	4376,78	-2,47	0	2606
PPP1R14A	NM_033256	94274	506,03	1231,02	-2,43	0	725
PLEKHA6	NM_014935	22874	187,07	450,52	-2,41	0	263,5
DLL3		10683	673,25	1613,39	-2,4	0,0307	940,1
IGSF3	NM_001007237	3321	159,48	380,72	-2,39	0	221,2
SLC29A4	NM_001040661	222962	691,91	1649,49	-2,38	0	957,6
FKBP11	NM_016594	51303	146,57	347,08	-2,37	0,0046	200,5
NEFH		4744	89,24	211,18	-2,37	4,00E-04	122
BTBD3	NM_014962	22903	86,63	204,64	-2,36	0	118
RGS4	NM_001102445	5999	551,56	1295,67	-2,35	0	744,1
LPPR4	NM_014839	9890	182,28	412,13	-2,26	0,0017	229,8
Sep 03	NM_019106	55964	201,29	448,01	-2,23	0	246,7
SFRP1	NM_003012	6422	362,15	808,45	-2,23	0	446,3
TSPAN18	NM_001031730	90139	155,77	347,02	-2,23	0	191,3
HES6	NM_018645	55502	685,51	1499,34	-2,19	6,00E-04	813,8

PCDH20	NM_022843	64881	131	286,95	-2,19	0,01	156
CSNK1G2	NM_001319	1455	595,76	1288,25	-2,16	0	692,5
ACCN2	NM_001095	41	223,14	478,67	-2,15	0	255,5
GNG4	NM_001098721	2786	141,06	301,19	-2,14	0	160,1
THBS4	NM_003248	7060	95,19	203,19	-2,13	0	108
PROX1	NM_002763	5629	111,46	235,64	-2,11	0	124,2
RNF150	NM_020724	57484	539,53	1132,04	-2,1	0,0037	592,5
SNAP25	NM_003081	6616	335,62	697,21	-2,08	0	361,6
DACH1	NM_004392	1602	480,26	987,66	-2,06	0	507,4
OCIAD2	NM_001014446	132299	844,83	1729,61	-2,05	0	884,8
RIMS3	NM_014747	9783	644,14	1322,52	-2,05	0	678,4
MFAP2	NM_001135247	4237	185,98	379,44	-2,04	0	193,5
RET		5979	128,56	262,89	-2,04	4,00E-04	134,3
OCIAD2	NM_001014446	132299	543,62	1101,99	-2,03	0	558,4
SLC10A4	NM_152679	201780	219,56	445,23	-2,03	0,0492	225,7
TMSL8	NM_021992	11013	480,82	976,86	-2,03	0	496
PI15	NM_015886	51050	220,15	445,05	-2,02	0,001	224,9
BATF3	NM_018664	55509	139,06	279,59	-2,01	0	140,5
MAOA	NM_000240	4128	196,95	395,99	-2,01	0	199
CDH11	NM_001797	1009	3322,94	1658,68	2	0	1664
NPC2		10577	12106,42	6049,48	2	0	6057
SERPINB1	NM_030666	1992	608,08	303,76	2	0	304,3
SERPINE1	NM_000602	5054	293,58	146,02	2,01	0	147,6
COL6A1	NM_001848	1291	566,99	280,07	2,02	0	286,9
FJX1	NM_014344	24147	812,42	401,28	2,02	0	411,1
NA	NA	NA	243,93	120,99	2,02	0	123
MYH9	NM_002473	4627	731,66	360,63	2,03	0	371
COL22A1	NM_152888	169044	226	110,97	2,04	0	115
LIPG	NM_006033	9388	287,99	141,21	2,04	0	146,8
HLA-B		3106	467,96	227,8	2,05	0	240,2
NPAS2	NM_002518	4862	253,72	123,85	2,05	0	129,9
NRIP1	NM_003489	8204	226,97	110,46	2,05	0	116,5
LRRC17	NM_001031692	10234	311,69	151,42	2,06	0	160,3
SLC44A1	NM_080546	23446	2113,03	1027,28	2,06	0	1086
ST3GAL5	NM_001042437	8869	437,8	213,04	2,06	0	224,8
MAGEC2	NM_016249	51438	361,26	174,64	2,07	0	186,6
SGK1	NM_005627	6446	608,97	292,4	2,08	0	316,6
CDKN2B	NM_004936	1030	212,93	102,03	2,09	0	110,9
IL8	NM_000584	3576	282,84	134,97	2,1	6,00E-04	147,9
NT5E	NM_002526	4907	576,79	274,86	2,1	1,00E-04	301,9
TIMP2	NM_003255	7077	2508,33	1195,09	2,1	0	1313
FILIP1	NM_015687	27145	476,9	224,65	2,12	0	252,3
PLEKHA2	NM_021623	59339	853,59	400,54	2,13	0	453,1
C1QTNF1	NM_030968	114897	1137,49	532,44	2,14	3,00E-04	605,1
FAM129A	NM_052966	116496	655,79	304,38	2,15	0	351,4
TNFRSF12 A	NM_016639	51330	476,77	221,03	2,16	1,00E-04	255,7

KIAA0746	NM_015187	23231	561,04	257,99	2,17	0	303,1
LAYN	NM_178834	143903	316,74	145,36	2,18	0	171,4
ITGA2		3673	440,88	201	2,19	0	239,9
NBL1	NM_005380	4681	1277,44	582,24	2,19	0	695,2
MT1A	NM_005946	4489	1016,56	461,42	2,2	0	555,1
NCALD	NM_001040624	83988	995,2	451,63	2,2	0	543,6
LOC400578	XR_017543	400578	205,91	93,16	2,21	0	112,8
FBLN2	NM_001004019	2199	255,64	114,81	2,23	0	140,8
NA	NA	NA	230,2	103,16	2,23	1,00E-04	127
CEBPD	NM_005195	1052	850,44	379,95	2,24	0	470,5
AXL	NM_001699	558	577,71	256,47	2,25	0	321,2
ANTXR1	NM_018153	84168	330,5	146,43	2,26	0	184,1
	HIST2H2AA3	8337	746,84	330,62	2,26	0	416,2
NA	NA	NA	435,45	192,08	2,27	0	243,4
AKR1C3	NM_003739	8644	252,35	110,46	2,28	0	141,9
ANXA2	NM_001002857	302	6130,46	2675,92	2,29	0	3455
MAGEC2	NM_016249	51438	2091,28	912,19	2,29	0	1179
F2RL1	NM_005242	2150	214,7	93,38	2,3	0	121,3
COL5A1		1289	780,13	337,34	2,31	0	442,8
ID3	NM_002167	3399	1557,39	674,34	2,31	0	883,1
PTRF	NM_012232	284119	826,6	357,41	2,31	0	469,2
TMEM20	NM_001134658	159371	568,19	245,48	2,31	0	322,7
CYP1B1		1545	1383,52	595,37	2,32	0	788,2
IL8	NM_000584	3576	739,32	318,8	2,32	0	420,5
MUC1	NM_001018016	4582	320,76	138,54	2,32	0	182,2
ACOT7	NM_007274	11332	209,77	89,52	2,34	0	120,3
NRP1	NM_001024628	8829	569,65	241,91	2,35	0	327,7
FAM43A	NM_153690	131583	213,78	90,77	2,36	0,002	123
CD44	NM_000610	960	4104,4	1731,43	2,37	0	2373
ANXA1	NM_000700	301	2669,22	1120,58	2,38	0	1549
CYBRD1	NM_001127383	79901	464,89	194,53	2,39	0	270,4
FAM46C	NM_017709	54855	324,23	134,4	2,41	0	189,8
HIST1H1C		3006	1011,22	419,85	2,41	0	591,4
SH3KBP1	NM_001024666	30011	1168,3	484,85	2,41	0	683,5
C15orf52	NM_207380	388115	609,28	250,86	2,43	0	358,4
KIAA1199	NM_018689	57214	353,02	144,65	2,44	0	208,4
TFAP2C	NM_003222	7022	276,53	113,47	2,44	0	163,1
C11orf41	NM_012194	25758	209,31	85,6	2,45	0	123,7
MT2A	NM_005953	4502	1395,3	569,39	2,45	0	825,9
NBL1	NM_005380	4681	520,6	211,54	2,46	0	309,1
TFAP2C	NM_003222	7022	430,48	174,97	2,46	0	255,5
	HIST2H2AA3	8337	946,5	381,48	2,48	0	565
NQO1	NM_000903	1728	2654,63	1071,94	2,48	0	1583
SPARC	NM_003118	6678	4100,62	1653,15	2,48	0	2447
ANXA2	NM_001002857	302	874,59	350,84	2,49	0	523,8
SVEP1	NM_153366	79987	368,82	148,11	2,49	0	220,7

RAB27B	NM_004163	5874	1547,74	614,75	2,52	0	933
OLFML3	NM_020190	56944	314,67	124,75	2,52	0	189,9
SLC16A3	NM_001042422	9123	803,54	318,95	2,52	0	484,6
TM4SF1	NM_014220	4071	2081,62	820,26	2,54	0	1261
TOX2	NM_001098796	84969	1088,08	424,7	2,56	0	663,4
ITGA3	NM_002204	3675	1059,16	413,17	2,56	0	646
LOC43994 9	XM_001128367	439949	538,67	210,53	2,56	0	328,2
TMEM163	NM_030923	81615	195,22	76,22	2,56	0	119
CYBRD1	NM_001127383	79901	447,9	173,56	2,58	0	274,3
EFEMP1	NM_001039348	2202	230,44	88,92	2,59	0	141,5
NA	NA	NA	263,44	101,9	2,59	0	161,5
COLEC12	NM_130386	81035	491,47	189,23	2,6	0	302,2
CCDC85A	NM_001080433	114800	267,83	102,68	2,61	0	165,2
FAM5C	NM_199051	339479	1355,4	518,36	2,61	0	837
COL4A1	NM_001845	1282	328,59	124,78	2,63	0	203,8
NA	NA	NA	513,4	195,34	2,63	0	318,1
RP13- 102H20.1	NM_144967	158763	1148,03	434,21	2,64	1,00E-04	713,8
HTR2B	NM_000867	3357	468,18	177,08	2,64	0	291,1
PLAU	NM_002658	5328	274,94	101,81	2,7	0	173,1
AXL	NM_001699	558	564,58	206,59	2,73	0	358
SH3KBP1	NM_001024666	30011	1124,01	403,42	2,79	0	720,6
ABCC3	NM_003786	8714	811,88	285,25	2,85	0	526,6
DEPDC6	NM_022783	64798	279,98	96,08	2,91	0	183,9
IFI16	NM_005531	3428	634,79	216,94	2,93	0	417,9
LRIG1	NM_015541	26018	466,36	159,32	2,93	0	307
FEZ1	NM_005103	9638	338,55	115,16	2,94	0	223,4
BDKRB1	NM_000710	623	462,41	156,77	2,95	0	305,6
PODN	NM_153703	127435	231,94	76,78	3,02	0	155,2
TFPI2	NM_006528	7980	1002,51	326,04	3,07	0	676,5
GPNMB	NM_001005340	10457	397,08	128,47	3,09	0	268,6
FER1L3	NM_013451	26509	409,42	131,54	3,11	0	277,9
PLOD2	NM_000935	5352	188,26	60,36	3,12	0	127,9
IL1RAP	NM_002182	3556	183,33	56,12	3,27	0	127,2
PSG5	NM_001130014	5673	228,32	69,41	3,29	0	158,9
CTHRC1	NM_138455	115908	445,27	135,07	3,3	0	310,2
CDH10	NM_006727	1008	504,38	152	3,32	0	352,4
LYPD6B	NM_177964	130576	483,65	145,1	3,33	0	338,5
TGM2	NM_004613	7052	2979,58	861,87	3,46	0	2118
D4S234E	NM_001040101	27065	1836,44	524,48	3,5	0	1312
KIF1A	NM_004321	547	383,69	107,17	3,58	0	276,5
PTGS2	NM_000963	5743	254,51	71,04	3,58	0	183,5
PLSCR4	NM_001128304	57088	275,47	76,29	3,61	0	199,2
A2M	NM_000014	2	201,85	55,45	3,64	0	146,4
RAI14	NM_015577	26064	343,27	92,75	3,7	0	250,5
PSG4	NM_002780	5672	307,31	82,17	3,74	0	225,1

FRMD4A	NM_018027	55691	518,22	135,58	3,82	0	382,6
PSG4	NM_002780	5672	252,45	65,19	3,87	0	187,3
PTX3	NM_002852	5806	514,35	132,91	3,87	0	381,4
PSG3	NM_021016	5671	252,67	63,85	3,96	0	188,8
CDKN2A		1029	861,53	216,9	3,97	0	644,6
ITGA10	NM_003637	8515	344,77	86,92	3,97	0	257,9
AKR1C4	NM_001818	1109	523,08	126,06	4,15	0	397
IGFBP7	NM_001553	3490	881,99	210,7	4,19	0	671,3
PLAT	NM_000930	5327	812,3	193,86	4,19	0	618,5
THBS2	NM_003247	7058	684,36	160,37	4,27	0	524
GREM1	NM_013372	26585	451,85	102,56	4,41	0	349,3
PENK	NM_006211	5179	285,19	63,56	4,49	0	221,6
PRRX1	NM_006902	5396	2505,74	548,33	4,57	0	1957
EFEMP1	NM_001039348	2202	580,88	126,14	4,61	0	454,7
SPOCK1	NM_004598	6695	345,94	73,42	4,71	0	272,5
PAPPA	NM_002581	5069	414,15	86,38	4,79	0	327,8
CYR61	NM_001554	3491	1596,48	323,93	4,93	0	1273
PRNP	NM_000311	5621	1953,32	384,15	5,08	0	1569
PRNP	NM_000311	5621	9770,37	1915,54	5,1	0	7855
PSG6	NM_001031850	5675	387,65	71,77	5,4	0	315,9
PSG5	NM_001130014	5673	350,73	63,83	5,49	0	286,9
GREM1	NM_013372	26585	770,77	131,51	5,86	0	639,3
VIPR1	NM_004624	7433	709,4	117,07	6,06	0	592,3
SERPINB2	NM_002575	5055	1092,78	173,85	6,29	0	918,9
SERPINB2	NM_002575	5055	1354,87	204,71	6,62	0	1150
TMEM200 A	NM_052913	114801	422,99	63,41	6,67	0	359,6
ACTA2	NM_001613	59	3997,66	510,72	7,83	0	3487
CRH	NM_000756	1392	1463,74	182,83	8,01	0	1281
PTGS2	NM_000963	5743	1530,52	188,78	8,11	0	1342
MMP1	NM_002421	4312	854,45	98,79	8,65	0	755,7
ANXA10	NM_007193	11199	1453,81	145,73	9,98	0	1308
CTGF	NM_001901	1490	1058,66	86,24	12,3	0	972,4
CTGF	NM_001901	1490	1088,01	78,21	13,9	0	1010

## Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

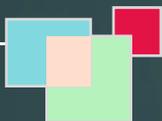
## Danksagung

Zunächst möchte ich mich vor allem bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Müller, Leiter des Instituts für Humangenetik, für die freundliche Überlassung des Themas und sowie für die beständige Betreuung und Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Doktorarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thilo Herzfeld für die gründliche Einarbeitung, kompetente Unterstützung und seinen Beistand bei allen Problemen und Fragen.

Nicht weniger danke ich Frau Apl. Prof. Dagmar Nolte für ihre wertvolle Hilfe und Anregungen während meiner Doktorarbeit und der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Humangenetik für die freundliche Aufnahme und kollegiale Atmosphäre.

Mein persönlicher Dank gilt meiner Familie, die mich ermutigt und unterstützt hat.



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5943-9



9 17 8 3 8 3 5 19 5 9 4 3 9