
Aus dem
Institut für Humangenetik
des Zentrums für Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin
des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Gal

**Funktionelle Analyse der 3´untranslatierten
Region des Dopamin D2 Rezeptor Gens**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Martin Ludwig Rein

aus München

Hamburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 12.11.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. U. Finckh

Prüfungsausschuss: 2.Gutachter/in: Prof. Dr. K. Wiedemann

Prüfungsausschuss: 3.Gutachter/in: Prof. Dr. Th. Braulke

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Arbeitshypothese	1
1.2	Einführung in die Thematik	2
2	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Molekularbiologische Methoden (DNA)	9
2.1.1	DNA-Gelelektrophorese	
2.1.2	Ethanolpräzipitation von DNA/RNA	
2.1.3	Phenol/Chloroform-Extraktion	
2.1.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	
2.1.5	Restriktionsverdau von DNA	
2.1.6	Ligation von DNA-Fragmenten	
2.1.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
2.1.8	Allel-spezifische Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
2.1.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	
2.1.10	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	
2.1.11	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Zellen	
2.1.12	DNA-Sequenzierung	
2.2	Molekularbiologische Methoden (RNA)	12
2.2.2	RNA-Gelelektrophorese	
2.2.2	<i>In vitro</i> -Transkription	
2.2.3	Phosphorylierung der 5´- Enden von RNA	
2.2.4	<i>UV-Crosslinking Assays</i>	
2.2.5	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assays</i> (EMSA)	
2.2.6	<i>In vitro</i> -Translation	
2.2.7	Luziferase-Reportergen-Analysen	
2.3	Proteinbiochemische Methoden	17
2.3.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	
2.3.3	Coomassie Färbung von Polyacrylamid-Gelen	
2.3.4	Herstellung eines Proteinrohlysates aus Hirngewebe	
2.3.5	Herstellung eines Proteinrohlysates aus Zellkulturlinien	
2.3.6	Fraktionierung eines Proteinrohlysates	
2.4	Zellbiologische Arbeitstechniken	19
2.4.1	Kultivierung von Cos-7-, HeLa-, Kelly-, SH-SY5Y Zellen	
2.4.1	Kultivierung und Transfektion von HEK293 Zellen	
2.5	Statistische Analysen	20

3	ERGEBNISSE	21
3.1	Charakterisierung der <i>DRD2</i> 3'UTR	21
3.1.1	Charakterisierung repräsentativer Haplotypen	
3.1.2	Vergleich der <i>DRD2</i> 3'UTR verschiedener Spezies	
3.1.3	Identifizierung eines neuen seltenen SNP in der <i>DRD2</i> 3'UTR	
3.1.4	Kopplungsungleichgewicht zwischen Haplotypen der <i>DRD2</i> 3'UTR und <i>DRD2</i> Exon 7 Polymorphismen	
3.1.5	Sekundärstrukturanalysen der <i>DRD2</i> 3'UTR	
3.1.6	Funktionelle Elemente in der <i>DRD2</i> 3'UTR	
3.2	Identifizierung spezifischer Proteinbindungssequenzen der <i>DRD2</i> 3'UTR	30
3.2.1	Bindung <i>trans</i> -agierender Faktoren an die <i>DRD2</i> 3'UTR	
3.3	Einfluss von SNPs der <i>DRD2</i> 3'UTR auf die Proteinbindung	32
3.3.3	Haplotyp-spezifisches Proteinbindungsverhalten	
3.3.3.1	Analyse der Proteinbindung mittels <i>UV-Crosslinking assay</i>	
3.3.3.2	Analyse der Proteinbindung mittels <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA)	
3.4	Einfluss der <i>DRD2</i> 3'UTR auf die Translation und Genexpression	37
3.4.1	Translationregulation der <i>DRD2</i> 3'UTR <i>in vitro</i>	
3.4.1.1	<i>In vitro</i> -Translation <i>DRD2</i> 3'UTR-fusionierter Luziferase mRNA	
3.4.2	Expressionsregulation der <i>DRD2</i> 3'UTR <i>in vivo</i>	
3.4.2.1	Konstruktion und Transfektion von dicistronischen Luziferase-Konstrukten	
4	DISKUSSION	42
5	ZUSAMMENFASSUNG	53
6	LITERATURVERZEICHNIS	54
7	APPENDIX	66
7.1	Firmenverzeichnis	66
7.2	Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere	67
7.3	Vektoren	67
7.4	Oligonukleotide	69
7.5	Einzelnukleotidaustausch-Polymorphismen	71
7.6	Danksagung	73
7.7	Curriculum vitae	74
7.8	Erklärung	76

ABKÜRZUNGEN

ANKK1	Ankyrin repeat and kinase domain containing 1 Gen
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	AU rich element
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BMP2	Bone morphogenic protein 2 Gen
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	Complementary DNA
CTP	Cytosintriphosphat
ΔG	Gibb'sche freie Energie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuklease
DRD2	Dopamin D2 Rezeptor
DRD2	Dopamin D2 Rezeptor Gen
DTT	Dithiothreitol
E 7	Exon 7 des DRD2
E 8	Exon 8 des DRD2
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
g	Erdbeschleunigung
GAIT	Gamma interferon activated inhibitor of Ceruloplasmin mRNA translation
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK	Human embryonic kidney
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
l	Liter

LB	Luria Bertoni
M	Molar, Mol/Liter
min	Minute
mRNA	Messenger RNA
NCBI	National Centrum for Biotechnological Information
nt	Nukleotide
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Shank	SH3 domain and ankyrin repeat containing protein
SNP	Einzelnukleotidaustausch-Polymorphismus
SOC	Super optimal (broth) catabol repression Medium
SSCP	Single stranded conformation polymorphism
TAE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N´N,N´-Tetramethylethylendiamin
Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
tRNA	Transfer RNA
U	Einheit für enzymatische Aktivität
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uraciltriphosphat
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid

1 EINLEITUNG

1.1 Arbeitshypothese

Das mesolimbische dopaminerge System gilt als das morphologische Korrelat des menschlichen Belohnungssystems. Dopamin ist in diversen Studien als ein zentraler Neurotransmitter für die Ausbildung addiktiven Verhaltens identifiziert worden (Wise, 1987; Di Chiara, 1998; Wise, 1998; Spanagel et al., 1999; Wightman et al., 2002; Bowirrat et al., 2005; Hyman et al., 2006).

In Assoziationsstudien wurden bestimmte allelische Varianten des D2 Dopamin Rezeptor Gens (*DRD2*) gehäuft bei Suchtkranken gefunden (Blum et al., 1990; Noble, 1993; Finckh et al., 1997; Noble, 1998, 2000, 2003). Da die Studien wenig eindeutige, zum Teil widersprüchliche Ergebnisse erbrachten und mögliche Effekte der untersuchten Genotypen bis dato nicht ausreichend erklärt werden konnten, wurde vermutet, dass diese sich in Kopplungsungleichgewicht mit einer funktionellen Variante des *DRD2* befinden (Comings et al., 1991; O'Hara et al., 1993; Ritchie et al., 2003).

Für die 3´untranslatierte Region (3´UTR) des humanen *DRD2* wurde von mehreren Arbeitsgruppen eine Assoziation zwischen Genotypvarianten und phänotypischen Ausprägungen bei Suchtkranken (Alkoholikern) beschrieben (Finckh et al., 1997; Koehnke et al., 1999; Samochowiec et al., 2000; Lucht et al., 2001).

Zudem wurde für nicht kodierende Genbereiche wie 5´- und vor allem 3´UTRs in den letzten Jahren zunehmend ein Einfluss auf die Regulation der Genexpression nachgewiesen (Wilusz et al., 2001; Mazumder et al., 2003; Wilkie et al., 2003; Hesketh, 2004), so dass besonders die genannten Studien zur *DRD2* 3´UTR die Hypothese nahelegten, dass Unterschiede in den untranslatierten Regionen des *DRD2* über die Beeinflussung der Genexpression zur Entstehung neuropsychiatrischer Phänotypen beitragen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels molekularbiologischer und zellbiologischer Methoden *in vitro* und *in vivo* die Polymorphismen der *DRD2* 3´UTR im Kontext repräsentativer Haplotypen auf translationeller Ebene hinsichtlich ihrer funktionellen Relevanz zu überprüfen und näher zu charakterisieren.

1.2 Einführung in die Thematik

Für eine Vielzahl komplexer Phänotypen wie zum Beispiel Intelligenz und die phänotypische Ausprägung neuropsychiatrischer Erkrankungen wurde in Familien- und Zwillingsstudien ein maßgeblicher Einfluss erblicher Faktoren beschrieben (Plomin, 1990).

Die allgemein zu beobachtende hohe phänotypische Variabilität in der Bevölkerung bzw. das individuelle Erkrankungsrisiko können durch einen ausschließlich genetischen Einfluss jedoch nicht vollständig erklärt werden. Im Gegensatz zu den seltenen, in der Regel durch einen Einzelgendefekt verursachten erblichen Erkrankungen mit Mendel'scher oder mitochondrialer Vererbung lässt sich in Familien mit gehäuftem Vorkommen komplexer Erkrankungen kein klassischer Erbgang erkennen. Die deutlich höhere Inzidenz komplexer - insbesondere neuropsychiatrischer - Erkrankungen im Vergleich zu den genannten monogenen Erkrankungen lässt vermuten, dass ein Teil der disponierenden oder bei einer Ausprägung mitgestaltenden genetischen Varianten durch Polymorphismen bzw. die Kombination mehrerer Polymorphismen determiniert ist, welche in der Bevölkerung häufig auftreten. So erscheint es durchaus denkbar, dass in aufeinander folgenden Generationen einer Familie Erkrankungen wiederholt auftreten - obwohl diese nicht im Mendel'schen Sinne vererbt werden.

In der jüngeren Vergangenheit wurden zahlreiche genetische Assoziationsstudien bei komplexen Erkrankungen durchgeführt, um zu untersuchen, ob bestimmte allelische Varianten einzelner Gene bei Betroffenen häufiger oder seltener vorkommen als bei nicht betroffenen Kontrollprobanden (Uhl et al., 1997; Risch, 2000; Rannala, 2001; Dean, 2003; Inoue et al., 2003; Suh et al., 2005).

Zusammenfassend kann behauptet werden, dass diese Studien bislang speziell bei neuropsychiatrischen Erkrankungen nicht sehr erfolgreich waren und im Hinblick auf einzelne Gen-Polymorphismen nicht selten zu widersprüchlichen Ergebnissen führten. Ein gemeinsames Merkmal der Assoziationsstudien ist das Vorgehen nach dem so genannten „Kandidatengen-Ansatz“. Hierbei werden ein für die Pathophysiologie der Erkrankung hypo-

thetisch oder erwiesenermaßen relevantes physiologisches System bzw. dessen zentrale Komponenten auf Basis der genetischen Variabilität der beteiligten Gene (genetische Polymorphismen) untersucht.

Bei der Alkoholismuskrankheit zum Beispiel vermutet man eine Störung oder besondere Vulnerabilität gegenüber Störfaktoren des mesolimbischen dopaminergen Systems - welches als das morphologische Korrelat des humanen Belohnungssystem beschrieben wurde (siehe 1.1 und dort zitierte Literatur).

Einer der zentralen Ansatzpunkte psychotroper Substanzen mit hoher Wirksamkeit ist der Dopamin D2 Rezeptor. Es erschien daher naheliegend, dass eine Variabilität dieses Rezeptors (bzw. dessen Gens = *DRD2*), der im erwähnten Belohnungssystem eine wichtige funktionelle Relevanz besitzt, für die Ausprägung der Alkoholismus-Disposition eine Rolle spielen könnte.

Basierend auf diesen Überlegungen wurden zahlreiche Assoziationsstudien des *DRD2* Gens durchgeführt, die jedoch keine befriedigenden bzw. schlüssigen Ergebnisse liefern konnten (Bolos et al., 1990; Blum et al., 1991; Comings et al., 1991; Gelernter et al., 1991; Goldman, 1993; Lawford et al., 1997; Noble, 1998; Sander et al., 1999). Nach wie vor muss die erstmalig von Blum et al. beschriebene Assoziation von Alkoholismus mit dem so genannten A1-Allel eines mehrere Kilobasen außerhalb des *DRD2* Gens liegenden *TaqI* Restriktions-Polymorphismus (Blum et al., 1990) als umstritten gelten. Andererseits deuten mehrere bildgebende Studien darauf hin, dass das A1-Allel mit einer reduzierten D2 Rezeptordichte bzw. reduzierten dopaminergen Neurotransmission assoziiert sein könnte (Thompson et al., 1997; Pohjalainen et al., 1998; Jonsson et al., 1999; Ritchie et al., 2003).

Generell wird vermutet, dass derartige Assoziationen am ehesten durch funktionelle genetische Varianten innerhalb des *DRD2* Gens zu erklären sein müssten - bedingt durch Polymorphismen, welche im Kopplungsgleichgewicht mit dem erwähnten SNP *TaqI* A1/A2 stehen (Comings et al., 1991; O'Hara et al., 1993; Ritchie et al., 2003).

Verschiedene Vorarbeiten deuteten an, dass die 3´untranslatierte Region des DRD2 Gens, welches ca. 65 Kb genomische DNA auf dem langen Arm des Chromosoms 11 umspannt, mit dem *TaqI* A-Polymorphismus in Kopplungsungleichgewicht steht (Noble, 1993; Finckh et al., 1996; Finckh et al., 1997; Noble, 1998; Noble et al., 2000; Samochowiec et al., 2000). Ebenso konnten außerhalb des kodierenden Bereiches der mRNA (3´UTR) in Exon 8, dem letzten Exon von *DRD2*, Polymorphismen identifiziert werden, die in Assoziationsstudien einen Einfluss auf phänotypische Merkmale bei Suchtkranken (Alkoholikern) zeigten (Finckh et al., 1997; Koehnke et al., 1999; Samochowiec et al., 2000; Lucht et al., 2001).

Die oben erwähnten Assoziationsstudien beinhalten naturgemäß das Problem, dass für die überwiegende Mehrheit der bekannten genetischen Polymorphismen des Menschen eine mögliche funktionelle Relevanz nicht erkennbar und oft auch nicht experimentell unmittelbar untersuchbar ist. Hinzu kommt, dass ein *in vitro* messbarer Effekt eines Polymorphismus nicht notwendigerweise in der Pathophysiologie der untersuchten Erkrankung eine entscheidende Rolle spielen muss. Außerdem wäre es möglich, dass benachbart liegende Polymorphismen sich gegenseitig beeinflussen, wodurch isolierte Betrachtungen einzelner Polymorphismen zu artifiziellen Ergebnissen führen könnten.

Eine weitere entscheidende Schwäche von Assoziationsstudien dürfte darin liegen, dass bei komplexen Erkrankungen a priori der relative bzw. quantitative Anteil eines bestimmten Polymorphismus oder eines polymorphen Gens an der Phänotyp-Varianz nicht abschätzbar erscheint, da nicht bekannt ist, wie viele unterschiedliche Gene beteiligt sind.

Primäres Ziel dieser Arbeit war es daher, für das fehlende Bindeglied zwischen genetischem Polymorphismus und komplexem Phänotyp ein molekulargenetisches Korrelat zu finden und die unbekannteste Wegstrecke, gemessen vom Genotyp bis hin zu einer phänotypischen Ausprägung, zu charakterisieren und somit zu verringern. Dies schien am ehesten möglich durch funktionelle Untersuchungen der Effekte einzelner Polymorphismen

und vor allem ihrer Kombination in definierten Genabschnitten im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Genexpression.

Wie bereits in der Arbeitshypothese angedeutet erfolgt die Regulation der Genexpression bei höheren Organismen hauptsächlich durch nicht kodierende Bereiche (Sonenberg, 1994; McCarthy et al., 1995; Pesole et al., 1997; Bashirullah et al., 1998; van der Velden et al., 1999). Dieser Vorgang findet auf 2 Ebenen statt:

1. Regulation auf Ebene der Transkription, hauptsächlich durch *cis*-agierende DNA-Elemente wie Promotoren, Enhancer und Silencer, sowie
2. post-transkriptionelle Regulation, durch Kontrolle des nukleär-zytoplasmatischen mRNA-Transports, der Translationseffizienz, der mRNA-Stabilität und der subzellulären Lokalisation der mRNA (Lipshitz et al., 2000; Mazumder et al., 2003; Wilkie et al., 2003; Hesketh, 2004; Kindler et al., 2005).

Bei den zuletzt genannten Vorgängen spielen von Seiten der mRNA *cis*-agierende RNA-Elemente eine entscheidende Rolle, die vorwiegend in den untranslatierten Regionen (5´ und 3´UTRs) lokalisiert sind (Pesole et al., 2001). Ungleich der transkriptionellen Kontrolle, deren regulatorische Signale hauptsächlich durch die Primärstruktur / Sequenz der DNA bestimmt werden, erfordern die Regulationsmechanismen auf mRNA-Ebene ein Zusammenspiel von Kontrollelementen, die sowohl von der Primär- als auch der Sekundärstruktur der mRNA abhängig sind.

Solche, z.T. bereits in Form übergeordneter, definierbarer Konsensus-Sequenzen bekannte, *cis*-agierende funktionelle RNA-Elemente können Struktur-spezifisch von RNA-bindenden Proteinen erkannt werden, die ihre regulatorische Funktion über die Beeinflussung der Verwertung der mRNA auf translationeller Ebene ausüben (Zaidi et al., 1994; Wilkie et al., 2003). Von mehreren Arbeitsgruppen konnte in der jüngeren Vergangenheit nachgewiesen werden, dass Einzelnukleotidaustausch-Polymorphismen (SNPs), welche in der 3´ untranslatierten Region lokalisiert sind, bei Erkrankungen mit komplexem Genotyp einen funktionellen Einfluss auf die beschriebenen Regulationsmechanismen haben können:

So beschrieben Miller et al. einen SNP in der 3´UTR des Dopamin Transporter Gens (*DAT*), der sowohl beim Menschen als auch bei Rhesusaffen einen Effekt auf die *in-vitro* Expression von Reporter genen (Luziferase) in HEK293 Zellen ausübt (Miller et al., 2002). Die Autoren werten die Ergebnisse als einen Haplotyp-spezifischen posttranskriptionellen Einfluss auf die Regulation der Dopamin Transporter Expression.

Griseri et al. untersuchten den Einfluss eines SNPs in der 3´UTR des humanen RET Protoonkogens (*RET*), welches als Suszeptibilitätsgen für Morbus Hirschsprung (HSCR) identifiziert wurde (Lantieri et al., 2006; Griseri et al., 2007). Abhängig von den durch den SNP determinierten Haplotypen wurden Unterschiede in der Expression von Reporter genen in humanen Neuroblastomzelllinien (SK-N-BE) beobachtet, die aus der unterschiedlichen mRNA-Stabilität der untersuchten Konstrukte resultierten. Eine Erklärung für die Differenzen in der mRNA-Stabilität sahen die Autoren in der durch den Einzelnukleotidaustausch verursachten Änderung der Sekundärstruktur (berechnet mittels mfold, siehe auch 3.1.5), auch wenn keine funktionellen Domänen mittels Sequenzanalyse der 3´untranslatierten Region nachgewiesen werden konnten.

Ein Beispiel für den funktionellen Einfluss eines Einzelnukleotidaustausches der in einer 3´UTR lokalisiert ist und durch *cis*-agierende Sequenzelemente vermittelt wird, stellt die posttranskriptionelle Regulation der Proteinexpression von BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*) dar. Dieses Protein ist als morphogenetischer Faktor an der embryonalen Osteo- und Kartilage-nese sowie an der Homöostase des reifen Knochens beteiligt. Es konnte in der hochkonservierten 3´UTR des *BMP2* ein SNP identifiziert werden, der in Assoziationsstudien gehäuft bei Osteoporose und Osteoarthritis gefunden wurde (Styrkarsdottir et al., 2003; Valdes et al., 2004)

Interessanterweise ist der beschriebene SNP in einem putativen *cis*-agierenden RNA-Element (ARE – *AU rich element*) lokalisiert. AU-reiche Elemente sind bekannt dafür, dass sie einen Einfluss auf die mRNA-Stabilität ausüben und es konnte von Fritz et al. gezeigt werden, dass der Polymorphismus die Ausbildung eines AU-reichen Elements verhindert.

Zudem wurden durch den Nukleotidaustausch sowohl in humanen als auch in murinen Zellsystemen die Bindungsaffinität zu ARE-bindenden Proteinen verändert und die mRNA-Stabilität *in vitro* signifikant beeinflusst (Fritz et al., 2006). Die Autoren werten die Ergebnisse als einen SNP-spezifischen Effekt auf das posttranskriptionelle Schicksal der *BMP2*-mRNA. Durch die Haplotyp-spezifischen Unterschiede in der Interaktion von mRNA-bindenden Proteinen mit den putativen *cis*-agierenden mRNA-Sequenzelementen (AREs) in der *BMP2* 3'UTR könnte somit die Expression des Proteins über eine Beeinflussung der mRNA-Stabilität modifiziert werden.

Da a priori nicht abzuschätzen war, auf welcher Ebene sich 3'UTR-Polymorphismen von *DRD2* zellbiologisch auswirken, und außerdem gezielt Haplotypen untersucht werden sollten, welche auf Populationsebene eine gewisse Relevanz haben (d.h. repräsentative Haplotypen), erforderte die vorliegende Arbeit ein relativ breites Spektrum an Methoden:

Ausgehend von der Genotypisierung und Sequenzierung größerer DNA-Abschnitte einer umfangreichen Gruppe von Probanden wurden *in vitro*-Transkripte verschiedener Haplotypen hergestellt und in Proteinbindungs- und Mobilitätsshift-Analysen untersucht. Desweiteren wurden cDNA-Klonierungen von Haplotyp-spezifischen Reporter-gen-Fusionskonstrukten und deren Analyse mittels *in vitro*-Translation und nach Transfektion in Zellkultur durchgeführt.

Auf Grund der oben erwähnten Erkenntnisse zum Kopplungsungleichgewicht zwischen der 3'-Region von *DRD2* und des *TaqI* A-Polymorphismus sowie bereits existierenden Assoziationsstudien zu Polymorphismen in der 3'untranslatierten Region des *DRD2* (Finckh et al., 1997; Koehnke et al., 1999; Samochowiec et al., 2000; Lucht et al., 2001) sollte in dieser Arbeit speziell die komplette 3'UTR von *DRD2* hinsichtlich der in der Bevölkerung real existierenden Haplotypen – im Sinne einer kombinierten Betrachtung des Genotyps mehrerer Polymorphismen in dieser Genregion - charakterisiert werden. Daraufhin sollten die identifizierten repräsentativen Haplotypen funktionell in Bezug auf experimentell messbare Unterschiede unter-

sucht werden. Dieser Ansatz sollte es ermöglichen, für zukünftige Assoziationsstudien eine sinnvolle Auswahl der zu untersuchenden Genotypen auf Basis von funktionell relevanten Haplotypen zu treffen, um diese hinsichtlich der Responsivität auf dopaminerge Pharmaka, des klinischen Phänotyps (z.B. Alkoholismus-Subtyp) sowie hinsichtlich neuroradiologisch differenzierbarer Phänotypen des Gehirns zu untersuchen.

Haplotyp-spezifische funktionelle Unterschiede wären auch als Grundlage zukünftiger Hypothesen zur Erforschung der genetischen Grundlage quantitativer Endophänotypen in Assoziationsstudien interessant. Der Haplotyp-basierte Studienansatz sollte auch verhindern, dass willkürlich einzelne Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) isoliert betrachtet werden, und dass mittels multiplen Testens ohne Berücksichtigung des Haplotyp-Hintergrundes durchaus auch sinnlose Stratifizierungen getestet werden - wie bislang vermutlich häufig geschehen.

Bei dieser Arbeit wurde also bewusst das klassische genetische Verfahren - wie es üblicherweise in Form von Assoziationsstudien oder Kopplungsanalysen durchgeführt wird - verlassen zu Gunsten eines zellbiologischen Ansatzes. Hierbei sollten repräsentative Haplotypen eines interessant erscheinenden genomischen Abschnittes, welcher auf mRNA-Ebene in der Zelle repräsentiert ist, hinsichtlich funktioneller bzw. messbarer Unterschiede untersucht werden. Die mit dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die funktionelle Relevanz der untersuchten Polymorphismen sollen wiederum dazu dienen, den klassischen genetischen Ansatz auf der Grundlage neuer und verbesserter Hypothesen bei komplexen neuropsychiatrischen Phänotypen zu optimieren.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Molekularbiologische Methoden (DNA)

2.1.1 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde in nicht denaturierenden 1-2%-igen horizontalen Agarose-Gelen (7 x 9 cm) in TAE- oder TBE-Puffer durchgeführt (Sambrock et al., 1989). Die Proben wurden vor dem Beladen mit 5-fachem DNA-Ladepuffer versetzt und bei einer konstanten Spannung von 80-100 Volt aufgetrennt. Der Nachweis der DNA-Banden erfolgte mittels Ethidiumbromid (0,2 µg/ml), das nach Interkalierung in den DNA-Strang auf einem UV-Leuchttisch (UVT-28M, Herolab) bei 356 nm sichtbar gemacht wurde. Zur Größenbestimmung und Konzentrationsabschätzung wurden die DNA-Leitern Gene Ruler 100 bp, Gene Ruler 1kb und Mass Ruler (MBI Fermentas) eingesetzt.

TAE: 100 mM Tris/Acetat, pH 8,0; 5 mM EDTA; TBE: 90 mM Tris/HCl, pH 7,5; 45 mM Borat; 2 mM EDTA ; 5-facher DNA-Ladepuffer: 40 mM Tris/HCl, pH 8,0; 30% (v/v) Glycerin; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylenylanol;

2.1.2 Ethanolpräzipitation von DNA/RNA

Zur Ausfällung von Nukleinsäuren aus wässrigen Lösungen wurde eine Mischung aus 100%-igem Ethanol (2,5-faches Volumen) und Natriumacetat (3 M; 1/10 Volumen) verwendet. Das Präzipitat wurde für 20 Minuten bei 20.000g und RT zentrifugiert, die pelletierte DNA zweimal in 70%-igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in Wasser oder TE-Puffer gelöst.

2.1.3 Phenol/Chloroform-Extraktion

Falls DNA oder RNA für nachfolgende Reaktionen von assoziierten Proteinen bzw. Nukleasen befreit werden sollte, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion angewandt. Eine Mischung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (24:24:1) wurde in gleichem Volumen zur DNA/RNA-Lösung gegeben, stark geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation bei 20.000g für 5 Minuten getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und der Vorgang zunächst mit Phenol/Chloroform und anschließend mit reinem Chloroform wiederholt. Die Nukleinsäuren im Überstand wurden durch E-

thanol ausgefällt und mittels DNA/RNA-Gelelektrophorese auf ihre Integrität überprüft.

2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem Gel Extraction Kit (Quiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Eine Präzipitation mit Ethanol zur Konzentrierung und Aufreinigung wurde angeschlossen.

2.1.5 Restriktionsverdau von DNA

Zum Restriktionsverdau von DNA wurde diese mit einer ausreichenden Menge an einem spezifischen Restriktionsenzym (New England Biolabs / MBI Fermentas / Promega) in einem adäquaten Puffer für mindestens eine Stunde bei einer Enzym-spezifischen Temperatur (meist 37°C) inkubiert. Der Erfolg der Restriktion wurde mittels DNA-Gelelektrophorese überprüft.

2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 3-5 (einzubauende DNA) zu 1 (Vektor) zusammen mit 1 U T4-Ligase (New England Biolabs) in einem Enzym-spezifischen Puffer über Nacht bei 16°C inkubiert (Sambrock et al., 1989).

2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden die thermostabilen Polymerasen *Taq* (Quiagen) und Pfx / Pfu (Invitrogen) eingesetzt. Bei einer Standardreaktion in einem Volumen von 50 µl wurden 20-100 ng Matrizen-DNA, je 10 pmol der beiden Oligonukleotide und 1-2 U DNA-Polymerase eingesetzt. Die Magnesium-Konzentration variierte je nach Länge und Struktur der zu amplifizierenden DNA zwischen 1,5 und 4 mM. Durchgeführt wurde die Reaktion im GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) nach folgendem Protokoll:

Denaturierung bei 94°C für 30 s
Oligonukleotid-Anlagerung bei 50 – 60°C für 30 s
Elongation bei 72°C (*Taq*) bzw. bei 68°C (Pfx) mit je 1min pro 1kB

Die PCR-Produkte wurden bei weiterer Verwendung in Klonierungsvektoren durch Ethanolpräzipitation aufgereinigt und in einer Gelelektrophorese analysiert. Sollten die Produkte mittels überhängender Adenosin-Nukleotide in einen T-Vektor (pCR[®]2.1TOPO, Invitrogen) kloniert werden, wurde nach Amplifikation mit „*proof-reading*“-Polymerasen ein zusätzlicher Elongationsschritt bei 72°C für 10 Minuten nach Zugabe von *Taq*-Polymerase in dem gleichen Puffer durchgeführt.

2.1.8 Allel-spezifische Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Entsprechend der unter 2.1.7 beschriebenen Standard-PCR wurden auch Allel-spezifische Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt. Hierbei wurden jedoch jeweils 2 Ansätze pro zu untersuchende Probanden-DNA gewählt. In beide Ansätze wurde jeweils ein Primer-Paar hinzugegeben, das ein Kontroll-Fragment der ca. zweifachen Größe des Abschnitts amplifizierte, welcher mit den Allel-spezifischen Oligonukleotiden hergestellt werden sollte. Für beide Allele wurde pro Ansatz jeweils entweder der spezifische Vorwärts- oder Rückwärtsprimer verwendet, der mit den Kontrollprimern ein zusätzliches DNA-Fragment amplifizierte. Je nach Präsenz der Allele ergaben sich somit bis zu 3 unterschiedliche große DNA-Fragmente, die gelelektrophoretisch analysiert werden konnten.

2.1.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm mit dem Spektrophotometer BioPhotometer (Eppendorf) bestimmt.

2.1.10 Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen

Zur Transformation von *E. coli* Zellen (Top Ten[®], Invitrogen) wurden 1-10 µl eines Ligationsansatzes mit 100 µl kompetenter Bakteriensuspension versetzt. Nach 10 Minuten auf Eis erfolgte ein Hitzeschock von 30 Sekunden bei 42°C. Nachdem die Suspension umgehend auf Eis wieder heruntergekühlt wurde und 250 µl SOC-Medium hinzugefügt wurden, schüttelte die Kultur mit 500–800 Upm bei 37°C für eine Stunde. Die Bakterien wurden zur Selektion auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) (Roche) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.11 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen

Zur Isolierung kleinerer DNA-Mengen aus *E. coli* wurde eine Mini-Präparation von 1,5 ml Bakterienkultur mittels alkalischer Lyse nach der Methode von Maniatis durchgeführt. Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden entweder als Midi- oder Maxipräparation mit Hilfe der Qiagen Plasmid Midi / Maxi Kits (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers gewonnen und in einem geeigneten Volumen H₂O gelöst.

2.1.12 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen von DNA wurden nach der Didesoxy-Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Es wurden hierzu 500 ng Plasmid-DNA mit einem geeigneten Sequenzierprimer eingesetzt und mit dem ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben inkubiert. Die Analyse der Fluoreszenz-markierten Fragmente erfolgte durch den ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems).

2.2 Molekularbiologische Methoden (RNA)

2.2.1 RNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA dienten 1%-ige horizontale Agarosegele in TAE-Puffer. Zuvor wurde die RNA zur Denaturierung mit formamidhaltigem RNA-Ladepuffer (Ambion) versetzt und für 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Gellauf und Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte wie bei der DNA-Gelelektrophorese. Um einer Degradierung durch RNAsen vorzubeugen, wurden ausschließlich RNase-freie Chemikalien und Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes Wasser eingesetzt. Die Größe der RNA-Moleküle wurde durch die RNA-Leitern RNA-Ladder High Range und RNA-Ladder Low range (MBI Fermentas) bestimmt.

2.2.2 *in vitro*-Transkription

Für die Methode der *in vitro*-Transkription von RNA nach Sambrook (Sambrook et al., 1989) wurde zunächst das Plasmid am 3´-Ende der abzuschreibenden Sequenz mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert. Der Erfolg der vollständigen Restriktion wurde mittels Gelelektropho-

rese überprüft und die DNA anschließend in einer Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt. Zur Herstellung geringer Mengen an RNA wurde das MAXIscript® In vitro Transcription Kit (Ambion) nach Herstellerangaben verwendet. Die Produktion größerer RNA-Mengen (3-5 mg in 30 Minuten) erfolgte mit dem T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (Promega) nach Herstellerangaben. Wurde mRNA mit einem 7-Methylguanosin-cap benötigt, so wurde diese mit dem Message Machine™ Kit der Firma Ambion nach Herstellerangaben produziert.

Für *UV-Crosslink-* und *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) wurden radioaktiv markierte RNA Sonden benötigt. Hierzu erfolgte die *in vitro*-Transkription in Anwesenheit von ³²P-markiertem UTP (Amersham Biosciences) mit dem MAXIscript® T7 In vitro Transcription Kit (Ambion).

Die Reaktion wurde im 20µl Maßstab nach dem folgendem Schema angesetzt:

1 µl 10mM ATP	
1 µl 10mM CTP	
1 µl 10mM GTP	
0,25 – 1 µl 200µm UTP	
1 µg linearisierte Plasmid-DNA	
2,5 µl ³² P-UTP (62,5 pmol)	
2 µl 10x Transkriptions-Puffer	
2 µl T7 Enzym Mix	
<hr/>	
H ₂ O ad 20 µl	

Die Reaktion wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert, danach zum Abbau der Plasmid-DNA mit 1 U DNase I (Promega) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 1 µl 0,5M EDTA terminiert. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 50 µl aufgefüllt. Zur Überprüfung der *in vitro*-Transkription ist die Bestimmung des in die RNA inkorporierten ³²P-UTP Anteils notwendig. Hierzu wurden zunächst 1 µl des auf 50 µl verdünnten Reaktionsansatzes in ein Szintillations-Röhrchen mit 10 ml Szintillations-Cocktail (OptiPhase HiSafe™ Wallac Scin-tillation Products) aufgenommen. Der restliche Ansatz

wurde nach Herstellerangaben durch eine G25-Säule (Amersham Biosciences) von nicht inkorporierten Nukleotiden befreit. Von der gereinigten *in vitro*-Transkription wurde ebenfalls 1 µl entnommen, in ein Szintillations-Röhrchen mit 10 ml Szintillations-Cocktail gegeben, bevor die Radioaktivität als counts per minute (cpm) in einem Szintillationszähler (Beckmann) gemessen wurde. Die Einbaurrate ergab sich aus dem Quotienten der Messungen. Anhand des Anteils des eingebauten ³²P-UTP und der Sequenz (bzw. des Uracil-Gehaltes) konnte die Konzentration der radioaktiv markierten RNA berechnet werden. Zur visuellen Kontrolle des Erfolgs der *in vitro*-Transkription wurden 2 µl des gereinigten Ansatzes in einer RNA-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Gelrocknung über Nacht autoradiographisch analysiert.

2.2.3 Phosphorylierung der 5´-Enden von RNA

Um RNA-Oligonukleotide an ihrem 5´-Ende radioaktiv zu markieren, wurde eine Phosphorylierungsreaktion mit [γ -³²P] ATP durchgeführt. Hierzu wurde das 5´ End Labeling Kit Kinase MaxTM der Firma Pierce verwendet. Entsprechend den Herstellerangaben wurde folgende Reaktion im Maßstab von 20 µl angesetzt:

2 µl 10x Kinase Puffer	
1 pmol RNA-Oligonukleotide	
15 pmol [γ - ³² P] ATP (10mCi/ml)	
1 µl T4 Polynukleotid Kinase	
<hr/>	
H ₂ O ad 20 µl	

Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA (Finalkonzentration 1mM) gestoppt und das Enzym 2 Minuten bei 95°C hitzedenaturiert.

2.2.4 *UV-Crosslinking Assay*

Zum Nachweis von RNA-Protein-Interaktionen wurden *UV-Crosslinking*-Analysen angewandt. Hierbei wurden 5-10 fmol einer radioaktiven RNA-Sonde zusammen mit 5-10 µg eines Proteinlysates für 20 Minuten bei RT inkubiert; die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 20 µl in RNA-Bindungspuffer statt. Es folgte eine Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm, 1 Joule / cm²) um eine kovalente Verbindung zwischen der radioaktiven RNA und interagierenden Proteinen herzustellen. Es wurden besonders dünnwandige Reaktionsgefäße verwendet, um eine Absorption von Anteilen des UV-Lichtes zu verhindern (Invitrogen). Während eines anschließenden Verdauens mit 2 U RNase A für 15 Minuten bei 37°C war die kovalent gebundene RNA vor einem Abbau geschützt und blieb mit den Proteinen assoziiert. Anschließend wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt und das Gel 1-2 Stunden unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Nach einer Autoradiographie von 1-3 Tagen (Cronex 5 Medical X-Ray Film, Agfa) bei -80°C konnten RNA-Protein-Komplexe als distinkte Bande nachgewiesen werden.

RNA-Bindungspuffer: 1 mM DTT; 5% Glycerin (v/v); 5 µg/µl Heparin; 10 mM HEPES, pH7,6; KCL 20mM; MgCl 3mM;

2.2.5 *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)*

Als weiterer Nachweis für RNA-Protein-Interaktionen wurden EMSA-Analysen durchgeführt. Bei Auftrennung von RNA-Protein-Komplexen in einem nicht denaturierenden Polyacrylamid-Gel ist deren Laufgeschwindigkeit im Vergleich zu freier RNA verzögert, wodurch sie als zusätzliche Bande autoradiographisch visualisiert werden können. Es wurden 0,5 fmol radioaktiv markierte RNA zusammen mit 10-40 µg eines Proteinlysates in 20 µl RNA-Bindungspuffer für 20 Minuten bei RT inkubiert. Je nach Größe der Sonde wurde der RNA-Protein-Komplex noch zusätzlich für 15 Minuten mit RNase H verdaut. Die Reaktionen wurden mit 5-fachem EMSA-Ladepuffer versetzt und direkt in einem nativen Polyacrylamid-Gel mit folgender Zusammensetzung aufgetrennt:

1 ml 10x TBE
0,625 ml 80% Glycerin
4ml Rotiphorese-Gel 30 (Roche)
20 µl TEMED
0,3 ml 10% APS
14,375 ml DEPC- H ₂ O

Die Elektrophorese erfolgte in 0,5-fachem TBE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 250-300 Volt für 2-3 Stunden bei 4°C. Das Gel wurde anschließend unter Vakuum für 2-3 Stunden bei 80 °C getrocknet und mittels Autoradiographie bei -80°C über Nacht visualisiert.

TBE-Puffer: 90 mM Tris/HCl, pH 7,5; 45 mM Borat; 2 mM EDTA

EMSA Ladepuffer: 80% (v/v) Glycerin; 0,5% (w/v) Bromphenolblau; 0,5% (w/v) Xylenyanol

2.2.6 *In vitro*-Translation

Zur *in vitro*-Translation von RNA wurde Nuklease behandeltes Retikulozytenlysat aus dem Kaninchen (Promega) verwendet. Als Substrat diente 1 µg *capped* RNA, welche mittels Message-Machine™ Kit der Firma Ambion nach Herstellerangaben synthetisiert wurde und entsprechend in die Reaktion eingesetzt sowie für 90 Minuten bei 30°C inkubiert wurde. Die Aktivität von *in vitro* translatierter Photinus-Luziferase wurde mit dem Luciferase Assay System (Promega) bestimmt.

2.2.7 Luziferase-Reporteragen-Analysen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Luziferasen vom Glühwürmchen (*Photinus*) und Seestiefmütterchen (*Renilla*) als Reporterogene eingesetzt. Sofern in einem Zelllysat oder einer *in vitro*-Translation nur die Photinus-Luziferase quantifiziert werden sollte, wurde das Luciferase Assay System (Promega) verwendet. Falls die Aktivität der Luziferasen beider Spezies in demselben Zelllysat nacheinander bestimmt werden sollte, wurde das Dual Luciferase Assay System (Promega) eingesetzt. In beiden Fällen wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Messung der Lichtintensität wurde in einem Luminometer durchgeführt (Microlumat LB 96 P, Berthold EG&G).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Proteinen wurde mit dem Bicinchoninsäure-Verfahren nach Smith bestimmt (Smith et al., 1985), wobei das BCATM Protein Assay Reagent der Firma Biorad nach Herstellerangaben eingesetzt wurde. Die Messung der Extinktion fand in dem Spektrophotometer BioPhotometer (Eppendorf) bei 595 nm statt. Als Referenz wurde die Extinktion einer Verdünnungsreihe des bovinen Serumalbumins (BSA) von 0,1 bis 20 mg/ml bestimmt.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen erfolgte nach der von Laemmli entwickelten Methode (Laemmli et al., 1970). Zur Herstellung der 8 bis 12%-igen Gele und anschließenden Elektrophorese in 1x SDS-Laufpuffer wurde das Mini-PROTEAN III System (BioRad) verwendet. Die Proben wurden mit 4-fachem Lade-Puffer (BioRad) versetzt und vor dem Auftragen auf das Gel für 3 Minuten auf 95°C erhitzt. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120–180 Volt für die Dauer von 1 bis 3 Stunden. Zur Größenbestimmung wurde der Full Range Rainbow Marker (Amersham Biosciences) eingesetzt.

1x SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8,8, 192 mM Glycerin, 0,1% (w/v) SDS

2.3.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Zum direkten Nachweis von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen diente eine Coomassie-Blaufärbung. Das Gel wurde für ca. 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung bei RT leicht geschüttelt und anschließend solange mit Entfärbelösung behandelt, bis Proteinbanden vor dem Hintergrund erkennbar waren. Alternativ wurde eine kolloidale Coomassie-Lösung der Firma Roth nach Herstellerangaben verwendet, wobei die Färbung meist über Nacht stattfand. Zur Konservierung wurden die Gele fixiert und in Plastikfolie eingeschweißt.

Coomassie-Färbelösung: 40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure; 0,1% (w/v) Coomassie G 250
Entfärbelösung: 50% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure

2.3.4 Herstellung eines Proteinrohlysates aus Hirngewebe

Die Herstellung der Proteinrohlysate erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Dignam (Dignam et al., 1983). Zur Isolierung von Proteinen aus Hirngewebe wurde dieses zunächst auf Eis mit einem Skalpell in kleinere Stücke zerschnitten. Anschließend wurden die Gewebestücke mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und zu Pulver gemörsert. Nach Übertragung in einen Glashomogenisator (Wheaton) wurde das pulverisierte Gewebe in Proteinextraktions-Puffer vorsichtig gelöst und unter Vermeidung von Schaumbildung mit dem enganliegenden Glasstößel homogenisiert (20 Passagen). Die unlöslichen Bestandteile wurden für 10 Minuten bei 14.000g und 4°C sedimentiert. Der Überstand (krudes Lysat) wurde abgenommen, aliquotiert, auf flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Alle Schritte der Proteinpräparation erfolgten bei maximal 4°C und unter Protektion durch unmittelbare Zugabe von Proteaseinhibitoren, um den Abbau der erschlossenen Proteine zu verhindern.

Proteinextraktions-Puffer: 20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 10 mM NaCl; 10 mM KCL; 3 mM MgCl₂; 0,5% Igepal/Nonidet P-40; 1mg/ml Proteaseinhibitoren (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets Mini EDTA-free, Roche)

2.3.5 Herstellung eines Proteinrohlysates aus Zellkulturlinien

Der dichtgewachsene Rasen von 10 cm Zellkulturschalen wurde dreimal mit 3 ml eiskaltem PBS vorsichtig gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml PBS mit einem Zellschaber geerntet und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden durch fünfzehnminütige Zentrifugation bei 14.000g und 4°C pelletiert und vorsichtig in Extraktions-Puffer H resuspendiert. Nach Inkubation für eine halbe Stunde bei 4°C wurden die Lysate durch mehrfache Passage durch eine Kanüle der Grösse G20 homogenisiert. Alternativ wurde ein Ultraschallgerät verwendet, mit dem bei einer Frequenz von 0,5 Hz und Amplitude von 50% die Zellen jeweils eine halbe Minute aufgeschlossen wurden. Nach Abzentrifugation der Zellkerne und unlöslichen Zelltrümmer bei 14.000g und 4°C für 15 Minuten wurde der Überstand aliquotiert, schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Extraktions-Puffer H: 10 mM Hepes pH 7,6; 3 mM MgCl₂; 40 mM KCL; 5% Glycerin; 0,2% Igepal; 1 mM DTT; 1 mg/ml Proteaseinhibitoren (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets Mini EDTA-free, Roche)

2.3.6 Fraktionierung des Proteinrohlysates in zytoplasmatische und nukleäre Anteile

Um ein Proteinrohlysat, das aus Zelllinien gewonnen wurde, in einen zytoplasmatischen und nukleären Anteil zu separieren wurde das Kit NEPER™ nach Angaben des Herstellers Pierce verwendet. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C und unter Verwendung des Proteaseinhibitors Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets Mini EDTA-free (Roche) in geeigneter Konzentration.

2.4 Zellbiologische Arbeitstechniken

2.4.1 Kultivierung von Cos-7, HeLa, Kelly, SH-SY5Y Zellen

Die Affinenzellen Cos-7, humane Zervixkarzinomzellen HeLa und die beiden humanen Neuroblastomzelllinien Kelly und SH-SY5Y wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco Life Technologies) kultiviert, das mit 10% fetalem Kälberserum sowie Penicillin und Streptomycin supplementiert wurde. Die Zellen wurden in beschichteten Zellkulturschalen (Nunc, Sarstedt) bei feuchter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C inkubiert. Zum Umsetzen und Aufteilen der Kulturen wurden diese mit Versene-Puffer gewaschen und durch kurze Inkubation mit 0,25% Trypsin (Gibco Life Technologies) von der Oberfläche abgelöst. Zur weiteren Kultivierung wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:5 – 1:10 mit frischem Medium verdünnt und auf neue Zellkulturschalen verteilt.

Versene-Puffer: 8,8 mM Na₂HPO₄; 0,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1 mM EDTA

2.4.2 Kultivierung und Transfektion von HEK293 Zellen

Humane embryonale Nierenzellen HEK293 (ATCC) wurden entsprechend den unter 2.4.1 beschriebenen Bedingungen kultiviert.

Die Transfektion der Zellen erfolgte mittels Calcium-Phosphat-Methode oder durch Transfektion unter Verwendung von FuGENE®-HD Transfection Reagent (Roche). Bei der Calcium-Phosphat-Methode wurde für eine Zellkulturschale von 10 cm Durchmesser 10 µg Plasmid-DNA verwendet. Diese wurde zu 500 µl einer Calciumchloridlösung (250 mM) gegeben und anschließend, bei gleichzeitiger Einleitung von Luftblasen, mit 500 µl

2-fachem HBSP-Puffer vermischt. Während der folgenden 20 Minuten bildeten sich bei RT DNA-enthaltende Präzipitate, die tropfenweise auf die zu 60 bis 90% konfluent bewachsenen Kulturschalen verteilt wurden. Nach 6 bis 8 Stunden, die den Zellen für die effiziente Aufnahme des Präzipitates durch Phagozytose blieben, wurde die Kultur mit PBS-Puffer gewaschen und das Medium erneuert. Die Expression der transfizierten Konstrukte erfolgte versuchsabhängig für 24-36 Stunden mit anschließender Lyse.

Bei Transfektion von Zellkulturschalen von 3 cm Durchmesser mittels FuGENE[®]-HD Transfection Reagent (Roche) wurden zunächst 1-4 µg DNA und anschließend die 2 bis 3-fache Menge (µl/µg) an FuGENE[®]-HD Transfection Reagent in 100 µl serumfreien DMEM gelöst und beide Ansätze vorsichtig gemischt. Nach 10-15 Minuten Inkubation bei RT wurden die 200 µl Transfektionsansatz vorsichtig tröpfchenweise über die Zellkulturplatten verteilt. Die Ernte der Zellen mit anschließender Lyse erfolgte abhängig vom Grad der Konfluenz nach 24 bis 36 Stunden.

PBS-Puffer: 8,8 mM Na₂HPO₄; 0,7 mM KH₂PO₄, pH 7,4; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl

HBSP-Puffer 2-fach: 50 mM Hepes, pH 7,0; 280 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,5 mM Na₂PO₄, 12 mM Glucose

2.5 Statistische Analysen

Alle Daten sind als Mittelwerte von mindestens n = 3 Experimenten mit Standardfehler und Standardabweichung angegeben. Zur statistischen Analyse wurden alle Ergebnisse mittels Varianzanalyse (ANOVA) und Bonferroni-Korrektur für multiples Testen überprüft, wobei ein Wahrscheinlichkeitswert von $p < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet wurde.

Zur Auswertung der Daten wurde das Programm SPSS for Windows, release 5.0.2 verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der *DRD2* 3'UTR

3.1.1 Charakterisierung repräsentativer Haplotypen

Die 3'untranslatierte Region der *DRD2* mRNA (NCBI Accesion number M29066) umfasst 1098 Basenpaare und ist auf der genomischen Sequenz des *DRD2* Gens (NCBI Gene Accesion number AF050737) von Nukleotid 22265 bis zum Polyadenylierungssignal (AATAAA) bei Position 23357-23362 repräsentiert.

In diesem Sequenzbereich befinden sich insgesamt elf bekannte SNPs (NCBI Single Nucleotide Polymorphism / refSNP). Diese beinhalten die drei SNPs E8 A/G [pos. G 22316 in AF050737; (Finckh et al., 1996)], SSCP [G/C, pos. C 22640 in AF050737; (Bolos et al., 1990)] und *Bso*FI A/B [G/T, B=G, pos. G 22989 in AF050737; (Poduslo et al., 1995)] - jeweils mit publizierten Allelfrequenzen von $\geq 10\%$ für das seltenere Allel.

Für die übrigen acht SNPs (siehe RefSNP, Appendix 7.5.2) waren sehr geringe Frequenzen für das seltenere Allel zu vermuten.

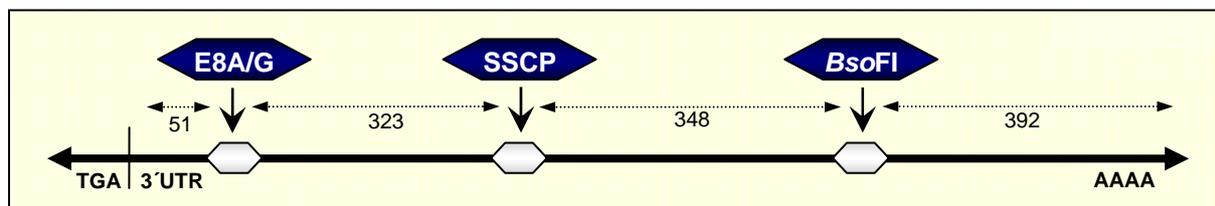


Abb. 3.1.1 Schematische Darstellung der Position der häufigen SNPs E8 A/G, SSCP und *Bso*FI der *DRD2* 3'UTR.

Der beschriebene Einfluss des Genotyps der 3'UTR von *DRD2* auf phänotypische Merkmale (Finckh et al., 1997; Koehnke et al., 1999; Samocho-wiec et al., 2000; Lucht et al., 2001) machte eine genauere genomische Charakterisierung der *DRD2* 3'UTR notwendig. Zunächst sollte in einem ausreichend großen Probandenkollektiv die Häufigkeit der SNP-Allelfrequenzen in der *DRD2* 3'UTR bestimmt werden, um anschließend repräsentative Haplotypen auszuwählen, die in funktionellen Untersuchungen weiter analysiert werden sollten. Es wurden initial 100 Proben genomischer DNA gesunder Probanden mittels PCR mit den Oligonukleotid-

Primern D2I7E8F und D2I7E8R amplifiziert und mittels *MspI*-Restriktionsverdau hinsichtlich des SNP E8 A/G genotypisiert. Die resultierenden Fragmente besaßen für das Allel E8 A eine Größe von 348, 45, 12 bp und für Allel E8 G 284, 64, 45, 12 bp. Hieraus konnten 22 homozygote (A/A, n = 11; G/G, n = 11) Proben ausgewählt werden, welche als Matrize zur Amplifikation der gesamten 3'UTR mittels PCR und den Primern M1F und M4R dienten und anschließend vollständig mittels DNA-Sequenzierung analysiert wurden.

Folgende drei repräsentative humane Haplotypen konnten charakterisiert werden (Abb.3.1.2):

Häufige Polymorphismen	E8A/G	SSCP	BsoFI
	Pos. 22316	Pos. 22640	Pos. 22989
Allelfrequenzen	A = 67 % G = 33 %	G = 67 % C = 33 %	G = 86 % T = 14 %
Repräsentative Haplotypen:			

Abb. 3.1.2 Häufige SNPs der 3'UTR von *DRD2* und daraus resultierende Haplotypen. Die Schätzung der angegebenen Haplotypfrequenzen wurde durch Genotypisierung mittels DNA Sequenzierung bzw. Restriktionsverdau der drei SNPs E8 A/G, SSCP und *BsoFI* in 200 Probanden ermittelt. Die Position der SNPs bezieht sich auf die Lage im Gen (NCBI Gene Accession number AF050737).

Es konnte gezeigt werden, dass sich der Polymorphismus SSCP in starkem Kopplungsungleichgewicht mit E8 A/G befindet und das relativ seltenere Allel T des SNPs *BsoFI* ausschließlich in *cis* mit E8A vorliegt.

Außer den drei erwähnten SNPs mit relativ hohen Allelfrequenzen und einer bislang nicht beschriebenen Einzelnukleotid-Sequenzvariante (s. 3.1.3) war bei den Sequenzanalysen keine weitere Abweichung von der Referenzsequenz nachweisbar.

Zur genaueren Abschätzung der Allelfrequenzen der drei häufigen Polymorphismen wurde zusätzlich zu den für E8A oder E8G homozygoten Proben ein Kollektiv von 23 E8 A/G heterozygoten Probanden durch DNA Sequenzierung und weiterhin insgesamt 200 DNA-Proben gesunder Individuen mittels Restriktionsverdau genotypisiert (Abb. 3.1.2).

3.1.2 Vergleich der *DRD2* 3'UTR verschiedener Spezies

Zur Ermittlung der Evolution der modernen humanen *DRD2*-Haplotypen wurden die hier ermittelten drei häufigen humanen Haplotypen mit den bislang bekannten Sequenzen anderer Spezies verglichen. (Abb. 3.1.3 A). Der Vergleich mit den Sequenzen anderer Spezies zeigt eine starke Konservierung der *DRD2* 3'UTR und die Übereinstimmung der humanen 3'UTR-Sequenzen mit denen der jeweils zum Vergleich verfügbaren Sequenzen der in Abb. 3.1.3 A beschriebenen Primaten liegt zwischen 92,6% und 98,5%. Der Vergleich mit der Sequenz der Maus ergibt eine Übereinstimmung von 62%.

Hinsichtlich der drei häufigen Polymorphismen der humanen *DRD2* 3'UTR ergibt sich eine vollständige Übereinstimmung von *pan troglodytes* (höhlenbewohnender Schimpanse) und *macaca mulatta* (Rhesusaffe) mit dem Haplotypen Human 2.

Auch der Vergleich mit verfügbaren Sequenzbereichen anderer Primaten (Pygmäen-Schimpanse / Weißwangen-Gibbon / Orang Utan / Gorilla Gorilla) weist darauf hin, dass Human 2 sehr wahrscheinlich den evolutionär ältesten der drei charakterisierten humanen Haplotypen repräsentiert (Abb. 3.1.3 B).

den. Der gleiche Ansatz enthielt die flankierenden Primer E8TXLF und E8TXLR, welche ein 506 bp großes DNA-Kontroll-Fragment amplifizierten. Je nach Präsenz der allelischen Varianten wurden zusätzlich zum 506 bp-Produkt 395 bp und 143 bp große Fragmente generiert (Abb. 3.1.4 B).

Aus einem unabhängigen Kollektiv von 120 Probanden wurde eine weitere heterozygote Probe identifiziert, so dass für diesen hier erstmalig beschriebenen und vermutlich als selten zu definierenden Polymorphismus eine Allelfrequenz von $\sim 0,59\%$ für das seltenere Allel zu schätzen ist. Bei diversen Primaten (Schimpanse, Gorilla, Orang Utan) findet sich ausschließlich ein C an der korrespondierenden Stelle.

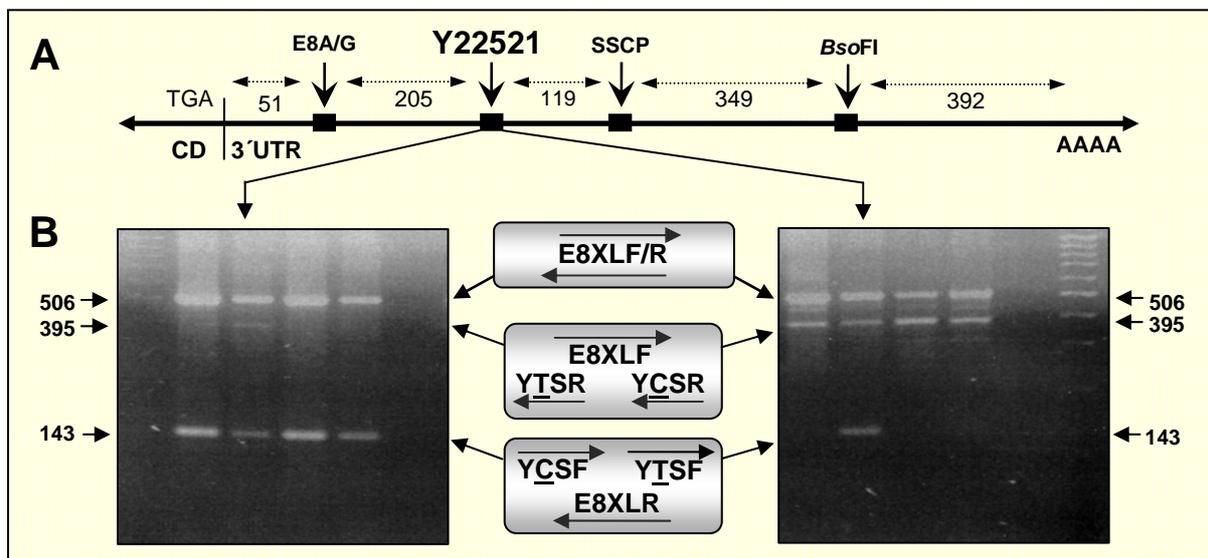


Abb.3.1.4 A) Schematische Darstellung der Position des seltenen Polymorphismus Y 22521 (NCBI Genbank# AF050737) in Bezug auf die 3 untersuchten SNPs der *DRD2* 3' UTR. B) Bi-direktionale allelspezifische PCR. Für den Polymorphismus besteht Heterozygotie in der auf der jeweils 2. Spur der beiden dargestellten Gele aufgetragenen Probe, was sich in dem Vorhandensein von 2 Allel-spezifischen Fragmenten (395 bp und 143 bp) verminderteter Bandenintensität im Vergleich zu den restlichen Proben darstellt, welche jeweils homozygot für das häufige C-Allel sind. Die 506 bp-Bande zeigt, dass in allen Proben gleichermaßen das den Polymorphismus umspannende DNA-Fragment amplifiziert wurde.

3.1.4 Kopplungsungleichgewicht zwischen Haplotypen der *DRD2* 3'UTR und *DRD2* Exon 7 Polymorphismen

Während der Entstehung dieser Arbeit wurde von Duan et al. in Exon 7 von *DRD2* ein Polymorphismus (E 7 957C/T) beschrieben, der einen Einfluss auf die Stabilität der reifen mRNA des *DRD2* ausüben soll (Duan et al., 2003).

Um einen eventuellen Einfluss der 3'UTR auf diese Beobachtungen abschätzen zu können, wurden die unter 3.1.1 beschriebenen DNA-Proben bezüglich ihres Genotyps in allen bekannten Polymorphismen des Exon 7 (siehe RefSNP, NCBI Database Single Nucleotide Polymorphism) mit der Methode der DNA-Sequenzierung analysiert.

Es zeigte sich, dass ein starkes Kopplungsungleichgewicht zwischen den Polymorphismen E8 A/G, SSCP und *BsoFI* der 3'UTR und E7 957C/T in Exon 7 besteht. So liegt die Variante E 8G ausschließlich in *cis* mit E7 957C vor. Ebenso wiesen alle Proben, welche homozygot für E7 957T waren, Homozygotie für das E8 A-Allel auf.

Für den selteneren Polymorphismus 1101G/A in Exon 7 zeigte sich bei allen Proben eine Homozygotie für 1101G (Abb. 3.1.5).

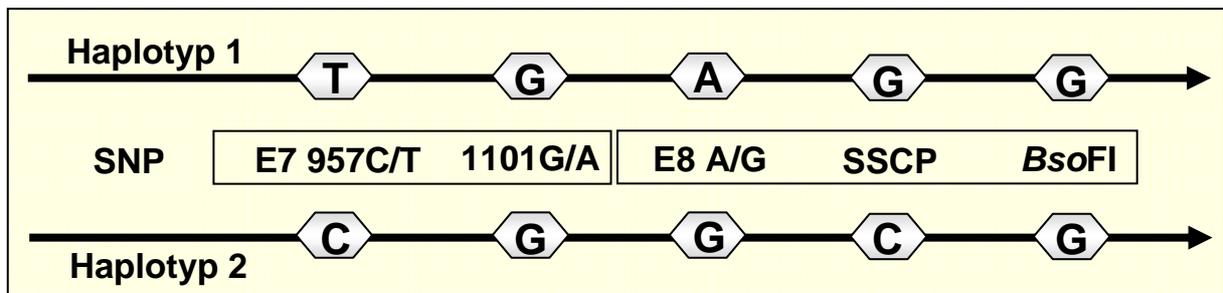


Abb. 3.1.5 Humane Haplotypen, die sich aus der Kombination der häufigen Einzenukleotid - Polymorphismen in Exon 7 (E7 957C/T / 1101G/A) und Exon 8 (E8 A/G / SSCP / *BsoFI*) ergeben; Orientierung: 5' → 3'.

Der Vergleich mit allen in NCBI verfügbaren Sequenzen des höhlenbewohnenden Schimpansen (*pan troglodytes*) [NCBI Nucleotide: Genbank# RefSeq NM001033928, AY665279, AB080609] wies für den Polymorphismus E7 957C/T das C-Allel und für 1101G/A das G-Allel auf, so dass der aus den Exon 7 und Exon 8 Polymorphismen resultierende, kombinierte Haplotyp 2 entsprechend Human 2 in Abb. 3.1.3 B als der entwicklungs geschichtlich ältere vermutet werden darf.

3.1.5 Sekundärstrukturanalysen der *DRD2* 3'UTR mRNA

Die Bindung *trans*-agierender Faktoren an die mRNA ist hochgradig abhängig von der Sekundärstruktur, die durch die Faltung der mRNA entsteht. So können bei geeigneter Faltung *cis*-agierende RNA-Elemente ausgebildet werden, die von RNA-bindenden Proteinen Primär- sowie Sekundärstruktur-spezifisch gebunden werden. Wegen des Einzelstrang-Charakters der mRNA kann die Faltung / Sekundärstruktur bereits bei geringfügiger Sequenzvariabilität eine sehr unterschiedliche Gestalt annehmen.

Um einen möglichen Einfluss der beschriebenen SNPs auf die Sekundärstruktur der *DRD2* mRNA abzuschätzen, wurden die drei repräsentativen Haplotypen Human 1-3 mit dem Programm mfold, version 2.3 (Mathews et al., 1999; Zuker, 2003) vergleichend analysiert. Durch das Programm kann die putative Sekundärstruktur einer RNA-Sequenz auf der Basis der durch die intramolekulare Doppelstrangbildung frei werdenden Energie (ΔG = Gibb'sche freie Energie) vorhergesagt werden.

Für die vollständige *DRD2* 3'UTR mRNA (1098 nt) sowie das in den *UV-Crosslink*-Analysen verwendete, *in-vitro* transkribierte RNA-Fragment von M1F / M4R (1174 nt) wurde bei maximalem ΔG und Faltung bei 37°C für den humanen Haplotyp 2 (-386,1 kcal/mol) eine von Haplotyp 1 (-387,6 kcal/mol) und Haplotyp 3 (-387,3 kcal/mol) deutlich unterschiedliche Sekundärstruktur ermittelt (Abb. 3.1.6).

Auch bei identischer, nicht maximaler frei werdender Gibb'scher Energie wird für den humanen Haplotyp 2 eine von den Haplotypen 1 und 3 unterschiedliche Sekundärstruktur errechnet. Da sich die humanen Haplotypen 1 und 3 lediglich in dem Polymorphismus *BsoFI* unterscheiden, könnte dieses Ergebnis eventuell für eine besondere funktionelle Relevanz der Polymorphismen E8 A/G und SSCP sprechen, auch hinsichtlich möglicher allelischer Unterschiede im Proteinbindungsverhalten.

Die mit dem Programm ermittelten SNP-assoziierten Unterschiede in der Sekundärstruktur kamen auch bei Betrachtung kürzerer Teilbereiche (780 nt) der 3'UTR zur Darstellung, welche die beschriebenen SNPs enthielten. Diese kürzeren Fragmente wurden in den nachfolgenden *UV-Crosslinking*-

Experimenten verwendet, bei denen Haplotyp-spezifische Sonden hinsichtlich ihres Proteinbindungsverhaltens verglichen werden sollten.

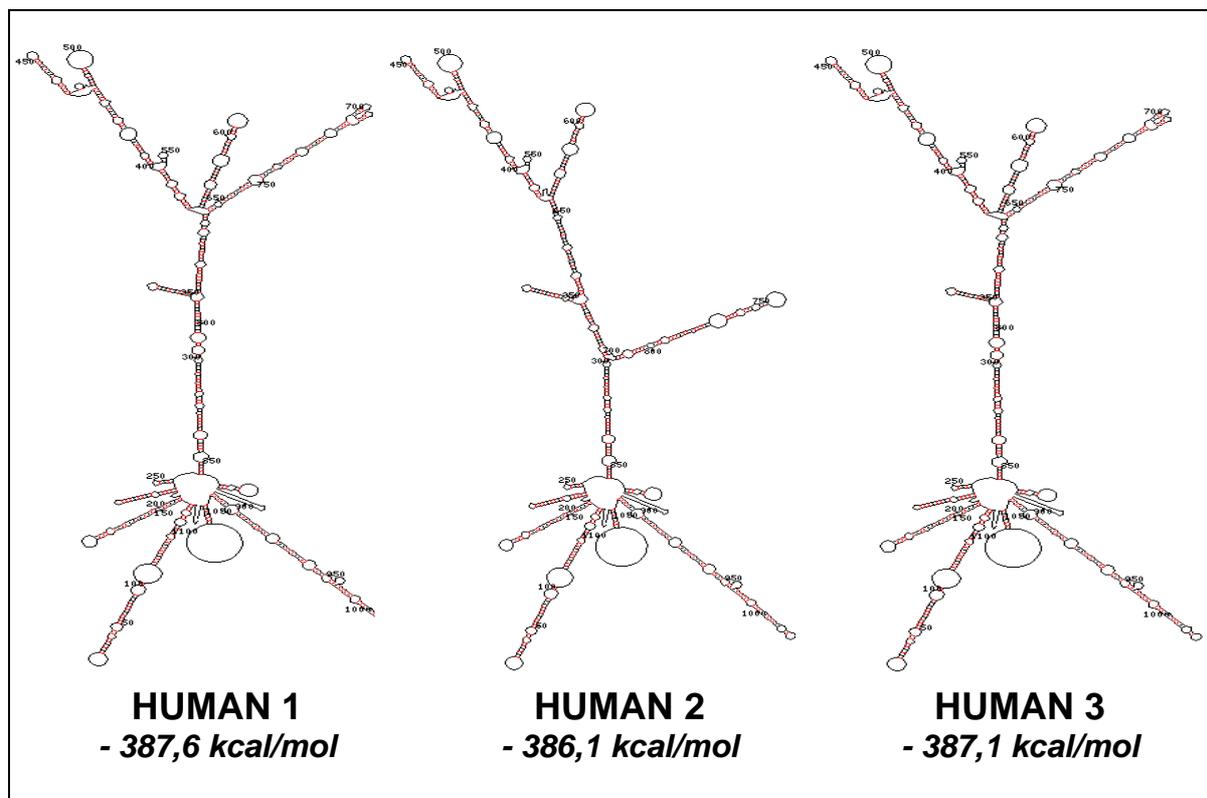


Abb.3.1.6 Mögliche Sekundärstrukturen der *DRD2* 3'UTR mRNA bei maximaler freier werdender Gibbs'scher Energie (ΔG in kcal/mol) und Faltung bei 37°C, berechnet nach dem Programm mfold, v 2.3 (Mathews et al., 1999; Zuker et al., 2003). Die beiden Haplotypen Human 1 und Human 2 der *DRD2* 3'UTR in voller Länge (1098 nt) zeigen deutliche Unterschiede in ihrer Sekundärstruktur. Für den Haplotyp Human 3 wurde bei maximalem ΔG die gleiche Sekundärstruktur wie für Human 1 ermittelt.

3.1.6 Funktionelle Elemente in der *DRD2* 3'UTR

Unter Verwendung des Programms RegRNA (Department of Biological Science and Technology, Institute of Bioinformatics, National Chiao Tung University, Taiwan) konnten in der humanen *DRD2* 3'UTR Konsensusstrukturen in Form des GAIT-Elements (*Gamma interferon activated inhibitor of Ceruloplasmin mRNA translation*) identifiziert werden - einem cis-agierenden funktionellen Element von 25 - 28 Nukleotiden Länge, welches erstmalig von Sampath et al. beschrieben wurde.

Die Autoren konnten einen inhibitorischen Effekt der Elemente auf die Translation der Coeruloplasmin mRNA nachweisen und deuteten an, dass

die Beeinflussung der Translation mittels GAIT-Element einen generellen, posttranskriptionellen Regulationsmechanismus der Translationseffizienz darstellt, welcher nicht nur auf die Coeruloplasmin mRNA beschränkt ist (Sampath et al., 2003) .

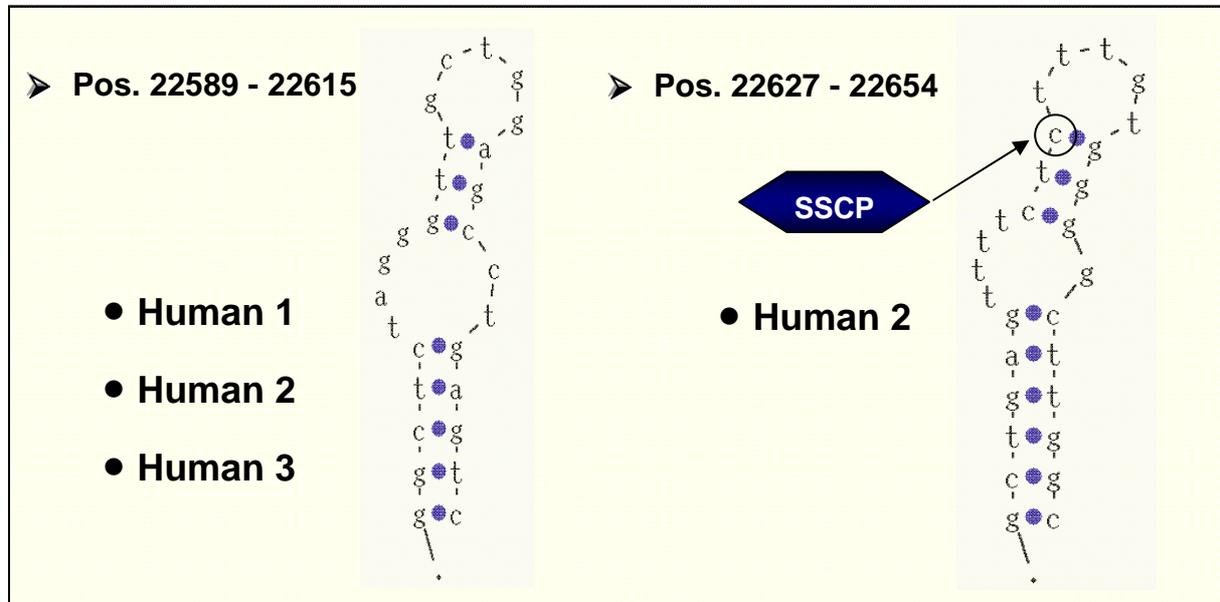


Abb. 3.1.7 Sekundärstruktur der GAIT-Elemente in der *DRD2* 3' UTR: Human 2 trägt ein zusätzliches Element an der Position 22627 – 22654 im Vergleich zu Human 1 und 3 (Pos.: NCBI Gene RefSeq AF050737).

Die drei repräsentativen humanen Haplotypen unterscheiden sich in der Anzahl dieser funktionellen Elemente: So enthalten alle drei Varianten jeweils ein GAIT-Element an der Position von Nucleotid 22589 bis 22615 (NCBI Gene RefSeq AF050737). In der mRNA des humanen Haplotypen 2 konnte jedoch im Gegensatz zu Human 1 und 3 ein weiteres dieser Elemente identifiziert werden, das sich von den Nucleotiden 22627 bis 22654 erstreckt (Abb. 3.1.7). Interessanterweise liegt bei der C-Variante des Polymorphismus SSCP der SNP im Zentrum dieses zusätzlichen Elements, so dass dieses zweite Element bei den Varianten Human 1 und Human 3 durch den im Rahmen der Haplotyp-Evolution eher früh vorkommenden C > G Einzelnucleotidaustausch an dieser Stelle verloren ging.

3.2 Identifizierung spezifischer Proteinbindungssequenzen der 3´untranslatierten Region des Dopamin D2 Rezeptor Gens

3.2.1 Bindung *trans*-agierender Faktoren an die *DRD2* 3´UTR

Zum Nachweis einer direkten Interaktion *trans*-agierender Faktoren mit der *DRD2* 3´UTR mRNA wurden *UV-Crosslink*-Analysen durchgeführt.

Dafür wurden unterschiedlich große, mit ³²P-UTP markierte RNA-Sonden der humanen *DRD2* 3´UTR mittels *in vitro*-Transkription generiert. Diese wurden mit Proteinrohlysaten verschiedener humaner neuronaler Zelllinien, wie den Neuroblastomlinien KELLY und SH-SY5Y sowie nicht neuronaler Zelllinien (HeLa / Zervixkarzinom) inkubiert. Ebenso wurde die Interaktion mit Rohlysaten der Affennieren-Zelllinie COS-7, sowie Rohlysaten aus humanem Striatum und Maushirn untersucht.

Mittels UV-Bestrahlung wurden die entstandenen RNA-Protein-Komplexe durch kovalente Bindung vernetzt, so dass bei dem anschließenden Verdau mit RNase A der proteingebundene Teil der RNA vor dem Abbau geschützt war. Die Proteinlysate aus Zellkulturen wurden mit dem kommerziell erwerbbaaren Kit NE-PER[®] (Pierce Biotechnology) entsprechend der Herstellerangaben in eine zytosolische und eine nukleäre Fraktion unterteilt und unmittelbar in den *UV-Crosslinking Assays* verwendet. Zur Herstellung von Rohlysaten aus Zellkulturen oder Gewebe wie Maushirn und humanem Striatum wurde eine modifizierte Methode nach Dignam (Dignam et al., 1983) verwendet.

Zunächst wurden RNA-Sonden von 1174 Nukleotiden Länge untersucht, welche mittels *in-vitro*-Transkription von DNA-Matrizen synthetisiert wurden, die mit den Oligonukleotiden M1F / M4R erzeugt wurden. Die verwendeten Sonden repräsentierten den häufigsten Haplotypen Human 1 der *DRD2* 3´UTR (Abb. 3.2.1 A).

In den zytosolischen Proteinlysaten, die aus den Zelllinien gewonnen wurde, jedoch nicht im Lysat aus dem humanen Striatum, zeigte sich eine starke Bande bei ~ 105 kDa und eine schwächere bei ~ 68 kDa. Im Gegensatz zu den Rohlysaten aus Gewebe, die nur eine zusätzliche Bande bei ~ 45 kDa aufwiesen, konnte bei den aus Zellkulturen gewonnenen zy-

tosolischen Präparationen zwei zusätzliche Banden bei ~ 55 kd und ~ 38 kd identifiziert werden.

Die Untersuchung der nukleären Fraktionen zeigte ausschließlich bei der Zelllinie SH-SY5Y ein schwaches, der zytosolischen Fraktion ähnliches Bandenmuster. Für die Präparationen nukleärer Lysate aus anderen Zelllinien konnte in der Autoradiographie kein radioaktives Signal nachgewiesen werden (Abb. 3.2.1 B).

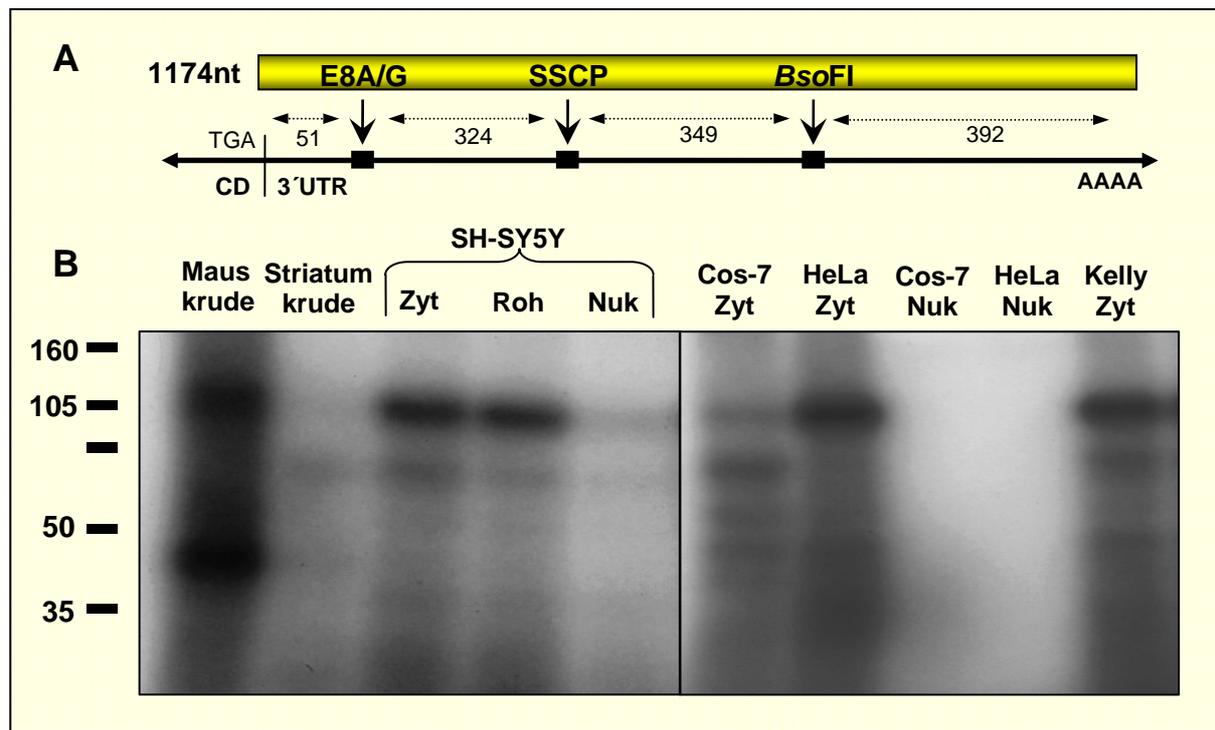


Abb. 3.2.1 *UV-Crosslinking*-Experimente mit Proteinlysaten unterschiedlicher Gewebe und Zelltypen. Inkubation von 5 fmol RNA (Sonde von 1174 nt Länge) 3.2.1 A mit 10µg Proteinlysat, anschließende Bestrahlung mit UV-Licht (1Joule/cm) und RNase A-Verdau sowie SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Autoradiographie 3.2.1 B; CD = Coding region, TGA = Stop-Codon, Roh = Rohlysat, Zyt = Zytosolisches-, Nuk = nukleäres Lysat.

Während der Entstehung dieser Arbeit wurde von einer anderen Forschergruppe bekannt (mündliche Mitteilung), dass SH-SY5Y Zellen den humanen D2 Rezeptor endogen exprimieren.

Daher wurden für die folgenden Experimente mit kleineren Teilbereichen der *DRD2* 3'UTR vor allem zytosolische bzw. Rohlysate der humanen Zelllinie SH-SY5Y verwendet.

3.3 Einfluss von Einzelnukleotidaustausch-Polymorphismen (SNPs) der *DRD2* 3'UTR auf die Proteinbindung

Nachdem die Ergebnisse der *UV-Crosslinking*-Experimente für eine spezifische Interaktion von Proteinen aus Rohlysaten verschiedener Zelllinien mit der *DRD2* 3'UTR sprachen, sollte geprüft werden, ob die unter 3.1 beschriebenen SNPs im Bereich der 3'UTR einen Einfluss auf diese Proteinbindung haben könnten.

3.3.1 Haplotyp-spezifisches Proteinbindungsverhalten

3.3.1.1 Analyse der Proteinbindung mittels *UV-Crosslinking Assays*

Zunächst wurden mittels *in vitro*-Transkription erzeugte Sonden entsprechend der Sequenz der vollständigen 3'UTR der drei humanen Haplotypen in *UV-Crosslinking*-Experimenten untersucht. Die mit ^{32}P -UTP radioaktiv markierten RNA-Sonden wurden mit Proteinrohlysaten inkubiert, mit UV-Licht bestrahlt und anschließend mit RNase A verdaut. Nach SDS-Gelelektrophorese und Trocknung wurden die Gele autoradiographisch analysiert.

Die initialen Versuche mit den Sonden der vollen Länge der *DRD2* 3'UTR, deuteten auf Unterschiede zwischen den untersuchten Haplotypen in Bezug auf ihre Interaktion mit Proteinlysaten hin.

Um einen möglichen Haplotyp-spezifischen Einfluss der Polymorphismen auf das Proteinbindungsverhalten genauer zu untersuchen, wurden kürzere Fragmente von 780 Nukleotiden Länge verwendet, welche nur den Sequenzbereich repräsentierten, der die drei Polymorphismen unmittelbar umspannt. In diesen Versuchen zeigten die Haplotypen 1 und 3 ein identisches Proteinbindungsmuster, welches sich deutlich vom dem des humanen Haplotypen 2 unterscheidet. Die mittels Autoradiographie visualisierten Bandenmuster sind in Abb. 3.3.1.1A dargestellt.

Die Konstrukte zeigen ein gemeinsames Bandenmuster bei ungefähr 105 kD, 50 kD sowie 45 kD, dessen Signalintensität durch spezifische Kompetition abgeschwächt wird. Die Haplotypen Human 1 und 3 weisen zudem eine vierte Bande bei ca. 55 kD auf, die bei Human 2 nicht vorhanden ist.

Im Gegensatz zu Human 1 und 3 können bei Human 2 nicht nur eine sondern zwei weitere Banden bei ca. 35 kD sowie 60 kD zusätzlich zu den gemeinsamen drei Banden bei 105, 50 und 45 kD nachgewiesen werden.

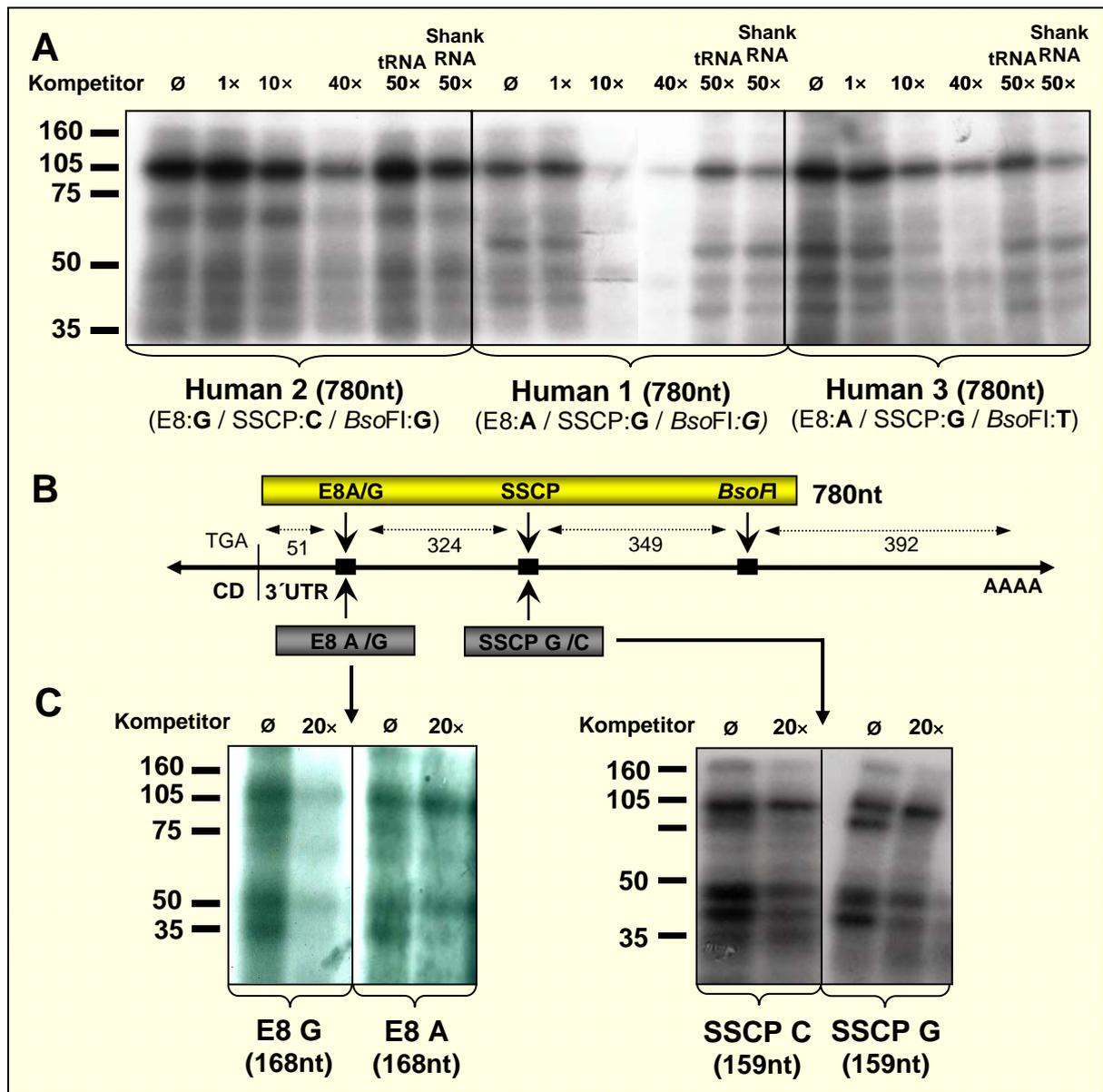


Abb. 3.3.1.1 UV-Crosslinking-Experimente mit Haplotyp-spezifischen Sonden unterschiedlicher Länge und spezifischer sowie nicht spezifischer Konkurrenz.

A) UV-Crosslinking der Haplotyp-spezifischen Varianten der *DRD2* 3'UTR mRNA von 780nt Länge mit 5µg Proteinrohlysat aus SH-SY5Y Zellextrakten und anschließender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Konkurrenzexperimente wurden mit nicht-radioaktiv markierter RNA mit bis zu 40-fachem Überschuss an spezifischem Kompetitor, sowie 50-fachem Überschuss an unspezifischem Kompetitor durchgeführt (Gelspuren 2-6).

B) Schematische Darstellung der verwendeten Sonden in Bezug auf ihre Lage in der *DRD2* 3'UTR.

C) UV-Crosslinking der jeweiligen 2 Sonden-Varianten der SNPs E8 A/G und SSCP unabhängig voneinander. Die jeweils linke Spur zeigt das Experiment ohne Konkurrenz, die rechte Spur die spezifische Konkurrenz mit der nicht radioaktiv markierten Sonde in 20-fachem Überschuss.

Da das Proteinbindungsverhalten sich nur jeweils zwischen den Konstrukten der Haplotypen Human 1 und Human 2 bzw. zwischen Human 2 und Human 3 unterschied, nicht jedoch zwischen Human 1 und Human 3, schienen die Polymorphismen E8 A/G oder SSCP, nicht jedoch *BsoFI*, welcher die beiden Haplotypen Human 1 und Human 3 unterscheidet, einen Einfluss auf die Proteinbindung auszuüben.

Um einen möglichen Einfluss der einzelnen SNPs weiter zu charakterisieren, wurden Sonden von 168 bzw. 159 Nukleotiden eingesetzt (Abb. 3.3.1.1B), wodurch die Sequenzumgebungen der beiden Polymorphismen E8 A/G und SSCP unabhängig von einander untersucht wurden (Abb. 3.3.1.1C). Dabei zeigten sich Unterschiede bei Verwendung der Sonden SSCP G und SSCP C, die den Polymorphismus SSCP flankieren, nicht jedoch zwischen E8 A und E8 G, welche die beiden Varianten des Polymorphismus E8 A/G darstellen (Abb. 3.3.1.1C).

Interessanterweise gehen wie bei den Experimenten mit den Sonden von 780nt Länge auch in diesem Falle die Unterschiede in der Proteinbindung mit einer ungleichen Sekundärstruktur - bei maximaler frei werdender Energie (ΔG) berechnet - einher. So werden für die Sonden von SSCP G und SSCP C unterschiedliche Sekundärstrukturen berechnet, während sich die von E8 A und E8 G gleichen.

Zusätzlich bestimmt der SNP SSCP, wie bereits unter 3.1.6 beschrieben, über das Vorhandensein eines zweiten funktionellen Elements (GAIT) bei Human 2 (siehe Abb. 3.1.7), was eine Erklärung für das unterschiedliche Proteinbindungsverhalten der Haplotypen darstellen könnte.

Die Spezifität der Bindung wurde in allen Versuchen durch Competition mit nicht radioaktiv markierten Haplotyp-spezifischen RNA-Konstrukten überprüft, die analog zu den radioaktiven Sonden mittels *in vitro*-Transkription generiert wurden. Schon bei Verwendung der zehn - bzw. vierzigfachen Menge an nicht radioaktiver Kompetitor-RNA zeigte sich eine deutliche Abschwächung des radioaktiven Signals (Abb. 3.3.1.1A, Gelspuren 2 bis 4), was für eine spezifische Verdrängung der markierten RNA aus der Bindung an das Protein durch den Kompetitor spricht. Als zusätzliche Kontrolle

wurde zur unspezifischen Kompetition tRNA sowie eine unmarkierte RNA ähnlicher Länge eingesetzt (Abb. 3.3.1.1A, Gelspuren 5 und 6). Letztere codiert für *shank-1*, ein neuronal exprimiertes Matrixprotein der postsynaptischen Dichte. Auch bei fünfzigfachem Überschuss an unspezifischem Kompetitor zeigte sich keine Abschwächung des Signals in der Autoradiographie. Dies ist als weiterer Hinweis für die Spezifität der Proteinbindung an die untersuchten *DRD2* RNA-Fragmente zu interpretieren.

3.3.1.2 Analyse der Proteinbindung mittels *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)

Zur Bestätigung der Ergebnisse der *UV-Crosslink*-Analysen, welche auf eine Haplotyp-spezifische Proteininteraktion der *DRD2* 3'UTR mRNA hinweisen, wurden EMSA-Versuche mit Allel-spezifischen Oligonukleotiden von 35 und 32 Nukleotiden Länge durchgeführt, welche nur die Haplotyp-determinierenden Polymorphismen flankierten.

Die Oligonukleotide waren an ihrem 3'-Ende mit Biotin markiert, um eine spätere affinitätschromatographische Anreicherung und massenspektrographische Analyse gebundener Proteine zu ermöglichen. Um die Bindung an Proteine autoradiographisch nachzuweisen, wurden die Oligonukleotide an ihrem 5'-Ende mit [γ - 32 P] ATP markiert. Nach Inkubation der Sonde mit Proteinrohlysaten wurden die RNA-Protein-Komplexe in einer nicht denaturierenden Gelelektrophorese aufgetrennt. Im Falle einer Proteinbindung wird die Laufgeschwindigkeit der gebundenen Sonden im Vergleich zur Sonde ohne Proteinbindung verzögert. Die Unterschiede im Laufverhalten können anschließend autoradiographisch analysiert werden.

Bei der Inkubation der Haplotyp-spezifischen Oligonukleotide der beiden SNPs mit den Proteinrohlysaten (dargestellt in der jeweils zweiten Gelspur) zeigte sich in der nativen Gelelektrophorese eine Verzögerung des Laufverhaltens (*shift*) im Vergleich zur nicht inkubierten Sonde (Gelspur 1). Dieses Ergebnis spricht für eine spezifische Bindung der untersuchten RNA an zelluläre Proteine (Abb. 3.3.1.2).

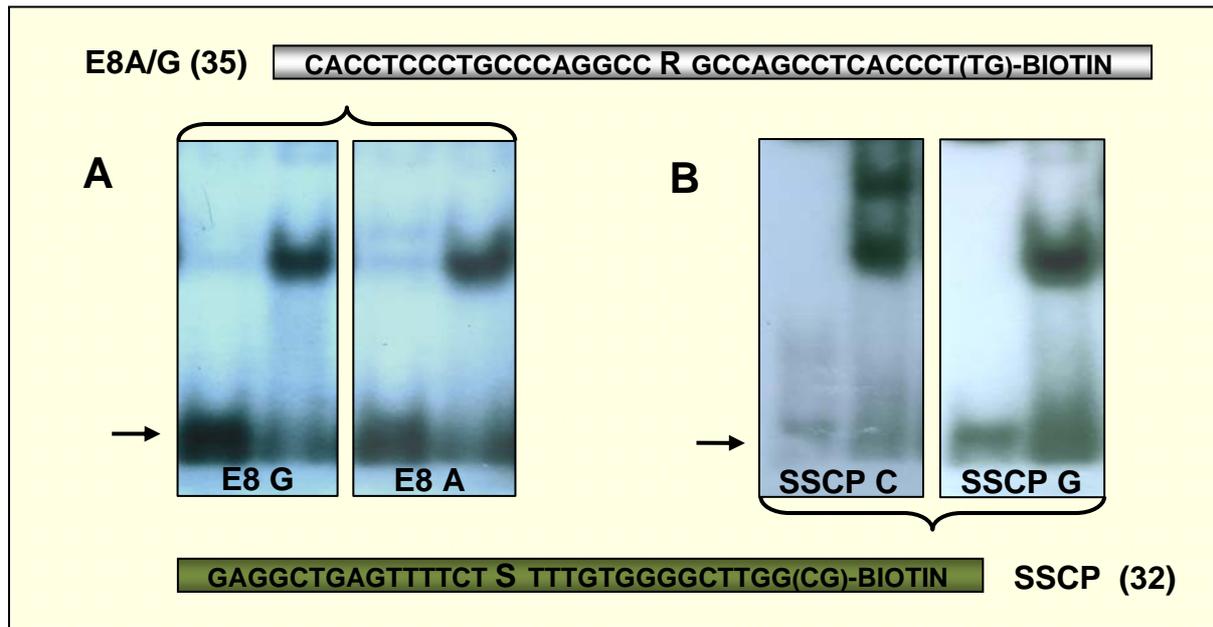


Abb. 3.3.1.2 EMSA-Experimente mit Oligomeren von 35 und 32 Nukleotiden Länge. Durch Bindung der radioaktiv markierten Sonden (in der jeweils linken Spur ist die ungebundene Sonde durch Pfeile markiert) an Proteine aus Proteinrohlysaten kommt es zu einer Reduktion der Laufgeschwindigkeit in der Gelelektrophorese (*shift*).
 A) Kein Unterschied im Proteinbindungsverhalten unter Verwendung der Oligonukleotide E8 G und E8 A (SNP E8A/G).
 B) Unterschiedliches Proteinbindungsmuster bei Einsatz der Oligonukleotide SSCP C und SSCP G (SNP SSCP).

Wie in den vorangegangenen Experimenten zeigten sich auch bei der Untersuchung dieser kurzen RNA-Oligomere Sequenz-spezifische Unterschiede im Proteinbindungsverhalten. Während die Sonde SSCP C zwei Banden in der Autoradiographie zeigte, wies die Sonde SSCP G lediglich eine Bande auf. Die beiden Sonden E8 G und E8 A, die den Polymorphismus E8 A/G abbilden, zeigten in Analogie zu den *UV-Crosslinking*-Experimenten keinen Haplotyp-spezifischen Unterschied im Proteinbindungsverhalten (Abb. 3.3.1.2).

Der Versuch die gebundenen Proteine mittels Biotin-Streptavidin-Affinitätschromatographie aufzureinigen und massenspektrographisch zu analysieren war leider nicht erfolgreich.

3.4 Einfluss der *DRD2* 3'UTR auf die Translation und Genexpression

3.4.1 Translationsregulation der *DRD2* 3'UTR *in vitro*

Die in den vorangegangenen *UV-Crosslinking*-Experimenten nachgewiesenen Haplotyp-spezifischen Unterschiede im Proteinbindungsverhalten der *DRD2* 3'UTR mRNA sollten hinsichtlich eines Einflusses auf translationelle Vorgänge weiter untersucht werden. Hierzu wurden zunächst *in vitro*-Experimente durchgeführt.

3.4.1.1 *in vitro*-Translation *DRD2* 3'UTR-fusionierter Luziferase mRNA

Um die Auswirkungen der 3'UTR auf die Translation der *DRD2* mRNA zu analysieren, wurde eine *in vitro*-Translation in einem mit Nuklease behandelten Lysat aus Kaninchenretikulozyten durchgeführt.

Hierzu wurden Haplotyp-spezifische 3'UTR DNA-Fragmente, die mit den Primern M1F / M4R amplifiziert wurden, in den Vektor „Blaulicht“ kloniert. Dieser Vektor enthält vor der multiplen Klonierungsstelle eine Sequenz, welche für das Enzym Photinus-Luziferase aus dem Glühwürmchen kodiert. So konnten nach Subklonierung der Haplotyp-spezifischen *DRD2* 3'UTRs in den Vektor chimäre Luziferase mRNA-Konstrukte mittels *in vitro*-Transkription hergestellt werden, die 3'-wärts mit den Haplotyp-spezifischen 3'UTRs von *DRD2* fusioniert waren (Abb. 3.4.1).

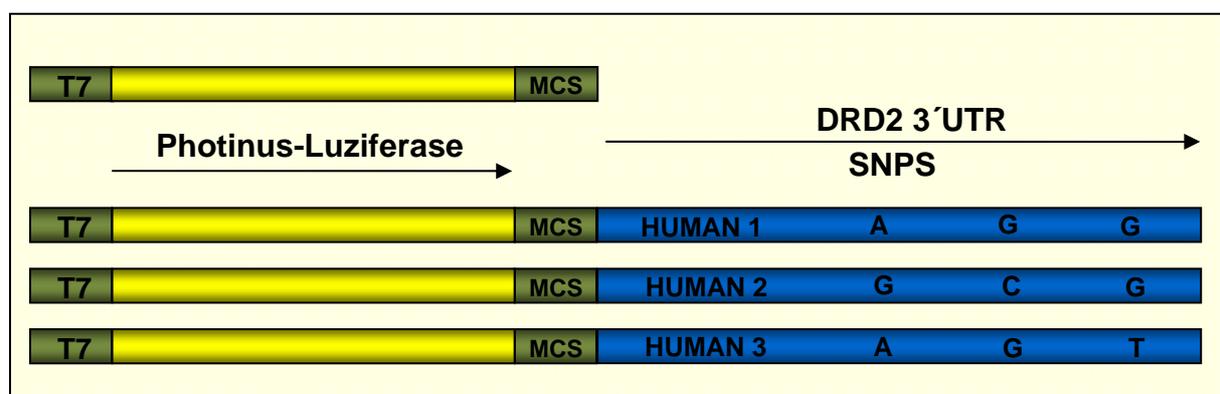


Abb. 3.4.1 Schematische Darstellung der verwendeten Photinus-Luziferase-Konstrukte. Es wurden drei Photinus-Luziferase-Konstrukte mit den vollständigen humanen *DRD2* 3'UTRs fusioniert, welche die drei häufigen Haplotypen repräsentieren: Human 1, Human 2, Human 3; Kontrolle (Leervektor nicht beschriftet), T7 (T7 Promoter site), MCS (multiple cloning site).

Diese Haplotyp-spezifischen Luziferase-Konstrukte wurden anschließend in einem Nuklease behandelten Lysat aus Kaninchenretikulozyten *in vitro* translatiert. Die Menge der *in vitro* translatierten Luziferase wurde durch die Messung der abgegebenen Lichtintensität mittels eines Luminometers quantifiziert. Zur Kontrolle diente eine äquimolar eingesetzte Kontroll-mRNA, die aus dem Leervektor „Blaulich“ ohne 3'UTR-Modifikation *in vitro* transkribiert wurde.

Durch Fusion der *DRD2* 3'UTRs Human 1 (E8:A / SSCP:G / *BsoFI* B:G), Human 2 (E8:G / SSCP:C / *BsoFI* B:G) und Human 3 (E8:A / SSCP:G / *BsoFI* A:T) an die Reporter-mRNA konnte jeweils eine statistisch signifikante Verstärkung der Translation um mehr als 50 Prozent im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Das Konstrukt Human 1 zeigte darüber hinaus eine signifikante Erhöhung um mehr als 50 Prozent in Relation zu Human 2 und Human 3 (Abb. 3.4.2).

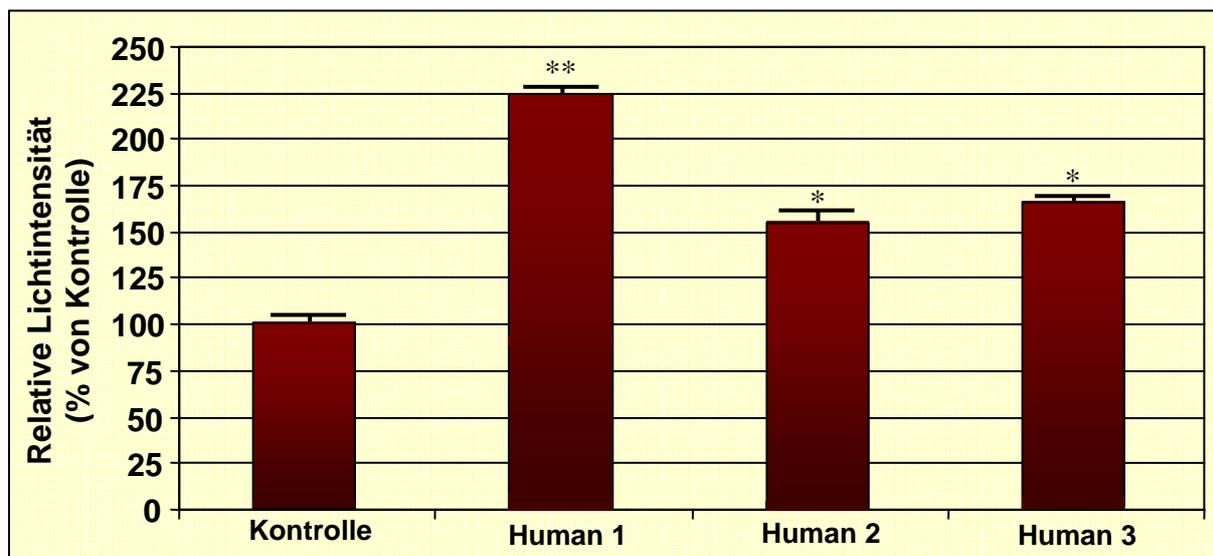


Abb. 3.4.2 Auswirkungen der *DRD2* 3'UTR auf die *in vitro*-Translation einer Reporter-mRNA. *In vitro* transkribierte RNA wurde zur *in vitro*-Translation von Luziferase in Retikulozytenlysaten eingesetzt. Dargestellt ist die Lichtemission der produzierten Luziferase nach Translation der Kontrolle und verschiedener *DRD2* 3'UTR-Fusionskonstrukte.

($n=3$ für alle Messwerte; Standardfehler oberhalb der Säulen; **, $p < 0,00005$ für Human 1 zu Kontrolle und $p \leq 0,011$ für Human 1 zu Human 2 oder 3; *, $p \leq 0,016$ für Human 2 oder Human 3 zu Kontrolle). (Standardabweichungen: Kontrolle = 1,6 %, Human 1 = 4,1 %, Human 2 = 15 %, Human 3 = 2,7 %). Die Bezeichnungen Human 1 (E8:A / SSCP:G / *BsoFI* B:G), Human 2 (E8:G / SSCP:C / *BsoFI* B:G), Human 3 (E8:A / SSCP:G / *BsoFI* A:T) repräsentieren die Haplotypen der *DRD2* 3'UTR gemäß Abb. 3.4.1.

Zusammengefasst sprechen diese Daten für einen Haplotyp-spezifisch unterschiedlich stark ausgeprägten translationsaktivierenden Effekt der

DRD2 3'UTR mRNA. Die stärksten Unterschiede in ihrem Einfluss auf die Translation zeigen sich zwischen den humanen Haplotypen 1 und 2, die sich in den beiden Polymorphismen E8 A/G und SSCP unterscheiden.

3.4.2 Untersuchung der Expressionsregulation der *DRD2* 3'UTR *in vivo*

Nachdem *in vitro* eine Haplotyp-spezifisch unterschiedlich starke Stimulation der Translation durch die *DRD2* 3'UTR gezeigt werden konnte, sollte überprüft werden ob diese Effekte auch *in vivo*, nach Transfektion entsprechender Reporter-Gen-Konstrukte in eukaryotische Zellen, zu beobachten sind. Hierzu wurden *Dual Luciferase Assays* durchgeführt.

Um etwaige Ungleichheiten in der Transfektionseffizienz zu korrigieren / normalisieren, werden häufig sekundäre Reporter-Konstrukte zur Kontrolle kotransfiziert. Um eine gegenseitige Beeinflussung gemeinsam transfizierter Reporter-Konstrukte und unterschiedliche Transfektions- und Expressionseffizienzen primärer und sekundärer Konstrukte zu vermeiden, bot es sich an, dicistronische Reporter-Gen-Konstrukte zu verwenden. Diese ermöglichen von der Transfektionseffizienz unabhängige Messungen und stellen ein hochsensitives System zum Vergleich auch schwächerer Einflüsse auf die Expression von Reporter-Genen dar. Ebenso ermöglichen sie eine Kotransfektion mit einem weiteren Konstrukt, falls dessen Einfluss auf die Translation beobachtet werden soll.

Die verwendeten dicistronischen Luziferase-Konstrukte besitzen in der 5'-Region ein offenes Leseraster für die Photinus-Luziferase. 3'-wärts dazu wurden die vollständigen humanen 3'UTRs der *DRD2* Haplotypen - Human 1, Human 2 und Human 3 - subkloniert. Auf demselben RNA-Strang folgt eine aus dem Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) stammende *Internal ribosomal entry site* (IRES), an die sich in 3'-Richtung ein offenes Leseraster der Renilla-Luziferase anschließt (Abb. 3.4.3). Diese zweite Luziferase, welche aus einem als Seestiefmütterchen (*renilla*) bezeichneten Organismus stammt, kann somit cap-unabhängig unter Verwendung der IRES translatiert werden.

Da die Effizienz des IRES-vermittelten Ribosomeneintritts durch die vollzogenen Modifikationen im 5'-Bereich der mRNA nicht beeinflusst wird, kann ihre Aktivität als interne Kontrolle auf derselben RNA verwendet werden (Myers et al., 2004).

Die Aktivitäten beider Luziferasen sind abhängig von unterschiedlichen Substraten und Pufferbedingungen, so dass es unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Systems (Promega) möglich ist, beide Aktivitäten in derselben Probe zu quantifizieren.

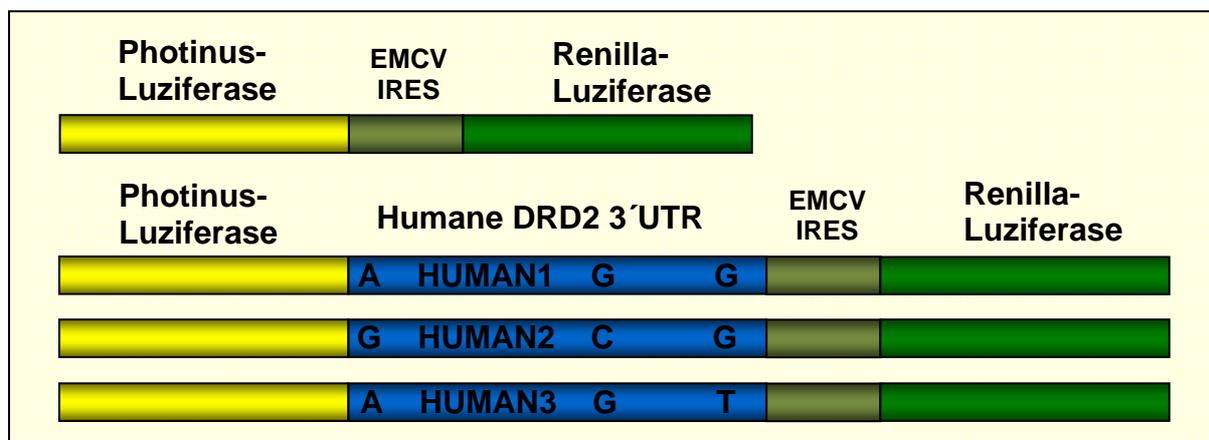


Abb. 3.4.3. Dicistronische Luziferase-Konstrukte zur Verwendung in *Dual Luciferase Assays*. Schematische Darstellung der drei hergestellten dicistronischen Luziferase-Konstrukte mit der fusionierten humanen *DRD2* 3'UTR entsprechend der zu untersuchenden Haplotypen. Die in den Konstrukten enthaltenen Haplotyp-spezifischen Sequenzunterschiede sind angegeben. IRES (*Internal ribosomal entry site*).

Nach Zugabe des Substrats Photinus-Reagenz wird zunächst die Aktivität der Photinus-Luziferase gemessen. Anschließend wird der Reaktion STOP & GLO[®] - Puffer zugefügt, der die Lichtemission durch Photinus-Luziferase nahezu vollständig unterdrückt und ein geeignetes Substrat für Renilla-Luziferase enthält. Der Quotient der gemessenen Lichteinheiten (Photinus-Aktivität / Renilla-Aktivität) ergibt einen gegenüber der Transfektionseffizienz normalisierten Wert. Somit können Effekte auf die Expression des Reporters Photinus-Luziferase auf Proteinebene nach Modifikation mit den verschiedenen *DRD2* 3'UTRs gemessen werden.

Die Luziferase-Konstrukte wurden in HEK293 Zellen transfiziert, nach 24 h in einem Puffer lysiert, der nach Herstellerangaben keinen Einfluss auf die

Luziferaseaktivität ausübt und die Aktivitäten luminometrisch bestimmt (Abb. 3.4.4).

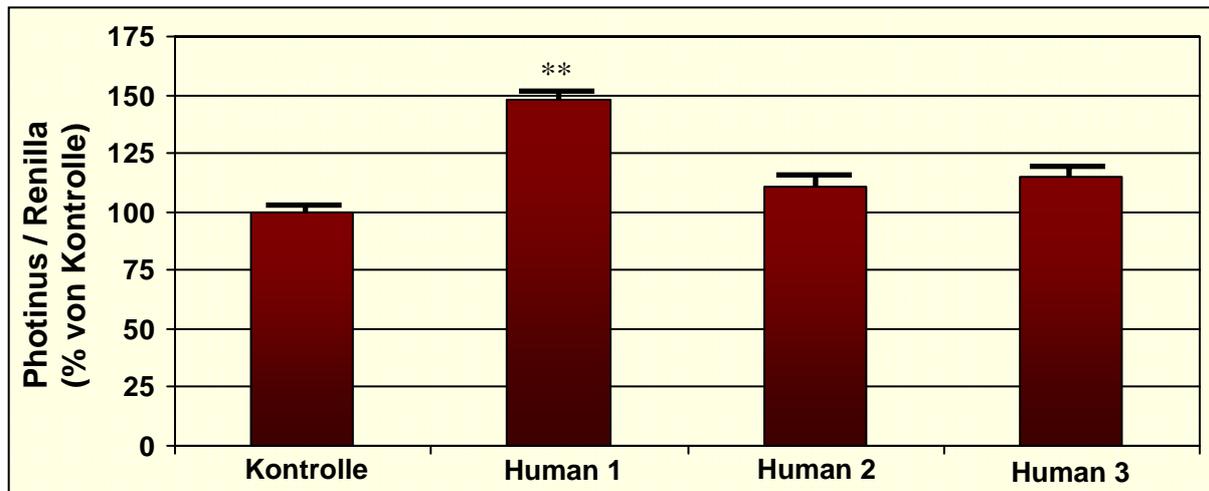


Abb. 3.4.4 Auswirkung der *DRD2* 3'UTR mRNA auf die *in vivo*-Expression dicistronischer Luziferase-Konstrukte. HEK293 Zellen wurden mit den in Abb. 3.4.3 beschriebenen dicistronischen Luziferase-Konstrukten transfiziert und nach 24 h lysiert. Die Expression der beiden Luziferasen wurde luminometrisch quantifiziert und das Verhältnis der Aktivität von Photinus- zu Renilla-Luziferase berechnet und in Relation zu der Kontrolle gesetzt.

(n = 3 für alle Messwerte; Standardfehler oberhalb der Säulen; **, p < 0,001 für Human 1 zu Kontrolle). (Standardabweichungen: Kontrolle = 6,4%, Human 1 = 3,4%, Human 2 = 9,6%, Human 3 = 8,7%). Die Bezeichnungen Human 1 (E8:A / SSCP:G / *Bso*FI B:G), Human 2 (E8:G / SSCP:C / *Bso*FI B:G) und Human 3 (E8:A / SSCP:G / *Bso*FI A:T) repräsentieren die beschriebenen Haplotypen der *DRD2* 3'UTR gemäß Abb. 3.4.3.

Das Fusionskonstrukt, welches mit der 3'UTR des Haplotypen Human 1 modifiziert wurde, ergab analog zu den Ergebnissen der *in vitro*-Experimente, die höchste Verstärkung der Expression von Photinus-Luziferase (p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle). Für die Haplotypen Human 2 und Human 3 zeigte sich eine den *in vitro*-Messungen vergleichbare relative Erhöhung der Reporterengenaktivität im Vergleich zur Leerkontrolle. Allerdings blieben die Ergebnisse für die Absolutwerte unterhalb der Signifikanzgrenze (p < 0,25), (Abb. 3.4.4).

4 DISKUSSION

Ein Ziel dieser Arbeit war die genaue Bestimmung von repräsentativen Haplotypen der 3' untranslatierten Region des humanen D2 Rezeptor Gens *DRD2*. Alleine in diesem Bereich des *DRD2* befinden sich elf bereits bekannte Einzelnukleotidaustausch-Polymorphismen, sog. SNPs (NCBI Single Nucleotide Polymorphism / Reference SNP (refSNP), IDs siehe 7.5.2, Appendix). Zusätzlich konnte aus einem Kollektiv von 120 gesunden Probanden während dieser Arbeit ein bisher unbekannter seltener Polymorphismus (Y22521, NCBI Gene Accession number AF050737) identifiziert werden.

Um die geplanten weiterführenden funktionellen Untersuchungen der *DRD2* 3' UTR in einem realisierbaren experimentellen Rahmen durchführen zu können, sollte deshalb vorausgehend eine Einteilung in repräsentative Haplotypen erfolgen, die in der untersuchten Bevölkerung eine Haplotyp-Frequenz ≥ 5 Prozent besitzen.

Im Falle der humanen *DRD2* 3' UTR konnte die Vielzahl an theoretisch möglichen genetischen Varianten trotz der hohen Anzahl von SNPs im Wesentlichen auf drei häufige Haplotypen reduziert werden: Human 1 (E8:A / SSCP:G / *BsoFI* B:G = A_G_G), Human 2 (E8:G / SSCP:C / *BsoFI* B:G = G_C_G) und Human 3 (E8:A / SSCP:G / *BsoFI* B:T = A_G_T). Alle übrigen Haplotypen besitzen eine sehr geringe Frequenz, so dass die humanen Haplotypen 1, 2 und 3 vermutlich mehr als 99 Prozent der Allele in der untersuchten Bevölkerung repräsentieren.

Die experimentelle Untersuchung von Haplotypen im Gegensatz zu singulären SNPs erscheint zweckmäßig, da die Betrachtung einzelner Polymorphismen in Hinblick auf ihren funktionellen Einfluss zum Teil unzureichend sein kann, was auch experimentell belegt werden konnte (Drysdale et al., 2000; Duan et al., 2003). Vielmehr ist anzunehmen, dass funktionelle Effekte einzelner SNPs durch andere Polymorphismen in nicht geringem Maße modifiziert werden können und die Kombination der Effekte einzelner Polymorphismen im Vergleich zur isolierten Betrachtung ihrer

Einzeleffekte deutlich unterschiedliche funktionelle Konsequenzen haben kann.

In den letzten Jahren konnte zunehmend nicht kodierenden Bereichen wie 5'- und 3'-UTRs ein Einfluss auf die Regulation der Expression von Genen zugeordnet werden (Wilusz et al., 2001; Mazumder et al., 2003; Wilkie et al., 2003; Hesketh, 2004). So zeigte sich an mehreren Beispielen von 3'-UTRs (siehe Einleitung, Miller et al., 2002; Fritz et al., 2006; Griseri et al., 2007), dass genetische Variationen funktionelle und physiologische Effekte auf das posttranskriptionelle Schicksal reifer mRNAs ausüben können und bestimmte allelische Varianten in Krankheiten gehäuft auftreten (Conne et al., 2000; Hesketh, 2004).

Da 5' bzw. 3'-UTRs ihre Effekte über spezifische RNA-bindende Proteine ausüben und mehrere Assoziationsstudien einen möglichen Einfluss genetischer Varianten der *DRD2* 3'-UTR auf phänotypische Ausprägungen nahe legten (Finckh et al., 1997; Koehnke et al., 1999; Samochowiec et al., 2000; Lucht et al., 2001), sollte mittels *UV-Crosslinking* analysiert werden, ob es spezifische Bindungspartner gibt, die mit der humanen *DRD2* 3'-UTR interagieren. Hierzu wurden aus humanem und murinem striatalem Gewebe sowie aus den Zellkulturlinien SH-SY5Y, Kelly, Cos-7 und HELA Proteinlysate gewonnen. Im Falle der Zelllinien wurden diese in eine zytosolische und in eine nukleäre Fraktion separiert.

Es zeigte sich eine starke, spezifische Bindung von Proteinen aus allen zytosolischen Präparationen an die 3'-UTR der mRNA, sowie eine schwächere Interaktion mit Proteinen aus nukleären Präparationen ausschließlich für die neuronale Zelllinie SH-SY5Y.

Um etwaige funktionelle Einflüsse der zu untersuchenden Polymorphismen auf die Proteinbindung nachzuweisen, wurden Sonden verwendet, welche die drei häufigen humanen Haplotypen repräsentierten. Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Proteinbindungsverhalten zwischen den Haplotypen Human 1 und Human 3 gegenüber Human 2.

Einen möglichen Erklärungsversuch für diese beobachteten Haplotyp-spezifischen Differenzen in der Interaktion der *DRD2* 3'-UTR mRNA mit po-

tentiellen Bindungspartnern könnte die Faltung der mRNA und die daraus resultierende Sekundärstruktur liefern. Es ist bekannt, dass reife mRNAs spezifische Sekundärstrukturen ausbilden. Diese können zur Entstehung von *cis*-agierenden funktionellen Elementen beitragen, welche spezifische Bindungsstellen für *trans*-agierende Faktoren wie RNA-bindende Proteine darstellen.

Interessanterweise wurden unter Verwendung des Programms mfold, Version 2.3 (Mathews et al., 1999; Zuker, 2003), analog zu den ungleichen Bindungsmustern in den *UV-Crosslinking*- und EMSA- Experimenten, sowohl bei maximaler frei werdender Energie (ΔG) als auch bei identischem nicht maximalem ΔG , unterschiedliche Sekundärstrukturen für die Haplotypen 1 und 3 gegenüber Haplotyp 2 bei 37°C errechnet. Die beiden erstgenannten Haplotypen unterscheiden sich ausschließlich in dem Polymorphismus *BsoFI*, wohingegen Human 2 in mindestens zwei bzw. in drei Polymorphismen von ihnen differiert. Diese Kombination mehrerer Einzelnukleotidaustausche im Vergleich zu einem singulären Austausch könnte einen stärker modifizierenden Einfluss auf die Sekundärstruktur ausüben und die berechneten Unterschiede in der Sekundärstruktur erklären.

Eine wichtige Rolle spielt hier der Haplotyp-spezifische Unterschied hinsichtlich des Polymorphismus SSCP, da bei der Berechnung kürzerer SNP-spezifischer RNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, im Gegensatz zu E8 A/G und *BsoFI* eine Sekundärstrukturänderung nur durch diesen Polymorphismus verursacht wird. Der SNP SSCP scheint zudem die Präsenz eines ausschließlich in Haplotyp 2 vorhandenen zweiten funktionellen Elements (GAIT) zu bedingen (s. u.).

Die in den *UV-Crosslinking*- und EMSA-Experimenten beobachteten Haplotyp-assoziierten Unterschiede im Proteinbindungsmuster könnten auf die beschriebenen Haplotyp-spezifischen Sekundärstrukturunterschiede zurückzuführen sein. Dementsprechend wäre eine Beeinflussung der Verwertung der mRNA auf translationeller Ebene durch eine Haplotyp-spezifische Bindung *trans*-agierender Faktoren denkbar.

Da der Einfluss dieser Interaktion hochgradig abhängig vom Vorhandensein *cis*-agierender funktioneller Elemente ist, wurde die *DRD2* 3'UTR mRNA gezielt in Bezug auf bekannte *cis*-agierende Elemente untersucht.

Unter Verwendung des Programms RegRNA (Department of Biological Science and Technology, Institute of Bioinformatics, National Chiao Tung University, Taiwan) - einer Datenbank von funktionellen Elementen die speziell in den 5' und 3'UTRs lokalisiert sind - konnten in der humanen *DRD2* 3'UTR Konsensusstrukturen in Form des GAIT-Elements (*Gamma interferon activated inhibitor of Ceruloplasmin mRNA translation*) identifiziert werden. Von diesem ist bekannt, dass es einen inhibitorischen Effekt auf die Translation der Coeruplasmin mRNA ausübt (Sampath et al., 2003).

Der Haplotyp Human 2 beherbergt zwei solcher inhibitorischen Elemente, während Human 1 und 3 jeweils nur ein GAIT-Element aufweisen. Interessanterweise ist der Polymorphismus SSCP in der Mitte dieses für Human 2 zusätzlich identifizierten Elements lokalisiert.

Sampath et al. zeigten, dass GAIT-Elemente einen Einfluss auf die Translationsrate von Luziferase-Lonstrukten ausüben, sowohl *in vitro* in Kaninchenretikulozyten als auch nach Transfektion von Dual-Luziferase-Konstrukten in Zelllinien (U937). Von den Autoren wird postuliert, dass die Beeinflussung der Proteinexpression durch den inhibitorischen Effekt der 3'UTR via GAIT-Element keinen auf Coeruloplasmin beschränkten Mechanismus darstellen dürfte, sondern auch auf andere 3'UTRs übertragbar ist: Chimäre Luc-Deletionskonstrukte, welche ausschließlich mit dem 29nt umfassenden GAIT-Element an ihrem 3'-Ende modifiziert wurden, zeigten eine Repression der Translationsrate im Vergleich zur Leerkontrolle (Sampath et al., 2003).

Die beschriebenen Haplotyp-spezifischen Unterschiede - sowohl in der Interaktion der *DRD2* 3'UTR mRNA mit potentiellen Bindungspartnern und der berechneten Sekundärstruktur als auch in der Anzahl funktioneller Elemente - wurden anschließend daraufhin untersucht, ob sie die Translationseffizienz beeinflussen können.

Ein geeignetes Instrument hierfür stellen Reporter-Gen-Analysen in Form von Luziferase-Assays dar. So wurden drei Haplotyp-spezifische Reporter-Gen-Konstrukte durch Fusion mit der vollständigen *DRD2* 3'UTR mRNA generiert, mittels *in vitro*-Transkription exprimiert und anschließend in äquimolarer Menge in einem Nuklease behandelten Lysat aus Kaninchenretikulozyten *in vitro* translatiert. Die luminometrische Auswertung ergab eine statistisch signifikante Erhöhung der Translation aller Konstrukte, welche mit der 3'UTR fusioniert waren im Vergleich zur Leerkontrolle, bei der keine 3'-Modifikation des Reportergens vorgenommen wurde. Am stärksten wirkte sich der Einfluss der 3'UTR des humanen Haplotyps 1 auf die Reporter-Gen-Aktivität aus, für den im Vergleich zu den Haplotypen Human 2 und Human 3 eine um mehr als 50 Prozent höhere Translationsrate (in Relation zur Kontrolle) gemessen wurde. Die häufigen Haplotypen Human 1 und Human 2 - welche sich in den beiden in starkem Kopplungsgleichgewicht befindlichen Polymorphismen E 8 A/G und SSCP unterscheiden - zeigten die stärksten Haplotyp-spezifischen Unterschiede in ihrem Einfluss auf die Translationsaktivierung.

Um den kombinierten Einfluss der Polymorphismen auch *in vivo* zu untersuchen und auch eventuelle transkriptionelle Effekte mit zu berücksichtigen, wurden Reporter-Gen-Assays auch in humanen Zellsystemen durchgeführt. Hierzu wurden entsprechend den drei humanen Haplotypen dicistronische cDNA-Luziferase-Konstrukte hergestellt, die nach Transfektion in HEK293 Zellen und deren Lyse nach 24 Stunden luminometrisch untersucht wurden.

Analog zu den oben beschriebenen Reporter-Gen-Assays in Retikulozytenlysaten konnte auch *in vivo* bei Haplotyp 1 die stärkste Reporter-Gen-Aktivität beobachtet werden. Die Haplotypen 2 und 3 wiesen eine den *in vitro*-Versuchen ähnliche, jedoch statistisch nicht mehr signifikante relative Erhöhung der Luziferase-Aktivität in Vergleich zur Leerkontrolle auf. Die Tatsache, dass die quantitativen Aktivitätsunterschiede und deren Rangordnung bei den *in vivo*-Messungen den Translationsdaten ähnlich, jedoch weniger signifikant waren, spricht dafür, dass sich die primären

funktionellen Effekte der untersuchten Polymorphismen auf translationeller Ebene auswirken. Wenn experimentell durch *in vivo*-Expression der cDNA das Stadium der Transkription „zwischengeschaltet“ wird, kommt es demnach zu einer gewissen Verschleierung von Effekten, welche sich erst auf der Ebene der Translation bemerkbar machen.

Zusammengenommen sprechen die in den beiden Varianten von Luziferase-Assays gemessenen kongruenten funktionellen Unterschiede für einen Haplotyp-spezifisch unterschiedlich starken translationsaktivierenden Effekt der humanen *DRD2* 3' UTR mRNA.

Da die mRNA des Haplotypen Human 2 ein zusätzliches reprimierendes GAIT-Element beherbergt und die niedrigste Reporterogenaktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zeigt, macht dies einen Einfluss solcher Elemente auch auf das posttranskriptionelle Schicksal der *DRD2* mRNA wahrscheinlich.

In Zusammenschau der Haplotyp-spezifischen Unterschiede in der Proteinbindung und Sekundärstruktur sowie des Vorhandenseins einer ungleichen Anzahl an funktionellen Elementen erscheint die in den Luziferase-Assays gemessene Beeinflussung der Translation der *DRD2* 3' UTR mRNA durch die kombinierte Wirkung der SNPs E8 A/G bzw. SSCP und *BsoFI* bedingt zu sein. Der dominierende Effekt entsteht durch die Polymorphismen E8 A/G bzw. SSCP und wird durch den Einfluss von *BsoFI* abgeschwächt.

An Hand der vorhergesagten Ähnlichkeit der Sekundärstrukturen von Haplotyp 1 und 3 war dies nicht unbedingt zu erwarten gewesen. Allerdings zeigte sich nach Vergleich mit den Sequenzen diverser Primaten und Murinae, dass der humane Haplotyp 3 die wohl evolutionär jüngste genetische Variante darstellt. Somit wäre der beschriebene Effekt der Polymorphismen E8 A/G sowie SSCP auf die Expression von Reporter genen mit einem kompensatorischen evolutionären Modell erklärbar, welches von Innan et al. für den Einfluss von Mutationen zweier oder mehrerer Genorte beschrieben wurde (Innan et al., 2001). So kommt es bei Polymorphismen mit einem ausgeprägten Einfluss auf den Phänotyp (E8 A/G bzw. SSCP) nicht selten zur Evolution eines Haplotypen, in welchem eine kompensato-

rische Wirkung eines neuen Polymorphismus (*BsoFI*) zum Tragen kommt und auf diese Weise die phänotypischen Ausprägungen im Sinne einer Gegenregulation modifiziert werden.

Die Summe der erzielten Ergebnisse deutet auf eine translationelle Beeinflussung der *DRD2*-Expression durch die 3'UTR hin, was ein molekularbiologisches Erklärungsmodell für die phänotypischen Beobachtungen in den erwähnten Assoziationsstudien (Finckh et al., 1997; Koehnke et al., 1999; Samochowiec et al., 2000; Lucht et al., 2001) darstellen könnte.

Insgesamt zeigte sich in diesen Studien, dass alkoholranke Probanden, welche bezüglich des SNPS E8 A/G homozygot für das A-Allel waren, eine in psychometrischen und pharmakologischen Tests gemessene deutlich schwerere Entzugssymptomatik präsentierten.

Als Ursache der beobachteten phänotypischen Ausprägungen wurde ein geringeres Maß an dopaminergem Transmission angenommen, da ein Defizit in der dopaminergen Neurotransmission - neben einer durch Umgebungseinflüsse bestimmten Neigung zum Alkoholkonsum sowie einem reduzierten Ansprechen auf Belohnungsreize - als ein entscheidender pathogenetischer Mechanismus der Alkoholkrankheit identifiziert wurde (Muller et al., 1980; Rommelspacher et al., 1992; Hietala et al., 1994; Cloninger et al., 1995; Mash et al., 1996; Volkow et al., 1996; Laine et al., 1999; Repo et al., 1999; Tupala et al., 2003).

Beim Menschen wurden 2 Isoformen des *DRD2* identifiziert (D2L und D2S), die durch alternatives *Splicen* in einem Verhältnis zu Gunsten der langen Variante D2L entstehen und sich um 29 Aminosäuren in der dritten intrazytoplasmatischen Schleife unterscheiden (Dal Toso et al., 1989). Den beiden Isoformen konnte durch Experimente mit transgenen Mäusen sowohl in Bezug auf ihre Lokalisation als auch funktionell eine unterschiedliche Rolle nachgewiesen werden (Uziel et al., 2000; Wang et al., 2000; Centonze et al., 2002). So wurde die kurze Isoform D2S, welche vornehmlich präsynaptisch lokalisiert ist, als Autorezeptor identifiziert. D2L hingegen ist hauptsächlich postsynaptisch lokalisiert und vermittelt in Zusammenspiel mit Dopamin D1 Rezeptoren nach Freisetzung von Dopa-

min in den synaptischen Spalt die postsynaptischen Effekte des Transmitters. Diese werden im Sinne einer negativen Rückkopplung durch die Autorezeptorfunktion von D2S negativ moduliert.

Beide Rezeptorisoformen vermitteln ihre Wirkung über die Kopplung an inhibitorische G-Proteine (Gi alpha) und konsekutiv über eine Inhibition der Adenylatcyclase mit Reduktion des *Second messengers* cAMP, wobei sie sich sowohl in den Subtypen der G-Proteine als auch in den Bindungsaffinitäten zu ihnen unterscheiden (Montmayeur et al., 1993; Senogles, 1994; Guiramand et al., 1995).

Eine Verringerung der dopaminergen Transmission, wie oben postuliert, lässt sich somit einerseits durch einen reduzierten postsynaptischen D2 Rezeptorstatus erklären und andererseits als Folge einer gesteigerten inhibitorischen Autorezeptorfunktion.

Das Verhältnis der prä- und postsynaptischen Expression des D2 Rezeptors spielt eine wichtige Rolle in der Feinregulation des mesolimbischen dopaminergen Systems, das als morphologisches Korrelat des menschlichen Belohnungssystems gilt (Salamone, 1996; Spanagel et al., 1999; Wightman et al., 2002; Bowirrat et al., 2005; Hyman et al., 2006).

Wie in der Einleitung angedeutet, ist Dopamin in diversen Studien als ein zentraler Neurotransmitter für die Ausbildung addiktiven und impulsiv-kompulsiven Verhaltens identifiziert worden (Wise, 1987; Koob et al., 1988; Di Chiara, 1998; Wise, 1998; Hyman et al., 2006).

In den Experimenten dieser Arbeit war für die Varianten Human 1 (A_G_G) und 3 (A_G_T) gegenüber Human 2 (G_C_G) eine relative Erhöhung der Luziferase-Aktivität zu beobachten. Demnach wäre, sofern eine reduzierte dopaminerge Transmission mit der Homozygotie E8 A/A assoziiert ist, für E8 A-positive Haplotypen eine vorwiegend präsynaptisch gesteigerte Autorezeptorexpression auf Proteinebene zu postulieren. Hierdurch könnte sich aufgrund des resultierenden Ungleichgewichts an dopaminergem Neurotransmission eine bestehende Suszeptibilität gegenüber addiktivem Verhalten verstärken, bzw. ließe sich bei bestehendem Alkoholismus der erhöhte Bedarf an Entzugsmedikation erklären.

Weiterhin stehen die Polymorphismen E8 A/G und SSCP in starkem Kopplungsungleichgewicht mit dem *TaqI* A1/A2 Polymorphismus, welcher ca. 10kb *downstream* von *DRD2* liegt (Grandy et al., 1989a; Grandy et al., 1989b). Hierbei liegt E8 A bzw. SSCP G in der kaukasischen Bevölkerung fast ausschließlich in *cis* mit *TaqI* A1 vor (Hauge et al., 1991; Goldman, 1993; Finckh et al., 1996; Jonsson et al., 1996; Samochowiec et al., 2000). Diese allelische Variante wurde in vielen Untersuchungen gehäuft bei kaukasischen Suchtkranken gefunden (Blum et al., 1990; Blum et al., 1991; Noble, 1993; Noble et al., 1993; Noble, 1994; Lawford et al., 1997; Noble, 1998a, 1998b, 2000, 2003). Zudem konnte sowohl bei gesunden als auch bei suchtkranken Individuen mit dem Allel *TaqI* A1 *in vivo* eine deutliche Reduktion der Rezeptordichte in striatalem Gewebe nachgewiesen werden (Thompson et al., 1997; Pohjalainen et al., 1998; Jonsson et al., 1999; Ritchie et al., 2003). In diesen Untersuchungen wurde überwiegend Racloprid als Radioligand des Rezeptors verwendet, der sowohl an prä- als auch postsynaptische Rezeptoren bindet. Es konnte noch kein geeigneter Radioligand synthetisiert werden, der isoformspezifisch interagiert, so dass bis jetzt beim Menschen keine selektive Unterscheidung des prä- und postsynaptischen Rezeptorstatus *in vivo* möglich ist und somit nur der gesamte D2 Rezeptor-Status abgebildet wird.

Ebenso konnte bis dato keine befriedigende Erklärung für die Funktion des *TaqI* A1 Polymorphismus gefunden werden, weshalb postuliert wurde, dass sich *TaqI* A1 in Kopplungsungleichgewicht mit einem funktionellen Polymorphismus befindet (Turner et al., 1992; Gejman et al., 1994; Ritchie et al., 2003). Dies ist umso eher anzunehmen, da sich *TaqI* A1 extragenisch in einer neu identifizierten, benachbarten Genregion auf Chromosom 11 (11q23.1.) befindet, welche als *ANKK1* (*ankyrin repeat and kinase domain containing 1 gene*) identifiziert wurde, und für eine Proteinkinase kodiert (Neville et al., 2004).

Duan et al. beschrieben kürzlich einen SNP in *DRD2* Exon 7 (E7 957C/T in Abb. 3.1.5), welcher sich in Kopplungsungleichgewicht mit *TaqI* A1 befindet. Nach den Autoren scheint der Polymorphismus einen Einfluss auf die

DRD2 RNA-Stabilität auszuüben, was sich in einer verringerten Anzahl an Dopamin D2 Rezeptoren für den hier untersuchten Haplotyp 1 auswirken könnte (Duan et al., 2003). Allerdings scheint das mittels Fusion eines *in vitro*-Mutagenese-Produktes mit der 5'- und 3'-UTR von *DRD2* hergestellte Konstrukt, welches mit einer reduzierten RNA-Stabilität assoziiert wurde, allenfalls einen sehr seltenen *in natura* vorkommenden Haplotypen zu repräsentieren. Die Plasmid-Konstrukte, welche mittels Mutagenesis-Primern zur Insertion der allelischen Exon 7-Varianten modifiziert wurden, enthalten die von Grandy et al. erstmalig beschriebenen Sequenzen von *DRD2*. Die 3'-UTR dieser Sequenz entspricht dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen humanen Haplotypen 2 (G_C_G).

In dem unter 3.1.4 beschriebenen Kollektiv von 22 Individuen fand sich kein Haplotyp, bei dem die in Exon 7 beschriebene allelische Variante E7 957T *in cis* mit der vorgegebenen 3'-UTR des humanen Haplotypen 2 vorkommt. Unter Berücksichtigung der in 3.1.4 beschriebenen Ergebnisse bleibt die Relevanz der beschriebenen Effekte des Exon 7 Polymorphismus in den erwähnten Versuchen von Duan et al. somit eher unklar.

Basierend auf den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit kann jedoch zusammenfassend angenommen werden, dass ein Haplotyp-spezifischer Einfluss der 3'-UTR auf die Expression von *DRD2* besteht. Der physiologisch dominierende Effekt der hier beobachteten Haplotyp-spezifisch gesteigerten Translation könnte vornehmlich präsynaptisch angesiedelt sein - im Sinne einer gesteigerten Autorezeptorfunktion. Global gemessen kann dies zu einer Verminderung der dopaminergen Transmission führen. Der daraus entstehende negative Effekt auf das Belohnungssystem könnte Ursache eines als „*reward deficiency syndrome*“ bezeichneten Krankheitsbildes sein, bei dem der verstärkte Bedarf an Stimulation durch exogene Zufuhr *reward*-assoziierten Drogen, wie zum Beispiel Alkohol, schnell, aber nicht dauerhaft stillbar ist.

Um das noch weithin unbekanntes Bindeglied zwischen genetischer Disposition und komplexem Phänotyp noch genauer charakterisieren zu können

sind auf Basis dieser hier erarbeiteten Hypothesen weitere und umfangreichere Experimente notwendig.

So sollte von der molekularbiologischen Seite her die Kombination von Effekten einzelner genetischer Varianten in komplexen Haplotypen mittels Reporteranalysen auch in neuronalen Zelllinien untersucht werden. Dadurch könnte eine mögliche Erklärung für die funktionellen Unterschiede des humanen Haplotypen 3 in Vergleich zu Human 1 – trotz scheinbar nicht differenter Sekundärstruktur und Bindungsverhalten - geliefert werden. Ein Desiderat wären auch vom Phänotyp ausgehende bildgebende Verfahren, mit denen nach vorhergehender, auf funktionellen Gesichtspunkten beruhender sinnvoller Genotypisierung, der prä- und postsynaptische Rezeptorstatus selektiv dargestellt werden kann.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Probanden für bildgebende Studien basierend auf den Haplotypen 1-3 in sechs unterschiedliche Genotyp-Gruppen (1/1, 1/2, 1/3, 2/2, 2/3, 3/3) einzuteilen sind, da a priori nicht bekannt ist, ob *in vivo* dominante, bzw. rezessive Allele zu unterscheiden sind. Der Haplotyp 3 (A_G_T) ähnelt funktionell in der vorliegenden Arbeit eher dem Haplotyp 2 (G_C_G), jedoch strukturell und hinsichtlich der Sequenz in den in der Vergangenheit häufig untersuchten SNPs E8 A/G und SSCP dem Haplotyp 1 (A_G_G). Daher kann sogar postuliert werden, dass die in der Literatur beschriebenen Phänotyp-Assoziationen mit den Genotypen in E8 A/G bei Ausschluss der Träger des Haplotyps 3 stärker ausgeprägt wären.

Von den unterschiedlichen experimentellen Ansatzpunkten ausgehend, wäre nach Aufzeigen der hier noch hypothetisch postulierten Zusammenhänge die gezielte, genetisch basierte pharmakologische Beeinflussung von klinisch bedeutsamen Störungen des dopaminergen Systems als gemeinsame Endstrecke anzustreben. Das Ziel bestünde in einer individuellen, hochwirksamen aber nebenwirkungsarmen Pharmakotherapie psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen, bei welchen das dopaminerge System involviert ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war die funktionelle Charakterisierung häufiger Polymorphismen der *DRD2* 3'UTR auf der Basis eines Haplotyp-basierten Versuchsansatzes.

Aus dem untersuchten Probandenkollektiv konnten drei repräsentative Haplotypen isoliert, sowie deren Frequenzen bestimmt werden:

Human1 (58 Prozent), Human 2 (33 Prozent) und Human 3 (09 Prozent).

Es konnte eine spezifische Interaktion der *DRD2* 3'UTR mRNA mit Proteinen aus zytosolischen und aus nukleären neuronalen Zell- und Gewebelysaten nachgewiesen werden, die Haplotyp-spezifische Unterschiede aufweist.

Ein in Vorarbeiten postulierter Einfluss der *DRD2* 3'UTR auf die Genexpression des Rezeptors wurde mittels Reporteranalysen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Zellkultur untersucht. Es konnte ein Haplotyp-spezifisch unterschiedlich stark ausgeprägter aktivierender Effekt der *DRD2* 3'UTR auf die Translation von Reportergen nachgewiesen werden. Die stärksten Unterschiede bestanden zwischen den häufigen Haplotypen Human 1 und Human 2.

Einhergehend mit diesen Ergebnissen konnte für Human 2 eine von Human 1 und 3 abweichende Sekundärstruktur berechnet, sowie eine unterschiedliche Anzahl funktioneller, *cis*-agierender Elemente (GAIT) nachgewiesen werden.

In der Arbeit wurde somit erstmalig durch die funktionelle Untersuchung repräsentativer Haplotypen ein spezifischer Effekt der *DRD2* 3'UTR auf die Rezeptorexpression nachgewiesen. Ebenso konnte gezeigt werden, dass dieser translationsaktivierende Effekt Haplotyp-spezifische Unterschiede aufweist.

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass der Haplotyp-spezifische Einfluss auf die Proteininteraktion und Reporterexpression das kombinierte Resultat funktioneller allelischer Varianten des Dopamin D2 Rezeptor Gens darstellt.

So kann diese Arbeit als ein initialer Schritt gewertet werden, hin zu einem molekulargenetischen Erklärungsmodell komplexer Phänotypen, für die eine Assoziation mit dem dopaminergen System vermutet wird.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD (1998) RNA localization in development. *Annu Rev Biochem* 67:335-394.
- Berggren U, Fahlke C, Aronsson E, Karanti A, Eriksson M, Blennow K, Thelle D, Zetterberg H, Balldin J (2006) The Taqi Drd2 A1 Allele Is Associated with Alcohol-Dependence Although Its Effect Size Is Small. *Alcohol Alcohol*.
- Blum K, Noble EP (1994) The sobering D2 story. *Science* 265:1346-1347.
- Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, Montgomery A, Ritchie T, Jagadeeswaran P, Nogami H, Briggs AH, Cohn JB (1990) Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *Jama* 263:2055-2060.
- Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, Finley O, Montgomery A, Ritchie T, Ozkaragoz T, Fitch RJ, Sadlack F, Sheffield D, et al. (1991) Association of the A1 allele of the D2 dopamine receptor gene with severe alcoholism. *Alcohol* 8:409-416.
- Bolos AM, Dean M, Lucas-Derse S, Ramsburg M, Brown GL, Goldman D (1990) Population and pedigree studies reveal a lack of association between the dopamine D2 receptor gene and alcoholism. *Jama* 264:3156-3160.
- Bowirrat A, Oscar-Berman M (2005) Relationship between dopaminergic neurotransmission, alcoholism, and Reward Deficiency syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 132:29-37.
- Centonze D, Usiello A, Gubellini P, Pisani A, Borrelli E, Bernardi G, Calabresi P (2002) Dopamine D2 receptor-mediated inhibition of dopaminergic neurons in mice lacking D2L receptors. *Neuropsychopharmacology* 27:723-726.
- Centonze D, Gubellini P, Usiello A, Rossi S, Tscherter A, Bracci E, Erbs E, Tognazzi N, Bernardi G, Pisani A, Calabresi P, Borrelli E (2004) Differential contribution of dopamine D2S and D2L receptors in the modulation of glutamate and GABA transmission in the striatum. *Neuroscience* 129:157-166.
- Cloninger CR, Sigvardsson S, Przybeck TR, Svrakic DM (1995) Personality antecedents of alcoholism in a national area probability sample. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 245:239-244.

- Comings DE (1998) Why different rules are required for polygenic inheritance: lessons from studies of the DRD2 gene. *Alcohol* 16:61-70.
- Conne B, Stutz A, Vassalli JD (2000) The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med* 6:637-641.
- Connor JP, Young RM, Lawford BR, Ritchie TL, Noble EP (2002) D(2) dopamine receptor (DRD2) polymorphism is associated with severity of alcohol dependence. *Eur Psychiatry* 17:17-23.
- Cools AR, Gingras MA (1998) Nijmegen high and low responders to novelty: a new tool in the search after the neurobiology of drug abuse liability. *Pharmacol Biochem Behav* 60:151-159.
- Crabbe JC (2002) Genetic contributions to addiction. *Annu Rev Psychol* 53:435-462.
- Dal Toso R, Sommer B, Ewert M, Herb A, Pritchett DB, Bach A, Shivers BD, Seeburg PH (1989) The dopamine D2 receptor: two molecular forms generated by alternative splicing. *Embo J* 8:4025-4034.
- Dean M (2003) Approaches to identify genes for complex human diseases: lessons from Mendelian disorders. *Hum Mutat* 22:261-274.
- Di Chiara G (1998) A motivational learning hypothesis of the role of mesolimbic dopamine in compulsive drug use. *J Psychopharmacol* 12:54-67.
- Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 11:1475-1489.
- Drysdale CM, McGraw DW, Stack CB, Stephens JC, Judson RS, Nandabalan K, Arnold K, Ruano G, Liggett SB (2000) Complex promoter and coding region beta 2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10483-10488.
- Duan J, Antezana MA (2003a) Mammalian mutation pressure, synonymous codon choice, and mRNA degradation. *J Mol Evol* 57:694-701.
- Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, Gejman PV (2003b) Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* 12:205-216.

- Finckh U, Giraldo-Velasquez M, Pelz J, Otto G, Sander T, Schmidt LG, Rommelspacher H, Rolfs A (1996a) Dopamine D2 receptor gene (DRD2) haplotypes in Caucasians. *Gene* 179:251-255.
- Finckh U, von Widdern O, Giraldo-Velasquez M, Podschus J, Dufeu P, Sander T, Harms H, Schmidt LG, Rommelspacher H, Rolfs A (1996b) No association of the structural dopamine D2 receptor (DRD2) variant 311Cys with alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 20:528-532.
- Finckh U, Rommelspacher H, Kuhn S, Dufeu P, Otto G, Heinz A, Dettling M, Giraldo-Velasquez M, Pelz J, Graf KJ, Harms H, Sander T, Schmidt LG, Rolfs A (1997) Influence of the dopamine D2 receptor (DRD2) genotype on neuroadaptive effects of alcohol and the clinical outcome of alcoholism. *Pharmacogenetics* 7:271-281.
- Fritz DT, Jiang S, Xu J, Rogers MB (2006) A polymorphism in a conserved posttranscriptional regulatory motif alters bone morphogenetic protein 2 (BMP2) RNA:protein interactions. *Mol Endocrinol* 20:1574-1586.
- Gejman PV, Ram A, Gelernter J, Friedman E, Cao Q, Pickar D, Blum K, Noble EP, Kranzler HR, O'Malley S, et al. (1994) No structural mutation in the dopamine D2 receptor gene in alcoholism or schizophrenia. Analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Jama* 271:204-208.
- Goldman D (1993) The DRD2 dopamine receptor and the candidate gene approach in alcoholism. *Alcohol Alcohol Suppl* 2:27-29.
- Gorwood P (2000) [Contribution of genetics to the concept of risk status for alcohol dependence]. *J Soc Biol* 194:43-49.
- Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni M, Makam H, Reed L, Magenis RE, Civelli O (1989a) The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP. *Am J Hum Genet* 45:778-785.
- Grandy DK, Marchionni MA, Makam H, Stofko RE, Alfano M, Frothingham L, Fischer JB, Burke-Howie KJ, Bunzow JR, Server AC, et al. (1989b) Cloning of the cDNA and gene for a human D2 dopamine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9762-9766.
- Griseri P, Lantieri F, Puppo F, Bachetti T, Di Duca M, Ravazzolo R, Ceccherini I (2007) A common variant located in the 3'UTR of the RET gene is associated with protection from Hirschsprung disease. *Hum Mutat* 28:168-176.

- Guiramand J, Montmayeur JP, Ceraline J, Bhatia M, Borrelli E (1995) Alternative splicing of the dopamine D2 receptor directs specificity of coupling to G-proteins. *J Biol Chem* 270:7354-7358.
- Hauge XY, Grandy DK, Eubanks JH, Evans GA, Civelli O, Litt M (1991) Detection and characterization of additional DNA polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene. *Genomics* 10:527-530.
- Heinz A, Sander T, Harms H, Finckh U, Kuhn S, Dufeu P, Dettling M, Graf K, Rolfs A, Rommelspacher H, Schmidt LG (1996) Lack of allelic association of dopamine D1 and D2 (TaqIA) receptor gene polymorphisms with reduced dopaminergic sensitivity to alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 20:1109-1113.
- Hesketh J (2004) 3'-Untranslated regions are important in mRNA localization and translation: lessons from selenium and metallothionein. *Biochem Soc Trans* 32:990-993.
- Hietala J, West C, Syvalahti E, Nagren K, Lehtikoinen P, Sonninen P, Ruotsalainen U (1994) Striatal D2 dopamine receptor binding characteristics in vivo in patients with alcohol dependence. *Psychopharmacology (Berl)* 116:285-290.
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural Mechanisms of Addiction: The Role of Reward-Related Learning and Memory. *Annu Rev Neurosci*.
- Innan H, Stephan W (2001) Selection intensity against deleterious mutations in RNA secondary structures and rate of compensatory nucleotide substitutions. *Genetics* 159:389-399.
- Inoue K, Lupski JR (2003) Genetics and genomics of behavioral and psychiatric disorders. *Curr Opin Genet Dev* 13:303-309.
- Jomphe C, Tiberi M, Trudeau LE (2006) Expression of D2 receptor isoforms in cultured neurons reveals equipotent autoreceptor function. *Neuropharmacology* 50:595-605.
- Jonsson E, Brene S, Geijer T, Terenius L, Tylec A, Persson ML, Sedvall G (1996) A search for association between schizophrenia and dopamine-related alleles. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 246:297-304.
- Jonsson EG, Nothen MM, Grunhage F, Farde L, Nakashima Y, Propping P, Sedvall GC (1999) Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 4:290-296.

- Kindler S, Wang H, Richter D, Tiedge H (2005) RNA transport and local control of translation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:223-245.
- Koehnke M, Kolb W, Gaertner I (1999) Delirium in alcohol withdrawal and DRD2 and DAT1 gene polymorphisms [abstract]. *Am J Med Genet* 96:518.518.
- Koob GF, Bloom FE (1988) Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242:715-723.
- Laakso A, Pohjalainen T, Bergman J, Kajander J, Haaparanta M, Solin O, Syvalahti E, Hietala J (2005) The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene is associated with increased activity of striatal L-amino acid decarboxylase in healthy subjects. *Pharmacogenet Genomics* 15:387-391.
- Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G (1970) A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 47:69-85.
- Laine TP, Ahonen A, Torniaainen P, Heikkila J, Pyhtinen J, Rasanen P, Niemela O, Hillbom M (1999) Dopamine transporters increase in human brain after alcohol withdrawal. *Mol Psychiatry* 4:189-191, 104-185.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissoe SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.

- Lantieri F, Griseri P, Puppo F, Campus R, Martucciello G, Ravazzolo R, Devoto M, Ceccherini I (2006) Haplotypes of the human RET proto-oncogene associated with Hirschsprung disease in the Italian population derive from a single ancestral combination of alleles. *Ann Hum Genet* 70:12-26.
- Lawford BR, Young RM, Rowell JA, Gibson JN, Feeney GF, Ritchie TL, Syndulko K, Noble EP (1997) Association of the D2 dopamine receptor A1 allele with alcoholism: medical severity of alcoholism and type of controls. *Biol Psychiatry* 41:386-393.
- Lindgren N, Usiello A, Goiny M, Haycock J, Erbs E, Greengard P, Hokfelt T, Borrelli E, Fisone G (2003) Distinct roles of dopamine D2L and D2S receptor isoforms in the regulation of protein phosphorylation at presynaptic and postsynaptic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4305-4309.
- Lipshitz HD, Smibert CA (2000) Mechanisms of RNA localization and translational regulation. *Curr Opin Genet Dev* 10:476-488.
- Little KY, Zhang L, Desmond T, Frey KA, Dalack GW, Cassin BJ (1999) Striatal dopaminergic abnormalities in human cocaine users. *Am J Psychiatry* 156:238-245.
- Lucht MJ, Kuehn KU, Schroeder W, Armbruster J, Abraham G, Schattenberg A, Gaensicke M, Barnow S, Tretzel H, Herrmann FH, Freyberger HJ (2001) Influence of the dopamine D2 receptor (DRD2) exon 8 genotype on efficacy of tiapride and clinical outcome of alcohol withdrawal. *Pharmacogenetics* 11:647-653.
- Mash DC, Staley JK, Doepel FM, Young SN, Ervin FR, Palmour RM (1996) Altered dopamine transporter densities in alcohol-preferring vervet monkeys. *Neuroreport* 7:457-462.
- Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH (1999) Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 288:911-940.
- Mazumder B, Seshadri V, Fox PL (2003) Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 28:91-98.
- McCarthy JE, Kollmus H (1995) Cytoplasmic mRNA-protein interactions in eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci* 20:191-197.
- Merikangas KR (1990) The genetic epidemiology of alcoholism. *Psychol Med* 20:11-22.

- Mignone F, Grillo G, Licciulli F, Iacono M, Liuni S, Kersey PJ, Duarte J, Saccone C, Pesole G (2005) UTRdb and UTRsite: a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 33:D141-146.
- Miller GM, Madras BK (2002) Polymorphisms in the 3'-untranslated region of human and monkey dopamine transporter genes affect reporter gene expression. *Mol Psychiatry* 7:44-55.
- Montmayeur JP, Guiramand J, Borrelli E (1993) Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G-proteins. *Mol Endocrinol* 7:161-170.
- Muller P, Britton RS, Seeman P (1980) The effects of long-term ethanol on brain receptors for dopamine, acetylcholine, serotonin and noradrenaline. *Eur J Pharmacol* 65:31-37.
- Myers SJ, Huang Y, Genetta T, Dingledine R (2004) Inhibition of glutamate receptor 2 translation by a polymorphic repeat sequence in the 5'-untranslated leaders. *J Neurosci* 24:3489-3499.
- Neville MJ, Johnstone EC, Walton RT (2004) Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. *Hum Mutat* 23:540-545.
- Noble EP (1993) The D2 dopamine receptor gene: a review of association studies in alcoholism. *Behav Genet* 23:119-129.
- Noble EP (1994) Polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene and alcoholism and other substance use disorders. *Alcohol Alcohol Suppl* 2:35-43.
- Noble EP (1996) Alcoholism and the dopaminergic system: a review. *Addict Biol* 1:333-348.
- Noble EP (1998a) DRD2 gene and alcoholism. *Science* 281:1287-1288.
- Noble EP (1998b) The D2 dopamine receptor gene: a review of association studies in alcoholism and phenotypes. *Alcohol* 16:33-45.
- Noble EP (2000a) Addiction and its reward process through polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene: a review. *Eur Psychiatry* 15:79-89.
- Noble EP (2000b) The DRD2 gene in psychiatric and neurological disorders and its phenotypes. *Pharmacogenomics* 1:309-333.

- Noble EP (2003) D2 dopamine receptor gene in psychiatric and neurologic disorders and its phenotypes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 116:103-125.
- Noble EP, Blum K (1993) Alcoholism and the D2 dopamine receptor gene. *Jama* 270:1547-1548.
- Noble EP, Zhang X, Ritchie TL, Sparkes RS (2000) Haplotypes at the DRD2 locus and severe alcoholism. *Am J Med Genet* 96:622-631.
- Noble EP, Syndulko K, Fitch RJ, Ritchie T, Bohlman MC, Guth P, Sheridan PJ, Montgomery A, Heinzmann C, Sparkes RS, et al. (1994) D2 dopamine receptor TaqI A alleles in medically ill alcoholic and nonalcoholic patients. *Alcohol Alcohol* 29:729-744.
- Pesole G, Liuni S, Grillo G, Saccone C (1997) Structural and compositional features of untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Gene* 205:95-102.
- Pesole G, Grillo G, Larizza A, Liuni S (2000) The untranslated regions of eukaryotic mRNAs: structure, function, evolution and bioinformatic tools for their analysis. *Brief Bioinform* 1:236-249.
- Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S (2001) Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene* 276:73-81.
- Pesole G, Liuni S, Grillo G, Ippedico M, Larizza A, Makalowski W, Saccone C (1999) UTRdb: a specialized database of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* 27:188-191.
- Pesole G, Liuni S, Grillo G, Licciulli F, Mignone F, Gissi C, Saccone C (2002) UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Update 2002. *Nucleic Acids Res* 30:335-340.
- Plomin R (1990) The role of inheritance in behavior. *Science* 248:183-188.
- Poduslo SE, Schwankhaus J (1995) A new polymorphism in the gene for the dopamine D2 receptor. *Hum Genet* 95:603-604.
- Pohjalainen T, Rinne JO, Nagren K, Lehtikoinen P, Anttila K, Syvalahti EK, Hietala J (1998) The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 3:256-260.

- Porjesz B, Begleiter H (1998) Genetic basis of event-related potentials and their relationship to alcoholism and alcohol use. *J Clin Neurophysiol* 15:44-57.
- Rannala B (2001) Finding genes influencing susceptibility to complex diseases in the post-genome era. *Am J Pharmacogenomics* 1:203-221.
- Repo E, Kuikka JT, Bergstrom KA, Karhu J, Hiltunen J, Tiihonen J (1999) Dopamine transporter and D2-receptor density in late-onset alcoholism. *Psychopharmacology (Berl)* 147:314-318.
- Risch NJ (2000) Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 405:847-856.
- Ritchie T, Noble EP (2003) Association of seven polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene with brain receptor-binding characteristics. *Neurochem Res* 28:73-82.
- Rommelspacher H, Raeder C, Kaulen P, Bruning G (1992) Adaptive changes of dopamine-D2 receptors in rat brain following ethanol withdrawal: a quantitative autoradiographic investigation. *Alcohol* 9:355-362.
- Salamone JD (1996) The behavioral neurochemistry of motivation: methodological and conceptual issues in studies of the dynamic activity of nucleus accumbens dopamine. *J Neurosci Methods* 64:137-149.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning - A Laboratorial Manual*: Cold Spring Harbour Press, New York.
- Samochowiec J, Ladehoff M, Pelz J, Smolka M, Schmidt LG, Rommelspacher H, Finckh U (2000) Predominant influence of the 3'-region of dopamine D2 receptor gene (DRD2) on the clinical phenotype in German alcoholics. *Pharmacogenetics* 10:471-475.
- Sampath P, Mazumder B, Seshadri V, Fox PL (2003) Transcript-selective translational silencing by gamma interferon is directed by a novel structural element in the ceruloplasmin mRNA 3' untranslated region. *Mol Cell Biol* 23:1509-1519.
- Sander T, Ladehoff M, Samochowiec J, Finckh U, Rommelspacher H, Schmidt LG (1999) Lack of an allelic association between polymorphisms of the dopamine D2 receptor gene and alcohol dependence in the German population. *Alcohol Clin Exp Res* 23:578-581.

- Sander T, Harms H, Podschus J, Finckh U, Nickel B, Rolfs A, Rommelspacher H, Schmidt LG (1995) Dopamine D1, D2 and D3 receptor genes in alcohol dependence. *Psychiatr Genet* 5:171-176.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Senogles SE (1994) The D2 dopamine receptor isoforms signal through distinct Gi alpha proteins to inhibit adenylyl cyclase. A study with site-directed mutant Gi alpha proteins. *J Biol Chem* 269:23120-23127.
- Sluyster F, Hof M, Ellenbroek BA, Degen SB, Cools AR (2000) Genetic, sex, and early environmental effects on the voluntary alcohol intake in Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav* 67:801-808.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.
- Sonenberg N (1994) mRNA translation: influence of the 5' and 3' untranslated regions. *Curr Opin Genet Dev* 4:310-315.
- Spanagel R, Weiss F (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci* 22:521-527.
- Stefanovic B, Hellerbrand C, Holcik M, Briendl M, Aliebhauer S, Brenner DA (1997) Posttranscriptional regulation of collagen alpha1(I) mRNA in hepatic stellate cells. *Mol Cell Biol* 17:5201-5209.
- Styrkarsdottir U, Cazier JB, Kong A, Rolfsson O, Larsen H, Bjarnadottir E, Johannsdottir VD, Sigurdardottir MS, Bagger Y, Christiansen C, Reynisdottir I, Grant SF, Jonasson K, Frigge ML, Gulcher JR, Sigurdsson G, Stefansson K (2003) Linkage of osteoporosis to chromosome 20p12 and association to BMP2. *PLoS Biol* 1:E69.
- Suh Y, Vijg J (2005) SNP discovery in associating genetic variation with human disease phenotypes. *Mutat Res* 573:41-53.
- Swanson MS, Dreyfuss G (1988) RNA binding specificity of hnRNP proteins: a subset bind to the 3' end of introns. *Embo J* 7:3519-3529.
- Thompson J, Thomas N, Singleton A, Piggott M, Lloyd S, Perry EK, Morris CM, Perry RH, Ferrier IN, Court JA (1997) D2 dopamine receptor gene (DRD2) Taq1 A polymorphism: reduced dopamine D2 receptor

- binding in the human striatum associated with the A1 allele. *Pharmacogenetics* 7:479-484.
- Trinklein ND, Aldred SF, Hartman SJ, Schroeder DI, Otilar RP, Myers RM (2004) An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res* 14:62-66.
- Tupala E, Hall H, Mantere T, Rasanen P, Sarkioja T, Tiihonen J (2003) Dopamine receptors and transporters in the brain reward circuits of type 1 and 2 alcoholics measured with human whole hemisphere autoradiography. *Neuroimage* 19:145-155.
- Turner E, Ewing J, Shilling P, Smith TL, Irwin M, Schuckit M, Kelsoe JR (1992) Lack of association between an RFLP near the D2 dopamine receptor gene and severe alcoholism. *Biol Psychiatry* 31:285-290.
- Uhl GR, Gold LH, Risch N (1997) Genetic analyses of complex behavioral disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2785-2786.
- Usiello A, Baik JH, Rouge-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408:199-203.
- Valdes AM, Hart DJ, Jones KA, Surdulescu G, Swarbrick P, Doyle DV, Schafer AJ, Spector TD (2004) Association study of candidate genes for the prevalence and progression of knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 50:2497-2507.
- van der Velden AW, Thomas AA (1999) The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol* 31:87-106.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, et al.

- (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Hitzemann R, Ding YS, Pappas N, Shea C, Piscani K (1996) Decreases in dopamine receptors but not in dopamine transporters in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 20:1594-1598.
- Wang X, Kiledjian M, Weiss IM, Liebhaber SA (1995) Detection and characterization of a 3' untranslated region ribonucleoprotein complex associated with human alpha-globin mRNA stability. *Mol Cell Biol* 15:1769-1777.
- Wang Y, Xu R, Sasaoka T, Tonegawa S, Kung MP, Sankoorikal EB (2000) Dopamine D2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions. *J Neurosci* 20:8305-8314.
- Wightman RM, Robinson DL (2002) Transient changes in mesolimbic dopamine and their association with 'reward'. *J Neurochem* 82:721-735.
- Wilkie GS, Dickson KS, Gray NK (2003) Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci* 28:182-188.
- Wilusz CJ, Wormington M, Peltz SW (2001) The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:237-246.
- Wise RA (1987) The role of reward pathways in the development of drug dependence. *Pharmacol Ther* 35:227-263.
- Wise RA (1998) Drug-activation of brain reward pathways. *Drug Alcohol Depend* 51:13-22.
- Xu R, Hranilovic D, Fetsko LA, Bucan M, Wang Y (2002) Dopamine D2S and D2L receptors may differentially contribute to the actions of antipsychotic and psychotic agents in mice. *Mol Psychiatry* 7:1075-1082.
- Zaidi SH, Malter JS (1994) Amyloid precursor protein mRNA stability is controlled by a 29-base element in the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 269:24007-24013.
- Zhang TA, Maldve RE, Morrisett RA (2006) Coincident signaling in mesolimbic structures underlying alcohol reinforcement. *Biochem Pharmacol* 72:919-927.
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31:3406-3415.

7 APPENDIX

7.1 Firmenverzeichnis

Abcam Limited, Cambridgeshire, UK
Adobe Systems Inc, Hamburg
Agfa, Köln
Ambion Europe Ltd. Huntington, UK
Amersham Biosciences Europe GmbH, Heidelberg
Berthold Technologies, Bad Wildbach
BioRad Laboratories GmbH, München
Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Eppendorf GmbH, Hamburg
Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Fluka, Buchs, Schweiz
Hofer Scientific Instruments, San Fransisco, USA
Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Immuquest, Ingleby Banks, USA
Improvision, Coventry, UK
Macherey & Nagel GmbH & Co KG, Düren
Microcal Software Inc., Northhampton USA
Millipore GmbH, Eschborn
New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus
PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pierce Science, Bonn
Promega GmbH, Mannheim
Qiagen GmbH, Hilden
Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Santa Cruz Biotechnologie Inc, Heidelberg
Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
Strathmann, Hamburg

7.2 Bakterienstämme, Zelllinien und Tiere

<i>E.coli</i> TOP 10F	Invitrogen Life Technologies
SH-SY5Y	Humangenetik Universitätskrankenhaus Eppendorf
COS-7	Humangenetik Universitätskrankenhaus Eppendorf
HELA	Humangenetik Universitätskrankenhaus Eppendorf
KELLY	Humangenetik Universitätskrankenhaus Eppendorf
HEK293	Humangenetik Universitätskrankenhaus Eppendorf
<i>Mus musculus</i>	Tierzucht Universitätskrankenhaus Eppendorf

7.3 Vektoren

7.3.1 Basisvektoren

Im Folgenden sind kommerziell erhältliche Basisvektoren aufgeführt, die in dieser Arbeit für die Herstellung neuer Konstrukte eingesetzt wurden. Plasmide, die von anderen Arbeitsgruppen freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, sind ebenfalls aufgelistet.

Bezeichnung	Verwendungszweck
	Herkunft
pCR2.1.Topo	Klonierung von PCR-Produkten zur Subklonierung in geeignete Vektoren
	Invitrogen Life Technologies
pBicfire-EMCV	Expression von Fusionsproteinen mit Photinus-Luziferase und Renilla-Luziferase in eukaryotischen Zellen zur Verwendung in <i>Dual Luziferase Assays</i>
	John Chua (Institut für Humangenetik, Hamburg)
pBlaulich	Expression von Fusionsproteinen mit Photinus-Luziferase zur Verwendung in Retikulozytenlysaten
	Dr. Kreienkamp (Institut für Humangenetik, Hamburg)

7.3.2 Konstruierte Plasmide

Aufgeführt sind bakterielle Klonierungsplasmide und eukaryotische Expressionsplasmide, die während der Doktorarbeit hergestellt und verwendet wurden. Aufgelistet sind die Bezeichnung, der enthaltene Sequenzbereich mit der GenBank-Zugriffsnummer (Accession-Nr. in NCBI) der inserierten Sequenzen, sowie die dafür verwendeten Oligonukleotide. (www.ncbi.nlm.nih.gov)

a) Prokaryotische Klonierungsvektoren:

Bezeichnung	Accession-Nr. cDNA-Bereich	Oligonukleotide
pCR2.1 D2M1F_4IR	NM_000795 Nt 1445-2612	D2E8M1F D2E8M4IR
pCR2.1 D2COMPF_R	NM_000795 Nt 1490-2269	D2E8COMPF D2E8COMPR
pCR2.1 D2M1F_M3R	NM_000795 Nt 1445-2319	D2E8M1F D2E8M3R
pCR2.1 COMPF_I7E8R	NM_000795 Nt 1490-1657	D2E8COMPF D2I7E8R
pCR2.1 D2SSCF_R	NM_000795 Nt 1797-1955	D2E8SSCF D2E8SSCR
pCR2.1 D2E8KF_M3R	NM_000795 Nt 2130-2319	D2E8KF D2E8M3R

b) Eukaryotische Expressionvektoren:

Bezeichnung	Originalvektor	Accession-Nr. cDNA-Bereich	Oligonukleotide
pD2Blue	pBlaulich	NM_000795 Nt 1445-2612	D2E8M1F D2E8M4IR
pBicDope	pBicfire-EMCV	NM_000795 Nt 1445-2612	D2E8M1F D2E8M4IR

7.4 Oligonukleotide

7.4.1 DNA-Oligonukleotide

Die verwendeten DNA-Oligonukleotide wurden kommerziell von den Firmen MWG-Biotech AG im Maßstab 0.01 μmol hergestellt und HPSF aufgereinigt sowie von Sigma-Genosys im Maßstab von 0.025 μmol hergestellt und durch den Hersteller im Standardverfahren entsalzt.

BEZEICHNUNG	SEQUENZ
D2E8M1F	CCACCTTCAACATTGAGTTCCGCA
D2E8M1R	GGATAGGGGGACTGGAGGTGGGAG
D2E8M2F	CCCCCAGCTCAGGGGCAGCTCATA
D2E8M2R	CTAGCCTGGAAAGTAGAGGTCCAC
D2E8M3F	AGACTGCAGGTTGGACCCCAGAGA
D2E8M3R	CCCAGATAGAGTTCCAGGGCCTGA
D2E8M4F	GGCCAGCCTGGGGCCTGGCAGGGA
D2E8M4IR	AGGTGACTCGTCAAAGTTTTATTA
D2E8M4R	ACTGCTGCCTTCTACCCAGGGGTC
D2E8COMPF	ACTGCTGACTCTGCTGCCTG
D2E8COMPR	GCATGTGCTGTGAGAAGGGA
DRD2_E8SSCF	AGCCGCCTTCCTTGACCTTC
DRD2_E8SSCR	AGCTTGCTTGCTCCTGTGG
D2E8KF	GTGGTTTCCACATGCTCTGAGAAG
DRD2_E8TXLF	AGTGTTGCTTGGCTCCATGCTCCT
DRD2_E8TXLR	ACCACTTGGGGAGCTGTAACGGGGT
E8YM1R	GGGCCCTGACTCAGGCTCCAGCAAC
D2E7F1	CAGCACCAGCCCACCCGAGA
D2E7R1	CAGCAGCCAGGGCCGACTCA
DRD2_E8YCSF	AGCTCATAGAGTCCC
DRD2_E8YCSR	TGGAGGTGGGAGGGG
DRD2_E8YTSF	AGCTCATAGAGTCCT
DRD2_E8YTSR	TGGAGGTGGGAGGGA
D2_22521Y_F	TTCGCTTGGCTCCATGCTCCTCACT
D2_22521Y_R	AGAGCCCCAGAGGAAGGTCAAGGAA

7.4.2 RNA-Oligonukleotide

Die folgenden RNA-Oligonukleotide wurden kommerziell von der Firma Eurogentec im Synthesemaßstab von 0.2 µmol hergestellt und laut Herstellerangaben entsalzt und entschützt. Am 3´- Ende wurden sie mit 2 Desoxyribonukleotiden ergänzt und durch Biotinylierung modifiziert.

Die lyophilisiert gelieferten Nukleotide wurden mit Nuklease-freiem Wasser (Eurogentec) auf 2 Arbeitsstocks in den Konzentrationen 500 pmol/µl und 50 pmol/µl verdünnt, welche permanent bei -20°C bzw. -80°C gelagert wurden.

BEZEICHNUNG	SEQUENZ
D2RNAE8A	CACCUCCCUGCCCAGGCCA GCCAGCCUCACCU(UG)-Biotin
D2RNAE8G	CACCUCCCUGCCCAGGCCG GCCAGCCUCACCU(UG)-Biotin
D2RNAE8ARC	AGGGUGAGGCUGGCUGGCCUGGGCAGGGAGGUG(AC)-Biotin
D2RNAYM1C	GGGGCAGCUCAUAGAGUCC CCCUCCCACCU(CC)-Biotin
D2 RNAYM1T	GGGGCAGCUCAUAGAGUCC UCCCUCCCACCU(CC)-Biotin
D2RNASSCPC	GAGGCUGAGUUUUCU UUUGUGGGGCUUGG(CG)-Biotin
D2RNASSCPG	GAGGCUGAGUUUUCU UUUGUGGGGCUUGG(CG)-Biotin

7.5 Einzelnukleotidaustausch-Polymorphismen der *DRD2* 3'UTR

7.5.1 Nicht in refSNP notierte Polymorphismen

Es existieren drei bekannte seltene Polymorphismen, welche nicht in NCBI Single Nucleotide Polymorphism Reference SNP (refSNP) erfasst sind, jedoch in der Referenzsequenz NCBI Gene Accession number Ref AF050737 als solche gekennzeichnet sind. Aufgeführt sind die Position in der Referenz - sowie in der Contig-Sequenz (NCBI Gene Accession NT_033899.7), die Position auf Chromosom 11 und die allelische Variante in der Contig-Sequenz entsprechend 7.5.2, sowie die flankierenden Sequenzbereiche. (S, G+C; R, A+G).

REFERENCE SEQUENCE	REFERENCE POSITION	CONTIG POSITION	CHROMOSOME POSITION	CONTIG ALLELE
AF050737	22741	16843388	112786182	G
CCGAGGAGCCAGS SCAACTTCAGTCC				
AF050737	22807	16843322	112786126	C
GAGATTCCCAAGS SCAAAAACCTTAG				
AF050737	22829	16843300	112786094	G
TAGCTCCCTCCC R CACCCCGATGTG				

7.5.2 NCBI Reference SNP (refSNP)

Aufgelistet sind die Reference-Ids der bekannten Einzelnukleotidaustauschpolymorphismen innerhalb der 3'UTR des humanen Dopamin D2 Rezeptorgens, die NCBI Gene Accession number der Contig-Sequenz, die Position innerhalb der Contig-Sequenz sowie auf Chromosom 11 und die in der Contig-Sequenz beschriebene allelische Variante mit flankierenden Sequenzbereichen. (K, G+T; S, G+C; R, A+G; M, C+A).

Die häufigen Polymorphismen, * K , ** SSCP, *** E8 A/G, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, sind hervorgehoben.

REFSNP ID	CONTIG ACCESSION	CONTIG POSITION	CHROMOSOME POSITION	CONTIG ALLELE
rs6273	NT_033899.7	16842939	112785733	C
TTCCTCTCTCCTKTTTCCCTTCCCT				
rs6278 *	NT_033899.7	16843140	112785934	C
CTAGCCCACCCTKCTGCCTTCTGAC				
rs1130354	NT_033899.7	16843336	112786130	G
CAGGTTGGACCCSAGAGATTCCCAA				
rs6274	NT_033899.7	16843344	112786138	A
CCAGACTGCAGGKTGGACCCAGAG				
rs6279 **	NT_033899.7	16843489	112786283	G
GCTGAGTTTTCTSTTTGTGGGGCTTGG				
rs9282672	NT_033899.7	16843774	112786568	C
GCAGGAAGGCCTRGGTGGATCGGCC				
rs6276 ***	NT_033899.7	16843813	112786607	C
CTCCCTGCCAGGCCRGCCAGCCTCACCT				
rs9282673	NT_033899.7	16843828	112786622	G
AGCCTGCTTCCCACMTCCCTGCCAGGCC				

7.6 Danksagung

Ich danke von ganzem Herzen meinen Eltern, Christiane und Kurt Rein für ihre liebevolle und tatkräftige Unterstützung die sie mir, nicht nur während der Entstehung dieser Arbeit, geschenkt haben. Durch Ihre großzügige Hilfe war die Durchführung meines Medizinstudiums und der dazu parallel entstandenen vorliegenden Arbeit überhaupt erst möglich geworden. Ebenso danke ich meinen Geschwistern, Dorothea und Christoph Rein sowie meinen Freunden, die mich auch in schweren Zeiten nie im Stich gelassen haben und mir treue Wegbegleiter in meinem Leben waren und auch in Zukunft sein werden.

Besonderer Dank gilt Dr. Ulrich Finckh für die Möglichkeit wissenschaftliches Arbeiten bei ihm erlernen zu dürfen und für die gute Betreuung der Arbeit. Auch den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Finckh danke ich für das immer freundliche und persönliche Verhältnis.

Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp und Dr. Peter Iglauer aus der befreundeten AG Kreienkamp sowie Dr. Monika Rehbein und die Mitglieder der AG Kindler haben durch ihre profunden Kenntnisse auf dem Gebiet der RNA-Protein-Interaktion sowie *der in vitro-* und *in vivo-*Gen-Expression wichtige Beiträge zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

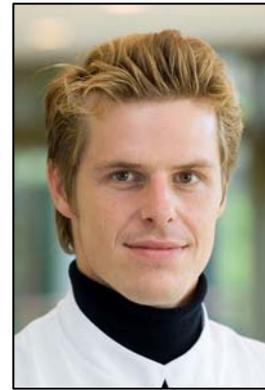
Ebenso danke ich den Mitgliedern der AG Hübner dafür, dass ich bei komplizierten Fragestellungen jederzeit konstruktiven Rat von ihnen einholen konnte.

Ich danke auch Prof. Dr. Andreas Gal für die großzügige materielle Unterstützung sowie den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz im Institut für Humangenetik, an dem diese Arbeit entstanden ist.

7.7 Curriculum vitae

MARTIN LUDWIG REIN

BERGSTRASSE 55 , D-69120 HEIDELBERG
 TEL 06221/890396
 EMAIL reinmartin@med.uni-heidelberg.de



PERSÖNLICHE ANGABEN

GEB.: 05.06.1977 IN MÜNCHEN

STAATSANGEHÖRIGKEIT: DEUTSCH / FAMILIENSTAND: LEDIG

ELTERN: DR. PHIL. CHRISTIANE REIN / PROF. DR. PHIL. KURT REIN

AUSBILDUNG / BERUFLICHER WERDEGANG

1987 – 1996	GYMNASIUM VATERSTETTEN
1994	JUNIOR HIGHSCHOOL, LAWRENCE KANSAS, USA
1996	ABITUR (NOTE 2,5) / MEDIZINERTEST (PROZENTRANG 95,5)
1996 – 1997	ZIVILLDIENST : INTENSIVPFLEGE DSG VATERSTETTEN
1997 – 1999	VORKLINIK AN DER UNIVERSITÄT ROSTOCK
2000 – 2001	STUDIUM AN DER UNIVERSITÄT HEIDELBERG
2001 – 2005	STUDIUM AN DER UNIVERSITÄT HAMBURG
2004	PRAKTISCHES JAHR (05/04 – 05/05)
2005	3. TEIL DER ÄRZTLICHEN PRÜFUNG (GESAMTNOTE GUT)
SEIT 2006	ASSISTENZARZT AN DER NEUROLOGISCHEN KLINIK DES UNIVERSITÄTSKLINIKUMS HEIDELBERG

PRAKTISCHES JAHR

INNERE MEDIZIN	HÄMATOLOGISCHE ONKOLOGIE / KARDIOLOGIE UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG EPPENDORF
CHIRURGIE	NEURO - / VISCERAL - / ONKOLOGISCHE CHIRURGIE HOSPITAL DE CLINICAS UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES HOSPITAL BOCALANDRO BUENOS AIRES ARGENTINA
NEUROLOGIE	NEUROLOGISCHE INTENSIVSTATION / NEUROLOGIE UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG EPPENDORF KLINIKUM ST. GEORG HAMBURG

WISSENSCHAFT

DISSERTATION: 2003-2006	FUNKTIONELLE ANALYSE DER 3' UNTRANSLATIERTEN REGION DES DOPAMIN D2 REZEPTOR GENS INSTITUT FÜR HUMANGENETIK, UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG - INSTITUTSLEITER: PROF. DR. ANDREAS GAL
2003	MOLEKULARBIOLOGISCHES PRAKTIKUM IN DER AG KUHL ZENTRUM FÜR MOLEKULARE NEUROBIOLOGIE HAMBURG
2004	EUROPEAN HUMAN GENETICS CONFERENCE (MÜNCHEN) POSTERPRÄSENTATION
2005	STUDENTISCHE, WISSENSCHAFTLICHE HILFSKRAFT AM SFB 444 GRUNDLAGEN NEURONALER KOMMUNIKATION UND SIGNALVERARBEITUNG - INSTITUT FÜR HUMANGENETIK, UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG
2006	VORTRAG BEI DER JAHRESTAGUNG DER DEUTSCHEN GE- SELLSCHAFT FÜR NEUROGENETIK (ROSTOCK)

QUALIFIKATIONEN

KLINIK	GRUNDLAGEN DER NEUROLOGISCHEN SONOLOGIE / INTENSIVMEDIZIN
LABOR	MOLEKULARBIOLOGIE (DNA / RNA), PROTEINBIOCHEMIE, ZELLKULTUR
SPRACHEN	ENGLISCH UND SPANISCH FLIEBEND IN SPRECHEN, LESEN UND SCHREIBEN, PORTUGIESISCH

WAS MIR AUSSER MEDIZIN AM HERZEN LIEGT

KULTURELL	MUSIKBEGEISTERUNG, VOR ALLEM FÜR JAZZ KUNST, CINEASTIK, LITERATUR
REISEN	ERLEBNIS MENSCHLICHER BEZIEHUNGEN, KULTURELLE BEREICHERUNG UND INTERKULTURELLER AUSTAUSCH
SPORT	WELLENREITEN, SCHWIMMEN, FUßBALLSPIELEN, SCHACH
UND BESONDERS	PFLEGE MEINER PERSÖNLICHEN BEZIEHUNGEN ZU MEINER FAMILIE UND MEINEN FREUNDEN

7.8 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferne versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Heidelberg, im Mai 2007