

Aus der Abteilung für Virologie
Fachrichtung Mikrobiologie und Hygiene
Bereich der Klinischen Medizin der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: PROF. DR. MÜLLER-LANTSCH

**Biochemische Charakterisierung der DiGeorge Critical
Region 6 Proteine und Expressionsstudie in
Gehirngewebe schizophreniekranker Menschen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von
MATTHIAS FRIEDEMANN DÜRR
aus Reutlingen

2007

Dem lebendigen Gott
und
meinen Eltern

Zusammenfassung

Deletionen auf dem Chromosom 22q11 zeigen eine Vielfalt an Entwicklungsdefekten, die unter den Namen DiGeorge-Syndrom, velokardiofaziales Syndrom, conotruncal face anomaly Syndrome, Cayler-Syndrom und dem Sedlackova-Syndrom bekannt geworden sind und nun zum 22q11-Deletionssyndrom zusammengefasst werden konnten (ROBIN et al., 2005; SHPRINTZEN, 2005). Eines der Kandidatengene in den deletierten Genombereichen ist das DiGeorge Critical Region 6 Gen (DGCR6) (Demczuk et al., 1996).

Ziel dieser Arbeit war es, zuerst eine biochemische Charakterisierung der Proteine DGCR6 / DGCR6L durchzuführen, anschließend die Organexpression der Proteine in Mensch- und Kaninchengewebe zu untersuchen und abschließend die Expression in Schizophrenie-vs. Normalgehirngewebe zu analysieren.

Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung konnte eine Phosphorylierung als Ursache des unterschiedlichen Laufverhaltens der beiden Proteine in der Gelelektrophorese ausgeschlossen werden. Somit handelt es sich bei den im Western Blot beobachteten Banden sehr wahrscheinlich um die beiden Proteine DGCR6 und DGCR6L. Die Halbwertszeit der Proteine beträgt 2,5 Stunden.

Bei der Analyse eines käuflich erhältlichen humanen Gewebeblots zeigte sich eine starke Expression in Leber, Herzmuskel und Skelettmuskel, eine schwache Expression auch im Gehirngewebe. Im Vergleich dazu zeigte sich in Kaninchengewebe auch eine starke Expression im Herzmuskel, jedoch eine sehr geringe Expression im Skelettmuskel. Eine starke Expression der DGCR6-Proteine in Ovarialgewebe könnte auf eine mögliche Beteiligung der Proteine in der Embryogenese hinweisen.

Aufgrund der Assoziation des 22q11-Deletionssyndroms mit der Schizophrenie wurde Normalgehirngewebe mit Gehirngewebe von an Schizophrenie erkrankten Menschen verglichen. Bei insgesamt 18 Patienten mit Proben aus jeweils 4 Gehirnarealen konnten die DGCR6-Proteine nachgewiesen werden, allerdings wurden keine Unterschiede in der DGCR6/L-Proteinmenge zwischen Proben aus Gesunden und Schizophreniepatienten festgestellt. Auffällig zeigte sich eine sehr starke Expression der DGCR6-Proteine im Kleinhirn sowohl bei erkranktem als auch bei gesundem Gehirngewebe. Eine Quantifizierung erbrachte geringe Mengen an DGCR6 / DGCR6L im Großhirn, eine verstärkte Expression in Gehirntumoren und sehr hohe Menge im Kleinhirn.

Summary

Biochemical characterisation of DiGeorge Critical Region 6 proteins and expression study in brain tissue of schizophrenic patients

Deletions on chromosomal region 22q11 show a wide variability in developmental defects. Recently, DiGeorge syndrome, velocardiofacial syndrome, conotruncal face anomaly syndrome, Cayler Syndrome and Sedlackova syndrome were combined in the novel “22q11-deletion syndrome” (ROBIN et al., 2005; SHPRINTZEN, 2005). One of the candidate genes in this chromosomal region is the DiGeorge critical region 6 gene (Demczuk et al., 1996). Two closely related copies called DGCR6 and DGCR6L which probably arose from a gene duplication exist within close distance on 22q11.

Using newly generated monoclonal antibodies against DGCR6, a biochemical characterisation of the proteins encoded by the DGCR6 and DGCR6L genes was carried out followed by an analysis of the expression of the protein(s) in human and rabbit tissue. The proteins were essentially present in all tissues and cell lines tested. We generally found higher levels in tumour cell lines than in primary tissues. The two proteins are very closely related in that only seven of the 220 aa are different between the two alleles. Nevertheless, we observed a slightly different migration behaviour in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Both proteins are phosphorylated but the difference in migration pattern in gel electrophoresis was shown not to be due to phosphorylation. The half life was about 2.5h.

Analysing a commercial available human tissue blot, a high expression of DGCR6 protein was detected in liver, heart and skeletal muscle with a low level observed in brain tissue. We also analysed the expression of the DGRC6 proteins in rabbit tissue and found high expression in heart (as was observed in human heart). In contrast, rabbit skeletal muscle contained a low amount of protein while the corresponding human tissue had higher amount of the protein(s). The high level in ovarial tissue may contribute to an already known involvement of DGCR6 during embryogenesis.

An association of the 22q11-deletion syndrome with schizophrenia had previously been shown. Therefore, levels of expression in schizophrenia and normal human brain tissue

was monitored. Tissue of patients with schizophrenia was analysed and compared with normal brain tissue. DGCR6/L proteins could be detected in a total of 18 different patient samples. We analysed the expression levels in forebrain (Brodman areas 11, 22, 46) and cerebellum. A significant difference between schizophrenic and normal brain tissue could not be shown. However, a surprisingly high expression level of DGCR6/L was detected in cerebellum, both in schizophrenic and normal brain tissue. The amount of DGCR6 in cerebellum was comparable to the levels seen in tumour cells.

INHALTSVERZEICHNIS

1.1 ZUSAMMENFASSUNG	1
1.2 SUMMARY	2
1.3 INHALTSVERZEICHNIS	4
2 EINLEITUNG	7
<hr/>	
2.1 Das Epstein-Barr Virus	8
2.1.1 Allgemeines	8
2.1.2 Genom und Kernproteine	9
2.2 Das DiGeorge-Syndrom / Velokardiofaziales Syndrom	11
2.2.1 Geschichtliches / Nomenklatur	11
2.2.2 Pathogenese/ Diagnostik	12
2.2.3 Das DiGeorge Critical Region 6 Gen	14
2.3 Das DiGeorge-Syndrom und die Schizophrenie	15
2.4 Zielsetzung der Arbeit	18
3 MATERIAL & METHODEN	19
<hr/>	
3.1 Material	20
3.1.1 Chemikalien, Membranen, Filter	20
3.1.2 Puffer & Lösungen	22
3.1.3 Kulturmedien	24
3.1.4 Zelllinien	25
3.1.5 Antikörper	25
3.1.6 Effektorplasmide	26
3.1.7 Molekulargewichtsmarker	27
3.1.8 Computer-Software	27
3.1.9 verwendete Laborgeräte	27
3.2 Methoden	28
<hr/>	
3.2.1 Haltung von Zellen	29
3.2.1.1 HeLa-Zellen	29
3.2.1.2 Primäre Fibroblasten	29

3.2.2	Passagieren von Zellen	29
3.2.3	Transfektion von Zelllinien	30
3.2.4	Proteinsynthese-Hemmung mit Cycloheximid	30
3.2.4.1	Cycloheximid	30
3.2.4.2	Das Prinzip	31
3.2.4.3	Durchführung der Cycloheximid-Inhibition	31
3.2.5	Gewebe-Asservation & Aufbereitung	32
3.2.5.1	Kaninchen	32
3.2.5.2	Gehirngewebe	33
3.2.5.3	Maus	33
3.2.6	Der Western Blot	34
3.2.6.1	Extinktions-Messung der Extrakte	34
3.2.6.2	Gelelektrophorese	35
3.2.6.2.1	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels	36
3.2.6.2.2	Auftragen der Extrakte	36
3.2.6.3	Der Proteintransfer	37
3.2.6.4.1	Ponseau S-/ Amidoschwarz-Färbung	37
3.2.6.4.2	Blocken in PBS-Milch	37
3.2.6.5	Immundetektion	38
3.2.6.5.1	Primär-/ Sekundär-Antikörper	38
3.2.6.5.2	Chemilumineszenz	39
3.2.6.5.3	Quantifizierung der Banden	39
3.2.6.6	Strippen eines Western Blots	40
 4 ERGEBNISSE		 41
<hr/>		
4.1	Grundlagen	42
4.2	Einfluss des Zellmetabolismus auf die DGCR6/L-Proteinexpression	43
4.3	DGCR6 ist ein Phosphoprotein	44
4.4	Halbwertszeitbestimmung der DGCR6/L-Proteine	47
4.4.1	In HeLa-Zellen	47
4.4.2	In primären Fibroblasten	48
4.5	Das DGCR6/L-Protein in Gehirngewebe schizophrener Menschen	50
4.5.1	Vergleich der Gehirngewebe von gesunden und schizophrener Menschen	50
4.5.1.1	Gegenüberstellung des Brodmann-11-Areals	50

4.5.1.2 Einfluss der Post Mortem-Zeit auf die DGCR6/L-Expression	52
4.5.3 Vergleich unterschiedlicher Gehirnregionen / Kleinhirn	54
4.5.4 Nachweis der DGCR6/L-Expression in Tumorgewebe	57
4.6 Unterschiedliche Gewebeexpression der DGCR6 / DGCR6L-Proteine	58
4.6.1 Mensch	58
4.6.2 Kaninchen	59
4.6.3 Maus	61
5 DISKUSSION	62
<hr/>	
5.1 DGCR6 / DGCR6L - Überblick	63
5.1.2 Phosphorylierung	63
5.1.3 Gewebeexpression	64
5.1.4 Funktion des DGCR6 / DGCR6L	65
5.1.4.1 Die Signifikanz der beiden funktionellen DGCR6 Gene	65
5.1.4.2 Biochemische Charakterisierung der beiden DGCR6 Proteine	66
5.1.4.3 Die DGCR6 Gene/Proteine in der Embryologie	67
5.1.4.4 Assoziation der DGCR6 / DGCR6L Proteine mit Tumorentstehung	68
5.2 Das DiGeorgesyndrom und die Schizophrenie	68
5.2.1 Bisherige Ansätze der Schizophrenie-Forschung	68
5.2.2 Die Assoziation mit dem 22q11-Lokus	69
5.2.3 Expression der DGCR6 Proteine im Gehirngewebe	70
5.2.4 Die DGCR6/L-Proteine im Kleinhirn	71
5.2.5 Die DGCR6/L-Proteine im Tumorgewebe	73
5.3 Zusammenfassung und Ausblick	73
6 LITERATURVERZEICHNIS	75
7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	96
8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	97
9 PUBLIKATIONEN	98
10 DANK	99
11 LEBENSLAUF	100

2 EINLEITUNG

2.1 Das Epstein-Barr Virus	8
2.1.1 Allgemeines	8
2.1.2 Genom und Kernproteine	9
2.2 Das DiGeorge-Syndrom / Velokardiofaziales Syndrom	11
2.2.1 Geschichtliches / Nomenklatur	11
2.2.2 Pathogenese/ Diagnostik	12
2.2.3 Das DiGeorge Critical Region 6 Gen	14
2.3 Das DiGeorge-Syndrom und die Schizophrenie	15
2.4 Zielsetzung der Arbeit	18

2.1 Das Epstein-Barr Virus

2.1.1 Allgemeines

Im Gegensatz zu Bakterien haben Viren nicht die Fähigkeit, sich allein zu vermehren. Ihnen fehlen die zur Replikation notwendigen Enzyme und Organellen und sind somit zur Produktion der viruseigenen Proteine auf eine fremde Zelle angewiesen. In Abhängigkeit vom Virustyp enthalten sie als genetische Information RNA oder DNA und liegen als Nukleinsäuren im Einzel- oder Doppelstrang vor. Ein aus viralem Protein bestehendes Kapsid schützt das Genom und eine lipidhaltige Hülle (Envelope) umgibt sie (bei komplexen Virionen). Häufig sind virale Glykoproteine in die Virushülle eingelagert (Spikes), die für die Infektiosität eine Rolle spielen.

Das Epstein-Barr Virus wurde im Jahre 1964 von den Forschern Tony Epstein, Budd Achong und Yvonne Barr entdeckt. Sie konnten das Virus elektronenmikroskopisch in Burkitt-Lymphomzellen nachweisen (EPSTEIN et al., 1964).

Das in seiner Gattung einzige humanpathogene Virus der Lymphocryptoviridae gehört zur Familie der γ -Herpesviridae. Eine doppelsträngige lineare DNA mit 172 kbp misst das Virus und wird von einem ikosaedrischen Nukleokapsid von 100-110nm Durchmesser umgeben (REVIEW BAUMFORTH et al., 1999). Das Tegument, das mehrere Virusproteine enthält, und das Envelope, welches Spikes beinhaltet, umschließen es von außen (ROIZMAN, 1990; RICKINSON et al., 1996). Man unterscheidet zwei EBV-Typen (Typ 1 und Typ 2), welche sich durch Variationen in den primären Aminosäuresequenzen der EBV-Kernantigene EBNA 2, -3A, -3B und -3C auszeichnen (SAMPLE et al., 1990). Dabei dominiert der Typ 1 in den westlichen Industrienationen (ZIMBER et al., 1986).

Weltweit sind ca. 95% der Erwachsenen seropositiv für das Virus und bleiben lebenslange Träger des Virus (REVIEW BAUMFORTH et al., 1999). Die Übertragung erfolgt durch die Speichelflüssigkeit (GERBER et al., 1972). Im frühen Erwachsenenalter führt die Primärinfektion mit dem Virus in 50% der Fälle zum klinischen Bild der Infektiösen Mononukleose (HENLE et al., 1968; KIEFF, 1996) mit Halsschmerzen, Fieber, Lymphknotenschwellung und leichter Hepatitis.

Das große Interesse an der Erforschung der γ -Herpesviren ist auf deren Assoziation mit Zellproliferation und Tumorentstehung zurückzuführen. Das EBV ist assoziiert mit lymphoproliferativen Erkrankungen (durch Immunsuppression ausgelöst), dem Burkitt's Lymphom, mit dem M. Hodgkin und bestimmten Non-Hodgkin-T-Zell-lymphomen, mit dem Nasopharyngealen Karzinom und mit diesem Karzinom ähnlichen Tumoren in Thymus, Tonsillen, Lunge, Magen, Haut und der Cervix uteri. Als Cofaktor der Tumorentstehung wird das EBV in einer Gruppe der Mamma-Karzinome und in primären Lebertumoren kontrovers diskutiert (REVIEW BAUMFORTH et al., 1999; HERRMANN und NIEDOBITEK, 2003).

2.1.2 Genom und Kernproteine

Das EBV-Genom wurde als erstes Herpesvirusgenom vollständig sequenziert (SKARE & STROMINGER et al., 1980; ARRAND et al., 1981; POLACK et al., 1984). Es liegt im Nukleokapsid des Virions als lineare doppelsträngige DNA vor (BAER et al., 1984). Für die zirkuläre Anordnung des Genoms in latentem Zustand sind die terminalen Sequenzwiederholungen essentiell (KINTNER et al., 1979).

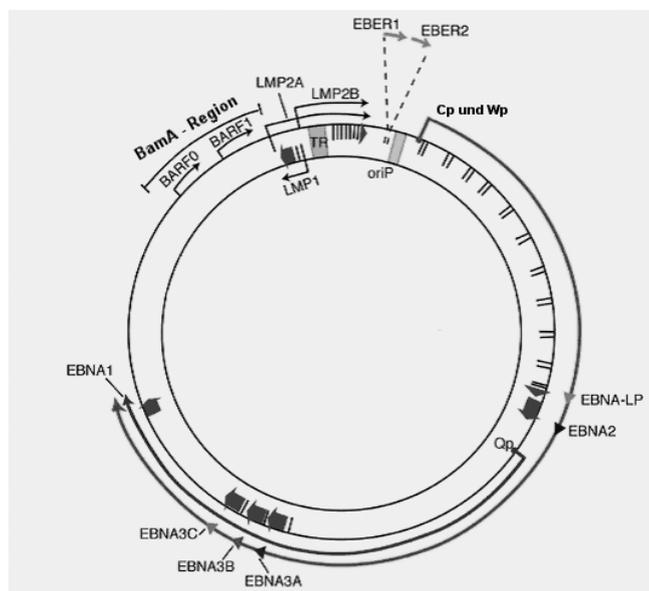


Abb. 1.1: das Epstein-Barr Virus Genom; gezeigt werden die Lokalisation und die Transkription der latenten EBV Gene auf dem doppelsträngigen viralen DNA-Episom; oriP: Ursprung der Plasmid-Transskription; markiert sind die E
 xone der Kernantigene EBNA 1, 2, 3a, 3b, 3c, EBNA-LP und die Promotoren Cp und Wp; die Transkriptionsrichtung ist aus dem Schema zu entnehmen (modifiziert nach MURRAY et al., 2001).

Über elf Gene können während der latenten Phase des Virus exprimiert werden und mehrere dieser Gene sind am Prozess der Transformation beteiligt (REVIEW BORNKAMM und HAMMERSCHIDT, 2001). Von besonderem Interesse sind in der vorliegenden Arbeit die Kernproteine EBNA2, EBNA3c und das LMP1, die im Folgendem kurz erläutert werden.

EBNA2 wird im Rahmen einer EBV-Infektion als erstes der viralen Gene exprimiert (ROONEY et al., 1989). Als Transkriptionsfaktor ist es in der Lage, virale (LMP1+2) und zelluläre Gene (CD21, CD23, c-fgr) anzuschalten (ABBOT et al., 1990; WANG et al., 1987; Wang et al., 1990). Es ist essentiell für die Etablierung der Latenz und die Immortalisierung von B-Zellen (COHEN et al., 1989; HAMMERSCHMIDT et al., 1989). Die Bindung von EBNA2 an die DNA erfolgt indirekt über eine Kooperation mit zellulären Faktoren, z.B. das RBPJ κ (recombinaton signal binding protein J κ) (ZIMBER STROBL et al., 1993). Die Interaktion von RBPJ κ und EBNA2 ist notwendig, jedoch nicht ausreichend für die Genexpression (MEITINGER et al., 1994). Bei der Suche nach Interaktionspartnern von EBNA2 und EBNA3c wurde das DGCR6-Protein als potentieller Bindungspartner sowohl von EBNA2 als auch EBNA3c gefunden (F.A.GRÄSSER, unveröffentlicht).

EBNA3a, 3b, 3c sind zueinander stark homologe Kernproteine und im Kern latent infizierter Zellen lokalisiert. Nur EBNA3a und EBNA3c sind für die Transformation durch das EBV notwendig (TOMKINSON et al., 1993). EBNA3b ist hoch immunogen und stellt eines der Hauptziele zytotoxischer T-Zellen dar (RICKINSON et al., 1997). EBNA3c supprimiert die antimetastatische Funktion des Nm23-H1 und scheint so die Metastasierung von EBV-positiven Tumoren zu begünstigen (SUBRAMANIAN et al., 2002).

LMP1 ist ein Zellmembranprotein und hat die Fähigkeit, Fibroblastenzelllinien in Nagetieren zu transformieren (WANG et al., 1985). LMP1 bewirkt den Verlust der Kontaktinhibition in Rat-1-Zellen, weiter den Verlust der zuvor bestehenden Bodenhaftung von Rat-1-Zellen und BALB/c 3T3-Zellen (BAICHWAL et al., 1988). Es wurde gezeigt, dass LMP1 die Apoptose von B-Zellen unterdrückt, indem es antiapoptotische Proteine (z.B. BCL-2, MCL-1, A20) hemmt (GREGORY et al., 1991; HENDERSON et al., 1991; LAHERTY et al., 1992). Weiter induziert es die Produktion

von IL-6 und IL-10 (ELIOPOULOS et al., 1997; NAKAGOMI et al., 1994) und beeinflusst mindestens vier Signaltransduktionswege innerhalb der Zelle: Aktivierung des nukleären Faktor κ B (NF- κ B), der c-Jun N-terminal-Kinase (JNK)-AP-1, der p38/MAPK (mitogen aktivierte Proteinkinase) und der Janus-Kinase (JAK)-STAT (signal transducers and activators of transcription) (HUEN et al., 1995; ELIOPOULOS et al., 1998; ELIOPOULOS et al., 1999; GIRES et al., 1999).

2.2 Das DiGeorge-Syndrom / Velokardiofaziales Syndrom

2.2.1 Geschichtliches / Nomenklatur

Der amerikanische Kinderarzt Angelo DiGeorge erkannte 1968 einen kausalen Zusammenhang zwischen einer Thymusfehlbildung und einem zellulären Immundefekt (KIRKPATRICK, 1968; GREENBERG, 1993). Diese Fehlbildungskombination erhielt 1969 den Namen DiGeorge-Syndrom (DODSON et al., 1969). Mit in das Syndrom aufgenommen wurden angeborene Herzfehler und Gesichtsdysmorphien (GOLDMUNTZ et al., 1998). Ätiologisch bedeutsam waren genetische Untersuchungen an vier Kindern, die eine Deletion an Chromosom 22 aufwiesen (KELLEY et al., 1982). In den folgenden Jahren wurden verschiedene Phänotypen, Syndrome und Fehlbildungskomplexe diskutiert, die in dem Akronym CATCH 22 zusammengefasst wurden (WILSON et al., 1993). Dieses beinhaltet die gemeinsame Ursache der Deletion auf dem Chromosom 22q11 und die Symptome „cardiac defect“, „abnormal face“, „thymushypoplasia“, „cleft palate“ und „hypocalcaemia“. Von einer japanischen Gruppe wurde der Begriff „conotruncal anomaly face syndrome“ eingeführt, dessen klinisches Erscheinungsbild mit dem des DiGeorge-Syndromes übereinstimmt (MATSUOKA et al., 1994).

Parallel zum DiGeorge-Syndrom entwickelte sich die Begrifflichkeit des Velokardiofazialen Syndromes (VCFS) mit gespaltenem Gaumen, Herzanomalien, Gesichtsveränderungen und Lernschwierigkeiten (SHPRINTZEN et al., 1978). 1992 wurde das VCFS durch folgende zwei Entdeckungen für die Forschung interessant: Zum Einen wurde es in Verbindung mit einer Deletion auf Chromosom 22 gebracht

(SCAMBLER et al., 1992; DRISCOLL et al., 1992; KELLY et al., 1993) und zum Anderen als Krankheit mit gehäuftem Auftreten von Symptomen aus dem Formenkreis der Psychiatrie in Verbindung gebracht (SHPRINTZEN et al., 1992). Eine Vielzahl von Veröffentlichungen folgten und die phänotypischen Expressionsmuster nahmen sprunghaft zu. Kardiologen nannten das Syndrom Familial Conotruncal Anomaly, Immunologen bezeichneten es als DiGeorge-Syndrom und aus der Kiefer- und Gesichtschirurgie stammte der Begriff Velokardiofaziales Syndrom (HALL, 1993). Heute beschreibt die Velo-Cardio-Facial Syndrome Educational Foundation über 180 Einzelfehlbildungen, die auch in Kombination auftreten können (www.vcfsef.org).

Die meisten aller Publikationen heutzutage deuten mittlerweile darauf hin, dass das VCFS mit dem DiGeorge-Syndrom, der DiGeorge-Sequenz, dem „conotruncal anomalies face syndrome“, dem Cayler-Syndrom und dem Sedlackova-Syndrom gleichzusetzen ist (ROBIN et al., 2005; SHPRINTZEN, 2005). Eine heute geläufige Bezeichnung führt den großen phänotypischen Bereich der oben genannten Syndrome auf deren häufigsten Ursprung zurück: das 22q11-Deletionssyndrom. Dieses lässt sich in einen pharyngealen Typ und einen neurologisch-psychischen Phänotyp aufteilen. Dabei umfasst der pharyngeale Typ die genetisch bedingten Herzfehler, die Gesichtsdysmorphien und die Hypoplasie des Thymus und der Nebenschilddrüsen. Der „neurologisch-psychische“ Typ zeichnet sich durch Lernschwierigkeiten, Konzentrationsstörungen, Aufmerksamkeitsstörungen und psychische Erkrankungen, z.B. der Schizophrenie, aus (LINDSAY, 2001).

2.2.2 Pathogenese/ Diagnostik

Mit einer Inzidenz von 1 : 4000 Lebendgeburten ist das DiGeorge-Syndrom das häufigste menschliche Mikrodeletionssyndrom (BOTTO et al., 2003; RYAN et al., 1997) und nach der Trisomie 21 der häufigste Grund für eine Fallot-Tetralogie (McDONALD-McGINN et al., 1999).

Die Pathogenese gründet sich auf eine gestörte Formation des Kiemenbogenapparates. Diese embryologische Struktur entsteht während der Wirbelkörperentwicklung, setzt sich aus Geweben des Ektoderms, Endoderms, Mesoderms und der Neuralleiste zusammen (GRAHAM, 2003) und beinhaltet die fünf Kiemenbogenarterien, die Kiemenfurchen und die fünf Schlundtaschen. Dabei resultieren aus der 3. und 4. Schlundtasche der Thymus, die Epithelkörperchen und der Ausflusstrakt des Herzens

und beinhalten somit die wichtigsten Organbereiche, die beim DiGeorge-Syndrom betroffen sind. Dies führte zu der Bezeichnung „3/4 Schlundtaschen-Syndrom“ (ROBINSON et al., 1975; ROHN et al., 1984). Jedoch können auch die 1., 2. und 5. Schlundtasche sowie alle Kiemenbögen betroffen sein (THOMAS et al., 1997). Hierdurch wird die große Variabilität der phänotypischen Ausprägungen erklärt.

Neue Einblicke in die embryonalen Abläufe bei DiGeorge-Patienten wurde mittels Knockoutmäusen ermöglicht. Die Aminosäuresequenz in der Maus stimmt zu 92% mit der des humanen DGCR6 überein und ist somit hoch konserviert. Das Gen liegt auf dem Chromosom 16 (LINDSAY und BALDINI, 1997). Mit neuen Chromosomentechniken konnten Deletionen des Bereichs, der auch für die 22q11-Deletions-Syndrome beim Menschen verantwortlich ist, durchgeführt werden und die Auswirkungen auf die Mäuse beobachtet werden. Es wurde eine Deletion dfl generiert, die 18 homologe Mausgene von den 24, die bei Patienten mit der 1,5 Mb Deletion fehlen, umfasst. Bei diesen Mäusen wurden kardiovaskuläre Defekte gefunden, die Ähnlichkeit mit solchen in betroffenen Menschen haben (LINDSAY et al., 1999).

Eine besondere Bedeutung bei der Entstehung des Kiemenbogenapparates erlangte der Transkriptionsfaktor Tbx1. Die homozygote Inaktivierung des Tbx1 führt zu einem dem DiGeorge-Syndrom sehr ähnlichen Phänotyp (TADDEI et al., 2001; JEROME et al., 2001). Ein weiteres Kandidatengen der DiGeorge Critical Region, das Crkl, ist wesentlich an der Regulation und Entstehung des Kiemenbogenapparates beteiligt (GURIS et al., 2006).

Ätiologisch können Alkohol, Vitamin-A-Derivate, mütterlicher Diabetes und zusätzliche Defekte am Chromosom 10p13 bei der Entstehung des DiGeorge-Syndroms eine Rolle spielen (HALL, 1993).

Bei Verdacht auf ein DiGeorge-Syndrom lässt sich die 22q11.2 – Deletion über eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH-Technik) schnell und zuverlässig nachweisen (DRISCOLL et al., 1993; DESMAZE et al., 1993). Schwierig gestaltet sich der Aussagewert im Falle einer pränatalen Diagnostik allerdings aufgrund der breiten phänotypischen Streuung und der fehlenden Korrelation zur Grösse der Deletion (AUGUSSEAU et al., 1986; LINDSAY et al., 1995).

2.2.3 Das DGCR6 Gen

Ungefähr 90% aller Patienten mit DiGeorge-Syndrom zeigen eine typisch deletierte Region (TDR) von 3Mb auf dem langen Arm des Chromosoms 22 (22q11.2). Es wurden zwei potentiell offene Leserahmen, DGCR3 und DGCR4, beschrieben (BUDARF et al., 1995). Dieser auch als DiGeorge Critical Region (DGCR) benannte Genabschnitt beginnt am Ort D22S75 (N25) und endet bei D22S259 (pR32). Dieser DNA-Abschnitt umfasst ca. 30 Gene. In 8% der Fälle handelt es sich um eine kleinere Deletion von ca. 1,5 Mb Länge mit 24 Genen (LINDSAY et al., 1995; SHAIKH et al., 2001). Beide Genabschnitte sind von sogenannten Low Copy Repeats (LCR) eingefasst, die für die konstante Bruchstelle der Deletion verantwortlich gemacht werden. Durch die Ähnlichkeit der Sequenzen kann es zu verschobener Paarung der homologen Chromosomen und zu ungleichem Crossing Over kommen (SHAIKH et al., 2001; HALFORD et al., 1993; LINDSAY et al., 1993; EDELMANN et al., 1999). Insgesamt konnten acht LCR's identifiziert werden (EDELMANN et al., 1999). In den meisten Fällen handelt es sich um eine DeNovo Deletion in der Gametogenese und in nur 5-10% um eine vererbte Deletion (SCAMBLER, 2000).

Das DiGeorge Critical Region 6 (DGCR6) Gen wurde 1996 erstmals von Demczuk et al. beschrieben. Es ist homolog zum Drosophila Protein *gonadal* (*gdl*), das für die Keimzellentwicklung wichtig ist, und zur humanen Laminin- γ -1 (LAMC1) Kette, die für die Gewebeentwicklung wichtig ist (DEM CZUK et al., 1996). Das DGCR6 Gen besitzt eine Länge von 1148 bp und codiert für 220 AS mit einem Molekulargewicht von 25kDa. Es liegt in zwei funktionellen Kopien mit hoch konservierten Intron/ Exon-Strukturen auf dem Chromosom 22q11 vor (EDELMANN et al., 2001). Die in der Abbildung 1.2 dargestellte Region sc11.1 wird in zwei Loci unterteilt - sc11.1a und sc11.1b - die ihrerseits von einer ca. 1 Mb langen Sequenz getrennt sind. Beide Loci sind bei betroffenen DiGeorge-Patienten deletiert (HALFORD et al., 1993; LINDSAY et al., 1993; 1995). Die Region sc11.1a ist unmittelbar distal zum Low Copy Repeat 22 lokalisiert und ist sowohl bei der 3 Mb als auch bei der 1,5 Mb Deletion die Bruchstelle. Zu dieser Region gehört von proximal nach distal das DGCR6-Gen, das PRODH-Gen, welches für die Prolindehydrogenase codiert, und ein HERV-K Provirus. Dieser sc11.1a Bereich liegt in einer invertierten Kopie proximal eines zweiten LCR22 vor – hier als sc11.1b benannt (mit Ausnahme des HERV-K Provirus). Diese Duplikation des

DGCR6-Gen wird als DGCR6L (like) Gen bezeichnet und teilt 97% Sequenzhomologie. Es wurden 7 Aminosäureunterschiede gefunden, jedoch kein alternatives Stop Codon. In einer PCR Analyse wurde die Expression des DGCR6 bzw. DGCR6L in praktisch allen Geweben des menschlichen Körpers nachgewiesen.

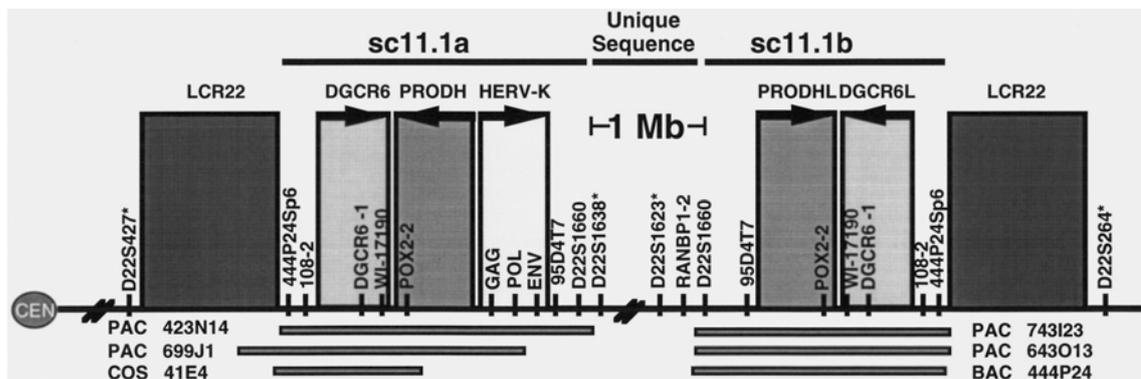


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der sc11.1 Duplikation auf Chromosom 22q11

Umgeben von den LCR22, die als Bruchstellen der Deletionen gelten, befinden sich die beiden Loci sc11.1a und sc11.1b. Die sc11.1a Region besteht aus dem DGCR6-Gen, dem PRODH-Gen und dem HERV-K-Provirus. Die sc11.1b Region besitzt das PRODHL Gen und das DGCR6L Gen (EDELMANN et al., 2001)

2.3 Das DiGeorge-Syndrom und die Schizophrenie

Die Schizophrenie ist eine schwere Geisteskrankheit, die mit 1% Lebenszeitprävalenz recht häufig ist. Sie ist charakterisiert durch Störungen der Gedankenabläufe und Defizite im emotionalen und sozialen Verhalten. Wie schon erwähnt sind Mikrodeletionen auf dem Chromosom 22q11 mit einem variablen Phänotyp assoziiert, der Lernschwierigkeiten, Gaumenanomalien, kongenitale Herzfehler und Gesichtsdysmorphien einschließt (SCAMBLER et al., 2000). Erste Hinweise für die Assoziation psychischer Erkrankungen mit dem 22q11 Locus ergab die Arbeit von GOLDING-KUSHNER et al. im Jahre 1985, der bei Kindern mit diesem Syndrom

expressionslose Gesichter, monotone Sprache und abgeflachte Affektivität feststellte. Daraufhin folgten zwei voneinander unabhängige Studien, die bei 25-31% der Patienten mit der 22q11-Mikrodeletion eine Schizophrenie bzw. eine schizoaffektive Erkrankung diagnostizierten (PULVER et al., 1994; MURPHY et al., 1999). Die Häufigkeit der Mikrodeletion 22q11 in der Bevölkerung liegt bei 0,025%, bei schizophreniekranken Erwachsenen jedoch bei 2% (KARAYIORGOU et al., 1995) und bei „early-onset“ schizophreniekranken Kindern sogar bei 6% (USISKIN et al., 1999). Weiterhin beschreiben verschiedene Studien 22q11-Mikrodeletionen bei schizophreniekranken Patienten unterschiedlicher ethnischer Zugehörigkeit. Aus diesen Studien geht hervor, dass die Morbidität für Schizophrenie unter Menschen mit einer 22q11-Mikrodeletion 20-30 mal über der Morbidität der Normalbevölkerung liegt. Auf der anderen Seite ist die Häufigkeit für eine 22q11-Mikrodeletion bei schizophreniekranken Patienten ca. 80fach erhöht (SUGAMA et al., 1999). LIU et al. vermuten im Jahre 2002, dass der Mangel an Prolindehydrogenase (PRODH) Störungen im Prolinstoffwechsel zur Folge hat und es zu einer Hyperprolinämie kommt, die toxische Effekte auf neuronale Zellen von Tieren hat. Nun liegt das PRODH Gen in direkter Nachbarschaft zum DGCR6 Gen und könnte bei Patienten mit DGS deletiert und so ein möglicher Auslöser für Schizophrenie sein. Ein Subhaplotyp des PRODH-Gens als möglicher Faktor der Entstehung der Schizophrenie in 22q11-kranken Patienten wurde in einer chinesischen Arbeit bestätigt (LI et al., 2004).

Insgesamt stellt heute die genetische Belastung den Hauptrisikofaktor dar. Protektiv wirkt eine intakte Kommunikationsstruktur bzw. ein positives Beziehungsklima innerhalb der Familie (TIENARI et al., 2004). Die neuroprotektiven Eigenschaften der Östrogene werden als ein entscheidender Faktor für das höhere Erstmanifestationsalter bei Frauen diskutiert (GRIGORIADIS et al., 2002).

Korbidian Brodmann, ein Neuroanatom und Psychiater (1868-1918), teilte die Großhirnrinde nach histologischen Kriterien in 52 Areale ein (BRODMANN, 1909).

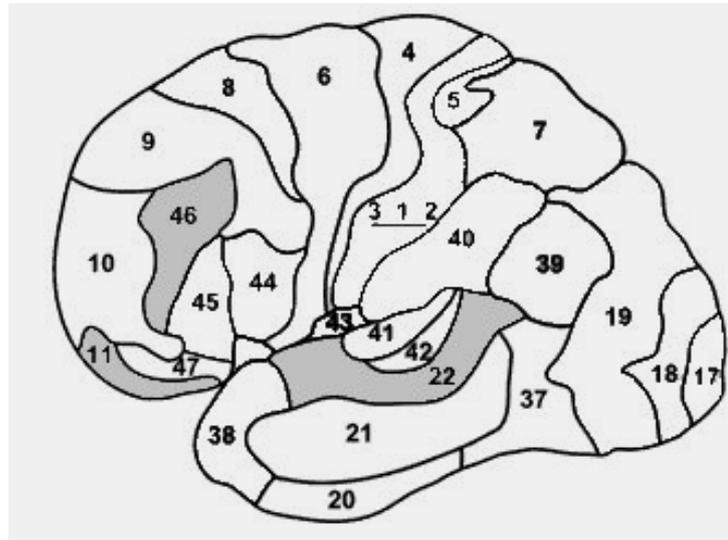


Abb. 1.3: histologische Einteilung der Großhirnrinde nach Korbinian Brodmann
 grau hervorgehoben: Brodmann-Areale 11 und 46 (Frontalcortex) und Areal 22 (Temporalcortex)

Dabei gibt diese hier dargestellte Einteilung nur zum Teil die Richtigkeit der Areale wieder, da die Gyri in ihrer Tiefe nicht mit berücksichtigt werden. Grau hervorgehoben sind die Areale Brodmann 11 und 46 (Frontalcortex) und das Areal 22 auf dem Temporalcortex, die für diese Arbeit von Bedeutung sind. Dabei gehört das Brodmann Areal 11 zum orbitofrontalen Cortex, der eine wichtige Rolle in der Schizophrenieforschung einnimmt (FREEDMAN et al., 1998; CRESPO-FACORRO et al., 2000; BAARE et al., 1999). Der präfrontale Cortex, zu dem das Brodmann Areal 46 zählt, nimmt eine Schlüsselrolle im Ablauf von kognitiven Funktionen ein, wie z.B. Planung, Urteilsvermögen, Entscheidungsfähigkeit und die Vermittlung von Gedächtnisfunktionen. All diese Funktionen sind bei schizophrenen Patienten betroffen (BUNNEY et al., 2000; GOLDMAN-RAKIC, 1997; LIDDLE et al., 1991). Das Brodmann Areal 22 posterior entspricht auf der dominanten Gehirnseite dem Wernicke-Sprachzentrum und ist Teil des Gyrus temporalis superior des Temporallappens. Ein Teil dieses Areals entspricht dem Planum temporale, einer für die Sprachproduktion wichtigen Struktur, die sich während der 29.-31.Schwangerschaftswoche entwickelt. In der Metaanalyse von SHAPLESKE et al. im Jahre 1999 zeigte sich eine deutliche Reduktion der Asymmetrie (physiologisch links > rechts), die durch ein größeres, rechtseitiges Planum temporale der Patienten verursacht wurde. Volumenänderungen

des Planum temporale sind bisher bei keiner anderen psychischen Erkrankung beschrieben worden.

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die DGCR6 mRNA in dem metastatischen Subklon MDA-MB435 des menschlichen Mammakarzinoms im Vergleich zu dem nicht metastatischen Subklon 2C5 hochreguliert war (EUER et al., 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von drei in der 22q11-Region lokalisierten Gene durch das DGCR6 beeinflusst werden. Dabei verstärkt das DGCR6 die Expression des Tbx1 und des UFD1L Gens und es verringert die des HIRA1 Gens (HIERCK et al., 2004). Das Tbx1 Gen beeinflusst direkt die Entwicklung des Kiemenbogenapparates und so die Entstehung des DiGeorge-Phänotyps (LIAO et al., 2004).

Nun stellte sich die Frage nach der Funktion des DGCR6 Gens. Der Nachweis des DGCR6 / DGCR6L – Proteins gelang mit der Hilfe von monoklonalen Antikörpern und eine erste biochemische Analyse der beiden Proteine folgte (PFUHL et al., 2005).

Zielsetzung der Arbeit war es, den Einfluss des Zellmetabolismus auf die DGCR6 / DGCR6L – Expression in Fibroblasten zu untersuchen, den Phosphorylierungsstatus zu analysieren, die Halbwertszeiten in HeLa-Zellen und primären Fibroblasten zu bestimmen und die Expression des DGCR6 / DGCR6L in Maus-, Kaninchen-, und menschlichem Gewebe zu untersuchen.

Weiter sollte die Expression des DGCR6 / DGCR6L im Gehirngewebe untersucht und mit Gehirngewebe aus schizophreniekranken Menschen verglichen werden.

3 MATERIAL & METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 Chemikalien, Membranen, Filter	20
3.1.2 Puffer & Lösungen	22
3.1.3 Kulturmedien	24
3.1.4 Zelllinien	25
3.1.5 Antikörper	25
3.1.6 Effektorplasmide	26
3.1.7 Molekulargewichtsmarker	27
3.1.8 Computer-Software	27
3.1.9 Verwendete Laborgeräte	27

3.1.1 Chemikalien, Membranen, Filter

Name	Hersteller	Katalog-Nr.
2,5-Diphenyloxazole	Sigma (Steinheim)	D-4630
2-Mercaptoethanol	Sigma (St.Louis, USA)	M-3148
2-Propanol	Roth (Karlsruhe)	9866.2
3-Mercapto-1,2-Propandiol	Sigma (Steinheim)	M-1753
Acrylamid (rotiphorese Gel A)	Roth (Karlsruhe)	3037.1
Agarose (SeaKem [®] GTG [®])	Biozym (Hess.Oldendorf)	50074
Amidoschwarz 10B extra	Serva (Heidelberg)	12310
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva (Heidelberg)	13375
Bisacrylamid (rotiphorese Gel B)	Roth (Karlsruhe)	3039.1
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)	12163
Calcium-Chlorid-Dihydrat	Roth (Karlsruhe)	5239.1
Cycloheximide ready made	Sigma (Steinheim)	C-4859
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (Steinheim)	D-8779
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	MERCK (Darmstadt)	1.06580.1000
Essigsäure (Rotipuran [®] 100%)	Roth (Karlsruhe)	3738.2
Ethanollösung, vergällt	Roth (Karlsruhe)	K 928.3
Fetal Bovine Serum	Biochrom AB (Berlin)	S 0115
Fugene ⁶ -Transfection Reagent	Roche (Mannheim)	11814443001
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schuell (Dassel)	10426694
Glycerol	Sigma (Steinheim)	G-5516

Glycin	Roth (Karlsruhe)	3908.3
Hyperfilm™ ECL	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England)	RPN 2103 K
Kalium-Chlorid	MERCK (Darmstadt)	1.04936.1000
Kaliumdihydrogenphosphat	MERCK (Darmstadt)	1.04873.1000
Magermilchpulver (Natura flor®)	Töpfer (Dietmannsried)	009
Magnesium-Chlorid-Hexahydrat	MERCK (Darmstadt)	1.05833.1000
Methanol	Apotheke der Universitätsklinik des Saarlandes	
N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva (Heidelberg)	T-8133
Natrium-Chlorid	Apotheke der Universität des Saarlandes	
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)	4360.2
Nitrocellulose Transfer Membrane (PROTRAN®)	Schleicher & Schuell (Dassel)	10401196
Nylon Transfer Membrane (Nytran®N)	Schleicher & Schuell (Dassel)	10416196
PonceauS™	ICN Biomedicals Inc. (Ohio, USA)	151942
Röntgen-Entwickler-Konzentrat	ADEFO-Chemie GmbH (Nürnberg)	00011
Röntgen-Fixierer-Konzentrat	ADEFO-Chemie GmbH (Nürnberg)	00063
Tris Ultra Pure	ICN Biomedicals, Inc. (Ohio, USA)	819638
Triton X-100	Sigma (Steinheim)	T-8787
Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England)	RPN 2106
Zellschaber (steril)	Greiner Bio-One (Solingen)	541070

3.1.2 Puffer & Lösungen

Puffer / Lösung	Bestandteile	
Amidoschwarz-Färbelösung	Isopropanol	25,0 % (v/v)
	Essigsäure	10,0 % (v/v)
	Amidoschwarz	0,1 % (v/v)
Amidoschwarz-Entfärber	Isopropanol	10,0 % (v/v)
	Eisessig	10,0 % (v/v)
Blocking-Puffer	Magermilchpulver in PBS – Puffer	5,0 % (w/v)
Bottomgelstock (SDS-Gel)	Tris-HCL pH 8,8	1,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
Lauf-Puffer	Tris-HCL	0,025 M
	SDS	0,1 % (w/v)
	Glycin	0,2 M
PBS, blau (Freiburg)	Stammlösung A	
	Natrium-Chlorid	80g
	Kalium-Chlorid	2g
	Magnesium-Chlorid-Hexahydrat	1g
	Calcium-Chlorid-Dihydrat	1,32g
	<i>mit Aqua dest. auf 1Liter auffüllen</i>	
	Stammlösung B	
	di-Natriumhydrogen- phosphatdihydrat	28,98g
	Kaliumdihydrogenphosphat	2g

	<i>mit Aqua dest. auf 1 Liter auffüllen</i>	
	→ PBS „blau“ für 1 Liter: Stammlösung A: 100ml + Stammlösung B: 100ml + 800ml Aqua dest	
2x SDS-Proben-Puffer (2x sample buffer) - klar	Tris-HCL, pH 6,8	130mM
	SDS	6 % (w/v)
	3-Mercapto-1,2-propandiol	10 % (v/v)
	Glycerol	10 % (w/v)
2x SDS-Proben-Puffer (2x sample buffer) - blau	Tris-HCL, pH 6,8	130mM
	SDS	6 % (w/v)
	3-Mercapto-1,2-propandiol	10 % (v/v)
	Glycerol	10 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
Transfer-Puffer	Tris-HCL	25mM
	Glycin	192mM
	Methanol	20 % (v/v)
	SDS	0,05 % (w/v)
Uppergelstock (SDS)	Tris-HCL pH 6,8	0,5 M
	SDS	0,4 % (w/v)
„4-er Antibiotika“- Lösung	Penicillin (Grünenthal GmbH, Aachen)	40 000 IE / ml
	Streptofatol (Fatol-Arzneimittel GmbH; Schiffweiler; Kat.-Nr. 3838258)	50 mg / ml
	Neomycinsulfat (Caesar & Loretz GmbH, Hilden; Kat.-Nr. 5419)	10mg / ml

	Nystatin (FAHRHAUS Pharma, Hamburg; Kat.-Nr. 113000 05GH)	10000 IE/ ml
	→ gelöst in MEM-EARLE	
Trypsin-EDTA (10x)	Trypsin-EDTA (PAA Laboratories GmbH, Linz; Österreich; Kat.-Nr. L11-003)	100ml / L
	Penicillin / Streptomycin (Biochrom AG, Berlin; Kat.-Nr. A2213)	5ml / L
	ad Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x) (PAA, Pasching; Österreich; Kat.-Nr. H21-002)	
"Stripping"-Puffer	Tris pH 6,7	7,57g / L
	SDS 20%	100ml / L
	ad Aqua dest.	

3.1.3 Kulturmedien

Den unten genannten Medien wurden je 0,5-Liter-Flasche 50ml Fötale Kälberserum und 0,5ml 4-er-Antibiotikum zugesetzt. Falls dies nicht der Fall war, wurde im Text speziell darauf hingewiesen.

MEM-EARLE (1x)	Biochrom AG (Berlin)	FG 0325
RPMI 1640	Camprex Bio Science Verviers (Belgien)	BE 12-702 F
DMEM (1x)	PAA Laboratories GmbH (Österreich)	E 15-810
1x MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM EAGLE (MOD.)	ICN Biomedicals, Inc. (Ohio, USA)	1641454

3.1.4 Zelllinien

HeLa	Diese Zelllinie stammt aus einem zervikalen Adenokarzinom der 31 Jahre alten Patientin Henrietta Lacks und wurde im Jahre 1952 etabliert (GEY, COFFMAN, KUBICEK; 1952)
Fibroblasten	Diese Zelllinie stammt aus Kindervorhaut-Fibroblasten von der Urologischen Klinik der Universität des Saarlandes

3.1.5 Antikörper

Primär-Antikörper

Antikörper	Funktion	Hersteller	Katalog-Nr.
Anti-DiGeorge-AK Klone 2C5, 3C7, 7C8	bindet sowohl das DGCR6- als auch das DGCR6-L-Protein	zur Verfügung gestellt von Fr. Dr. Kremmer (GSF München)	
Anti-HA, Klon 3F10	bindet das humane Hämagglutinin-Protein	Roche Applied Science (Mannheim)	11867423001
Anti- β -Actin Klon AC15	monoklonaler AK gegen humanes β -Aktin	Sigma (Taufkirchen)	A5441
p53 (AB-6) Klon Do-1	monoklonaler AK gegen humanes p53	Onkogene TM	OP43-100UG
c-Myc (9E10)	monoklonaler AK gegen humanes c-Myc p67 Protein	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-40

Sekundär-Antikörper

α -rat IgG Peroxidase	monoklonaler peroxidase-gekoppelter Ak gegen Ratte-IgG	Sigma (Taufkirchen)	A 5795
α -mouse IgG - Peroxidase	monoklonaler peroxidase-gekoppelter Ak gegen Maus-IgG	Sigma (Taufkirchen)	A 9044

Die Antikörper wurden in folgenden Verdünnungen eingesetzt:

Primär-Antikörper		Sekundär-Antikörper	
Anti-DiGeorge	1 : 10	Anti-rat	1 : 2000
Anti-HA	1 : 100	Anti-mouse	1 : 2000
Anti-β-Actin	1 : 5000		
Anti-p53	1 : 100		
Anti-c-Myc	1 : 100		

3.1.6 Vektoren & Effektorplasmide

Vektoren:

pSG5 Vector	Stratagene (La Jolla, USA)	216201
-------------	----------------------------	--------

Für Transfektionen wurden folgende Effektorplasmide eingesetzt:

pSG5-HA-DGCR6 und pSG5-HA-DGCR6-L:

Diese Plasmide wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Thorsten Pfuhl hergestellt und dienen der eukaryotischen Expression des humanen DiGeorge Critical Region 6 Proteins (DGCR6) bzw. des humanen DiGeorge Critical Region 6L Proteins (DGCR6-L). Durch den zusätzlichen HA-„Tag“ konnte das Protein auch mit Anti-HA – Antikörper (Roche) nachgewiesen werden.

pSG5-HA-SMN:

Dieses Plasmid wurde im Labor von Prof. Dr. Friedrich Grässer hergestellt und diente als Transfektionskontrolle der Versuche mit den Effektorplasmiden pSG5-HA-DGCR6 und pSG5-HA-DGCR6-L. Dieses HA-SMN-Protein kann ebenfalls mit anti-HA-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden.

3.1.7 Molekulargewichtsmarker

Die Einzelkomponenten wurden von Sigma (München) bezogen und der Marker selbst zusammengestellt. Das Molekulargewicht anderer Substanzen konnte anhand der im Marker enthaltenen Proteine geschätzt werden.

Der Marker enthält folgende Proteine:

Phosphorylase B	94	kDa
Bovines Serumalbumin (BSA)	67	kDa
Ovalbumin (OVA)	43	kDa
Carboanhydrase	30	kDa
Trypsininhibitor aus Sojabohnen	20,1	kDa
Lactalbumin	14,4	kDa

3.1.8 Computer-Software

Zur Erstellung dieser Arbeit wurde das Textprogramm Microsoft WORD 2000 und für die Bildbearbeitung das Programm Corel Photo-Paint 9 verwendet.

3.1.9 verwendete Laborgeräte

Blotkammer	LKB 2005 Transphor Electro Blotting Unit
Ultraschallgerät	Bronson Sonifier 250
Ultra-Thurrax®	IKA Labortechnik, Staufen, Germany
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1,0 R; Heraeus Picofuge Sigma 202 MK
Vortex	Heidolph REAX 2000
Sterilbank	Waldner Electronics FAZ 3
Wärmschrank	Heraeus Typ B5060 EK – CO ₂

3 MATERIAL & METHODEN

3.2 METHODEN

3.2.1	Haltung von Zellen	29
3.2.1.1	HeLa-Zellen	29
3.2.1.2	Primäre Fibroblasten	29
3.2.2	Passagieren von Zellen	29
3.2.3	Transfektion von Zelllinien	30
3.2.4	Proteinsynthese-Hemmung mit Cycloheximid	30
3.2.4.1	Cycloheximid	30
3.2.4.2	Das Prinzip	31
3.2.4.3	Durchführung der Cycloheximid-Inhibition	31
3.2.5	Gewebe-Asservation & Aufbereitung	32
3.2.5.1	Kaninchen	33
3.2.5.2	Gehirngewebe	33
3.2.5.3	Maus	33
3.2.6	Der Western Blot	34
3.2.6.1	Extinktions-Messung der Extrakte	34
3.2.6.2	Gelelektrophorese	35
3.2.6.2.1	Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels	36
3.2.6.2.2	Auftragen der Extrakte	36
3.2.6.3	Der Proteintransfer	37
3.2.6.4.1	PonceauS TM -/ Amidoschwarz - Färbung	37
3.2.6.4.2	Blocken in PBS-Milch	37
3.2.6.5	Immundetektion	38
3.2.6.5.1	Primär- / Sekundär - Antikörper	38
3.2.6.5.2	Chemilumineszenz	39
3.2.6.5.3	Quantifizierung der Banden	39
3.2.6.6	"Strippen" eines Western Blots	40

3.2.1 Haltung von Zellen

3.2.1.1 HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in 75cm² bzw. 175cm² Gewebeskulturflaschen gehalten. Pro Gewebeskulturflasche wurden 25ml bzw. 50ml DMEM-Nährmedium (inklusive fötalem Kälberserum und 4er-Antibiotikum) hinzugegeben. Anschließend wurden diese im Wärmeschrank bei 37°C und 5% CO₂ Partialdruck inkubiert.

3.2.1.2 Primäre Fibroblasten

Die aus Kindervorhäuten etablierte und somit primäre Fibroblastenzelllinie wurde analog der HeLa-Zelllinie in 75cm² bzw. 175cm² Gewebeskulturflaschen gehalten. Als Nährmedium wurde MEM-EARLE (mit fötalem Kälberserum und 4er-Antibiotikum) verwendet. Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 37°C und 5% CO₂ – Partialdruck.

3.2.2 Passagieren von Zellen

Nachdem sich die Zellen auf den Boden der Gewebeskulturflasche niedergelassen haben, beginnen sie zu wachsen und sich zu vermehren. Je nach Generationszeit ist der Boden der Flasche nach ca. 3-6 Tagen zugewachsen. Aufgrund der Zellkontakte zueinander stellt sich eine Wachstumsinhibition der Fibroblasten und der HeLa-Zellen ein, die Zellteilung stoppt und die Zellen gehen in die G₀-Ruhephase über.

Da für eine Versuchsanordnung jedoch meist größere Mengen von Zellen benötigt werden, müssen diese vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und entweder in mehrere Gewebeskulturflaschen aufgeteilt (~gesplittet) oder in größere Gewebeskulturflaschen überführt werden. Hierzu wird das Nährmedium abgenommen und 6ml Trypsin-EDTA hinzugefügt. Im Normalfall lösen sich die Zellen nach ca. 10min. ab. Ist dies nicht der Fall, führt das Auswechseln des schon zugeführten Trypsins durch frisches Trypsin-EDTA meist zum Erfolg.

3.2.3 Transfektion von Zelllinien

Für eine Transfektion wurden runde Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10cm verwendet. Das Reagenz wurde zuvor auf Zimmertemperatur aufgewärmt.

- 1) Pro Ansatz wurden 5µl Fugene⁶-Transfektions-Reagenz in 100µl DMEM-Nährmedium eingetropt. Es ist zu beachten, dass das Nährmedium frei von fötalem Kälberserum und 4er -Antibiotikum ist, um eine Einflußnahme auf die Transfektion zu verhindern.
- 2) Nach 5min wurden 2µl Vektorlösung (pSG5-DGCR6 oder pSG5-DGCR6-L; 1µg/µl) und 0,2µl pSG5-SMN-Vektorlösung (mit HA-Tag; ebenfalls 1µg/µl) als Transfektionskontrolle hinzugegeben.
- 3) Für weitere 15-45min binden nun die Nukleinsäure – Konstrukte an die Micellen des Fugene⁶-Transfection Reagenz.
- 4) Diese Lipid-Nährmedium-Mischung wird nun tröpfchenweise auf den Fibroblasten-Zellkulturschalen u. HeLa-Zellkulturschalen verteilt. Um eine gute Aufnahme der Micellen in die Zellen zu erlangen, sollten die Zellen 50-80% des Kulturschalenbodens bedeckt haben und noch voll im Wachstum inbegriffen sein.
- 5) Es folgt eine Haltung der Zellen für 24-48 Stunden im Wärmeschrank; danach schließt sich die Cycloheximid-Inhibition an, die folgend erklärt wird.

3.2.4 Proteinsynthese-Hemmung mit Cycloheximid

3.2.4.1 Cycloheximid

Cycloheximid, auch unter dem Akronym CHX bekannt, zählt zur Gruppe der Antibiotika und wird von *Staphylokokkus griseus* produziert. Die hauptsächliche biologische Aktivität besteht in der Hemmung der Translation in eukaryoten Zellen und führt damit zur Proteinsynthese-Hemmung, die eine Zellwachstumshemmung und den Zelltod zur Folge haben. Es wird weithin für die Bestimmung von Protein-Halbwertszeiten eingesetzt.

3.2.4.2 Das Prinzip

Bei der Erforschung von Zellfunktionsabläufen ist die Charakterisierung von beteiligten Proteinen eine Disziplin, die grundlegende Informationen für weitere Forschungsbereiche bereitstellt. Die Bestimmung der Protein-Halbwertszeiten trägt in diesem Zusammenhang einen wichtigen Faktor zur Charakterisierung von Proteinen bei. Bei der Cycloheximid-Inhibition wird die Proteinsynthese gehemmt. Folglich wird kein neues Protein synthetisiert und das bereits vorhandene Protein wird abgebaut. Durch parallele Führung von mehreren Zellkulturschalen und einer zeitlich einheitlichen Inhibierung der Proteinsynthese lassen sich durch das Abnehmen von Zellkulturschalen zu unterschiedlichen Zeiten deren aktuelle Proteinmengen bestimmen. Ein Marker für die Abnahme der Proteinmenge ist die Reduzierung des Proteins auf 50% der Ausgangsmenge, der sogenannten Halbwertszeit.

3.2.4.3 Durchführung der Cycloheximid-Inhibition

Herstellung der Cycloheximid-MEM-EARLE-Lösung (CM-Lsg.):

Da der Metabolismus von Zellen unterschiedlich ist, muss die Cycloheximid-Konzentration den Zellen angepasst werden. In Anlehnung an die wissenschaftliche Arbeit von Björn Schwalbert (<http://scidok.sulb.uni-saarland.de/volltexte/2006/582/>) wurden folgende Konzentrationen überprüft und modifiziert:

für primäre Fibroblasten: 60µg / µl , alternativ 80µg / µl

für HeLa-Zellen: 25µg / µl

Verwendet wurde „Cycloheximid ready made“ mit einer Konzentration von 100mg/ml.

Der Zeitverlauf:

- 2x 50ml MEM-EARLE-Nährmedium wurden mit je 30µl Cycloheximid versetzt (CM-Lösung)
- Nährbodenüberstand der 12 Schalen wurden abpipetiert
- 10 von 12 Schalen wurden mit CM-Lösung überschichtet und in den Wärmeschrank gestellt; Erstellung eines Zeitplanes (Überschichtungszeit = T₀; Schalenabnahmen dann nach 2, 4, 8 und 12 Stunden = T₂, T₄, T₈, T₁₂).

Die übrigen 2 Proben wurden wie folgt weiterverarbeitet:

- Schalen wurden mit je 5ml PBS gewaschen, abpipetiert und erneut mit 1,5ml PBS überschichtet
- Mit einem sterilen Zellkratzer wurden die Zellen vom Schalenboden abgehoben, in ein Reaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten zentrifugiert (1200rpm, 4°C)
- Anschließend wurde der Überstand abgenommen und das Pellet bei -20°C eingefroren. Zu den jeweiligen Zeitwerten wurden die anderen Schalen analog der ersten beiden verarbeitet und eingefroren.

Am nächsten Tag:

- Lösung der Pellets mit 100µl klarem Sample buffer
- Ultraschallzertrümmerung für 5s (Zellen werden zerstört)
- Kochen der Zellen für 10min (Denaturierung der Proteine)

Nun ist die Inhibition abgeschlossen und es folgt der Western Blot.

3.2.5 Gewebe-Asservation

3.2.5.1 Kaninchen

Um die Gewebeexpression der DiGeorge-Proteine in Kaninchengewebe zu untersuchen, wurden Gewebeproben aus Großhirn, Kleinhirn, Medulla oblongata, Lunge, Skelettmuskel, Herzmuskel, Nieren, Nebennieren, Milz, Leber, Ovarien, Magen, Jejunum, Ileum und Colon.

Das Kaninchen (New Zealand White Rabbit; Jackson laboratories) wurde im Rahmen anderer Studien am virologischen Institut der Universität des Saarlandes Homburg mit Peptidkonjugaten immunisiert, ausgeblutet und mir unmittelbar danach als Tierkadaver überlassen. Die Immunisierung erfolgte mit Keyhole limpit hemcyanin, SDMA und CFA (Freudsches Adjuvant).

Vorgehensweise:

Das Kaninchen wurde mit 1,5ml Ketavet und 2,5ml Rombun 2% eingeschlafert. Der Tod trat mittels Herzpunktion ein (vollständige Blutentnahme). Unmittelbar danach wurden je 3 Proben mit einem Volumen von je 1cm³ von den oben genannten Geweben entnommen und sofort bei -70°C eingefroren.

Weiterverarbeitung des Gewebes zu Extrakten:

- Auftauen der Proben
- Mechanische Zerkleinerung des Gewebes (Skalpell)
- Zugabe von 100µl klarem Proben Puffer incl. einem Proteinase-Inhibitorengemisches
- Zerkleinerung des Gewebes mit Hilfe eines Homogenisators (ca. 5s; grob)
- Ultraschallzertrümmerung (3 mal 7s; fein)
- Kochen für 10min bei 98°C
- Zentrifugation für 5min bei 13000rpm
- Überführen des Überstandes in neue Reaktionsgefäße

Nun folgte die Weiterverarbeitung im Western Blot (S. 34).

3.2.5.2 Gehirngewebe

Alle in dieser Arbeit verwendeten Gehirngewebe wurden mir freundlicherweise von Fr. Dr. Schmitt, Institut für Psychiatrie - Universität Göttingen, zur Verfügung gestellt. Die zuvor in Trockeneis gelagerten Gewebeproben wurden in gefrorenem Zustand in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 100µl klarem Sample Buffer (incl. Proteinase-Inhibitorengemisch) versetzt. Es folgte die Ultraschallzertrümmerung, das Kochen und das Zentrifugieren analog der Gewebeaufbereitung der Kaninchengewebe. Aufgrund des weichen Gehirngewebes war die Grobgewebezertrümmerung mit dem Ultrathurrax nicht notwendig. Auch hier folgte nun die Weiterverarbeitung im Western Blot.

3.2.5.3 Maus

Das Mausgewebe stand mir laborintern schon als Gewebeextrakt zur Verfügung, das von NIH-3T3-Zellen (American Type Culture Collection; Kat.Nr. CRL-1658) gewonnen wurde. Der Name dieser immortalisierten Mäusefibroblasten-Zelllinie stammt aus der Etablierungszeit, bei der die Zellen zu Beginn alle 3 Tage 1 : 3 passagiert wurden (~3T3).

3.2.6 Der Western Blot

Molekularbiologisch meint man heute mit dem Western Blot die Übertragung von Proteinen von einer Trägermatrix, z.B. eines Gels, auf eine Membran (z.B. Nitrozellulosemembran, Nylon-Membran). Nach einer Proteinfärbung lassen sich die übertragenen Proteine als eine Art „Fleck“ (blot) sichtbar machen. Während die Proteine nach der Gelelektrophorese im Gel eingeschlossen sind, befinden sie sich nach dem Blot auf der Oberfläche einer Membran und können so von Antikörpern gebunden und damit später leicht sichtbar gemacht werden.

3.2.6.1 Extinktions-Messung der Extrakte

Ziel ist die Bestimmung der Proteinmenge in dem jeweiligen Gewebeextrakt. Diese ist notwendig, um bei der Gelelektrophorese gleiche Mengen an Protein aufzutragen und somit Unterschiede von Mengen anderer Proteine zuverlässig bestimmen zu können. Die Extinktionsmessung allein ist wissenschaftlich jedoch nicht anerkannt, um identische Mengen an Protein nachzuweisen. Deshalb wurden zusätzlich Molekulargewichtsmarker verwendet. Im Verlauf zeigte sich jedoch, dass die Bestimmung der Proteinmenge über die Extinktions-Messung sehr zuverlässig den Proteingehalt von Lösungen widerspiegelte und keinerlei Korrekturen notwendig wurden.

Aufgrund der großen Proteinmengen in einem Gewebeextrakt wurde eine Verdünnungslösung von 1:50 zur Extinktionsmessung hergestellt. Dabei werden vom Gerät 500µl Flüssigkeit benötigt:

10µl Gewebeextrakt + 490µl 0,1M NaOH → 500µl
--

Als Referenzwert werden 500µl 0,1M NaOH verwendet und die Proteinmenge bei 280nm Wellenlänge gemessen. Zu Beginn und vor jeder neuen Messung wurde das Schlauchsystem mit destilliertem Wasser ausgespült.

Die Formel zur Berechnung des Volumens, das 30µg Protein beinhaltet, wurde speziell für dieses Labor und das entsprechende Gerät erstellt.

Volumen für 30µg Protein in µl:

$$\frac{6,4}{\text{Extinktion swert}} \cdot 2$$

In wenigen Fällen wurden für Gele andere Proteinvolumenta verwendet, auf die bei der jeweiligen Bildbeschreibung speziell eingegangen wird.

3.2.6.2 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine analytische Methode der Chemie und Molekularbiologie, um verschiedene Arten von Molekülen zu trennen. Dabei wandert eine Mischung aus zu trennenden Molekülen unter Einfluss eines elektrischen Feldes durch ein Gel, welches in einer ionischen Pufferlösung liegt. Je nach Größe und Ladung der Moleküle bewegen sich diese unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel.

Als Gelmatrix wird u.a. Agarose eingesetzt, ein hochreiner Algenextrakt, der ein relativ großporiges Netzwerk (150nm – 500nm) bildet und sich gut zur Trennung von DNA, RNA und hochmolekularen Proteinen eignet. Im Gegensatz dazu verwendet man eine polymerisierte Acrylamid-Matrix z.B. zur Trennung von mittel- und niedermolekularen Proteinen (Porengröße ca. 3-6nm). Die Matrix behindert die zu trennenden Moleküle bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld.

Eine Variante der Gelelektrophorese ist die sogenannte **SDS-Page** (Abkürzung für *engl. sodium dodecylsulfate polyacrylamid gelelectrophoresis*). Als Basis fungiert ein Acrylamidgel, das zusätzlich SDS (deutsch: Natriumdodecylsulfat) enthält. Ist dieses anionische Detergenz im Überfluss vorhanden, überdeckt es die Eigenladungen von Proteinen, sodass alle Proteine vergleichbar negativ aufgeladen sind und deren Laufverhalten im Gel somit nur noch von deren Größe abhängt.

3.2.6.2.1 Herstellung eines SDS-Polyacrylamidgels

Die beiden Anteile des Gels (Sammelgel, Trenngel) werden zwischen zwei Glasplatten einpipettiert. Das Sammelgel fungiert darin, Unterschiede der Proteinlösung im pH-Wert und der Konzentration auszugleichen, um eine Kontrasterhöhung bei der Proteinauftrennung zu erreichen. Im Trenngel findet die Auftrennung der Proteine statt. Durch Zugabe von Temed und APS polymerisiert das Gel innerhalb 15min.

Gelzusammensetzung:

Bestandteile	Trenngel (Bottomgelstock)	Sammelgel (Uppergelstock)
Sammelgelstock	-	1,25 ml
Trenngelstock	4,0 ml	-
Acrylamid (30%)	5,3 ml	750 µl
Bisacrylamid (2%)	2,12 ml	300 µl
H ₂ O _{bidest}	4,58 ml	2,7 ml
APS (10%)	140 µl	50 µl
TEMED	14 µl	10 µl

3.2.6.2.2 Auftragen der Extrakte

Das fertiggestellte Gel wird nun in die Gelelektrophoresevorrichtung eingebracht und befestigt. Durch den oben und unten eingefüllten Transferpuffer steht das Gel in einem gleichmäßigen elektrischen Feld.

In die mit dem Teflonkamm erzeugten Geltaschen werden nun die Extrakte eingefüllt. Dabei bedient man sich einer Hamilton-Mikronadel, mit der sich die Extrakte zielgenau in die Geltaschen einfügen lassen.

3.2.6.3 Der Proteintransfer

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf Nitrozellulose übertragen und fixiert. Über ein elektrisches Feld werden die Proteine nun im Gegensatz zur Elektrophorese horizontal aus dem Gel auf die Membran gezogen. Das so erhaltene Bandenmuster spiegelt die Verteilung der Proteine im Originalgel exakt wider (BURNETTE, 1981).

Vorbereitung:

Nitrozellulose-Transfer-Membran wird für 10min in PBS äquilibriert. Nun wird das fertige Gel aus der Gelkammer genommen und eine der Glasscheiben abgehoben. Das Sammelgel hat keine weitere Funktion mehr und wird mit einem Spatel vom Trenngel abgestreift.

Der „Blot-Sandwich“ besteht aus dem Gel und der direkt aufliegenden Nitrozellulosemembran, die in Stofftücher und Blottingpapiere fixiert werden und in die Blotkammer eingesetzt werden.

3.2.6.4.1 PonceauS™ - / Amidoschwarz – Färbung

Nach Beendigung des Proteintransfers wurden die übertragenen Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit Hilfe des Farbstoffes PonceauS™ detektiert. Eine Einschätzung der Proteinmengen in den Proben und die Abtrennung des Molekulargewichtsmarkers werden dadurch ermöglicht.

Der Molekulargewichtsmarker wird für 30min mit Amidoschwarz überschüttet und daraufhin in ein Amidoschwarz-Entfärbebad überführt und für weitere 30min entfärbt. Mit einem Gel Blotting Papier wird der Marker getrocknet und die Banden zusätzlich markiert, da sich durch den Trocknungsprozeß ein Großteil der Farbe auflöst.

3.2.6.4.2 Blocken in PBS – Milch

Nach dem Proteintransfer haben die Proteine des Gels kovalent an die aktivierte Nitrozellulosemembran gebunden. Um eine kovalente Bindung der folgenden primären

und sekundären Antikörper zu verhindern, werden die noch freien bindungsfähigen Abschnitte der Membran mit einer Proteinlösung gesättigt (~geblockt). Man bedient sich dabei der natürlichen Proteinlösung fettarmer Milch.

3.2.6.5 Immundetektion

Der qualitative und quantitative Nachweis eines bestimmten Proteins ist mittels einer Immundetektion möglich. Dazu bedient man sich Antikörpern, die spezifisch an Epitope der gewünschten Proteine binden. Durch den Einsatz von primären oder sekundären Antikörpern, die an Enzyme gekoppelt sind, ist es möglich, Aussagen über die Menge gebundener Antikörper und damit über die Gesamtmenge an Protein zu treffen.

3.2.6.5.1 Primär-/ Sekundär-Antikörper

Die verschiedenen Primärantikörper wurden im Teil Material aufgelistet. Ihnen gemeinsam ist die Bindung an das Protein-Epitop auf der Nitrozellulose-Membran.

Pro Membran wurden 4ml 5%-ige PBS-Milch in ein 15ml Falcon einpipettiert und mit dem entsprechenden Antikörper in der angegebenen Verdünnung versetzt. Nach Mischung im Vortex wurde die geblockte Membran 2x in PBS gewaschen und anschließend in einer Prospekthülle blasenfrei mit der Antikörper-Milch-Mischung eingeschweißt. Für mindestens 4 Stunden wurde sie für eine gute Bindung der Antikörper bei 4°C auf den Taumler gelegt.

Nach erfolgter Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem Erstantikörper wurde die Membran für 3 x 10min mit PBS gewaschen, um die restlichen nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden erneut 4ml 5%-ige PBS-Milch in ein 15ml Falcon einpipettiert und mit dem entsprechenden Zweitantikörper gemischt. Dieser gegen das Fc-Fragment des Erstantikörpers gerichtete Antikörper beinhaltet das Enzym Peroxidase, das für die folgende Chemilumineszenz - Reaktion verantwortlich ist.

3.2.6.5.2 Chemilumineszenz

Es handelt sich hierbei um eine chemische Reaktion, bei der Licht abgestrahlt wird. Die Chemilumineszenz unterscheidet sich von der Fluoreszenz oder der Phosphoreszenz dadurch, dass dieser spezielle angeregte Zustand von Molekülen im Verlauf einer chemischen Reaktion erreicht wird, und das Licht nicht als Folge einer hohen Temperatur sichtbar wird.

Die bekannteste Chemilumineszenz-Reaktion (ECL - **E**nhanced **C**hemiluminescence, Amersham) wird auch in dieser Arbeit verwendet. Dabei wird durch Zugabe von Wasserstoffperoxid Luminol in Gegenwart von Eisenionen oxidiert und es entsteht ein bläuliches Licht mit einer Wellenlänge von 428nm. Mit diesem Licht lässt sich ein ECL-HyperfilmTM belichten.

Protokoll:

Für die ECL-Färbung wurden je 3ml der ECLTM-Western Blotting Detection Reagents miteinander vermischt und für ca. 1min auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Anschließend wurde ein ECLTM-Hyperfilm mit der leuchtenden Membran für 30 Sekunden bis 10 Minuten belichtet. Nach Entwicklung und Fixierung des Filmes (Röntgen-Entwickler/ Fixierer-Konzentrat; ADEFO) wurde der Film bei Raumtemperatur getrocknet und ausgewertet.

3.2.6.5.3 Quantifizierung der Banden

Für die Quantifizierung des Lichts wurde der LumoImager von Roche verwendet. In diesem Gerät kommen eine Peltier-gekühlte CCD-Kamera und ein speziell entwickeltes Linsensystem mit einer Auflösung von 1280x1024 Pixeln zum Einsatz. Das emittierte Licht wird direkt von dieser Kamera in Abhängigkeit der Belichtungszeit aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgt mittels der Lumi-AnalystTM -Software. Dabei erfolgt die Umsetzung der Lichtquanten anhand von Lichtschwärmungspunkten in einem digitalen Bild. Die Auswertung erfolgt in BLU (**B**iochemical **L**ight **U**nits) .

3.2.6.6 "Strippen" eines Western Blots

Um Kreuzreaktionen verschiedener Antikörper untereinander zu verhindern, kann es sinnvoll sein, bei mehreren zu detektierbaren Proteinen eine Aufteilung der Antikörperlösungen pro Inkubation vorzunehmen. Dadurch wird es aber auch nötig, die nicht kovalent gebundenen Antikörper wieder von der Nitrozellulosemembran zu lösen, um anschließend weitere Antikörper auf die Membran zu applizieren.

Diese Ablösung erfolgt mittels eines „Stripping Puffers“ und einem Zusatz von β -Mercaptoethanol. Dabei führt das β -Mercaptoethanol zu einer Auflösung der Disulfidbrücken der Antikörper und der Antikörper zerfällt. Der SDS-haltige Puffer löst die nicht kovalenten Bindungen des Antikörpers zum Protein-Epitop auf. Zu einem geringen Anteil werden durch das SDS auch die kovalenten Protein-Nitrozellulosemembran-Bindungen angegriffen. Darum ist es nötig, die Membran nach dem Strippen und dem Waschen nochmals mit PBS-Milch zu blocken.

4.1 Grundlagen

Das DiGeorge-Syndrom gehört zu der Gruppe der 22q11-Mikrodeletionssyndrome (SCAMBLER 2000). Das DGCR6 Gen ist eines der Kandidatengene der DiGeorge Critical Region (DEMCZUK et al., 1996). Aufgrund einer Duplikation bestehen zwei funktionelle Kopien des Gens – DGCR6 und DGCR6L (EDELMANN et al. 2001). Eine Hochregulation der mRNA des DGCR6 zeigte sich in der Mamma-Karzinom-Zelllinie MDA-MB-435 (EUER et al., 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das DGCR6 die Genregulation beeinflusst (HIERCK et al., 2004).

Das Epstein-Barr-Virus induziert die infektiöse Mononukleose und ist mit verschiedenen Tumoren assoziiert (REVIEW IN RICKINSON UND KIEFF, 1996). Von den Genen bzw. Proteinen, die das Virus in Tumorzellen exprimiert, sind das EBNA2, das EBNA3c und das LMP1 essentiell für die Transformation durch das Virus (REVIEW IN BORNKAMM UND HAMMERSCHMIDT, 2001). Dabei fungiert das EBNA2 als Transaktivator der viralen und zellulären Genexpression (REVIEW ZIMMER-STROBL und STROBL, 2001), das LMP1 dagegen als virales Onkogen, das z.B. über NfκB die Genexpression aktiviert (LAHERTY et al., 1992). Das EBNA3c ist u.a. an der Metastasierung von EBV-transformierten Tumorzellen beteiligt ist (SUBRAMANIAN et al., 2001; SUBRAMANIAN UND ROBERTSON, 2002).

Nun zeigte sich im Rahmen eines Hefe-Zwei-Hybridexperiments, bei dem das EBNA2 als Fänger eingesetzt wurde, das DGCR6 und das EBNA3c als potentieller Bindungspartner (GRÄSSER, unveröffentlicht, 2003).

Da bisher das DGCR6 / DGCR6L – Protein noch nicht charakterisiert worden war, wurden monoklonale Antikörper gegen die DGCR6 / DGCR6L – Region hergestellt. Dabei zeigte sich eine leicht erhöhte Mobilität des DGCR6-Proteins. Zusätzlich zeigte sich eine doppelte Bande beim Nachweis des endogenen DGCR6 / DGCR6L in der Mamma-Ca-Zelllinie MDA-MB-231 (PFUHL et al., 2005). Damit lag der Verdacht nahe, dass beide Proteine, DGCR6 und DGCR6L, in diesen Geweben exprimiert werden. Ausgeschlossen werden konnte eine Phosphorylierung als Zeichen einer sekundären Modifikation, die zu einer Migrationsdifferenz führen könnte (s. Kapitel 4.3).

Eine unterschiedliche Faltung der beiden Proteine könnte sich in einer Migrationsdifferenz der beiden Proteine und so auch in unterschiedlichen biologischen Funktionen manifestieren. Jedoch zeigten sich weder in der Lokalisation des DGCR6 bzw. DGCR6L-Proteins (PFUHL et al., 2005) noch in der Metabolisierung der beiden Proteine Unterschiede (Halbwertszeiten, s. Kapitel 4.4).

Es zeigte sich eine Erhöhung der DGCR6-Proteinmenge in EBV-transformierten Tumorzellen und lymphoblastoiden Zelllinien (PFUHL et al., 2005). Weder ein Einfluss des DGCR6 in die EBNA2 / EBNA3c-gesteuerte Transaktivierung des viralen LMP1 Promotors noch ein Einfluss in die Aktivierung des NFkB durch das virale LMP1 konnte bestätigt werden (PFUHL et al., 2005).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss des Zellmetabolismus auf die DGCR6/ DGCR6L-Expression in Fibroblasten zu untersuchen, die Frage der Phosphorylierung zu klären, die Halbwertszeiten in HeLa-Zellen und primären Fibroblasten zu bestimmen und die Expression des DGCR6 / DGCR6L in Maus-, Kaninchen-, und menschlichem Gewebe zu untersuchen.

Weiter war es Ziel der Arbeit, die Expression des DGCR6 / DGCR6L im Gehirngewebe zu untersuchen und mit Gehirngewebe aus schizophreniekranken Menschen zu vergleichen.

4.2 Einfluss des Zellmetabolismus auf die DGCR6 / DGCR6L – Expression

Da die T-Zellfunktion in Patienten mit DiGeorge-Syndrom häufig gestört ist, wurde die Expression des DGCR6 und DGCR6L in aktivierten T-Zellen (PBMC's) untersucht. Nach einer Stimulation mit einer Mischung aus IL-2 und Phytohämagglutinin wurden die CD69 und CD3-positiven Lymphozyten über eine FACS analysiert. Eine Vermehrung der Zellzahl und der Zellaktivität konnte beobachtet werden. Zellextrakte von stimulierten und nicht stimulierten PBMC's wurden im Western Blot analysiert. Die Proteinmenge erhöhte sich auf das ca. 5-fache. Dies würde bedeuten, dass eine Aktivierung des Zellwachstums mit einer Erhöhung der DGCR6-Proteinmenge einhergeht (PFUHL et al., 2005).

Dieses Ergebnis sollte anhand von primären Fibroblasten näher untersucht werden.

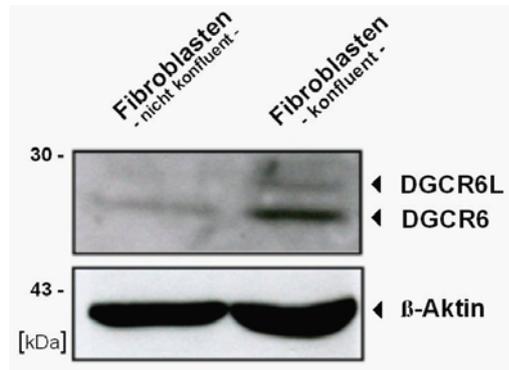


Abb. 4.1: DGCR6 – Expression in wachsenden und ruhenden Fibroblasten

Links-oben: Primäre Fibroblasten (Mensch) nicht konfluent, also noch wachsend, aktiviert
 Rechts-oben: Primäre Fibroblasten (Mensch) konfluent, also dicht gewachsen, Kontaktinhibition;
 Färbung über DGCR6-7C8-Antikörper; Proteinmengenkontrolle über β-Aktin – Färbung (unten)

Im oberen linken Bereich der Abbildung 4.1 sind die noch wachsenden Fibroblasten aufgetragen. Zu Erkennen sind zwei Banden, wobei sich die obere nur erahnen lässt. Im Vergleich dazu wurden im oberen rechten Bereich die bereits ruhenden Fibroblasten aufgetragen. Es zeigen sich zwei Banden, die in ihrer Intensität verglichen mit den Banden der noch wachsenden Fibroblasten einen 5-10fach höheren Gehalt an DGCR6-Protein aufweisen. Als Proteinmengenkontrolle dient β-Aktin.

4.3 DGCR6 ist ein Phospho-Protein

Die beiden Proteine DGCR6 und DGCR6L haben die gleiche Aminosäurenlänge, unterscheiden sich jedoch in wenigen Aminosäuren. Das unterschiedliche Laufverhalten in der SDS-Page könnte damit entweder auf diesen unterschiedlichen Aminosäuren beruhen oder aber auf eine sekundäre Modifikation wie z.B. einer Phosphorylierung zurückzuführen sein. Um den Phosphorylierungsstatus der DGCR6 / DGCR6L-Proteine zu untersuchen (siehe 4.1), wurden zuerst HeLa-Zellen mit pSG5-HA-DGCR6 und pSG5-HA-DP103 kotransfiziert. Dabei diente das Phosphoprotein DP103 als interne Kontrolle (GRUNDHOFF et al., 1999). Die transfizierten HeLa-Zellen wurden mit radioaktivem ^{35}S -Methionin und radioaktivem $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ markiert und die Extrakte

immunpräzipitiert. Als Isotyp - Kontrolle diente ein irrelevanter monoklonaler Antikörper aus der Ratte (Klon 5F10; KREMMER AND GRÄSSER, nicht publiziert), der das Bornavirus-p40-Protein bindet (SAUDER et al., 1996). Weiter wurden der Ratte-Antikörper 3F10 (Roche) gegen das HA-Epitop und eine 1:1:1 Mischung der spezifischen DGCR6-Antikörper verwendet. Die Präzipitate wurden über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und anschließende Fluorographie (GRÄSSER et al., 1991) analysiert.

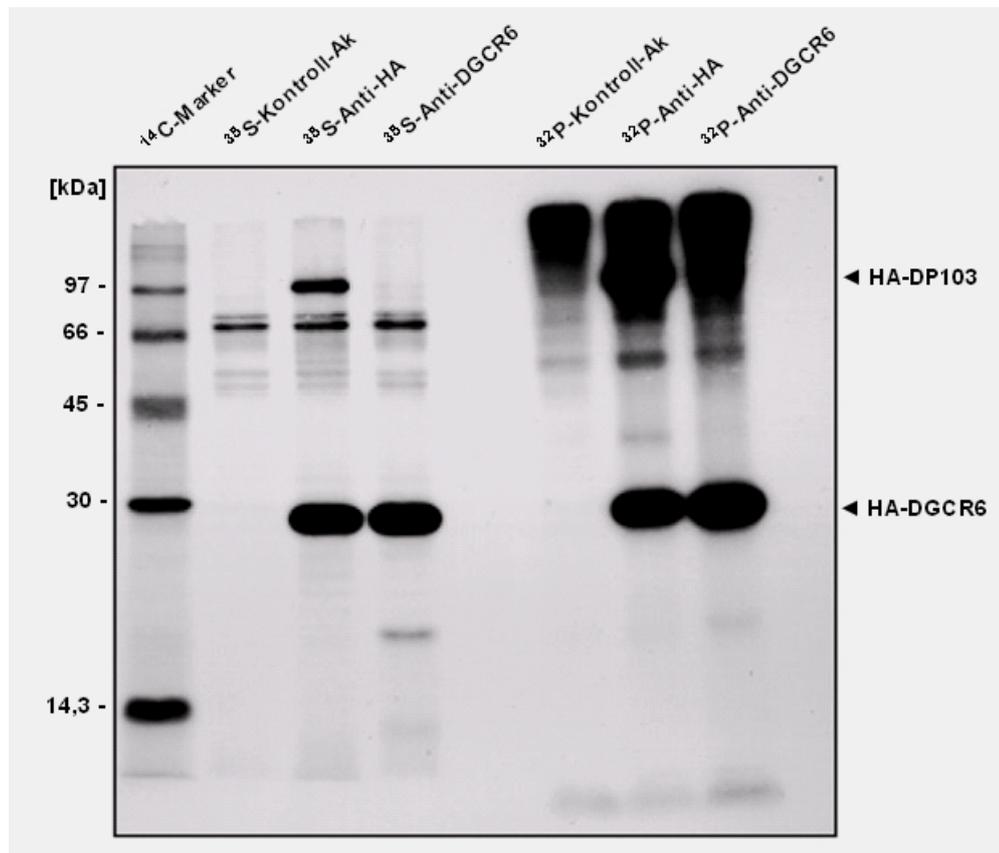


Abb. 4.2: Phosphorylierung des DGCR6 /DGCR6L

HeLa-Zellen wurden mit einer Mischung aus pSG5-HA-DP103 / pSG5-HA-DGCR6 transfiziert und mit ³⁵S-Methionin bzw. H₃³²PO₄ radioaktiv markiert. Zellextrakte wurden immunpräzipitiert mit irrelevantem monoklonalem Antikörper (³⁵S-Kontrolle), mit monoklonalem Anti-HA-Antikörper 3F10 (³⁵S-Anti-HA) und mit einer Anti-DGCR6-Antikörpermischung (³⁵S-Anti-DGCR6). Die Präzipitate wurden über SDS-Page und Fluorographie analysiert. Die Positionen des HA-DP103 und des HA-DGCR6 sind markiert. Die linke Bande zeigt die elektrophoretisch mit aufgetrennten ¹⁴C-markierten Markerproteine (Amersham): Phosphorylase b, Rinderserumalbumin, Ovalbumin, Karboanhydrase, Lysozym (absteigende Reihenfolge)

Aus der Abbildung 4.2 wird deutlich, dass sowohl die HA-spezifischen als auch die DGCR6-spezifischen Antikörper ein ^{35}S -markiertes Protein mit einer molekularen Masse von ca. 25kDa präzipitieren. Die ^{35}S -Kontrolle ist negativ. Der HA-spezifische Antikörper präzipitierte zudem die DP103-spezifische Bande, während diese in der ^{35}S -Kontrolle und der ^{35}S -Anti-DGCR6-Bande nicht vorhanden war.

Im parallel ausgeführten Experiment, in dem ^{32}P -markierte Zellextrakte verwendet wurden, stellten sich präzipitierte Proteine mit der gleichen Mobilität sowohl mit den HA-spezifischen als auch mit den DGCR6-spezifischen Antikörpern dar. Die ^{32}P -Kontrolle war wiederum negativ und der HA-spezifische Antikörper präzipitierte wiederum das HA-DP103-Phospho-Protein (GRUNDHOFF et al., 1999).

In beiden Experimenten zeigte sich eine kleinere Bande mit der molekularen Masse von ca. 20kDa bei Benützung der DGCR6-Antikörpermischung.

In einem ähnlichen Experiment wurden ^{32}P -markierte Proteine präzipitiert, die mit pSG5-HA-DGCR6 bzw. pSG5-HA-DCGR6L transfiziert worden waren.

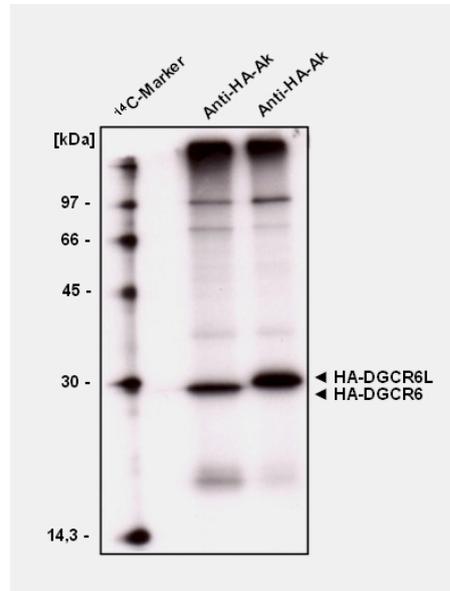


Abb. 4.3: Phosphorylierung von DGCR6 / DGCR6L

COS-Zellen wurden mit pSG5-HA-DGCR6 bzw. pSG5-HA-DGCR6L transfiziert und mit $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ markiert; die Zellextrakte mit dem Anti-HA 3F10-Antikörper (Roche) anschließend immunpräzipitiert. Die linke Bande zeigt die elektrophoretisch mit aufgetrennten ^{14}C -markierten Markerproteine (Amersham): Phosphorylase b, Rinderserumalbumin, Ovalbumin, Karboanhydrase, Lysozym (absteigende Reihenfolge)

Aus der SDS-Page wird ersichtlich: sowohl das DGCR6- als auch das DGCR6L-Protein sind Phosphoproteine. Der Vergleich des Migrationsverhaltens zeigt wiederum das unterschiedliche Laufverhalten der beiden Proteine in der SDS-Page: DGCR6 zeigt eine leicht erhöhte Mobilität.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass es sich bei den beiden Banden, die im Western Blot -Verfahren in nicht transfizierten Zellen dargestellt werden können, sehr wahrscheinlich um die beiden Proteine DGCR6 und DGCR6L handelt, und nicht um eine sekundäre Modifikation einer der Proteine im Sinne einer Phosphorylierung.

4.4 Halbwertszeitbestimmung der DGCR6 / DGCR6L – Proteine

Es wurde spekuliert, dass die unterschiedliche Mobilität der DGCR6 / DGCR6L – Proteine in der Gelelektrophorese auf eine unterschiedliche Proteinstruktur zurückgeführt werden könnte. Diese könnte sich z.B. in einer unterschiedlichen Stabilität der Proteine widerspiegeln.

4.4.1 Halbwertszeitbestimmung in HeLa-Zellen

Wir analysierten den Umsatz der Proteine DGCR6 und DGCR6L jeweils separat. Nach der Transfektion des HA-DGCR6 und HA-DGCR6L - Gens in HeLa-Zellen wurde die De-novo-Proteinsynthese mittels Cycloheximid inhibiert (GRÄSSER et al., 1991). Bis zu 16 Stunden lang wurden die transfizierten HeLa-Zellen mit Cycloheximid inkubiert, die Zellextrakte anschließend mittels der DGCR6-spezifischen Antikörper über das Western Blot – Verfahren analysiert; β -Aktin diente als interne Kontrolle.

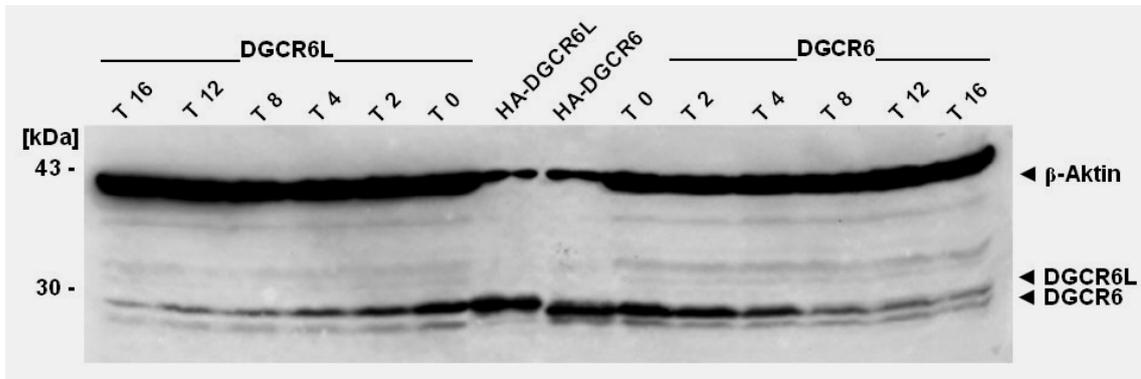


Abb. 4.4: Bestimmung der Halbwertszeit von DGCR6 und DGCR6L in HeLa-Zellen

Transfizierung entweder mit HA-DGCR6 oder HA-DGCR6L, nachfolgend Inkubation mit dem Proteinsynthese-Hemmer Cycloheximid über 2,4,8,12 und 16 Stunden. Zellextrakte wurden über das Western Blot - Verfahren analysiert, indem eine Mischung aus anti-HA-Antikörper (3F10) und anti- β -Aktin-Antikörper aufgetragen wurde. Die beiden zentralen Banden zeigen COS-Zellextrakte, die entweder mit HA-DGCR6 oder HA-DGCR6L transfiziert wurden

Die zwei zentralen Banden dienen dabei als Referenz und stammen von COS-Zellen, die mit HA-DGCR6 bzw. HA-DGCR6L transfiziert wurden. Zu sehen ist der leichte Migrationsunterschied der beiden Banden. Die Dichte der DGCR6 / DGCR6L-Banden wurde über einen Lumi Imager (Roche, Penzberg, Germany) gemessen. Die Halbwertszeiten betragen sowohl für DGCR6L als auch für DGCR6 ca. 2,5 Stunden.

4.3.2 Halbwertszeiten in primären Fibroblasten

Analog der Halbwertszeitbestimmung in den HeLa-Zellen (s. 4.3.1) erfolgte die Bestimmung der Halbwertszeit in primären Fibroblasten. Bis zu 12 Stunden lang wurden die mit HA-DGCR6 bzw. HA-DGCR6L transfizierten Fibroblasten mit Cycloheximid inkubiert. Die Analyse erfolgte über das Western Blot – Verfahren und β -Aktin diente als interne Kontrolle.

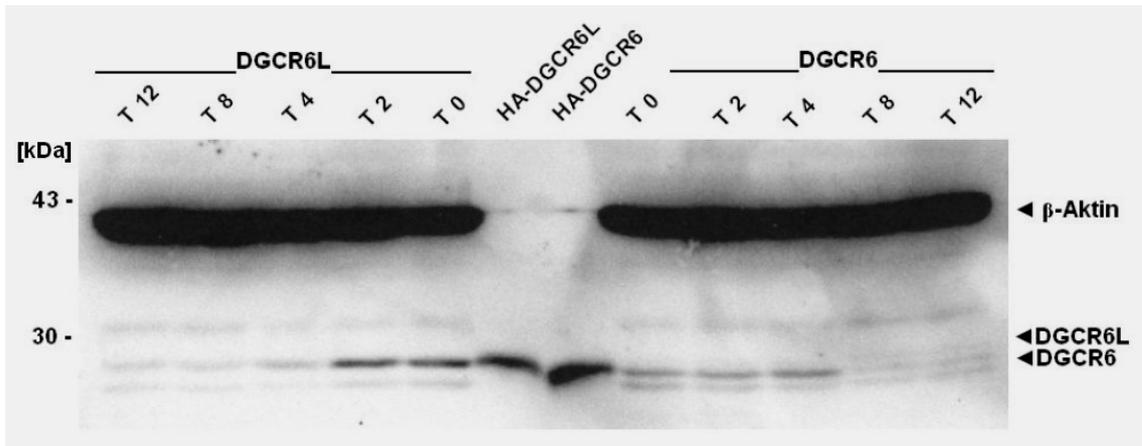


Abb. 4.5: Bestimmung der Halbwertszeit von DGCR6 und DGCR6L in Fibroblasten

Die Zellen wurden entweder mit HA-DGCR6 oder HA-DGCR6L transfiziert und nachfolgend mit dem Proteinsynthese-Hemmer Cycloheximid über 2,4,8 und 12 Stunden inkubiert. Zellextrakte wurden über das Western Blot - Verfahren analysiert, indem eine Mischung aus anti-HA-Antikörper (3F10) und anti- β -Aktin-Antikörper aufgetragen wurde. Die beiden zentralen Banden zeigen COS-Zellextrakte, die entweder mit HA-DGCR6 oder HA-DGCR6L transfiziert wurden

Die zwei zentralen Banden dienen dabei ebenfalls wieder als Referenz. Zu sehen ist wiederum der leichte Migrationsunterschied der beiden Banden. Es ergeben sich folgende Halbwertszeiten in primären Fibroblasten:

DGCR6L zwischen 2-4 Stunden und DGCR6 zwischen 6-8 Stunden.

4.5 Das DGCR6/L-Protein in Gehirngewebe schizophrener Menschen

In zwei voneinander unabhängigen Studien wurde gezeigt, dass 25-31% der DGS-Patienten Verhaltensweisen von Schizophrenie zeigen (MURPHY, JONES und OWEN 1999; PULVER et al., 1994). Umgekehrt wiesen erwachsene Schizophrenie-Patienten in 2% der Fälle eine Deletion in der 22q11 – Region auf im Vergleich zu 0,025% in der Normalbevölkerung (KARAYIORGOU et al., 1995). Das Gen PRODH, das für die Prolinhydrogenase codiert, liegt in direkter Nachbarschaft zum DGCR6-Gen und hat die Deletion des PRODH/DGCR6 – Lokus in Zusammenhang mit der Entstehung der Schizophrenie gebracht (LIU et al., 2002a; LIU et al., 2002b).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Gehirngewebe von gesunden und schizophrener Menschen in Bezug auf die Expression der beiden DGCR6-Proteine zu untersuchen.

4.5 Vergleich der Gehirngewebe von gesunden und schizophrener Menschen

4.5.1 Gegenüberstellung des Brodmann-11 – Areals

Die Gehirngewebe wurden mir von Frau Dr. C. Schmitt zur Verfügung gestellt (Institut für Psychiatrie, Universität Göttingen). Da sich die Erkrankung an Schizophrenie besonders in der Persönlichkeit ausdrückt und anatomisch deshalb besonders Veränderungen im Frontalhirnbereich zu erwarten sind, wurde das Brodmann-Areal 11 ausgewählt (THOMAS et al., 2003). Nach dem Auftauen wurden die Gewebeproben mit farblosem Proben Puffer und den Proteinaseinhibitoren Pepstatin und Aprotinin versetzt. Nach der Ultraschallzertrümmerung wurden die Proben gekocht und zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neue Eppendorftube überführt, die Extinktions-Messung zur Proteinmengenbestimmung durchgeführt und die Proben über

das Western-Blot-Verfahren analysiert. In Abbildung 4.6 wurden 60µg, in Abbildung 4.7 30µg Protein aufgetragen.

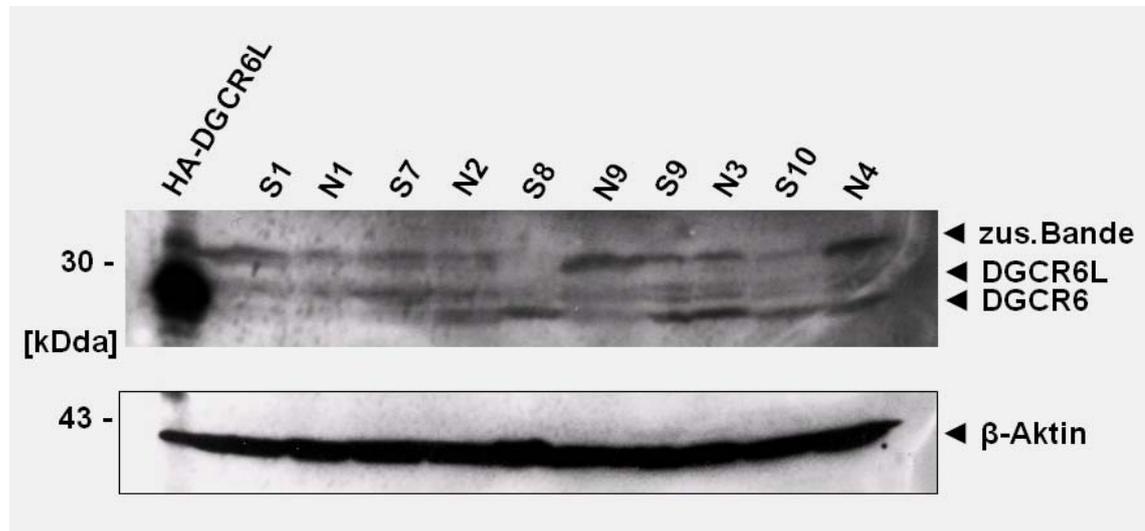


Abb. 4.6: Expression von DGCR6 / DGCR6L in Schizophrenie-/Normalgehirn (1)

Gehirngewebe wurde zu Gewebeextrakt verarbeitet (60µg Protein pro Tasche) und anhand des Western Blot Verfahrens analysiert, indem eine Mischung aus anti-HA-Antikörper (3F10), anti-β-Aktin-Antikörper und eine 1:1:1 Mischung der DGCR6-Klone 2H5, 3C7 und 7C8 aufgetragen wurde; links oben wurden mit HA-DGCR6L transfizierte COS-Zellen als Marker aufgetragen; anschließend wurde abwechselnd Gehirngewebe schizophrener Menschen (S) und normales Gehirngewebe (N) aufgetragen; im unteren Teil: β-Aktin zur Proteinmengenkontrolle

Im oberen Teil der Abbildung ist links das HA-DGCR6L als Marker für das endogene DGCR6 / DGCR6L – Protein aufgetragen. Nun folgen von links nach rechts abwechselnd Gehirngewebeproben von schizophrenen Menschen (S) und Gehirngewebeproben von normalem Gehirngewebe (N). Das DGCR6 bzw. DGCR6L ist seitlich markiert. Unterschiede in der Ausprägung der einzelnen Banden sind deutlich ersichtlich. Sie sind jedoch sehr unregelmäßig und lassen somit keinen Rückschluss für eine signifikante Differenz an Protein in schizophrenen Menschen zu.

Es ist eine zusätzliche Bande oberhalb der DGCR6L-Bande zu sehen. Im unteren Teil der Abbildung ist β-Aktin zur Proteinmengen-Kontrolle aufgetragen.

In der Abbildung 4.7 folgen weitere Gehirngewebeproben, die analog Abb. 4.6 von links nach rechts abwechselnd Gehirngewebeproben von schizophrenen Menschen (S) und Proben von normalem Gehirngewebe (N) darstellen. Zu sehen ist

eine eher einheitliche Ausprägung der Proteinmengen, die wiederum keinen Schluss für eine signifikante Differenz an Protein in schizophrenerkrankten Menschen zulässt. Deutlich ist die zusätzliche immunreaktive Bande oberhalb der DGCR6L-Bande zu sehen.

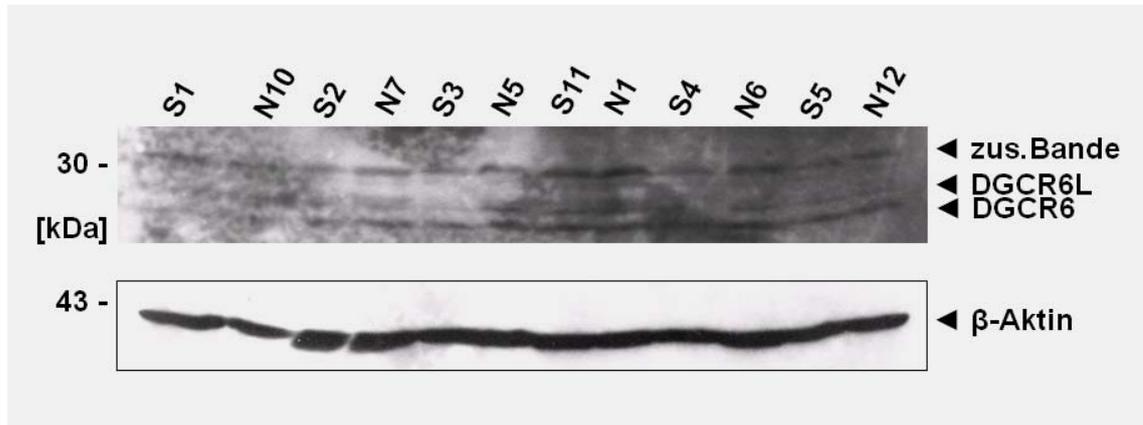


Abb. 4.7: Expression von DGCR6 / DGCR6L in Schizophrenie-/Normalgehirn (2)

Gehirngewebe wurde zu Gewebeeextrakt verarbeitet (30µg Protein pro Tasche) und anhand des Western Blot Verfahrens analysiert, indem eine Mischung aus anti-HA-Antikörper (3F10), anti-β-Aktin-Antikörper und eine 1:1:1 Mischung der DGCR6-Klone 2H5, 3C7 und 7C8 aufgetragen wurde; es wurde abwechselnd Gehirngewebe schizophrenerkrankter Menschen (S) und normales Gehirngewebe (N) aufgetragen; im unteren Teil: β-Aktin zur Proteinmengenkontrolle

4.5.1.2 Einfluss der Post Mortem-Zeit auf die DGCR6/6L-Expression

Für den Ausschluss des Einflusses des Zeitpunktes der Gewebeentnahme nach dem Tod durch autolytische Prozesse wurden die Gehirngewebeproben der Brodmann-11-Region in jeweils eine Schizophreniegruppe und eine Normalgehirngewebegruppe aufgeteilt. Anschließend wurden sie der Reihe nach geordnet und, beginnend mit dem spätesten Entnahmezeitpunkt nach dem Tod, von links nach rechts auf das Gel aufgetragen. Abbildung 4.8 zeigt die Schizophrenie-Gruppe mit der von links nach rechts abnehmenden Post Mortem-Zeit (Zeitspanne: 46h bis 4h post mortem). Als Marker ist links das in COS-Zellen transfizierte HA-DGCR6L aufgetragen. Die DGCR6-Bande, die DGCR6L-Bande und die zusätzliche Bande mit etwas geringerer Mobilität sind rechts gekennzeichnet. Die Bestimmung der Proteinmenge über β-Aktin wurde anhand

der zuvor durchgeführten Blots sichergestellt und bei diesen Blots nicht zusätzlich bestimmt, um mögliche Interaktionen bei sehr geringer Proteinmenge zu vermeiden. Mit Ausnahme der Probe S10 sind die Banden der kurzen Zeitpunkte stärker. Diese Verringerung der Proteinmengen bei längerer Post Mortem Zeit lässt einen möglicherweise schon eingesetzten Proteinabbau durch Proteasen erkennen.

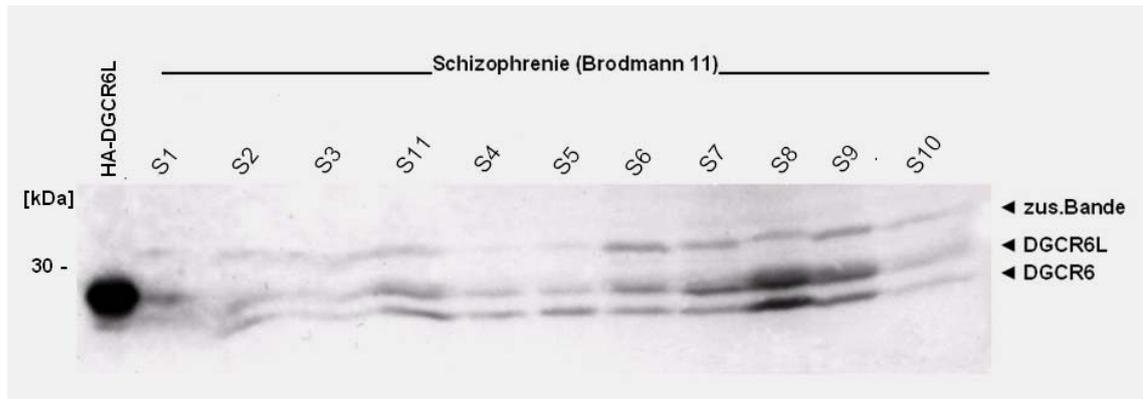


Abb. 4.8:

Proteingehalt des DGCR6 /6L in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Entnahme Post Mortem

Gehirngewebe wurde zu Gewebeextrakt verarbeitet (30µg Protein pro Tasche) und anhand des Western Blot Verfahrens analysiert, indem eine Mischung aus anti-HA-Antikörper (3F10) und eine 1:1:1 Mischung der DGCR6-Klone 2H5, 3C7 und 7C8 aufgetragen wurde; jeweils links oben: HA-DGCR6/6L-transfizierte COS-Zellen als Marker

Abbildung 4.8 zeigt die Normalgehirngewebe-Gruppe mit der von links nach rechts abnehmenden Post Mortem-Zeit (Zeitspanne: 96h bis 7h post mortem). Als Marker ist links das in COS-Zellen transfizierte HA-DGCR6L aufgetragen. Die DGCR6-Bande, die DGCR6L-Bande und die zusätzliche Bande mit etwas geringerer Mobilität sind rechts gekennzeichnet. Obwohl die Zeitspanne im Vergleich zur Schizophreniegewebegruppe noch wesentlich mehr divergiert, sind die Banden der DGCR6 / DGCR6L – Proteine in ihrer Intensität vergleichbar. Unterschiede bestehen jedoch in der Ausprägung der zusätzlichen Bande, wobei sich dort dennoch keine Linearität abzeichnet.

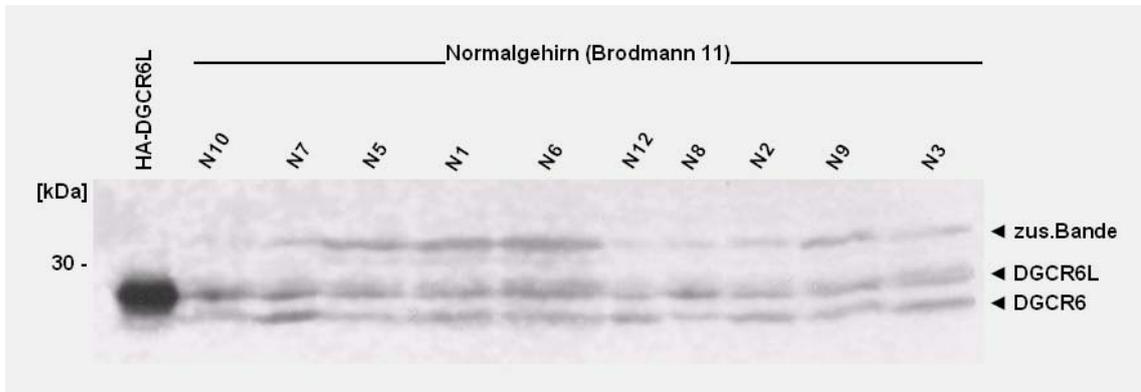


Abb. 4.9:

Proteingehalt des DGCR6 /6L in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Entnahme Post Mortem

Gehirngewebe wurde zu Gewebeextrakt verarbeitet (30µg Protein pro Tasche) und anhand des Western Blot Verfahrens analysiert, indem eine Mischung aus anti-HA-Antikörper (3F10) und eine 1:1:1 Mischung der DGCR6-Klone 2H5, 3C7 und 7C8 aufgetragen wurde; jeweils links oben: HA-DGCR6/6L-transfizierte COS-Zellen als Marker

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass ein Einfluss der DGCR6/6L-Proteinexpression auf den Entnahmezeitpunkt nach dem Tod bezüglich der Gehirngewebe bei schizophrenerkrankten Menschen besteht. Ob dieser Einfluss nun allein durch proteolytischen Abbau zu werten ist oder einen Einfluss des Turnovers der Proteine bei erkranktem versus normalem Gehirngewebe darstellt, ist aktuell noch Gegenstand der Forschung.

4.5.3 Vergleich unterschiedlicher Gehirnregionen / Kleinhirn

An den Vergleich mit den Brodmann-11-Arealen schloss sich der Vergleich unterschiedlicher Gehirnregionen an, um mehr über die dortige Expression der DGCR6/DGCR6L-Proteine zu erfahren. Dazu wurden die Brodmann-Areale B11, G46, 22P und das Kleinhirn (C) ausgewählt. Analysiert wurden diese Areale in je 9 Patienten mit nachgewiesener Erkrankung an Schizophrenie und als Kontrolle in je 9 Proben Normalgehirngewebe. Eine repräsentative Auswahl stellen die nachfolgenden drei

Western Blots dar. Dabei wurden auf jeden Blot die Gehirngewebe eines an Schizophrenie erkrankten Menschen (S) und eines gesunden Menschen (N) mit den dazugehörigen vier Gehirnarealen aufgetragen. Als Marker sind im linken oberen Bereich eines jeden Blots mit HA-DGCR6 bzw. mit HA-DGCR6L transfizierte COS-Zellen aufgetragen. DGCR6 bzw. DGCR6L sind seitlich gekennzeichnet. Zudem stellt sich auf allen Blots eine zusätzliche dritte Bande oberhalb der DGCR6L-Bande dar.

Zu den Blots:

Deutlich zu differenzieren sind die Banden des DGCR6 bzw. DGCR6L und die zusätzliche Bande. Auffällig ist ein um ein Vielfaches stärkeres Signal im Kleinhirn (C), welches sich sowohl im gesunden als auch im kranken Gehirngewebe abzeichnet. Weitere Unterschiede in den Brodmann-Arealen B11, G46 und 22P sind zwar vorhanden, aber unregelmäßig, sodass sich keine allgemein gültige Tendenz abzeichnet. Ein gleichmäßiges β -Aktin-Signal zur Proteinmengenkontrolle ist vorhanden. Aufgrund eines leicht gestörten Laufverhaltens der Kleinhirnbande im Normalgehirngewebe ist eine sichere Aussage bezüglich des Vergleiches der Proteinmenge in den Kleinhirnen nicht möglich.

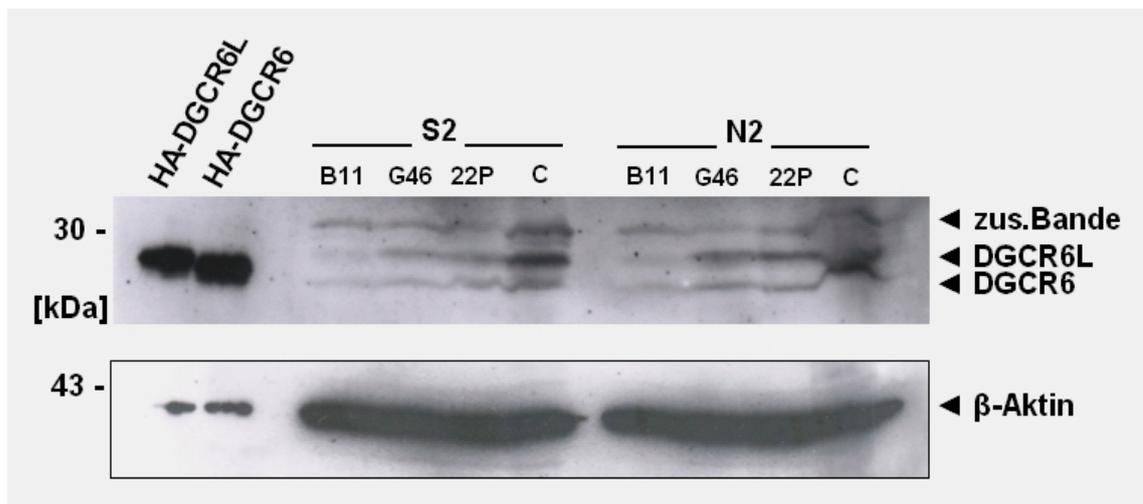


Abb. 4.10 (Erklärung s. Abb. 4.12)

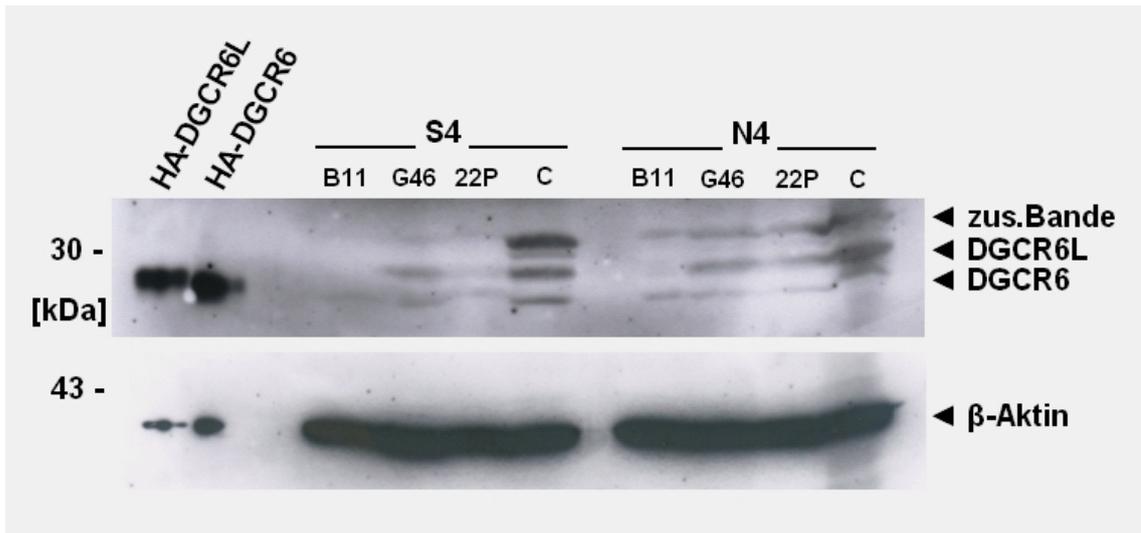


Abb. 4.11 (Erklärung s. Abb. 4.12)

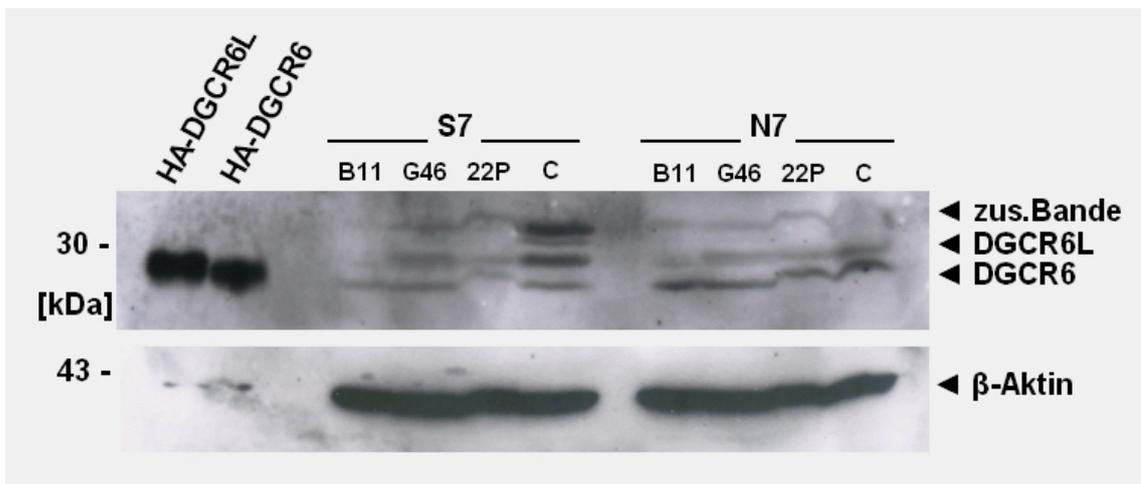


Abb. 4.12: - Erklärung zu den Abbildungen 4.10 - 4.12:

Vergleich der Gehirnnareale Brodmann B11, G46, 22P und Kleinhirn in Gehirngewebe von an schizophrenieerkrankten Menschen (S) im Vergleich zu Normalgehirngewebe (N)

Gehirngewebe wurde zu Gewebeextrakt verarbeitet (30µg Protein pro Tasche) und anhand des Western Blot Verfahrens analysiert, indem eine Mischung aus anti-HA-Antikörper (3F10), anti-β-Aktin-Antikörper und eine 1:1:1 Mischung der DGCR6-Klone 2H5, 3C7 und 7C8 aufgetragen wurde; jeweils links oben: HA-DGCR6/6L-transfizierte COS-Zellen als Marker; jeweils unten: β-Aktin als Proteinmengenkontrolle

4.5.4 Nachweis der DGCR6/L - Expression in Tumorgewebe

Um die Expression der DGCR6 / DGCR6L-Proteine in Gehirntumoren zu untersuchen, wurden fünf Proben von Gehirntumoren zu Zellextrakten verarbeitet und als Vergleich zu HeLa-Zellen und Normalgehirngewebe (Brodmann-11-Areal) aufgetragen. Dabei differierten die Gliome histologisch von diffus-oligoastrozytär bis diffus-astrozytär. Der Differenzierungsgrad reichte von WHO Grad 2 bis WHO Grad 4 (Glioblastom). Als Referenzen wurden links oben HeLa-Zellen und drei Proben eines Normalgehirngewebes aus dem Brodmann-11-Areal aufgetragen. Auch in den Gliomen ist eine deutliche zusätzliche Bande oberhalb der DGCR6L-Bande sichtbar. Drei von den fünf aufgetragenen Tumoren zeigten im Gegensatz zu Normalhirngewebe eine erhöhte Proteinmenge – dabei waren besonders das DGCR6 und die zusätzliche Bande deutlich verstärkt. Als Proteinmengenkontrolle diente β -Aktin, welches im Bereich des Glioms 1414 eine erhöhte Proteinmenge zeigt. Dennoch dürfte der Proteingehalt des DGCR6 erhöht sein.

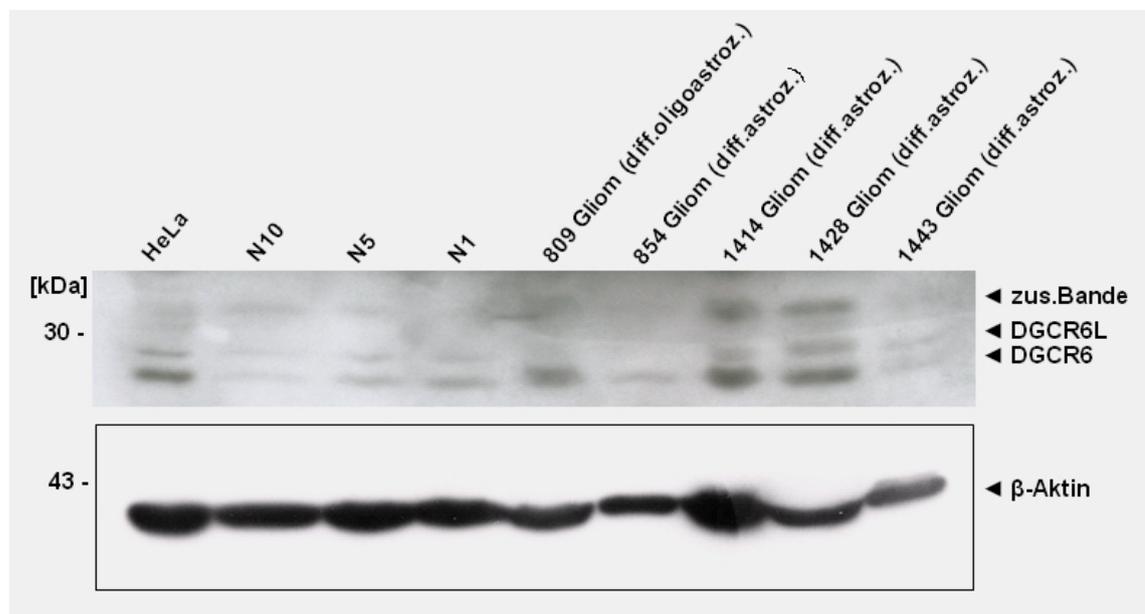


Abb. 4.13: Vergleich der DGCR6/L - Expression in Tumorgewebe und Normalgehirngewebe
 Gehirngewebe wurde zu Gewebeextrakt verarbeitet (30 μ g Protein pro Tasche) und anhand des Western Blot Verfahrens analysiert, indem eine Mischung aus anti-HA-Antikörper (3F10), anti- β -Aktin-Antikörper und eine 1:1:1 Mischung der DGCR6-Klone 2H5, 3C7 und 7C8 aufgetragen wurde; β -Aktin dient als Proteinmengenbestimmung

Eine direkte Gegenüberstellung des Tumorgewebes mit dem Kleinhirn (C) zeigte, dass die Proteinmengen von DGCR6 und DGCR6L zusammen im Kleinhirn gegenüber Tumorgewebe höher sind. Als weitere Referenzen wurden HeLa-Zellen und Fibroblasten aufgetragen. Auch hier wurde die Proteinmengenbestimmung über β -Aktin mittels der zuvor durchgeführten Blots sichergestellt.

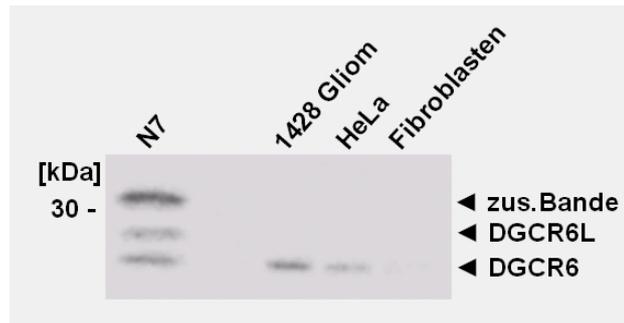


Abb. 4.14: Vergleich von Kleinhirngewebe mit Tumorgewebe

Gehirngewebe wurde zu Gewebeextrakt verarbeitet (30 μ g Protein pro Tasche) und anhand des Western Blot Verfahrens analysiert, indem eine Mischung aus anti-HA-Antikörper (3F10) und eine 1:1:1 Mischung der DGCR6-Klone 2H5, 3C7 und 7C8 aufgetragen wurde

4.6 Unterschiedliche Gewebeexpression der DGCR6 /DGCR6L-Proteine

4.6.1 Mensch

Die Expression der DGCR6 / DGCR6L – Proteine wurde zuerst in menschlichem Gewebe untersucht. Dazu wurde ein gewerblich erhältlicher Western Blot (BioChain, Hayward, California, USA) mit Gewebe von erwachsenen Gewebespendern mit einer Mischung der drei DGCR6-spezifischen Antikörpern gefärbt. Als Proteinmengenkontrolle diente der Nachweis des menschlichen GAPDH – Proteins, der von der Firma BioChain selbst erbracht wurde.

Im Vergleich zum Gehirngewebe wurde viel DGCR6/6L – Protein in Herz, Leber und Skelettmuskel exprimiert und mittlere Mengen in Pankreas und Plazenta. Weiterhin zeigt Abbildung 4.15 detektierbare Mengen in Gehirngewebe (s. auch Kapitel 4.5) und

deutlich erhöhte Mengen in Leber bzw. Herzgewebe. Besonders auffällig sind die Mengen im Herzgewebe, bei dem eine deutliche Assoziation zur DiGeorgekrankheit besteht, und die Tatsache, dass für das DGCR6 / DGCR6L nur eine immunreaktive Bande besteht.

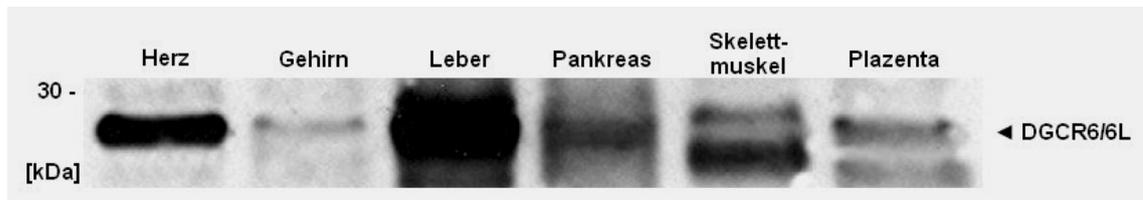


Abb. 4.15: Expression des DGCR6 in menschlichen Geweben

Ein gewerblich erhältlicher Blot mit 50µg Extrakt pro Geltasche wurde mit den drei DGCR6-Antikörpern gefärbt; die Gewebe sind oben bezeichnet und rechts wird die Position des DGCR6 angegeben

4.6.2 Kaninchen

Weiterhin detektierten die DGCR6-Antikörper das Protein in Kaninchengewebe und Mausgewebe (s. 4.6.3.). Diese Möglichkeit wurde genutzt, um weitere Gewebe über das Western Blot Verfahren zu untersuchen.

Grosse Mengen an DGCR6L konnten in Niere, Nebenniere, Herz und Ovarien und mittlere Mengen in Leber und Milz nachgewiesen werden. Nur geringe Mengen zeigten Gehirngewebe (Großhirn, Kleinhirn, Medulla obongata, Rückenmark), Lunge und Gewebe des Gastrointestinaltraktes (Magen, Jejunum, Ileum, Colon).

Im Gegensatz zum menschlichen Gewebe zeigte das Skelettmuskelgewebe in Kaninchen einen sehr geringen Gehalt an DGCR6-Protein. Auffällig ist die starke zusätzliche Bande im Skelettmuskel.

Zusammenfassend zeigten sich unterschiedliche Mengen an Protein in den Geweben. Dabei ist die DGCR6-Bande sehr gering ausgeprägt. Am deutlichsten erscheint sie in Milz und Leber. Die starke Expression im Herz- und Ovarialgewebe weist auf die Assoziation mit Fehlbildungen bzw. Entwicklungsstörungen der DiGeorgepatienten hin. In den Gewebeproben zeigten sich verschiedene weitere Banden, die möglicherweise von der Laminin-Kette herrühren (DEMCZUK et al., 1996).

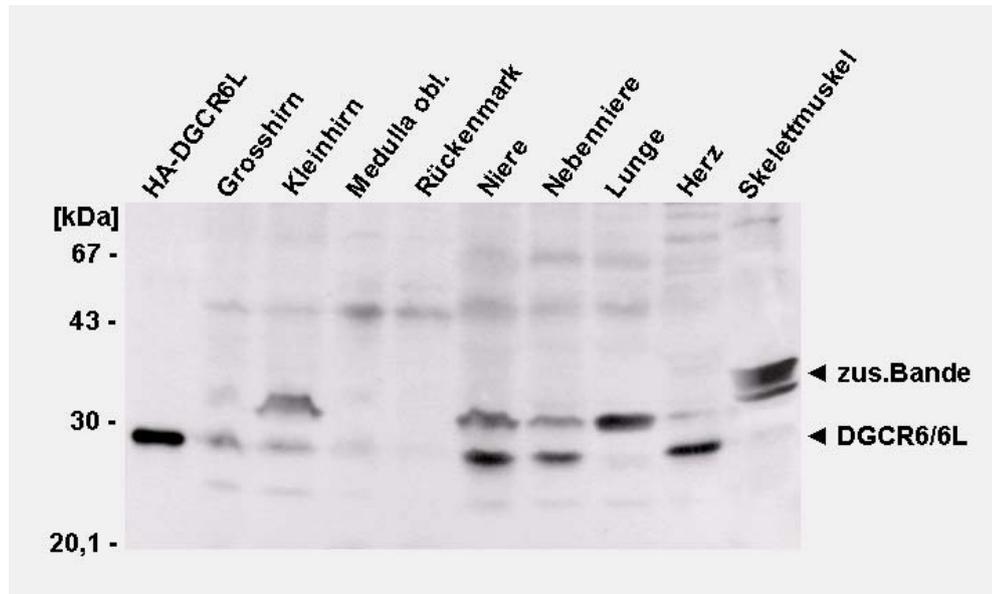


Abb. 4.16 (Erläuterungen s. Abb. 4.17)

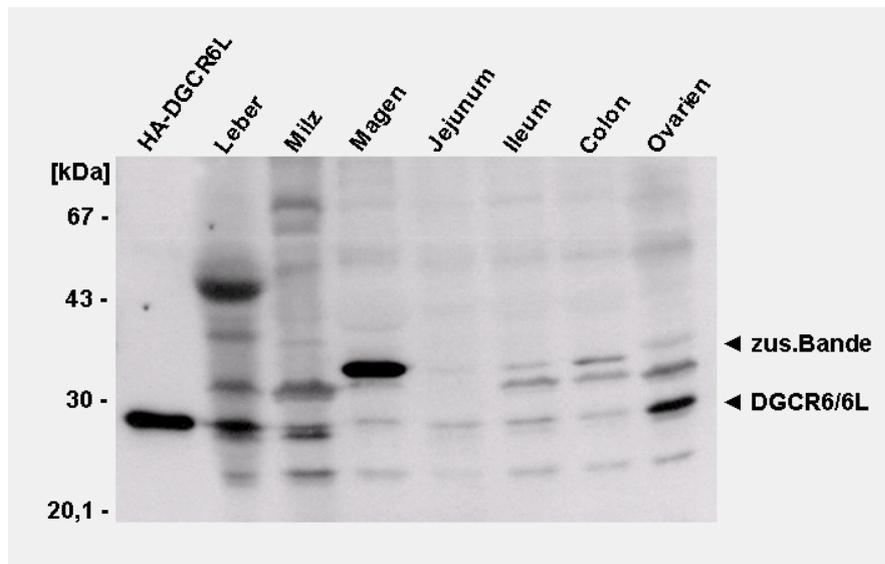


Abb. 4.17: - Erklärung zu den Abbildungen 4.16 u. 4.17 -

Abb. 4.16 u. 4.17: Nachweis des DGCR6/6L in Kaninchengewebe

die Gewebeextrakte (siehe Beschriftung) wurden mit 30µg Proteingehalt aufgetragen; als Marker für das DGCR6L wurden links HA-DGCR6L-transfizierte COS-Zellen aufgetragen; PonceauS™ -Färbung nach Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran zeigte vergleichbare Proteinmengen; β-Aktin zur Proteinmengenkontrolle wurde nicht verwendet, da der β-Aktin-Antikörper Kaninchen-β-Aktin nicht erkennt

4.6.3 Maus

Das Mausgewebe stammt aus der Zelllinie NIH-3T3. Die Färbungen mittels der DGCR6-spezifischen Antikörper 2H5 und 3C7 zeigen eine Bande im Bereich von 22-25 kDa. Ein DGCR6-Transskript mit 198 AS, das ca. 22 kDa entspricht, wurde nachgewiesen (LINDSAY et al., 1997). Der Antikörper 7C8 färbt kein Protein auf selbiger Höhe. Im Vergleich dazu wurden jeweils Banden mit den schon bekannten HeLa-Zellen aufgetragen, die die beiden Banden des DGCR6 bzw. DGCR6L deutlich zeigen. Die Proteinmengenkontrolle über β -Aktin zeigt vergleichbare Mengen und die Hintergrundbandenbestimmung über das Bornavirus zeigt die Spezifität der DGCR6/6L Banden im Bereich zwischen 20 und 43 kDa. Bei ca. 35 kDa zeigt sich sowohl in Maus- als auch in HeLa-Zellen eine weitere Bande.

Zusammenfassend lässt sich davon ausgehen, dass das Maus-Analogon des DGCR6-Proteins mit ca. 22 kDa in nachfolgendem Experiment nachgewiesen wurde.

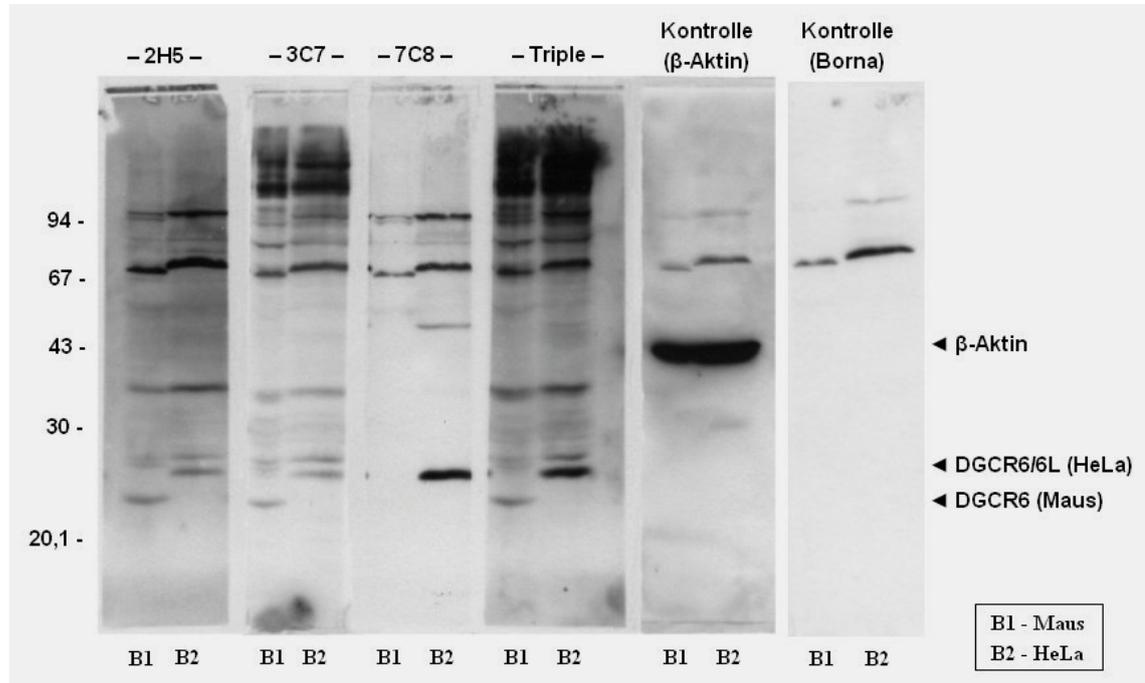


Abb. 4.18: Nachweis des DGCR6-Proteins in Mausgewebe (NIH-3T3-Zellen)

Aufgetragen sind die DGCR6-spezifischen Antikörper 2H5, 3C7 und 7C8, wobei letzterer das Mausprotein nicht färbt; Proteinmengenkontrolle über β -Aktin; Hintergrundbestimmung zum Nachweis der Spezifität der DGCR6-Färbung über das Bornavirus

5 DISKUSSION

5.1 DGCR6 / DGCR6L - Überblick	63
5.1.2. Phosphorylierung	63
5.1.3. Gewebeexpression	64
5.1.4. Funktion des DGCR6 / DGCR6L	65
5.1.4.1 Die Signifikanz der beiden funktionellen DGCR6 Gene	65
5.1.4.2 Biochemische Charakterisierung der beiden DGCR6 Proteine	66
5.1.4.3 Die DGCR6 Gene/Proteine in der Embryologie	67
5.1.4.4 Assoziation der DGCR6 / DGCR6L Proteine mit Tumorentstehung	68
5.2 Das DiGeorgesyndrom und die Schizophrenie	68
5.2.1 Bisherige Ansätze der Schizophrenie-Forschung	68
5.2.2 Die Assoziation mit dem 22q11-Lokus	69
5.2.3 Expression der DGCR6 Proteine im Gehirngewebe	70
5.2.4 Die DGCR6/L-Proteine im Kleinhirn	71
5.2.5 Die DGCR6/L-Proteine im Tumorgewebe	73
5.3 Zusammenfassung und Ausblick	73

5.1 DGCR6 / DGCR6L - Überblick

Die ursprüngliche Beschreibung des DGCR6 Gens durch DEMCZUK et al. (1996) sagte ein Protein von einer Größe von ca. 80 Aminosäuren voraus. Fünf Jahre später wurde von zwei Allelen des DGCR6 Gens berichtet, die beim Menschen im Bereich des 22q11 Locus lokalisiert sind und für ein Protein von 220 Aminosäuren codieren (EDELDMANN et al., 2001). In einem Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment zeigte sich das DGCR6-Protein bei der Suche nach zellulären Partnerproteinen von EBNA2 und EBNA3c als potentieller Bindungspartner (GRÄSSER, 2003, unveröffentlicht). Um die Funktion des mutmaßlichen DGCR6-Proteins zu untersuchen, wurden monoklonale Antikörper gegen die DGCR6 / DGCR6L-Region hergestellt. Dazu wurde ein DGCR6 / DGCR6L-Konstrukt mit HA-„Tag“ kloniert, um das exprimierte Protein mittels HA-Antikörper (Roche) nachzuweisen. Nach erfolgreicher Klonierung konnten die neu hergestellten monoklonalen Antikörper gegen das DGCR6 / DGCR6L getestet werden (PFUHL et al., 2005). Dabei zeigte das DGCR6-Protein im Vergleich zum DGCR6L-Protein eine leicht erhöhte Mobilität in der SDS-Page. In verschiedenen Zellreihen und Geweben ließen sich zwei Banden darstellen, die mutmaßlich die zwei Formen der Proteine darstellen, deren Allele EDELDMANN et al. im Jahre 2001 beschrieben hatte.

5.1.2 Phosphorylierung

Jedoch konnte auch eine Phosphorylierung des DGCR6-Proteins für die Migrationsdifferenz verantwortlich sein. Da beide Proteine, das DGCR6 und das DGCR6L, phosphoryliert sind (Abb. 4.2), wurden sie mit ^{32}P markiert und mittels einer SDS-Page analysiert. Auch hier ist das unterschiedliche Laufverhalten der beiden Proteine zu sehen (Abb. 4.3). Folglich sind die Proteine DGCR6 und DGCR6L gleichzeitig exprimiert. Daraus wird deutlich, dass das unterschiedliche Laufverhalten sehr wahrscheinlich auf unterschiedliche Eigenschaften der beiden Proteine DGCR6 und DGCR6L zurückzuführen ist. Eine weitere Möglichkeit der posttranslationalen

Modifizierung, z.B. eine Glykosylierung oder Azetylierung, ist denkbar, wurde aber in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

5.1.3 Gewebeexpression

Durch die Identifizierung der beiden zu 97% homologen Proteine DGCR6 und DGCR6L stellte sich die Frage nach der Ursache der Duplikation. Es bestehen sieben Aminosäureunterschiede bei gleicher Länge der Aminosäuresequenz (EDELMAAN et al., 2001). Es wurde davon berichtet, dass zwei paraloge Gene in einem Genom erhalten werden, wenn sich asymmetrische Mutationen in den Genen, die für die regulatorische Funktion wichtig sind, anhäufen. In diesem Fall besitzen Genome mit beiden Kopien einen Selektionsvorteil (REVIEW KRAKAUER und NOWAK, 1999). Jedoch können asymmetrische Mutationen in paralogen Genen auch zu unterschiedlichen Funktionen der beiden entstehenden Proteine führen. Diese können sich in Organselektivität und Expressionsmenge manifestieren.

Erste Expressionsstudien mit menschlicher cDNA, die anhand der PCR amplifiziert wurden, zeigten eine ausgedehnte Expression des DGCR6 und DGCR6L in vielen Geweben. Eine Bestimmung der Expressionsmenge wurde nicht durchgeführt. Die DGCR6L-mRNA konnte im adulten Skelettmuskel sowie im Dünndarm nicht nachgewiesen werden (EDELMAAN et al., 2001). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von EDELMAAN et al. konnte das DGCR6 bzw. DGCR6L-Protein in einem käuflich erworbenen erhältlichen Western Blot mit humanen Extrakten in Herz, Gehirn, Leber, Pankreas und Plazenta mittels der neu entwickelten Anti-DiGeorge-Antikörper nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Herzgewebe jedoch nur eine einzige starke Bande und im Skelettmuskel eine deutliche Doppelbande für das DGCR6 und DGCR6L. Es zeigten sich hohe Mengen an DGCR6 / DGCR6L im Herzen, in der Leber und im Skelettmuskel, mittlere Mengen in Pankreas und Plazenta und geringe, aber detektierbare, Mengen in Gehirngewebe.

Verglichen mit dem menschlichen DGCR6-Protein teilt die Maus 92% und das Huhn 77% Sequenzhomologie (EDELMAAN et al., 2001). Aufgrund der hohen Konservierung auf Ebene der Aminosäuren unter Wirbeltieren bot sich das Kaninchen als Versuchsmodell an. Im Kaninchengewebe konnten die beiden Proteine mittels der

anti-DGCR6-Antikörper klar detektiert werden. In allen getesteten Geweben ließ sich das DGCR6 bzw. das DGCR6L-Protein nachweisen. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Arbeiten an Mensch und Mausgewebe überein (LINDSAY et al., 1997; EDELMANN et al., 2001). Zudem wurden deutliche Unterschiede im Expressionsmuster sichtbar. Hohe Mengen an DGCR6L zeigten Herz, Leber, Ovarien, Niere und Nebenniere, während die DGCR6-Mengen sehr niedrig waren. Die Bande des Skelettmuskels zeigt sich im Vergleich zum humanen Gewebe sehr schwach. Jedoch fand sich ein breites und deutliches Signal oberhalb der DGCR6L-Bande. Ob die Ursache dafür an der unzureichenden Zertrümmerung des festen Skelettmuskelgewebes liegt oder eine Spezialität der DiGeorgeexpression im Kaninchenskelettmuskel darstellt, kann zum aktuellen Zeitpunkt der Forschung nicht differenziert werden. Deutlich sind die starke Expression im Herzmuskelgewebe, die ebenso auch im humanen Gewebe ausgeprägt ist, und eine Assoziation zu den häufigen Herzfehlern bei DiGeorgepatienten darstellen könnte. Weiterhin sind hohe Mengen an DGCR6L-Protein in den Ovarien auffällig (s. Abb. 4.17). Schwach ausgeprägt, aber vorhanden, sind sowohl DGCR6 als auch DGCR6L im Dünndarm. Im Kontrast dazu konnte keine humane cDNA im Dünndarm gefunden werden (EDELMANN et al., 2001). Im Gehirngewebe konnte in allen Bereichen (Großhirn, Kleinhirn, Medulla oblongata, Rückenmark) DGCR6 /DGCR6L schwach nachgewiesen werden, wobei eine stärkere Bande oberhalb der DGCR6L-Bande im Kleinhirn auffällt (s. Abb. 4.10-4.12 und 4.16-4.17). Überraschenderweise findet sich eine sehr starke Bande im Magengewebe mit einer Größe von ca. 35kDa. Hierbei könnte es sich am ehesten um eine Kreuzreaktion handeln. Weitere Möglichkeiten wären eine sekundäre Modifizierung (z.B. Sumoilierung). Eine Splice-Variante ist prinzipiell auch denkbar, wurde jedoch bisher in der Literatur nicht beschrieben.

5.1.4 Funktion des DGCR6 / DGCR6L

5.1.4.1 Die Signifikanz der beiden funktionellen DGCR6 Gene

Die Funktion des DGCR6 Gens ist unbekannt. In einer Studie, in der verschiedene Arten von Menschenaffen auf die DGCR6-Sequenz hin untersucht wurden, konnte die Duplikation des sc11.1 Lokus auf mindestens elf Millionen Jahre zurückdatiert werden.

Genomsequenzanalysen innerhalb des DGCR6-Gens deuten darauf hin, dass die Duplikation auf eine Affenart zurückzuführen ist, die vor 35 Millionen Jahren existiert hatte (EDELMANN et al., 2001). Die Erhaltung der Gene über diese Zeit macht es wahrscheinlich, dass die beiden Gene im menschlichen Genom eine essentielle Funktion innehaben. Im Vergleich dazu dient das PRODH-Gen, dessen funktionelle Kopie sich im sc11.1a Locus befindet, dessen Kopie im Bereich sc11.1b über die Zeit jedoch verloren gegangen ist. Überreste einer zweiten Kopie des PRODH-Gens wurden im sc11.1b Locus gefunden (GenBank Zugangsnummer: AC007663; DUNHAM et al., 1999), durch die Deletion jedoch mögliche Exone verloren. Daher ist es unwahrscheinlich, dass sich eine funktionelle Kopie des PRODH-Gens auf dem Locus sc11.1b befindet.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass gerade durch die asymmetrischen Mutationen die Funktion des darin kodierten Proteins abgeschwächt bzw. erloschen ist. Daraus würde sich für die Natur keine Notwendigkeit ergeben, beide Kopien des Gens im menschlichen Genom zu erhalten (EDELMANN et al., 2001).

5.1.4.2 Biochemische Charakterisierung der beiden DGCR6 Proteine

Das unterschiedliche Migrationsverhalten der Proteine in der SDS-Page weist auf einen Unterschied in deren Tertiärstruktur hin, der z.B. mit verschiedenen biochemischen Eigenschaften der Proteine in Verbindung gebracht werden kann. Eine Stabilitätsbestimmung der DGCR6 / DGCR6L Proteine wurde anhand einer Halbwertszeiten-Untersuchung durchgeführt. Durch die Hemmung des Proteinbiosyntheseapparates mittels Cycloheximid wurde es möglich, die metabolische Stabilität der Proteine in HeLa-Zellen und primären Fibroblasten durch zeitlich versetzte Herstellung von Zellextrakten zu untersuchen. In transfizierten HeLa-Zellen (menschliche Tumorzellen) zeigte sich eine Halbwertszeit von ca. 2,5 Stunden, sowohl für DGCR6 als auch für DGCR6L. Ein ähnliches Ergebnis erbrachte die Untersuchung transfizierter Fibroblasten mit einer Halbwertszeit zwischen 2-4 Stunden für das DGCR6L Protein und einer etwas längeren Halbwertszeit von 4-8 Stunden für das DGCR6 Protein. Zur subzellulären Lokalisationsbestimmung der beiden Proteine wurden HeLa-Zellen mit pSG5-HA-DGCR6 und pSG5-HA-DGCR6L transfiziert und

mittels der Immunfluoreszenz analysiert (beschrieben durch VOSS et al., 2001). Sowohl DGCR6 als auch DGCR6L konnten hauptsächlich im Kern und zu einem geringen Teil auch im Zytoplasma nachgewiesen werden (PFUHL et al., 2005). Eine Zellmembranfunktion, die von HIERCK et al. im Jahre 2004 postuliert wurde, erscheint daher eher unwahrscheinlich.

5.1.4.3 Die DGCR6 Gene/Proteine in der Embryologie

Das DGCR6 /DGCR6L-Gen ist homolog zum *Drosophila melanogaster* gonadal Gen (D-gdl) und zum Laminin-Gen (DEMCZUK et al., 1996). Das D-gdl wird nur in der Gametogenese exprimiert und beinhaltet vier Transskripte, wovon die ersten beiden nur in Embryos, in Ovarien und Hoden Erwachsener zu finden sind und auf eine samenzellspezifische Funktion hindeuten (SCHULZ und BUTLER, 1989). Eine überraschend deutliche Expression des DGCR6L Proteins konnte im Kaninchen-Ovarialgewebe nachgewiesen werden (s. Abb 4.17). Das Laminin-Gen ist u.a. an der Gewebeentstehung im 2-4-Zellstadium des Mäuseembryos beteiligt (ENGEL, 1992). Weiter konnten im Mäusemodell in unterschiedlichen Stadien der Embryogenese hohe Mengen an DGCR6 im Gehirn, in der Neuralleiste, in den Kiemenbögen und an den nasalen Prozesstellen E11.5 festgestellt werden. In der Maus weist das DGCR6-Transskript 198 Aminosäuren auf, die ca. 22kDa entsprechen (LINDSAY et al., 1997). In dieser Arbeit wird gezeigt, dass das DGCR6-Protein in der Maus nachweisbar ist (Kap 4.6.3).

Die Ausschaltung des DGCR6 im Hühnermodell führt zu Herzfehlern, die dem DiGeorge-Syndrom ähnlich sind (HIERCK et al., 2004), und die homozygote Inaktivierung des *Tbx1* führt zu einem dem DiGeorge-Syndrom sehr ähnlichen Phänotyp (TADDEI et al., 2001; JEROME et al., 2001).

5.1.4.4 Assoziation der DGCR6 / DGCR6L Proteine mit Tumorentstehung

In einer Arbeit von EUER et al. im Jahre 2002 wurde eine Hochregulation der beiden DGCR6 Gene mit dem metastatischen Verhalten der Mamma-Karzinom-Zelllinie MDA-MD-435 in Verbindung gebracht. Übereinstimmend mit dieser Beobachtung war die ebenfalls starke Hochregulation der DGCR6-Proteine in vielen menschlichen Tumorzellen, wobei die SAOS Osteosarkom-Zelllinie eine Ausnahme darstellt. Ebenso konnte diese Hochregulation in transformierten Lymphozyten-Zelllinien, in EBV-immortalisierten B-Lymphozyten und in aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden (PFUHL et al., 2005). Diese Beobachtungen stützen die These, dass eine Hochregulation der DGCR6-Proteine mit der Metastasierung maligner Tumoren assoziiert ist.

Im Gegensatz dazu zeigten ruhende, nicht stoffwechselaktive Fibroblasten einen höheren Gehalt an DGCR6 Protein als noch wachsende, stoffwechselaktive Fibroblasten (s. Abb 4.1). Zusätzlich ergab die Untersuchung von Gewebe des Gastrointestinaltraktes als metabolisch aktives Gewebe sehr kleine Mengen an DGCR6/DGCR6L (s. Abb 4.17), während ein deutlich höherer Gehalt in Herzgewebe und Ovarien zu messen war (s. Abb 4.16-4.17, 4.15). Weiter ergab sich eine deutliche Hochregulation der DGCR6 / DGCR6L Proteine in aktivierten T-Lymphozyten (PFUHL et al., 2005). Damit geht eine erhöhte Menge an DGCR6/L-Protein nicht immer mit einer Steigerung der Teilungsaktivität der Zellen einher. Dies jedoch könnte dann auch bedeuten, dass die Proteine eine wesentlich spezifischere Funktion in der Tumorentstehung einnehmen.

5.2 Das DiGeorgesyndrom und die Schizophrenie

5.2.1 Bisherige Ansätze der Schizophrenie-Forschung

Obwohl die Ursachen schizophrener Erkrankungen bis heute als unbekannt angesehen werden müssen, hat die klinische, die epidemiologische und insbesondere die neurobiologische Forschung gerade in den letzten zwei Jahrzehnten zu einem

beträchtlichen Erkenntnisgewinn geführt, der uns den Ursachen der Erkrankung wesentlich näher gebracht hat. Die schizophrenen Erkrankungen stellen eine wahrscheinlich heterogene Gruppe von im Allgemeinen schwerwiegenden psychischen Störungen dar. Die Vielgestaltigkeit der äußeren Erscheinungsform erschwert die neurobiologische und die ätiologisch-pathogenetische Forschung sehr. Schwerpunkte dabei spielen die Neuropsychologie, Störungen der zellulären Kommunikation, molekulargenetische Mechanismen bis hin zu integrativen Modellen der Neurobiologie. Aufgrund der Mannigfaltigkeit der betroffenen Gehirnareale entstand die Hypothese der funktionellen Diskonnektivität als Grundlage der Pathophysiologie schizophrener Psychosen. Besonders betroffen sind dabei der Frontal- und Temporallappen, das Striatum, der Thalamus und neuerdings auch vermehrt das Kleinhirn. Die damit verbundenen Modelle einer pränatalen neuronalen Entwicklungsstörung werden u.a. gestützt durch Gyrifikationsstörungen bei schizophrenen Psychosen, da die in der 20.-24. Schwangerschaftswoche erfolgende Gyrifikation durch externe Einflüsse postnatal so gut wie nicht mehr beeinflusst wird (VOGELEY et al., 2000). Ein weiterer in letzter Zeit unter großem Aufwand erforschter Bereich geht der Frage volumetrischer Veränderungen des Gehirns nach.

5.2.2 Die Assoziation mit dem 22q11-Lokus

Wie bereits im Einleitungsteil dieser Arbeit erwähnt, sind die drei häufigsten Syndrome, die mit dem 22q11-Lokus in Zusammenhang gebracht werden, zum Begriff des 22q11-Deletionssyndrom (22q11DS) zusammengefasst; dazu gehören das DiGeorge-Syndrom, das velokardiofaziale Syndrom und das conotruncal anomaly face syndrom (THOMAS et al., 1997; BASSET et al., 1998). Obwohl nicht in jedem Fall eine Mikrodeletion 22q11 nachzuweisen ist (DRISCOLL et al., 1993), darf die verwendete Methode, z.B. im Fall der Metaphase-FISH, auf deren Sensitivität hinterfragt werden (PORTNOI et al., 2005).

Im Jahre 1992 wurde erstmals über eine Gruppe von erwachsenen VCFS-Patienten berichtet, die in über 10% psychiatrische Auffälligkeiten bot (SHPRINTZEN et al., 1992). In einer großen Studie von 50 erwachsenen VCFS-Patienten erfüllten 24% die DSM-4-Kriterien für Schizophrenie (MURPHY, JONES, OWEN; 1999). In einer

weiteren Studie von Patienten mit „childhood onset schizophrenia“ wurden in 5,3% eine 22q11-Deletion nachgewiesen (SPORN et al., 2004). Die Korrelation von neurokognitiven Defiziten mit anderenorts beschriebenen morphologischen Hirnveränderungen war jedoch bisher leider nicht möglich (SIEBERER et al., 2006). In genomweiten Linkage-Studien wurde der PRODH2/DGCR6-Lokus mit der Entstehung der Schizophrenie assoziiert. Dabei wurde die Assoziation des PRODH2 in weiteren Studien belegt (LIU et al., 12/2002), der Einfluss des DGCR6 Gens bezüglich der Entstehung der Schizophrenie jedoch nicht weiter untersucht (LIU et al., 03/2002). Im Mausmodell konnte die konstante Expression des DGCR6 Gens im fetalen, postnatalen und erwachsenen Gehirngewebe nachgewiesen werden und schließt damit kritische Prozesse der neuronalen Proliferation, Migration und die Differenzierung neuronaler Regelkreise mit ein. Im Gegensatz dazu wird u.a. das Tbx1 Transkript besonders im jugendlichen Alter exprimiert, d.h. in der Zeit der Verfeinerung und Stabilisierung synaptischer Verbindungen (MAYNARD et al., 2003). Im Hühnermodell konnte die Expression des DGCR6 während der Embryogenese und der Entstehung des zentralen und peripheren Nervensystems bestätigt werden. Zudem konnte eine Repressorfunktion des DGCR6 Gens auf das Tbx1 Gen beobachtet werden (HIERCK et al., 2004). Aufgrund dieser Datenlage wurde die Untersuchung der DGCR6/DGCR6L-Proteine im Gehirngewebe schizophrener Patienten mittels monoklonaler Antikörper (PFUHL et al., 2005) interessant.

5.2.3 Expression der DGCR6 Proteine im Gehirngewebe

In der Abbildung 4.6 und 4.7 wird die Expression der beiden DGCR6-Proteine in Gehirngewebe gezeigt. Das Brodmann Areal 11 als Teil des orbitofrontalen Cortex wurde ausgewählt, da es eine wichtige Rolle in der Schizophrenieforschung einnimmt (FREEDMANN et al., 1998; CRESPO-FACORRO et al., 2000; BAARE et al., 1999). Gehirngewebe von schizophreniekranken Menschen wurden mit Gehirngewebe von gesunden Menschen kontrastiert. Doch weder in Abbildung 4.6 noch in Abbildung 4.7 ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gehirngeweben nachweisen. Eine zusätzliche Bande von ca. 35kDa konnte beobachtet werden. Auch hier liegt eine Kreuzreaktion mit anderen Proteinen am nächsten. Ein Einfluss der Autolyse post

mortem auf die Proteinexpression konnte ausgeschlossen werden (Abb. 4.8). Die Untersuchung verschiedener Gehirnareale mittels der Brodmann-Areale 11, 22 und 46 erbrachte ein uneinheitliches Bild. An insgesamt 18 Proben verschiedener Patienten (9 Schizophrenie; 9 Kontrollen) konnte keine eindeutige Expressionsdifferenz der DGCR6/L-Proteine nachvollzogen werden. Die Inkonstanz der Ergebnisse ist jedoch bemerkenswert. So ist denkbar, dass die DGCR6/L-Proteine nur bei einem bestimmten Subtyp der Schizophrenie erhöht bzw. erniedrigt sind (Schizophrenie und verwandte Störungen, Springer-Verlag, 2006). Dabei wäre es sinnvoll, dies anhand von deutlich größeren Studien mit erheblich größeren Fallzahlen differenziert zu untersuchen.

5.2.4 Die DGCR6/L-Proteine im Kleinhirn

Überraschenderweise fand sich eine überaus starke Expression der DGCR6/L-Proteine im Kleinhirn. Diese starke Expression konnte sowohl in Gehirngewebe schizophrener Menschen als auch in Normalgehirngewebe nachgewiesen werden.

Anerkannt ist die Rolle des Kleinhirns für Planung, Koordination und Feinabstimmung von Bewegungen. In einer Übersicht über 17 Studien konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von motorischen Funktionen bei Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu Gesunden gestört ist (BOKS et al., 2000). So unterschieden sich Patienten mit Schizophrenie von Gesunden insbesondere hinsichtlich der Koordination und des Funktionsablaufs. In einer kürzlich veröffentlichten Studie bestätigte sich, dass Individuen mit 22q11DS häufig eine frühkindliche motorische Entwicklungsverzögerung zeigen. So hatte die Hälfte der untersuchten Kinder und Jugendlichen mit 22q11DS nie das Stadium des Krabbelns durchlaufen, signifikant später Laufen gelernt als Kontrollen ohne Deletion, und bei zwei Drittel der Patienten waren sogar Balancestörungen manifest (ÓSKARSDÓTTIR et al., 2005). Altersunabhängig scheinen Beeinträchtigungen bei visuell-räumlichen Aufgaben sowie der Bewegungsperzeption zu bestehen. So stellten GOLDING-KUSHNER und Mitarbeiter schon im Jahre 1985 bei der Mehrheit der Patienten mit 22q11DS geringe

Koordinationsstörungen oder apraktische Phänomene fest (GOLDING-KUSHNER et. al., 1985). In einer MRT-Studie an einer kleinen Patientenserie mit VCFS fiel eine geringe Größe des Kleinhirnwurms auf (MITNICK et. al., 1994). Kasuistisch wurde zudem über eine progressive neurodegenerative Erkrankung mit deutlicher Kleinhirnatrophie bei VCFS berichtet (LYNCH et al., 1995). In einer weiteren Untersuchung von erwachsenen Patienten mit 22q11DS und Schizophrenie wurde eine mäßige Kleinhirnatrophie in 36% und eine zerebrale Hirnatrophie mit Ventrikelerweiterung in 54% gefunden (CHOW et. al., 1999; 2002). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen haben VCFS-Patienten generell ein signifikant geringeres Kleinhirnvolumen, ein signifikant geringeres Gesamtgehirnvolumen und reduzierte Volumina der weißen Substanz (van AMELSVOORT et. al., 2004). Im Gegensatz dazu stellten ELIEZ u. Mitarbeiter (Jan/2001) bei VCFS-Patienten mit maternaler Herkunft der 22q11-Deletion eine signifikante Reduktion der grauen Hirnsubstanz fest. Eine weitere Studie unter Kindern und Jugendlichen mit VCFS konnte eine signifikante Volumenminderung vor allem der grauen Substanz des Parietallappen mit einer Asymmetrie zugunsten rechts nachweisen (ELIEZ et. al., 2000). Zudem konnten signifikante Volumenminderungen temporaler und mesiotemporaler Hirnregionen nachgewiesen werden, was als mögliches gemeinsames morphologisches Substrat einer entwicklungsneurologischen Ätiologie des 22q11DS und schizophrener Psychosen diskutiert wird (ELIEZ et. al., 03/2001). Bisher sind die Ergebnisse der meisten Studien jedoch aufgrund geringer Fallzahlen oder wegen anderer methodischer Limitierungen als vorläufig zu werten.

Zusammenfassend ergibt sich aus geschilderter Datenlage eine deutliche Störung des Kleinhirns bei schizophrener Menschen im Vergleich zu Gesunden. Dabei konnten im Rahmen des 22q11DS sowohl Störungen der Motorik und Koordination als auch eine Kleinhirnatrophie belegt werden. Welche Funktionen die DGCR6/L-Proteine im Kleinhirn ausüben, ist leider noch nicht klar. Der Bezug zur Erkrankung der Patienten mit 22q11DS an Schizophrenie ist jedoch unübersehbar.

5.2.5 Die DGCR6/L-Proteine im Tumorgewebe

Um die Menge an exprimiertem DGCR6/L-Protein im Kleinhirn zu quantifizieren, wurden 5 Gehirntumoren auf die DGCR6/L-Proteinexpression getestet. Bei drei von fünf Tumoren konnte eine signifikante Erhöhung der DGCR6/L-Expression festgestellt werden. Dieses Ergebnis spiegelt die häufige Erhöhung der DGCR6/L-Proteine in Tumorgewebe wider (s. Kap. 5.1.4.4.). Bei einer direkten Gegenüberstellung der DGCR6/L-Expression in Tumorgewebe, Kleinhirn, HeLa-Zellen und Fibroblasten zeigt sich eine größere Menge an DGCR6/L-Protein in Tumorgewebe und am deutlichsten im Kleinhirn (Abb. 4.14).

5.3 Ausblick

Das Alter der DGCR6-Duplikation kann auf mindestens elf Millionen Jahre zurückdatiert werden. Die Erhaltung dieser Gene über diese Zeit macht es wahrscheinlich, dass die beiden Gene im menschlichen Genom eine essentielle Funktion innehaben (EDELDMANN et al., 2001). Die Assoziation der DGCR6-Proteine in der Embryogenese des Herzens bei Patienten mit 22q11DS gilt als gesichert. Zudem fand sich im Hühnermodell durch Ausschaltung des DGCR6 Gens ein DiGeorge-ähnlicher Phänotyp (HIERCK et al., 2004). Die genauen Mechanismen, die zu den Entwicklungsdefekten führen, sind noch Gegenstand aktueller Forschung.

Die beiden Proteine DGCR6 und DGCR6L sind in allen untersuchten Geweben des Menschen nachweisbar. Dabei fällt die hohe Expression im Herzmuskel auf, die eine mögliche Assoziation zu den entwicklungsbedingten Herzfehlern des 22q11-Deletionssyndromes darstellt.

Interessant ist die hohe Expression in den Ovarien. Zusammen mit der Homologie zum *Drosophila melanogaster* gonadal Gen und zum Laminin-Gen weist dies auf eine Funktion in der Embryogenese hin. Zudem konnten im Mäusemodell hohe Mengen an DGCR6-mRNA im Gehirngewebe, in der Neuralleiste, in den Kiemenbögen und an

den nasalen Prozesstellen E11.5 festgestellt werden (LINDSAY et al., 1997). Diese Organbereiche sind nachweislich alteriert bei Patienten mit DiGeorge-Syndrom.

Eine mögliche Assoziation der DGCR6-Proteine mit Tumorentstehung wurde erläutert. Bisher gibt es jedoch diesbezüglich nur wenige Publikationen und darf daher nicht überinterpretiert werden.

Der Begründer Emil Kraepelin, der den Begriff der „Dementia praecox“ prägte, ließ im Jahre 1913 verlauten: „Über den Ursachen der Dementia praecox schwebt heute noch ein undurchdringliches Dunkel“. Leider sind knapp hundert Jahre später Krankheit und Ursache auch heute nicht annähernd geklärt und eine adäquate Therapie liegt noch in weiter Ferne. Dennoch gibt es auf dem Gebiet der Molekulargenetik Kandidatengene, durch die versucht wird, Genetik und Krankheit bzw. deren Ausprägung zu korrelieren. In dieser Hinsicht könnten auch die beiden DGCR6-Proteine aufgrund der überraschend hohen Expression im Kleinhirn ihre Rolle innehaben. Ein größeres Patientenkollektiv und die Zuordnung der DGCR6/DGCR6L-Protein-Expression zu Subtypen der Schizophrenie könnten weitere notwendige Schwerpunkte zukünftiger Forschung darstellen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. ABBOT, S. D., ROWE, M., CADWALLADER, K., RICKSTEN, A., GORDON, J., WANG, F., RYMO, L. and RICKINSON, A. B. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J Virol*, 64, 2126-2134.
2. ARRAND, J. R., RYMO, L., WALSH, J. E., BJORCK, E., LINDAHL, T. and GRIFFIN, B. E. (1981). Molecular cloning of the complete Epstein-Barr virus genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments. *Nucleic Acids Res*, 9, 2999-3014.
3. AUGUSSEAU, S., JOUK, S., JALBERT, P. and PRIEUR, M. (1986). DiGeorge syndrome and 22q11 rearrangements. *Hum Genet*, 74, 206.
4. BAARE, W. F., HULSHOFF POL, H. E., HIJMAN, R., MALI, W. P., VIERGEVER, M. A. and KAHN, R. S. (1999). Volumetric analysis of frontal lobe regions in schizophrenia: relation to cognitive function and symptomatology. *Biol Psychiatry*, 45, 1597-1605.
5. BAER, R., BANKIER, A. T., BIGGIN, M. D., DEININGER, P. L., FARRELL, P. J., GIBSON, T. J., HATFULL, G., HUDSON, G. S., SATCHWELL, S. C., SEGUIN, C. and ET AL. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310, 207-211.

6. BAICHWAL, V. R. and SUGDEN, B. (1988). Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene*, 2, 461-467.
7. BASSETT, A. S., HODGKINSON, K., CHOW, E. W., CORREIA, S., SCUTT, L. E. and WEKSBERG, R. (1998). 22q11 deletion syndrome in adults with schizophrenia. *Am J Med Genet*, 81, 328-337.
8. BAUMFORTH, K. R., YOUNG, L. S., FLAVELL, K. J., CONSTANDINOU, C. and MURRAY, P. G. (1999). The Epstein-Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol*, 52, 307-322.
9. BOKS, M. P., RUSSO, S., KNEGTERING, R. and VAN DEN BOSCH, R. J. (2000). The specificity of neurological signs in schizophrenia: a review. *Schizophr Res*, 43, 109-116.
10. BORNKAMM, G. W. and HAMMERSCHMIDT, W. (2001). Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356, 437-459.
11. BOTTO, L. D., MAY, K., FERNHOFF, P. M., CORREA, A., COLEMAN, K., RASMUSSEN, S. A., MERRITT, R. K., O'LEARY, L. A., WONG, L. Y., ELIXSON, E. M., MAHLE, W. T. and CAMPBELL, R. M. (2003). A population-based study of the 22q11.2 deletion: phenotype, incidence, and contribution to major birth defects in the population. *Pediatrics*, 112, 101-107.
12. BUDARF, M. L., COLLINS, J., GONG, W., ROE, B., WANG, Z., BAILEY, L. C., SELLINGER, B., MICHAUD, D., DRISCOLL, D. A. and EMANUEL, B. S. (1995). Cloning a balanced translocation associated with DiGeorge syndrome and identification of a disrupted candidate gene. *Nat Genet*, 10, 269-278.

13. BUNNEY, W. E. and BUNNEY, B. G. (2000). Evidence for a compromised dorsolateral prefrontal cortical parallel circuit in schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev*, 31, 138-146.
14. BURNETTE, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112, 195-203.
15. CHOW, E. W., MIKULIS, D. J., ZIPURSKY, R. B., SCUTT, L. E., WEKSBERG, R. and BASSETT, A. S. (1999). Qualitative MRI findings in adults with 22q11 deletion syndrome and schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 46, 1436-1442.
16. CHOW, E. W., ZIPURSKY, R. B., MIKULIS, D. J. and BASSETT, A. S. (2002). Structural brain abnormalities in patients with schizophrenia and 22q11 deletion syndrome. *Biol Psychiatry*, 51, 208-215.
17. COHEN, J. I., WANG, F., MANNICK, J. and KIEFF, E. (1989). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 9558-9562.
18. CRESPO-FACORRO, B., KIM, J., ANDREASEN, N. C., O'LEARY, D. S. and MAGNOTTA, V. (2000). Regional frontal abnormalities in schizophrenia: a quantitative gray matter volume and cortical surface size study. *Biol Psychiatry*, 48, 110-119.
19. DEMCZUK, S., THOMAS, G. and AURIAS, A. (1996). Isolation of a novel gene from the DiGeorge syndrome critical region with homology to Drosophila *gdl* and to human *LAMC1* genes. *Hum Mol Genet*, 5, 633-638.

20. DESMAZE, C., PRIEUR, M., AMBLARD, F., AIKEM, M., LEDEIST, F., DEMCZUK, S., ZUCMAN, J., PLOUGASTEL, B., DELATTRE, O., CROQUETTE, M. F. and ET AL. (1993). Physical mapping by FISH of the DiGeorge critical region (DGCR): involvement of the region in familial cases. *Am J Hum Genet*, 53, 1239-1249.
21. DODSON, W. E., ALEXANDER, D., AL-AISH, M. and DE LA CRUZ, F. (1969). The DiGeorge syndrome. *Lancet*, 1, 574-575.
22. DRISCOLL, D. A., SALVIN, J., SELLINGER, B., BUDARF, M. L., MCDONALD-MCGINN, D. M., ZACKAI, E. H. and EMANUEL, B. S. (1993). Prevalence of 22q11 microdeletions in DiGeorge and velocardiofacial syndromes: implications for genetic counselling and prenatal diagnosis. *J Med Genet*, 30, 813-817.
23. DRISCOLL, D. A., SPINNER, N. B., BUDARF, M. L., MCDONALD-MCGINN, D. M., ZACKAI, E. H., GOLDBERG, R. B., SHPRINTZEN, R. J., SAAL, H. M., ZONANA, J., JONES, M. C. and ET AL. (1992). Deletions and microdeletions of 22q11.2 in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet*, 44, 261-268.
24. EDELMANN, L., PANDITA, R. K. and MORROW, B. E. (1999). Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome. *Am J Hum Genet*, 64, 1076-1086.
25. EDELMANN, L., STANKIEWICZ, P., SPITERI, E., PANDITA, R. K., SHAFFER, L., LUPSKI, J. R. and MORROW, B. E. (2001). Two functional copies of the DGCR6 gene are present on human chromosome 22q11 due to a duplication of an ancestral locus. *Genome Res*, 11, 208-217.

26. ELIEZ, S., ANTONARAKIS, S. E., MORRIS, M. A., DAHOUN, S. P. and REISS, A. L. (2001). Parental origin of the deletion 22q11.2 and brain development in velocardiofacial syndrome: a preliminary study. *Arch Gen Psychiatry*, 58, 64-68
27. ELIEZ, S., BLASEY, C. M., SCHMITT, E. J., WHITE, C. D., HU, D. and REISS, A. L. (2001). Velocardiofacial syndrome: are structural changes in the temporal and mesial temporal regions related to schizophrenia? *Am J Psychiatry*, 158, 447-453.
28. ELIEZ, S., SCHMITT, J. E., WHITE, C. D. and REISS, A. L. (2000). Children and adolescents with velocardiofacial syndrome: a volumetric MRI study. *Am J Psychiatry*, 157, 409-415.
29. ELIOPOULOS, A. G., BLAKE, S. M., FLOETTMANN, J. E., ROWE, M. and YOUNG, L. S. (1999). Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates the JNK pathway through its extreme C terminus via a mechanism involving TRADD and TRAF2. *J Virol*, 73, 1023-1035.
30. ELIOPOULOS, A. G., STACK, M., DAWSON, C. W., KAYE, K. M., HODGKIN, L., SIHOTA, S., ROWE, M. and YOUNG, L. S. (1997). Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene*, 14, 2899-2916.
31. ELIOPOULOS, A. G. and YOUNG, L. S. (1998). Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene*, 16, 1731-1742.

32. ENGEL, J. (1992). Laminins and other strange proteins. *Biochemistry*, 31, 10643-10651.
33. EPSTEIN, M. A., BARR, Y. M. and ACHONG, B. G. (1964). A Second Virus-Carrying Tissue Culture Strain (Eb2) of Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Pathol Biol (Paris)*, 12, 1233-1234.
34. EUER, N., SCHWIRZKE, M., EVTIMOVA, V., BURTSCHER, H., JARSCH, M., TARIN, D. and WEIDLE, U. H. (2002). Identification of genes associated with metastasis of mammary carcinoma in metastatic versus non-metastatic cell lines. *Anticancer Res*, 22, 733-740.
35. FREEDMAN, M., BLACK, S., EBERT, P. and BINNS, M. (1998). Orbitofrontal function, object alternation and perseveration. *Cereb Cortex*, 8, 18-27.
36. GERBER, P., LUCAS, S., NONOYAMA, M., PERLIN, E. and GOLDSTEIN, L. I. (1972). Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet*, 2, 988-989.
37. GEY, G., COFFMAN, W., KUBICEK, M. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium *Cancer Research*
38. GIRES, O., KOHLHUBER, F., KILGER, E., BAUMANN, M., KIESER, A., KAISER, C., ZEIDLER, R., SCHEFFER, B., UEFFING, M. and HAMMERSCHMIDT, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J*, 18, 3064-3073.

39. GOLDING-KUSHNER, K. J., WELLER, G. and SHPRINTZEN, R. J. (1985). Velo-cardio-facial syndrome: language and psychological profiles. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 5, 259-266.
40. GOLDMAN-RAKIC, P. S. and SELEMON, L. D. (1997). Functional and anatomical aspects of prefrontal pathology in schizophrenia. *Schizophr Bull*, 23, 437-458.
41. GOLDMUNTZ, E., CLARK, B. J., MITCHELL, L. E., JAWAD, A. F., CUNEO, B. F., REED, L., MCDONALD-MCGINN, D., CHIEN, P., FEUER, J., ZACKAI, E. H., EMANUEL, B. S. and DRISCOLL, D. A. (1998). Frequency of 22q11 deletions in patients with conotruncal defects. *J Am Coll Cardiol*, 32, 492-498.
42. GRAHAM, A. (2003). Development of the pharyngeal arches. *Am J Med Genet A*, 119, 251-256.
43. GRASSER, F. A., HAISS, P., GOTTEL, S. and MUELLER-LANTZSCH, N. (1991). Biochemical characterization of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2A. *J Virol*, 65, 3779-3788.
44. GREENBERG and RIDDEL (1999). Deficient Cellular Immunity--Finding and Fixing the Defects *Science* 10, 1126.
45. GREGORY, C. D., DIVE, C., HENDERSON, S., SMITH, C. A., WILLIAMS, G. T., GORDON, J. and RICKINSON, A. B. (1991). Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis. *Nature*, 349, 612-614.

46. GRIGORIADIS, S. and SEEMAN, M. V. (2002). The role of estrogen in schizophrenia: implications for schizophrenia practice guidelines for women. *Can J Psychiatry*, 47, 437-442.
47. GRUNDHOFF, A. T., KREMMER, E., TURECI, O., GLIEDEN, A., GINDORF, C., ATZ, J., MUELLER-LANTZSCH, N., SCHUBACH, W. H. and GRASSER, F. A. (1999). Characterization of DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. *J Biol Chem*, 274, 19136-19144.
48. GURIS, D. L., DUESTER, G., PAPAIOANNOU, V. E. and IMAMOTO, A. (2006). Dose-dependent interaction of Tbx1 and Crkl and locally aberrant RA signaling in a model of del22q11 syndrome. *Dev Cell*, 10, 81-92.
49. HALFORD, S., LINDSAY, E., NAYUDU, M., CAREY, A. H., BALDINI, A. and SCAMBLER, P. J. (1993). Low-copy-number repeat sequences flank the DiGeorge/velo-cardio-facial syndrome loci at 22q11. *Hum Mol Genet*, 2, 191-196.
50. HALL, J. G. (1993). Catch 22. *J Med Genet*, 30, 801-802.
51. HAMMERSCHMIDT, W. and SUGDEN, B. (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature*, 340, 393-397.
52. HENDERSON, S., ROWE, M., GREGORY, C., CROOM-CARTER, D., WANG, F., LONGNECKER, R., KIEFF, E. and RICKINSON, A. (1991). Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell*, 65, 1107-1115.

53. HENLE, G., HENLE, W. and DIEHL, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 59, 94-101.
54. HERRMANN, K. and NIEDOBITEK, G. (2003). Epstein-Barr virus-associated carcinomas: facts and fiction. *J Pathol*, 199, 140-145.
55. HIERCK, B. P., MOLIN, D. G., BOOT, M. J., POELMANN, R. E. and GITTENBERGER-DE GROOT, A. C. (2004). A chicken model for DGCR6 as a modifier gene in the DiGeorge critical region. *Pediatr Res*, 56, 440-448.
56. HUEN, D. S., HENDERSON, S. A., CROOM-CARTER, D. and ROWE, M. (1995). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene*, 10, 549-560.
57. JEROME, L. A. and PAPAIOANNOU, V. E. (2001). DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet*, 27, 286-291.
58. KARAYIORGOU, M., MORRIS, M. A., MORROW, B., SHPRINTZEN, R. J., GOLDBERG, R., BORROW, J., GOS, A., NESTADT, G., WOLYNIEC, P. S., LASSETER, V. K. and ET AL. (1995). Schizophrenia susceptibility associated with interstitial deletions of chromosome 22q11. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7612-7616.
59. KELLEY, R. I., ZACKAI, E. H., EMANUEL, B. S., KISTENMACHER, M., GREENBERG, F. and PUNNETT, H. H. (1982). The association of the DiGeorge anomaly with partial monosomy of chromosome 22. *J Pediatr*, 101, 197-200.

60. KELLY, D., GOLDBERG, R., WILSON, D., LINDSAY, E., CAREY, A., GOODSHIP, J., BURN, J., CROSS, I., SHPRINTZEN, R. J. and SCAMBLER, P. J. (1993). Confirmation that the velo-cardio-facial syndrome is associated with haplo-insufficiency of genes at chromosome 22q11. *Am J Med Genet*, 45, 308-312.
61. KIEFF, E. (1996). Epstein-Barr Virus and its replication. In *Fields Virology* (B. Fields, D. Knipe, P. Howley, Eds.), Vol. 2, pp. 2343-2396. 2 vols. Lippincott-Raven, Philadelphia.
62. KINTNER, C. R. and SUGDEN, B. (1979). The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus. *Cell*, 17, 661-671.
63. KIRKPATRICK, J. A., JR. and DIGEORGE, A. M. (1968). Congenital absence of the thymus. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, 103, 32-37.
64. KORBIDIAN BRODMANN (1909, 2.AUFLAGE 1925) Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde : in ihren Principien dargestellt auf Grund des Zellenbaues *Johann Ambrosius Barth Verlag Leipzig*.
65. KRAKAUER, D. C. and NOWAK, M. A. (1999). Evolutionary preservation of redundant duplicated genes. *Semin Cell Dev Biol*, 10, 555-559.
66. LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
67. LAHERTY, C. D., HU, H. M., OPIPARI, A. W., WANG, F. and DIXIT, V. M. (1992). The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem*, 267, 24157-24160.

68. LI, T., MA, X., SHAM, P. C., SUN, X., HU, X., WANG, Q., MENG, H., DENG, W., LIU, X., MURRAY, R. M. and COLLIER, D. A. (2004). Evidence for association between novel polymorphisms in the PRODH gene and schizophrenia in a Chinese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 129, 13-15.
69. LIAO, J., KOCHILAS, L., NOWOTSCHIN, S., ARNOLD, J. S., AGGARWAL, V. S., EPSTEIN, J. A., BROWN, M. C., ADAMS, J. and MORROW, B. E. (2004). Full spectrum of malformations in velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome mouse models by altering Tbx1 dosage. *Hum Mol Genet*, 13, 1577-1585.
70. LIDDLE, P. F. and MORRIS, D. L. (1991). Schizophrenic syndromes and frontal lobe performance. *Br J Psychiatry*, 158, 340-345.
71. LINDSAY, E. A. (2001). Chromosomal microdeletions: dissecting del22q11 syndrome. *Nat Rev Genet*, 2, 858-868.
72. LINDSAY, E. A. and BALDINI, A. (1997). A mouse gene (Dgcr6) related to the Drosophila gonadal gene is expressed in early embryogenesis and is the homolog of a human gene deleted in DiGeorge syndrome. *Cytogenet Cell Genet*, 79, 243-247.
73. LINDSAY, E. A., BOTTA, A., JURECIC, V., CARATTINI-RIVERA, S., CHEAH, Y. C., ROSENBLATT, H. M., BRADLEY, A. and BALDINI, A. (1999). Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region. *Nature*, 401, 379-383.

74. LINDSAY, E. A., GREENBERG, F., SHAFFER, L. G., SHAPIRA, S. K., SCAMBLER, P. J. and BALDINI, A. (1995). Submicroscopic deletions at 22q11.2: variability of the clinical picture and delineation of a commonly deleted region. *Am J Med Genet*, 56, 191-197.
75. LINDSAY, E. A., HALFORD, S., WADEY, R., SCAMBLER, P. J. and BALDINI, A. (1993). Molecular cytogenetic characterization of the DiGeorge syndrome region using fluorescence in situ hybridization. *Genomics*, 17, 403-407.
76. LIU, H., ABECASIS, G. R., HEATH, S. C., KNOWLES, A., DEMARS, S., CHEN, Y. J., ROOS, J. L., RAPOPORT, J. L., GOGOS, J. A. and KARAYIORGOU, M. (2002). Genetic variation in the 22q11 locus and susceptibility to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 16859-16864.
77. LIU, H., HEATH, S. C., SOBIN, C., ROOS, J. L., GALKE, B. L., BLUNDELL, M. L., LENANE, M., ROBERTSON, B., WIJSMAN, E. M., RAPOPORT, J. L., GOGOS, J. A. and KARAYIORGOU, M. (2002). Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 3717-3722.
78. LYNCH, D. R., MCDONALD-MCGINN, D. M., ZACKAI, E. H., EMANUEL, B. S., DRISCOLL, D. A., WHITAKER, L. A. and FISCHBECK, K. H. (1995). Cerebellar atrophy in a patient with velocardiofacial syndrome. *J Med Genet*, 32, 561-563.
79. MATSUOKA, R., TAKAO, A., KIMURA, M., IMAMURA, S., KONDO, C., JOH-O, K., IKEDA, K., NISHIBATAKE, M., ANDO, M. and MOMMA, K. (1994). Confirmation that the conotruncal anomaly face syndrome is associated with a deletion within 22q11.2. *Am J Med Genet*, 53, 285-289.

80. MAYNARD, T. M., HASKELL, G. T., PETERS, A. Z., SIKICH, L., LIEBERMAN, J. A. and LAMANTIA, A. S. (2003). A comprehensive analysis of 22q11 gene expression in the developing and adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14433-14438.
81. MCDONALD-MCGINN, D. M., KIRSCHNER, R., GOLDMUNTZ, E., SULLIVAN, K., EICHER, P., GERDES, M., MOSS, E., SOLOT, C., WANG, P., JACOBS, I., HANDLER, S., KNIGHTLY, C., HEHER, K., WILSON, M., MING, J. E., GRACE, K., DRISCOLL, D., PASQUARIELLO, P., RANDALL, P., LAROSSA, D., EMANUEL, B. S. and ZACKAI, E. H. (1999). The Philadelphia story: the 22q11.2 deletion: report on 250 patients. *Genet Couns*, 10, 11-24.
82. MEITINGER, C., STROBL, L. J., MARSCHALL, G., BORNKAMM, G. W. and ZIMBER-STROBL, U. (1994). Crucial sequences within the Epstein-Barr virus TP1 promoter for EBNA2-mediated transactivation and interaction of EBNA2 with its responsive element. *J Virol*, 68, 7497-7506.
83. MITNICK, R. J., BELLO, J. A. and SHPRINTZEN, R. J. (1994). Brain anomalies in velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet*, 54, 100-106.
84. MURPHY, K. C., JONES, L. A. and OWEN, M. J. (1999). High rates of schizophrenia in adults with velo-cardio-facial syndrome. *Arch Gen Psychiatry*, 56, 940-945.
85. MURRAY, P. G. and YOUNG, L. S. (2001). Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med*, 2001, 1-20.

86. NAKAGOMI, H., DOLCETTI, R., BEJARANO, M. T., PISA, P., KIESSLING, R. and MASUCCI, M. G. (1994). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer*, 57, 240-244.
87. OSKARSDOTTIR, S., BELFRAGE, M., SANDSTEDT, E., VIGGEDAL, G. and UVEBRANT, P. (2005). Disabilities and cognition in children and adolescents with 22q11 deletion syndrome. *Dev Med Child Neurol*, 47, 177-184.
88. PFUHL, T., DURR, M., SPURK, A., SCHWALBERT, B., NORD, R., MYSLIWIETZ, J., KREMMER, E. and GRASSER, F. A. (2005). Biochemical characterisation of the proteins encoded by the DiGeorge critical region 6 (DGCR6) genes. *Hum Genet*, 117, 70-80.
89. POLACK, A., HARTL, G., ZIMBER, U., FREESE, U. K., LAUX, G., TAKAKI, K., HOHN, B., GISSMANN, L. and BORNKAMM, G. W. (1984). A complete set of overlapping cosmid clones of M-ABA virus derived from nasopharyngeal carcinoma and its similarity to other Epstein-Barr virus isolates. *Gene*, 27, 279-288.
90. PORTNOI, M. F., LEBAS, F., GRUCHY, N., ARDALAN, A., BIRAN-MUCIGNAT, V., MALAN, V., FINKEL, L., ROGER, G., DUCROCQ, S., GOLD, F., TAILLEMITE, J. L. and MARLIN, S. (2005). 22q11.2 duplication syndrome: two new familial cases with some overlapping features with DiGeorge/velocardiofacial syndromes. *Am J Med Genet A*, 137, 47-51.
91. PULVER, A. E., NESTADT, G., GOLDBERG, R., SHPRINTZEN, R. J., LAMACZ, M., WOLYNIEC, P. S., MORROW, B., KARAYIORGOU, M., ANTONARAKIS, S. E., HOUSMAN, D. and ET AL. (1994). Psychotic illness in patients diagnosed with velo-cardio-facial syndrome and their relatives. *J Nerv Ment Dis*, 182, 476-478.

92. RICKINSON, A. B., KIEFF, E. (1996). Epstein-Barr Virus. In *Fields Virology* (B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds.), Vol. 2, pp. 2397-2446. 2 vols. Lippincott-Raven, Philadelphia.
93. RICKINSON, A. B., LEE, S. P. and STEVEN, N. M. (1996). Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. *Curr Opin Immunol*, 8, 492-497.
94. RICKINSON, A. B. and MOSS, D. J. (1997). Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol*, 15, 405-431.
95. ROBIN, N. H. and SHPRINTZEN, R. J. (2005). Defining the clinical spectrum of deletion 22q11.2. *J Pediatr*, 147, 90-96.
96. ROBINSON, H. B., JR. (1975). DiGeorge's or the III-IV pharyngeal pouch syndrome: pathology and a theory of pathogenesis. *Perspect Pediatr Pathol*, 2, 173-206.
97. ROHN, R. D., LEFFELL, M. S., LEADEM, P., JOHNSON, D., RUBIO, T. and EMANUEL, B. S. (1984). Familial third-fourth pharyngeal pouch syndrome with apparent autosomal dominant transmission. *J Pediatr*, 105, 47-51.
98. ROIZMAN, B. (1990). Whither herpesviruses? *Adv Exp Med Biol*, 278, 285-291.
99. ROONEY, C., HOWE, J. G., SPECK, S. H. and MILLER, G. (1989). Influence of Burkitt's lymphoma and primary B cells on latent gene expression by the nonimmortalizing P3J-HR-1 strain of Epstein-Barr virus. *J Virol*, 63, 1531-1539.

100. RYAN, A. K., GOODSHIP, J. A., WILSON, D. I., PHILIP, N., LEVY, A., SEIDEL, H., SCHUFFENHAUER, S., OECHSLER, H., BELOHRADSKY, B., PRIEUR, M., AURIAS, A., RAYMOND, F. L., CLAYTON-SMITH, J., HATCHWELL, E., MCKEOWN, C., BEEMER, F. A., DALLAPICCOLA, B., NOVELLI, G., HURST, J. A., IGNATIUS, J., GREEN, A. J., WINTER, R. M., BRUETON, L., BRONDUM-NIELSEN, K., SCAMBLER, P. J. and ET AL. (1997). Spectrum of clinical features associated with interstitial chromosome 22q11 deletions: a European collaborative study. *J Med Genet*, 34, 798-804.
101. SAMPLE, J., YOUNG, L., MARTIN, B., CHATMAN, T., KIEFF, E., RICKINSON, A. and KIEFF, E. (1990). Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol*, 64, 4084-4092.
102. SAUDER, C., MULLER, A., CUBITT, B., MAYER, J., STEINMETZ, J., TRABERT, W., ZIEGLER, B., WANKE, K., MUELLER-LANTZSCH, N., DE LA TORRE, J. C. and GRASSER, F. A. (1996). Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA. *J Virol*, 70, 7713-7724.
103. SCAMBLER, P. J. (2000). The 22q11 deletion syndromes. *Hum Mol Genet*, 9, 2421-2426.
104. SCAMBLER, P. J., KELLY, D., LINDSAY, E., WILLIAMSON, R., GOLDBERG, R., SHPRINTZEN, R., WILSON, D. I., GOODSHIP, J. A., CROSS, I. E. and BURN, J. (1992). Velo-cardio-facial syndrome associated with chromosome 22 deletions encompassing the DiGeorge locus. *Lancet*, 339, 1138-1139.

105. SCHULZ, R. A. and BUTLER, B. A. (1989). Overlapping genes of *Drosophila melanogaster*: organization of the z600-gonadal-Eip28/29 gene cluster. *Genes Dev*, 3, 232-242.
106. SHAIKH, T. H., KURAHASHI, H. and EMANUEL, B. S. (2001). Evolutionarily conserved low copy repeats (LCRs) in 22q11 mediate deletions, duplications, translocations, and genomic instability: an update and literature review. *Genet Med*, 3, 6-13.
107. SHAPLESKE, J., ROSSELL, S. L., WOODRUFF, P. W. and DAVID, A. S. (1999). The planum temporale: a systematic, quantitative review of its structural, functional and clinical significance. *Brain Res Brain Res Rev*, 29, 26-49.
108. SHPRINTZEN, R. J., GOLDBERG, R., GOLDING-KUSHNER, K. J. and MARION, R. W. (1992). Late-onset psychosis in the velo-cardio-facial syndrome. *Am J Med Genet*, 42, 141-142.
109. SHPRINTZEN, R. J., GOLDBERG, R. B., LEWIN, M. L., SIDOTI, E. J., BERKMAN, M. D., ARGAMASO, R. V. and YOUNG, D. (1978). A new syndrome involving cleft palate, cardiac anomalies, typical facies, and learning disabilities: velo-cardio-facial syndrome. *Cleft Palate J*, 15, 56-62.
110. SHPRINTZEN, R. J., HIGGINS, A. M., ANTSHEL, K., FREMONT, W., ROIZEN, N. and KATES, W. (2005). Velo-cardio-facial syndrome. *Curr Opin Pediatr*, 17, 725-730.
111. SIEBERER, M., RUNTE, I., WILKENING, A., PABST, B., ZIEGENBEIN, M. and HALTENHOF, H. (2006). [Spectrum of neuropsychiatric features associated with velocardiofacial syndrome (Deletion 22q11.2)]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 74, 263-274.

112. SKARE, J. and STROMINGER, J. L. (1980). Cloning and mapping of BamHI endonuclease fragments of DNA from the transforming B95-8 strain of Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77, 3860-3864.
113. SPORN, A., ADDINGTON, A., REISS, A. L., DEAN, M., GOGTAY, N., POTOČNIK, U., GREENSTEIN, D., HALLMAYER, J., GOCHMAN, P., LENANE, M., BAKER, N., TOSSELL, J. and RAPOPORT, J. L. (2004). 22q11 deletion syndrome in childhood onset schizophrenia: an update. *Mol Psychiatry*, 9, 225-226.
114. STROBL, L. J. and ZIMBER-STROBL, U. (2001). Magnetic DNA affinity purification of a cellular transcription factor. *Methods Mol Biol*, 174, 271-277.
115. SUBRAMANIAN, C., COTTER, M. A., 2ND and ROBERTSON, E. S. (2001). Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: a molecular link to cancer metastasis. *Nat Med*, 7, 350-355.
116. SUBRAMANIAN, C. and ROBERTSON, E. S. (2002). The metastatic suppressor Nm23-H1 interacts with EBNA3C at sequences located between the glutamine- and proline-rich domains and can cooperate in activation of transcription. *J Virol*, 76, 8702-8709.
117. SUGAMA, S., NAMIHIRA, T., MATSUOKA, R., TAIRA, N., ETO, Y. and MAEKAWA, K. (1999). Psychiatric inpatients and chromosome deletions within 22q11.2. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 67, 803-806.
118. TADDEI, I., MORISHIMA, M., HUYNH, T. and LINDSAY, E. A. (2001). Genetic factors are major determinants of phenotypic variability in a mouse model of the DiGeorge/del22q11 syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 11428-11431.

119. THOMAS, E. A., DEAN, B., SCARR, E., COPOLOV, D. and SUTCLIFFE, J. G. (2003). Differences in neuroanatomical sites of apoD elevation discriminate between schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry*, 8, 167-175.
120. THOMAS, J. A. and GRAHAM, J. M., JR. (1997). Chromosomes 22q11 deletion syndrome: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr (Phila)*, 36, 253-266.
121. THOMAS JAHN, BRIGITTE ROCKSTROH (2006) Neurobiologie psychischer Störungen *Springerverlag Berlin Heidelberg* DOI 10.1007/3-540-30887-3 ISBN 978-3-540-25694-6 (Print) 978-3-540-30887-4 (Online)
122. TIENARI, P., WYNNE, L. C., SORRI, A., LAHTI, I., LAKSY, K., MORING, J., NAARALA, M., NIEMINEN, P. and WAHLBERG, K. E. (2004). Genotype-environment interaction in schizophrenia-spectrum disorder. Long-term follow-up study of Finnish adoptees. *Br J Psychiatry*, 184, 216-222.
123. TOMKINSON, B., ROBERTSON, E. and KIEFF, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol*, 67, 2014-2025.
124. USISKIN, S. I., NICOLSON, R., KRASNEWICH, D. M., YAN, W., LENANE, M., WUDARSKY, M., HAMBURGER, S. D. and RAPOPORT, J. L. (1999). Velocardiofacial syndrome in childhood-onset schizophrenia. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 38, 1536-1543.
125. VAN AMELSVOORT, T., DALY, E., HENRY, J., ROBERTSON, D., NG, V., OWEN, M., MURPHY, K. C. and MURPHY, D. G. (2004). Brain anatomy in adults with velocardiofacial syndrome with and without schizophrenia: preliminary results of a structural magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry*, 61, 1085-1096.

126. VELO-CARDIO-FACIAL SYNDROME EDUCATIONAL FOUNDATION, INC. (www.vcfsef.org); P.O. Box 874 Milltown, NJ 08850
127. VOGEELEY, K., SCHNEIDER-AXMANN, T., PFEIFFER, U., TEPEST, R., BAYER, T. A., BOGERTS, B., HONER, W. G. and FALKAI, P. (2000). Disturbed gyrification of the prefrontal region in male schizophrenic patients: A morphometric postmortem study. *Am J Psychiatry*, 157, 34-39.
128. VOSS, M. D., HILLE, A., BARTH, S., SPURK, A., HENNRICH, F., HOLZER, D., MUELLER-LANTZSCH, N., KREMMER, E. and GRASSER, F. A. (2001). Functional cooperation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and the survival motor neuron protein in transactivation of the viral LMP1 promoter. *J Virol*, 75, 11781-11790.
129. WANG, D., LIEBOWITZ, D. and KIEFF, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, 43, 831-840.
130. WANG, F., GREGORY, C. D., ROWE, M., RICKINSON, A. B., WANG, D., BIRKENBACH, M., KIKUTANI, H., KISHIMOTO, T. and KIEFF, E. (1987). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 3452-3456.
131. WANG, F., TSANG, S. F., KURILLA, M. G., COHEN, J. I. and KIEFF, E. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J Virol*, 64, 3407-3416.
132. WILSON, D. I., BURN, J., SCAMBLER, P. and GOODSHIP, J. (1993). DiGeorge syndrome: part of CATCH 22. *J Med Genet*, 30, 852-856.

133. ZIMBER, U., ADLDINGER, H. K., LENOIR, G. M., VUILLAUME, M., KNEBEL-DOEBERITZ, M. V., LAUX, G., DESGRANGES, C., WITTMANN, P., FREESE, U. K., SCHNEIDER, U. and ET AL. (1986). Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology*, 154, 56-66.
134. ZIMBER-STROBL, U., KREMMER, E., GRASSER, F., MARSCHALL, G., LAUX, G. and BORNKAMM, G. W. (1993). The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 interacts with an EBNA2 responsive cis-element of the terminal protein 1 gene promoter. *Embo J*, 12, 167-175.
135. ZIMBER-STROBL, U. and STROBL, L. J. (2001). EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin Cancer Biol*, 11, 423-434.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Einleitungsteil

1.1	Das Epstein-Barr Virus Genom	8
1.2	Schematische Darstellung der sc11.1 Duplikation auf Chromosom 22q11	14
1.3	Histologische Einteilung der Großhirnrinde nach Korbinian Brodmann	16

Ergebnisteil

4.1	DGCR6 – Expression in wachsenden und ruhenden Fibroblasten	44
4.2	Phosphorylierung des DGCR6 /DGCR6L – HeLa-Zellen	45
4.3	Phosphorylierung von DGCR6 / DGCR6L – COS-Zellen	46
4.4	Bestimmung der Halbwertszeit von DGCR6 und DGCR6L in HeLa-Zellen	48
4.5	Bestimmung der Halbwertszeit von DGCR6 und DGCR6L in Fibroblasten	49
4.6	Expression von DGCR6 / DGCR6L in Schizophrenie-/Normalgehirn (1)	51
4.7	Expression von DGCR6 / DGCR6L in Schizophrenie-/Normalgehirn (2)	52
4.8/	Proteingehalt des DGCR6 /6L in Abhängigkeit vom Zeitpunkt	53/
4.9	der Entnahme post mortem	54
4.10/	Vergleich der Gehirnnareale Brodmann B11, G46, 22P und	55/
4.11/	Kleinhirn in Gehirngewebe von an Schizophrenie erkrankten	56
4.12	Menschen (S) im Vergleich zu Normalgehirngewebe (N)	
4.13	Vergleich der DGCR6/L - Expression in Tumorgewebe und Normalgehirngewebe	57
4.14	Vergleich von Kleinhirngewebe mit Tumorgewebe	58
4.15	Expression des DGCR6 in menschlichen Geweben	59
4.16/	Nachweis des DGCR6/6L in Kaninchengewebe	60
4.17		
4.18	Nachweis des DGCR6-Proteins in Mausgewebe (NIH-3T3-Zellen)	61

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Absorption
α	Anti
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CMV	Cytomegalievirus
CR	Critical region
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ds	Doppelstrang
EBNA	Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	Fötale Kälberserum
HA	Hämagglutinin
IG	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge (lamda)
min	Minute
mRNA	Messenger – Ribonukleinsäure
PBS	polyacrylamidgelelektrophorese phosphate buffred saline
rpm	Rounds per Minute
SB	Sample buffer
ss	Single Strang

9 PUBLIKATIONEN

Die Experimente zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg / Saar durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:
Human Genetics 117: 70-80 (2005)

Biochemical characterization of the proteins encoding the DiGeorge Critical Region 6 (DGCR 6) genes

Pfuhl, T., Dürr, M., Spurk, A., Schwalbert, B., Kremmer, E., Nord, R., Mysliwietz, J. and Grässer, F. A.85

10 Dank

Herrn Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch danke ich für die Überlassung des Themas sowie die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. A. Grässer für sein Vertrauen, seine stete Diskussionsbereitschaft und die hervorragende Betreuung.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dipl. Biol. Thorsten Pfuhl und Frau Ruth Nord für die Hilfsbereitschaft und das sehr gute Arbeitsklima bedanken.

Allen Mitarbeitern der Virologie danke ich herzlich für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Aufrichtigen Dank gebührt auch PD. Dr. Jung für die freundliche Einweisung in den Lumo-Imager.

Einen speziellen Dank gebührt Roger Herbold für seine große Hilfsbereitschaft, seine konstruktiven Ideen und seine Zuverlässigkeit.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich in verschiedenster Weise hilfreich unterstützt haben.

Mein größter Dank geht an eine Person, ohne deren Gnade und Liebe für jeden neuen Tag diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre: an den lebendigen Gott der Bibel.

11 LEBENS LAUF

Name: MATTHIAS FRIEDEMANN DÜRR
Geburtsort: Reutlingen
Geburtsdatum: 25. 05.1976
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schule: _____

Aug 83-Jun 96 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
Jul 96-Jul 97 Zivildienst als Rettungssanitäter

Studium: _____

Okt 1999 Beginn des Studiums der
Humanmedizin
Aug 2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Sept 2005 Zweiter Abschnitt der ärztlichen
Prüfung
2. November 2006 Dritter Abschnitt der ärztlichen
Prüfung
ab 18.01.2007 Approbation als Arzt