

**Untersuchungen zur
androgenetischen Alopezie:

Funktionelle Aufarbeitung des
humanen Androgenrezeptors

&

Identifizierung kausaler Gene**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

vorgelegt von
Felix Franz Brockschmidt
aus Trier

Bonn 2008

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Genetische Medizin
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. M. Nöthen
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Höfeld

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2008

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
2. Theoretische Grundlagen	3
2.1 Die Haarentwicklung	3
2.2 Die androgenetische Alopezie (AGA)	4
2.2.1 Klinik und Klassifikation	4
2.2.2 Assoziation der AGA mit anderen Erkrankungen	5
2.2.3 Pathophysiologische Konzepte der AGA	6
2.2.4 Formalgenetische Befunde der AGA	8
2.2.5 Therapie der AGA	8
2.3 Identifizierung von ursächlichen Genen bei komplexen Phänotypen	9
2.3.1 Kopplungsuntersuchungen	9
2.3.2 Assoziationsuntersuchungen	11
2.3.3 Haplotyp „tagging“	12
Genotypisierung mittels Bead Array-Technologie	13
Genotypisierung mittels MassExtend-Reaktion	15
2.4 Das <i>AR</i> -Gen als Kandidatengen für die AGA	17
2.5 Der polymorphe Glycin-Repeat in Exon 1 des <i>AR</i> -Gens	19
2.6 <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	20
3. Material & Methoden	21
3.1 Geräte	21
3.2 Chemikalien	23
3.3 Ergänzende Materialien zur Analyse von Nukleinsäuren	24
3.4 Ergänzende Materialien zur Analyse von Proteinen	25
3.5 Ergänzende Materialien für Zellkultur	25
3.6 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien	25
3.7 Kommerzielle Systeme (Kits)	27

3.8	Verwendete Zellen und Vektorsysteme	28
3.9	Software und Datenbanken	28
3.10	Nukleinsäuren	29
3.10.1	Probandenmaterial	29
3.10.2	cDNA Panels	31
3.10.3	Synthetische Oligonukleotide (Primer und Sonden)	31
3.11	Molekularbiologische Methoden	32
3.11.1	Isolierung von RNA	32
	Allgemeines zu Arbeiten mit RNA	32
	Isolierung von Gesamt-RNA aus proximalen Haarschäften	32
	Isolierung von Gesamt-RNA aus einer Kopfhautbiopsie	33
	Isolierung von Gesamt-RNA aus Haut	34
	Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen	35
3.11.2	Isolierung von DNA	36
	Allgemeines zu Arbeiten mit DNA	36
	DNA-Isolierung aus Blut, Aufbereitung und Verwaltung	36
	DNA-Isolierung aus Bakterienkultur (Plasmid-Präparation)	36
3.11.3	Aufreinigung von Nukleinsäuren	37
	Aufreinigung von amplifizierter DNA aus Reaktionsansätzen	37
	Aufreinigung von amplifizierter DNA aus Agarosegelen	38
3.11.4	Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von DNA und RNA	39
3.11.5	Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	39
3.11.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
3.11.7	Quantitative Real-Time PCR mittels TaqMan	41
3.11.8	Herstellung fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte	44
3.11.9	Enzymatische Spaltung von PCR-Produkten durch Restriktions-Endonukleasen	44
3.11.10	Agarosegelelektrophorese	45
3.11.11	Nicht radioaktive Fragmentlängenanalyse von PCR-Produkten am automatischen Sequenzierer mittels Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese	45
3.11.12	Sequenzierung von Nukleinsäuren	46
3.11.13	Genotypisierung mittels Bead Array-Technologie	48
3.11.14	Genotypisierung mittels MassExtend-Reaktion	51
3.12	Zellbiologische Methoden	54

3.12.1	Klonierungsarbeiten in <i>E. coli</i>	54
	Herstellung und Aufbewahrung chemisch kompetenter Bakterien	54
	Ligation von PCR-Produkten mittels Topoisomerase	55
	Transformation von <i>E. coli</i> nach TOPO TA Klonierung	55
	Umklonierung von unterschiedlich langen GGN-Repeatlängen Allelen	56
	Transformation von <i>E. coli</i> nach Ligation	57
3.12.2	Analyse in Zellkultur	57
	Kultivierung von adhärent wachsenden Säugerzellen	57
	Transiente Transfektion von Mammalia Zellen	58
	Quantifizierung von AR-Protein mittels	
	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	60
	Lumineszenzanalyse von transient transfizierten Zellen	61
	Western-Blot-Analyse	61
3.13	Statistische Methoden	63
3.13.1	Statistik in Fall-Kontroll Studien und familienbasierten Tests	63
	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy-Weinberg-Equilibrium, HWE)	63
	Chi ² -Test (χ^2 -Test)	63
	Odds Ratio (OR)	64
	Cochran-Armitage-Trend-Test (ATI)	64
	Allele-Frequency-Difference-Test (AFD)	64
	Transmission-Disequilibrium-Test (TDT)	64
	Bonferroni-Korrektur	65
3.13.2	Kruskal-Wallis-Test	65
4.	Ergebnisse	66
4.1	Glycinspezifische AR-Expression	66
4.1.1	AR GGN-Repeatlängen in der Bevölkerung	66
4.1.2	GGN-Repeatlängen-abhängige AR-Transaktivierungseigenschaft	66
4.1.3	GGN-Repeatlängen-abhängige Quantifizierung von AR-Protein	68
4.1.4	GGN-Repeatlängen-abhängige pro-Protein AR-Transaktivierungseigenschaft	69
4.1.5	GGN-Repeatlängen-abhängige Quantifizierung von AR-mRNA	70
4.1.6	GGN-Repeatlängen-abhängige AR-Proteinstabilität	72
4.1.7	GGN-Repeatlängen, ihre vorhergesagten Strukturen und freien Energien	74
4.2	Genomweite Assoziationsuntersuchung und ihre Validierung	75

4.2.1	Genomweite Assoziation mittels Illumina Infinium II	75
4.2.2	Replikation der Assoziation	78
4.2.3	Resequenzierung der genomischen Sequenzen von „Kojak“ und „Charlie-B“	84
4.2.4	Expressionsanalyse der Kandidatengene <i>PAX1</i> , „Kojak“ und „Charlie-B“	84
5.	Diskussion	86
5.1	Die Suche nach genetischen Ursachen für komplex vererbte Erkrankungen und die Bedeutung des <i>AR</i> -Locus für die AGA	86
5.2	Einfluss des polymorphen GGN-Repeats auf die Expression, Funktion und Stabilität des <i>AR</i>	89
5.3	Neuer AGA-Locus auf Chr. 20p11	95
6.	Zusammenfassung	102
7.	Ausblick	104
8.	Literaturverzeichnis	106
9.	Eigene Publikationen	125
10.	Anhang	IX

Danksagung

Lebenslauf

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABI	Applied Biosystems
AFD	Allele-Frequency-Difference-Test
AGA	androgenetische Alopezie
ANA	Kollektiv der Androgenetischen Alopezie
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgen Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
ATT	Cochran-Armitage-Trend-Test
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
β2M	β2-Mikroglobulin
β-ME	β-Mercaptoethanol
C	Celsius
C	Cytosin
c.i.	Konfidenzintervall
ca.	circa
CAG	Polyglutamin
cDNA	copy-Deoxiribonukleinsäure
Chr.	Chromosom
CHX	Cycloheximid
cm	Zentimeter
CNV	Copy Number Variant
corr.	korrigiert
ct	cycle threshold
Cyc	Cyclophilin
d.h.	das heißt
Da	Dalton
ddNTP	Dideoxyribonukleosidtriphosphat

DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
dest.	destilliert
DHT	Dihydrotestosteron
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Deoxiribonukleinsäure
dNTP	Deoxiribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EST	Expressed Sequence Tag
et al.	et alii
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	forward
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GGN	Polyglycin
GWA	genomweite Assoziationsuntersuchung
h	Stunden
HRP	Horseradish-Peroxidase
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare

LB	Luria-Bertani
LD	Linkage Disequilibrium
LOD	logarithmic odds ratio
M	Molar
MALDI-ToF-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry
mA	Milliampere
Mb	Megabasenpaare
MCS	Multiple Cloning Site
mg	Milligramm
min	Minuten
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MTC	Multiple-Tissue cDNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
nom.	nominal
NPL	non-parametric LOD
OD	optische Dichte
OR	Odds Ratio
P	Wahrscheinlichkeit
PAA	Polyacrylamid
PAX1	Paired Box Gen 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Pen	Penicillin
PLB	Passive Lysis Buffer
pmol	Picomol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	reverse
RLU	relative Luziferaseeinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion
SAP	Shrimp-Alkaline-Phosphatase
SBE	Single-Base-Extension
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden
SNP	Single-Nucleotide-Polymorphism
Strep	Streptomycin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TDT	Transmission-Disequilibrium-Test
tSNP	tagging SNP
U	Units
u.a.	unter anderem
UTR	untranslated region
UV	ultra violett
ü.N.	über Nacht
V	Volt
vs.	gegen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

Die Verschiedenheit von Individuen einer Art kann - neben Umweltfaktoren - auf die genetische Variabilität zurückgeführt werden. Genetische Variabilität bezeichnet die interindividuellen Unterschiede in der Sequenz des genetischen Materials, der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Der Großteil der genetischen Varianten hat keine wahrnehmbaren phänotypischen Auswirkungen. Es gibt aber auch Varianten, die phänotypische Unterschiede hervorrufen und dazu beitragen, dass jedes Individuum einzigartig ist. Sie können Ansatzpunkte für Selektionsprozesse darstellen und sind somit die treibende Kraft der Evolution. In der Humangenetik sind Veränderungen in der DNA-Sequenz des Menschen von großem Interesse, da sie die Ursache für erbliche Erkrankungen sein können.

Genetische Varianten entstehen in den meisten Fällen durch Fehler während der Replikation und Reparatur der DNA (Cooper & Krawczak, 1993). Der Prozess der Sequenzveränderung wird in der Biologie als Mutation bezeichnet. In der Humangenetik werden Sequenzvarianten als Mutationen bezeichnet, wenn sie ursächlich für Erkrankungen sind. In der Regel sind sie selten. Treten Mutationen in Zellen der Keimbahn auf, d.h. in Zellen, aus denen Eizellen bzw. Spermien hervorgehen, so werden sie an die nächste Generation weitergegeben. Einzelbasenaustausche (Single-Nucleotide-Polymorphisms, SNPs) machen rund 80% der genetischen Varianten des Menschen aus (Haff & Smirnov, 1997; Wang et al., 1998; The International HapMap Consortium, 2003). Zwei Kopien des menschlichen Genoms unterscheiden sich durchschnittlich in einer von 1.000 Basen (Li & Sadler, 1991; Wang et al., 1998; Cargill et al., 1999; Halushka et al., 1999; The International HapMap Consortium, 2003). Strukturelle Varianten wie Insertionen, Deletionen, Duplikationen, Inversionen, Translokationen und komplexe Rearrangements sind in ihrer Häufigkeit geringer (Cooper & Schmidtke, 1993). Zunehmend bedeutend werden diesbezüglich Duplikationen, Deletionen und Insertionen, die in der Allgemeinbevölkerung eine Frequenz von mehr als 1% aufweisen (Scherer et al., 2007). Sie umfassen ein Kilobasenpaar (kb) bis zu mehreren Megabasenpaaren (Mb) und werden als Kopienzahl-Varianten, so genannte „Copy Number Variants“ (CNVs) bezeichnet (Freeman et al., 2006; Scherer et al. 2007; Beckmann et al., 2007).

Etwa 3,6 von Tausend Neugeborenen tragen eine Mutation, die bei ihnen bis zum 25. Lebensjahr zur Entwicklung einer monogenen Erkrankung führt und die nach den Mendelschen Regeln weitervererbt wird. Eine sehr viel größere Zahl von Menschen entwickelt eine so genannte multifaktoriell erbliche oder genetisch komplexe Krankheit, bei der das Auftreten familiärer Häufung sowie Befunde aus Zwillings- und Adoptionsuntersuchungen für eine genetische Ursache spre-

chen. Ein Mendelscher Erbgang ist dabei nicht erkennbar. Zu diesen komplex vererbten Phänotypen zählt die androgenetische Alopezie (AGA, MIM 109200) (Küster & Happle, 1984; Nyholt et al., 2003; Hillmer et al., 2008). Über die für die Entstehung der AGA verantwortlichen Gene ist bislang nur wenig bekannt. Das Androgenrezeptor (*AR*)-Gen ist das erste bestätigte Gen, das einen Beitrag zur AGA leistet. Sawaya und Shalita publizierten 1998 die erste Assoziation zwischen AGA und einem Polyglutamin (CAG) kodierenden Repeat in Exon 1 des *AR*. Ellis et al. konnten 2001 eine Assoziation zwischen der AGA und einer Kombination von kurzen CAG- und Polyglycin (GGN) kodierenden Repeatallelen sowie einem Restriktionspolymorphismus (*StuI* (=rs6152)) jeweils im Exon 1 des *AR* zeigen. Die Assoziation zwischen dem Restriktionspolymorphismus (bzw. SNP) und AGA wurde in unabhängigen Untersuchungen bestätigt (Hayes et al., 2005; Levy-Nissenbaum et al., 2005; Hillmer et al., 2005). Bei einer systematischen Untersuchung des *AR*-Locus fanden Hillmer et al. (2005) eine hoch signifikante Assoziation eines ca. 1 Mb großen Bereichs um den *AR*. In dieser Studie war der GGN-Repeat die einzige kodierende Variante im *AR*, die mit AGA assoziiert war, und wurde daher als ursächliche Variante angenommen.

Neben dem *AR* konnte bisher kein weiteres zur AGA beitragendes Gen identifiziert werden. Ein wesentliches Ziel der Forschung ist es daher, weitere Gene zu identifizieren und zu charakterisieren, die an der Entstehung der AGA beteiligt sind. Die Kenntnis der genetischen Ursachen wird zu einem besseren Verständnis der physiologischen Prozesse des Haarverlusts führen und ermöglicht die Entwicklung einer effizienteren Therapie der AGA.

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Die Haarentwicklung

Bereits in der 9. Embryonalwoche des Menschen beginnt die Ausbildung von Haarfollikeln, welche nach der Geburt nicht mehr neu gebildet werden können. Der Haarfollikel wird durch komplexe Interaktionen zwischen epidermalen Zellen, die dem Ektoderm entstammen, und Dermalpapillen-Zellen, die mesodermaler Herkunft sind, gebildet (Übersicht in Botchkarev & Kishimoto, 2003). Das Wachstum des Haares verläuft in Aktivitätsschüben, die sich in mehreren vollständigen Zyklen wiederholen (siehe Abbildung 2.1) (Kligman, 1959; Hibberts et al., 1998; Ellis et al., 2002):

1. In der Wachstumsphase (Anagen) geht aus dem kontinuierlichen Fluss der mitotisch hochaktiven Haarmatrixzellen das Haar mit Mark, Rinde und Kutikula sowie die innere Wurzelscheide hervor. Das Anagen dauert etwa 3 - 6 Jahre.
2. Die Übergangsphase (Katagen), welche nur wenige Tage dauert, umfasst den morphologischen Umbau zur nachfolgenden Ruhephase. Die mitotische Aktivität stoppt plötzlich, der Bulbus verhornt bis auf eine kleine Gruppe undifferenzierter Epithelzellen und rückt gegen die Hautoberfläche vor.
3. Während der 3 - 4 monatigen Ruhephase (Telogen) befindet sich der Follikel kurz unter der Talgdrüsenmündung des Haarschaftes. Am Ende der Telogenphase fällt das Haar aus.

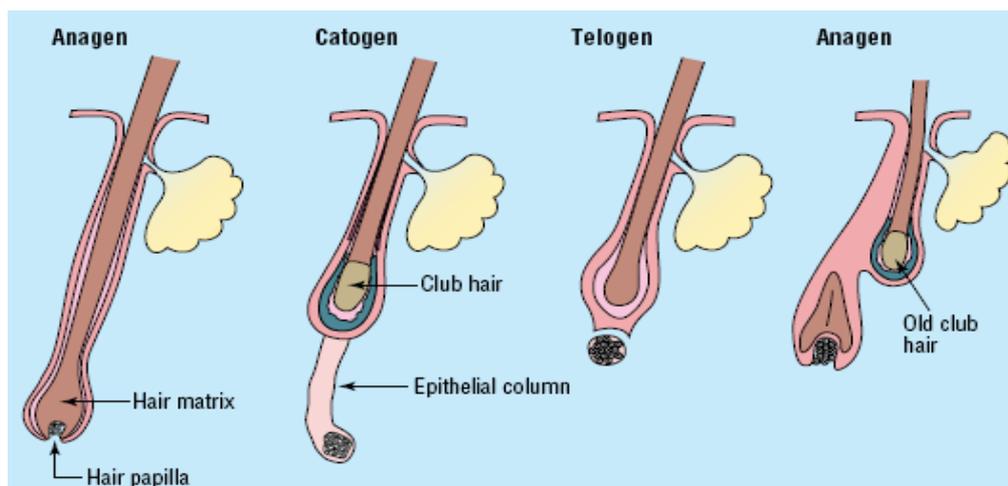


Abb. 2.1: Der normale Haarzyklus. Die Anagenphase ist die Haarwachstumsphase. Die Dermalpapillen-Zellen der Dermalpapille differenzieren sich hier zu Haarmatrixzellen. Diese sind mitotisch hoch aktiv, so dass ein kontinuierliches Haarwachstum ermöglicht wird. In der Katagenphase stoppt die mitotische Aktivität. Der Bulbus verhornt und rückt Richtung Hautoberfläche vor. In der Telogenphase ist das Haar nur locker in der Kopfhaut verankert. Die Dermalpapille hat sich weitestgehend vom alten Haarfollikel gelöst. In der Übergangsphase zu einem neuen Haarzyklus beginnen sich Dermalpapillen-Zellen erneut zu differenzieren, das alte Telogenhaar fällt aus. Entnommen aus Sinclair (1998).

2.2 Die androgenetische Alopezie (AGA)

Die AGA ist die häufigste Ursache für Haarausfall beim Menschen und betrifft vorwiegend Männer (Rexbye et al., 2005). Sie ist von Alopezien abzugrenzen, die als Symptome einer anderen Grunderkrankung auftreten, wie z.B. der myotonischen Dystrophie Curschmann-Steinert (MIM 160900) oder dem Stein-Leventhal-Syndrom (Syndrom der polyzystischen Ovarien, MIM 184700) (Carey et al., 1993; Lee & Zane, 2007).

Die gegenwärtigen Erkenntnisse zur AGA des Mannes basieren wesentlich auf den biologisch-epidemiologischen Arbeiten von Hamilton (1951). Er erkannte zwei ätiologische Komponenten, nämlich die spezifische männliche hormonelle Situation (Lucky, 1985; Hibberts et al., 1998) und die genetische Anlage. Möglicherweise tragen auch Umweltfaktoren (Sprecher et al., 2000) oder Nikotinabusus (Mosley & Gibbs, 1996) zur Entwicklung der AGA bei. Der Beitrag exogener Faktoren wird jedoch als äußerst gering eingeschätzt (Nyholt et al., 2003).

2.2.1 Klinik und Klassifikation

Bis zu einem Alter von 80 Lebensjahren sind rund 80% der Männer europäischer Abstammung von AGA betroffen (Hamilton, 1951). Der Haarausfall schreitet dabei nach einem charakteristischen Muster voran (siehe Abbildung 2.2), was eine Klassifikation betroffener Personen ermöglicht (Hamilton, 1951; Norwood, 1975): Er beginnt mit dem Verlust der Haare an der frontalen Haargrenze insbesondere im Bereich der Geheimratsecken (Stadien I - III). Diesem folgt der Haarverlust im zentralen Vertex-Bereich des Kapillitiums (Stadium IIIa vertex). Schließlich kann sich die Haarlosigkeit weiter ausbreiten (Stadium IV - VI), bis nur noch ein schmaler okzipitaler Haarkranz zurückbleibt (Stadium VII) (Hamilton, 1951; Norwood, 1975).

Die AGA tritt selten auch bei Frauen auf (Küster & Happle, 1984; Übersicht in Olsen et al., 2005). Bei ihnen zeigt sie ein diffuses Muster mit einem persistierenden frontalen Haaransatz (Ludwig, 1977; Norwood, 2001).

Die AGA wird zunehmend als psychologische Belastung für Betroffene erkannt (Stough et al., 2005). Insbesondere in jungen Jahren kann die AGA beim Mann psychologischen Krankheitscharakter entfalten (Cash, 1992; Tosti & Piraccini, 1999), was häufig zur Konsultation eines Dermatologen führt.

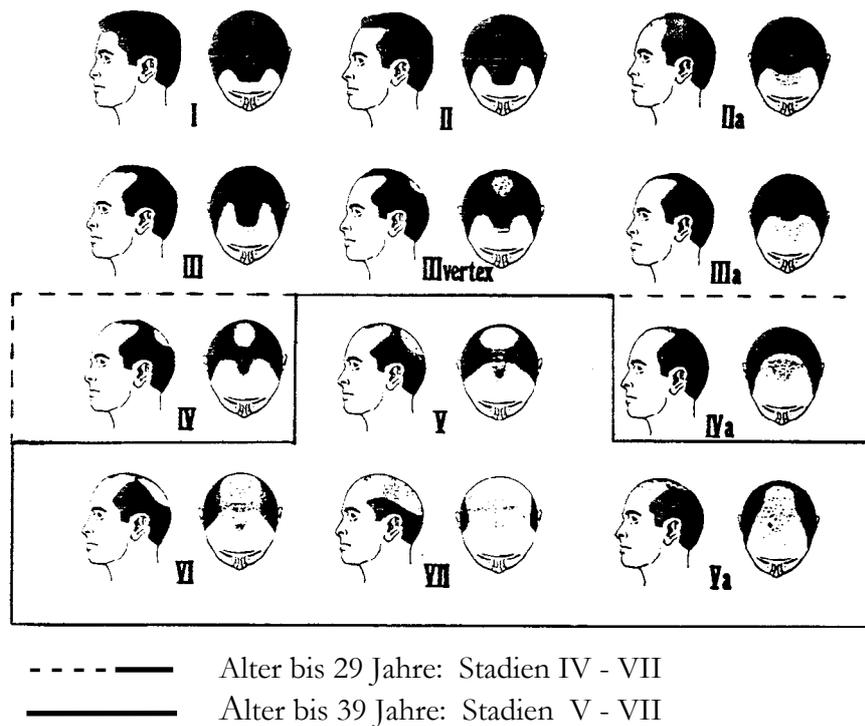


Abb. 2.2: Die phänotypische Klassifikation der AGA nach der von Hamilton (1951) entwickelten und von Norwood (1975) modifizierten Stadieneinteilung. Der Haarverlust beginnt an der frontalen Haargrenze (Stadien I - III), bevor der Haarverlust im zentralen Vertex-Bereich des Kapillitiums einsetzt (Stadium IIIvertex/Stadium IV). Die haarlosen Areale vergrößern sich zunehmend und führen zu einer ausgeprägten Alopezie.

2.2.2 Assoziation der AGA mit anderen Erkrankungen

Bisher konnten verschiedene Assoziationen zwischen der AGA und anderen humanen Erkrankungen aufgezeigt werden. Matilainen et al. (2000; 2001) konnten in ihren Arbeiten neben Bluthochdruck (MIM 145500), Dyslipidemie (Störung der Lipidkonzentration im Blut) und Hyperinsulinämie auch Assoziationen zu Insulinresistenz-assoziierten Erkrankungen wie Fettleibigkeit (MIM 601665) und zu kardiovaskulären Erkrankungen zeigen. Bei frühem Vorliegen einer AGA (Alter < 36 Jahren) war hier das Risiko für koronare Herzerkrankungen besonders stark erhöht. Hirsso et al. (2006) konnten die Assoziationen zu Bluthochdruck und Insulinresistenz in ihren Untersuchungen replizieren und Ahouansou et al. (2007) bestätigten die Assoziation zu Bluthochdruck. Eine Reihe von Studien zeigten ebenfalls Assoziation zu kardiovaskulären Erkrankungen: Lotufo et al. (2000) fanden ein erhöhtes Risiko für Myokardinfarkt (Herzinfarkt) bei Männern mit Haarverlust im Vertex-Bereich des Kapillitiums. In der „Copenhagen City Heart Study“ wurde eine Assoziation zwischen Herzinfarkt und frontaler Haarlosigkeit gefunden (Schnohr et al., 1995). Im Rahmen der „Framingham Heart Study“ konnte bei Männern unter 55 Jahren eine Assoziation zwischen schnell fortschreitender AGA und koronaren Erkrankungen festgestellt werden (Herrera et al., 1995). Die „First National Health and Nutrition Examination Survey“ fand eine Assoziation mit der Sterblichkeit durch koronare Herzerkrankungen (Ford et

al., 1996). Hirsso et al. (2007) zeigten in ihrer Arbeit, dass Entzündungsmarker für kardiovaskuläre Erkrankungen ebenfalls mit AGA assoziiert sind. Die bereits 2001 publizierte Studie von Ellis et al., die sich explizit mit der Assoziation zu kardiovaskulären Erkrankungen auseinandersetzte, bestätigte diese jedoch nicht. Bei Männern mit AGA konnte ein erhöhtes Risiko für Prostatakrebs (MIM 176807) gezeigt werden (Oh et al., 1998; Giles et al., 2002). Hawk et al. (2000) beobachteten eine Assoziation mit einer gutartigen Hyperplasie der Prostata (MIM 600082).

2.2.3 Pathophysiologische Konzepte der AGA

Der Haarzyklus von Personen mit AGA weist eine andere Dynamik auf als bei Nicht-Betroffenen (Courtois et al., 1994). Die Anagenphase des Haares ist deutlich verkürzt und die Telogenphase verlängert sich (Kaufman, 2002). Zudem ist die Übergangszeit von Telogen- zu Anagenphase verlängert, wodurch die Dichte des Haupthaars abnimmt (Ellis et al. 2002). Schlussendlich wird die Anagenphase so kurz, dass das Haar nicht mehr die Hautoberfläche erreicht. Der einzige Hinweis auf einen funktionierenden Haarfollikel ist eine sichtbare Pore (Sinclair, 1998). Bedingt durch die veränderten Zeiten der verschiedenen Haarzyklusstadien verändert sich somit histopathologisch betrachtet das Verhältnis von anagenem zu telogenem Haar (Whiting, 1993; 1998). Diese Haarzyklusveränderungen gehen mit einer Miniaturisierung des Haarfollikels einher (Whiting, 2001). Von der Miniaturisierung ist auch die Dermalpapille betroffen (Sinclair, 1998), welche wiederum essentiell für den Haarwuchs ist (Oliver & Jahoda, 1989) und daher vermutlich selbst den Grund für die Miniaturisierung des Haarfollikels darstellt (Obana & Uno, 1996).

Die veränderte Dynamik des Haarzyklus ist androgenabhängig (Hamilton, 1942; Braun-Falco & Bergner, 1989). Niedrige Androgenspiegel verhindern die Entwicklung einer AGA. Eunuchen beispielsweise entwickeln keine AGA, da ihnen die in den Testis (Hoden) synthetisierten Androgene fehlen (Griffin & Wilson, 1989; Sinclair, 1998; Ellis et al., 2001). Umgekehrt konnte bei vor der Pubertät kastrierten Eunuchen, in deren Stammbäumen AGA auftrat, durch Androgenbehandlung der Haarausfall induziert werden (Hamilton, 1951).

Das Androgen Testosteron ist im Blutplasma an ein „sex-hormone-binding-globuline“ gebunden und in dieser Form biologisch nicht aktiv. Der Testosteronspiegel im Serum von Männern mit AGA ist normal (Pitts, 1987), im Speichel wurden jedoch erhöhte Werte berichtet (Cipriani, 1983). Möglicherweise ist die aktive Fraktion der Androgene bei Männern mit AGA erhöht (Cipriani, 1983). Die 5- α -Reduktase wandelt Testosteron zum aktiveren 5- α -Dihydrotestosteron (DHT) um (Ellis, 2001; Chen et al., 2005). Dieser Vorgang findet im Cytosol von Haarmatrixzellen und im Blutplasma statt. Es gibt zwei 5- α -Reduktase-Isoenzyme: Die 5- α -Reduktase Typ I ist in einer Vielzahl verschiedener Gewebe exprimiert, wobei die physiologische Funktion noch rela-

tiv ungeklärt ist. Typ II wird in androgenabhängigen Geweben wie der Prostata und dem Haarfollikel exprimiert (Olsen, 2005). Untersuchungen konnten keine Assoziation zwischen den Genen für die 5- α -Reduktasen Typ I und Typ II und der AGA feststellen (Ellis et al., 1998). Ebenfalls kann bei Pseudohermaphroditen mit defekter 5- α -Reduktase kein Haarausfall beobachtet werden (Imperato-McGinley et al., 1974; Andersson et al., 1991). Im Vergleich zu Männern kann in der Kopfhaut von Frauen eine höhere Aromatase-Aktivität festgestellt werden. Die Aromatase katalysiert u.a. die Reaktion von Testosteron zu Estradiol, so dass bei Frauen von Natur aus weniger DHT gebildet wird. Der niedrige DHT-Spiegel wird als Grund für die wesentlich seltenere AGA bei Frauen angenommen (Bergfeld, 1995).

Der Androgenrezeptor (*AR*) vermittelt als Mitglied der nukleären Rezeptor-Genfamilie die Wirkung von Androgenen (Mangelsdorf et al., 1995). Testosteron und DHT binden u.a. in Dermalpapillen-Zellen des Haarfollikels als Liganden an den AR (Brown et al., 1989; Lee & Chang 2003; Wang et al., 2005). Die Affinität von DHT zum AR ist dabei mehrfach stärker als von Testosteron (Zhou et al., 1995; Tran & Sinclair, 1999). Der AR ist vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert und transloziert erst nach Ligandenbindung in den Zellkern (Pawlowski et al., 2002; Wang et al., 2004), wo er als Transkriptionsfaktor fungiert (Randall, 1994; Tyagi et al., 2000; Lee & Chang, 2003). Individuen, denen ein funktionsfähiger AR fehlt bzw. bei denen der *AR* mutiert ist (Androgen-Insensitivitäts-Syndrom, AIS), zeigen keinen Verlust der Haare an der frontalen Haargrenze (Griffin & Wilson, 1989), so dass anscheinend das Zusammenwirken von DHT und dem AR den Haarausfall bewirkt (Kaufman, 2002). Zudem ist die AR-Menge in primären Zelllinien von Dermalpapillen-Zellen aus haarloser Kopfhaut gegenüber Zellen aus behaarter Kopfhaut deutlich erhöht (Sawaya & Price, 1997; Hibberts et al., 1998), was die Relevanz des DHT/Testosteron-Signalwegs für die AGA unterstreicht.

Verschiedene Beobachtungen lieferten widersprüchliche Ergebnisse: Die androgenabhängige Haarlosigkeit nimmt im Alter zu (Birch & Messenger, 2001), wohingegen die Steroidkonzentrationen abnehmen (gemessen an Ketosteroiden im Urin) (Hamilton, 1951). Paradox ist auch, dass die gleichen Enzymsysteme wie im Kopfhaar auch im Barthaar existieren und dennoch das Barthaarwachstum durch Androgene gefördert wird (Rutberg et al., 2006), wohingegen das Wachstum des Kopfhaares durch Androgene gehemmt wird (Hamilton, 1951; Winiarska et al., 2006). Ungeklärt ist ebenfalls, warum die Haare okzipital nicht auf androgene Reize mit Miniaturisierung reagieren.

Insgesamt gilt, dass das Vorhandensein von Androgenen zur Entwicklung der AGA erforderlich ist, die Höhe der Androgenstimulation aber nicht die interindividuelle Variabilität bezüglich des Auftretens bzw. des Beginns der Symptome erklärt.

2.2.4 Formalgenetische Befunde der AGA

Der zugrunde liegende Erbgang der AGA ist nicht eindeutig charakterisiert. Bis heute existiert lediglich eine einzige ausgedehnte Familienuntersuchung, die von Dorothy Osborn bereits 1916 publiziert wurde. Sie betrachtete ihre Ergebnisse als Hinweis auf das Vorliegen eines monogenen Erbgangs. Wegen des deutlichen Geschlechtsunterschiedes hinsichtlich des Auftretens der AGA postulierte sie bei Männern einen dominanten und bei Frauen einen rezessiven Geneffekt. Die Ergebnisse der Studie sind wegen der fehlenden Angaben zu den Untersuchungsmethoden und dem Fehlen einer standardisierten Klassifikation des Phänotyps allerdings nur sehr begrenzt aussagekräftig.

Küster und Happle veröffentlichten 1984 eine umfassende Übersichtsarbeit über die bis dahin existierende Literatur zur Vererbung der AGA. Die hohe Prävalenz der Erkrankung, die quantitativ variierende Ausprägung des Phänotyps und die Beobachtung, dass die Wahrscheinlichkeit für das frühe Auftreten der AGA mit der Anzahl der betroffenen Familienmitglieder steigt, sprechen nach Ansicht der Autoren gegen das Vorliegen eines monogenen und für das Vorliegen eines polygenen Erbgangs. Diese Vorstellung wird heute allgemein vertreten und durch verschiedene Studien belegt (Ellis et al., 1998; Nyholt, 2003; Rexbye, 2005; Hillmer et al., 2008).

Bislang ist keine systematisch durchgeführte Familienuntersuchung veröffentlicht worden, auf deren Basis man mit Hilfe von Segregationsanalysen einzelne Erbgänge favorisieren könnte. Trotz des Fehlens gut begründeter Daten erscheint die folgende Hypothese zur Genetik der AGA am wahrscheinlichsten: Es liegt kein einfacher Erbgang vor, aber es gibt eine begrenzte Zahl von Hauptgenen, die vor einem polygenen Hintergrund zum AGA-Phänotyp führen.

2.2.5 Therapie der AGA

Eine verlässliche Therapie steht zur Behandlung der AGA bislang nicht zur Verfügung: Von Antiandrogenen wird angenommen, dass sie die Umwandlung von Testosteron zu DHT reversibel hemmen (Brooks et al., 1981) und Testosteron bzw. DHT von den entsprechenden Rezeptoren verdrängen. Beim Mann ist die systemische Verabreichung aufgrund der zu erwartenden unerwünschten Nebenwirkungen nicht möglich (Braun-Falco & Bergner, 1989). Die Behandlungen mit Östrogenderivaten und Progesteron führten auch nicht zu den erhofften Erfolgen (Tromovitch et al., 1985; Orentreich & Orentreich, 1987). Minoxidil (ein Pyrimidin-Derivat) ist ein hochpotenter myogener Vasodilatator, dem haarwuchsfördernde Wirkung nachgesagt werden, obwohl bei äußerlicher Anwendung nur mäßige Erfolge zu verzeichnen sind (Übersicht in Olsen et al., 2005; Bienová et al., 2005). Seit einigen Jahren wird Finasterid als Wirkstoff des Präparats Propecia® zur oralen Verabreichung eingesetzt. Finasterid ist ein spezifischer Inhibitor der menschl-

chen Typ II 5- α -Reduktase, von der gezeigt wurde, dass sie Serum- und Kopfhaut-DHT-Konzentrationen bei Männern mit AGA reduziert (Dallob et al., 1994; Waldstreicher et al., 1994; Kaufman et al., 1998; Ryu et al., 2006). In einer 48 wöchigen Doppelblind-, Placebo-kontrollierten Studie, in der 1 mg Finasterid pro Tag an Probanden mit AGA verabreicht wurde, konnte eine Zunahme der Haarzahl um 8,3% festgestellt werden (Van Neste et al., 2000). In der Finasterid-Gruppe waren zudem 27% mehr Haare im Anagen, als in der Placebo-Gruppe. Die Behandlung mit Finasterid schlägt bei etwa 2/3 der Männer an (Kaufman et al., 1998). In einer Langzeitstudie konnte gezeigt werden, dass die Haaranzahl nach einem Jahr Behandlung in den Folgejahren zu keiner weiteren Haarzunahme führt, sondern vielmehr zu einer Erhaltung des Haarstatus beiträgt (The Finasteride Male Pattern Hair Loss Study Group, 2002), so dass auch von Finasterid kein entscheidender Durchbruch in der Therapie der AGA zu erwarten ist. Da bis auf die operative Behandlung in Form von Transplantationen (Unger & Unger, 2003) bisher keine wirklich durchgreifenden Therapieansätze zur Verfügung stehen, sind sowohl Betroffene als auch Dermatologen sehr an der Aufklärung der Ätiologie der AGA als Ansatzpunkt für Therapeutika interessiert.

2.3 Identifizierung von ursächlichen Genen bei komplexen Phänotypen

Die genetische Epidemiologie hat sich die Lokalisierung und Identifizierung von genetischen Faktoren zur Aufgabe gemacht, die zur Entstehung von Krankheiten beitragen. Das größte Problem dabei ist die Größe des menschlichen Genoms, welches nur durch eine systematische Herangehensweise zufriedenstellend analysiert werden kann. In der molekulargenetischen Forschung kommen dazu insbesondere zwei Methoden zur Anwendung: Kopplungs- und Assoziationsuntersuchungen.

2.3.1 Kopplungsuntersuchungen

Beim Kopplungsansatz sucht man in geeigneten Stammbäumen nach gemeinsamer Vererbung (Co-Segregation) eines genetischen Markers und eines Krankheitsphänotyps. Ein Marker ist ein genetischer Polymorphismus (genetische Variante), dessen chromosomale Lage bekannt ist. Bei Vorliegen von Kopplung werden Marker und Phänotyp überzufällig häufig gemeinsam vererbt. Das bedeutet, dass Marker und Krankheitsgenort so nahe zueinander liegen, dass beide nicht oder nur extrem selten durch Rekombination (Crossing-Over) getrennt werden. Ein Kopplungsansatz über das gesamte Genom, ein so genannter „Genome-Scan“, untersucht dabei rund 400 Marker, die systematisch über das Genom verteilt sind. Mit speziell dafür entwickelten statistischen Analyseverfahren können die Genotypdaten hierbei auf Kopplung analysiert werden. Diese

Analyse kann dabei parametrisch (mit Annahmen über das zugrunde liegende genetische Modell) oder nicht-parametrisch (ohne Modell) erfolgen. Als Maß für die parametrische Wahrscheinlichkeit einer bestehenden Kopplung dient der LOD-Score („logarithmic odds ratio“-Score). Die Berechnung des LOD-Scores erfolgt unter der Annahme verschiedener Rekombinationsfrequenzen und damit unterschiedlicher Abstände zwischen Marker und Genort. Ein LOD-Score von mindestens 3 (d.h. die Hypothese, dass Kopplung vorliegt, ist 1000-mal wahrscheinlicher als die Hypothese, dass keine Kopplung vorliegt) wird bei monogenen Merkmalen als hinreichend für den Kopplungsnachweis angesehen.

Bei der parametrischen Kopplungsanalyse müssen Annahmen über Erbgang (dominant oder rezessiv), Genfrequenz, Penetranz und Phänokopierate gemacht werden, womit sie vor allem bei monogenen Erkrankungen, wie z.B. der autosomal rezessiven universalen congenitalen Alopezie (einer seltenen monogenen Haarlosigkeit), mit großem Erfolg angewendet werden konnte (Nöthen et al., 1998). Bei genetisch komplexen Erkrankungen wird die parametrische Kopplungsanalyse kaum angewandt, da die zu spezifizierenden Parameter meist nicht bekannt sind. Durch die nicht-parametrische Kopplungsanalyse ist aber auch hier eine Analyse möglich. Als Maß für die nicht-parametrische Wahrscheinlichkeit dient der NPL-Score („non-parametric LOD“-Score). Hierdurch führten Kopplungsanalysen in den letzten Jahren bei komplexen Erkrankungen zur Identifizierung von Suszeptibilitäts-Genen, also Genen, die für eine Erkrankung prädisponieren. Beispielsweise zeigten verschiedene nicht-parametrische Kopplungsuntersuchungen bei Morbus Crohn (MIM 266600) positive Befunde auf Chromosom (Chr.) 16q (Hugot et al., 1996; Ohmen et al., 1996; Parkes et al., 1996; Brant et al., 1998; Cavanaugh et al., 1998; Cho et al., 1998; Curran et al., 1998; Annese et al., 1999; Hampe et al., 1999). Später konnte das ursächliche Gen „*CARD15*“ (caspase recruitment domain containing protein 15) auf Chr. 16q12 identifiziert werden (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001).

Für die AGA haben wir die bislang einzige genomweite Kopplungsuntersuchung durchgeführt (Hillmer et al., 2008). Hier konnten genomweit 14 Kopplungsregionen (nominale p-Werte für Kopplung von $< 0,05$) aufgezeigt werden. Der autosomale Locus mit der stärksten Kopplungstendenz wurde auf Chr. 3q26 gefunden. Er wies einem NPL-Score von 3,96 ($p = 0,00055$) auf. Das für die Kopplung zur AGA ursächliche Gen in dieser Region konnte jedoch noch nicht identifiziert werden (unveröffentlichte Daten). Die in der genomweiten Betrachtung stärkste Kopplungsregion war auf Chr. Xq11-q12. Die Region enthält den *AR*-Locus.

2.3.2 Assoziationsuntersuchungen

Eine weitere Methode zur Identifizierung von Krankheitsgenen stellen Assoziationsuntersuchungen dar. Hierfür werden Allele von Erkrankten und Gesunden aus ethnisch möglichst ähnlichen Populationen verglichen. Neben diesen Fall-Kontroll-Studien finden Assoziationsuntersuchungen auch in familienbasierten Untersuchungen Anwendung, in denen meist Trio-Familien (ein betroffenes Kind mit seinen Eltern) untersucht werden. In diesem Fall dienen die nicht transmittierten Allele als Kontrollallele. Die Auflösung der allelbasierten Assoziationsuntersuchung ist gegenüber der Kopplungsuntersuchung deutlich vergrößert: Die gewonnenen Kopplungsregionen sind meist mehrerer Millionen Basenpaare (bp) groß, eine assoziierte Region umfasst in der Regel einige tausend bis hunderttausend bp. Das „relative Risiko“ ist eine einfache und entsprechend häufig angewandte Möglichkeit, den Grad einer Assoziation von Allel und Krankheit auszudrücken. Das relative Risiko sagt aus, wieviel mal wahrscheinlicher eine Krankheit bei Trägern eines bestimmten Allels innerhalb einer bestimmten Zeit auftritt, als bei Personen, die dieses Allel nicht tragen (= Inzidenz). Es gibt somit das Erkrankungsrisiko in einem bestimmten Zeitraum wieder. Die Berechnung des relativen Risikos erfolgt in Form eines 2 x 2-Schemas:

	Allel 1	Allel 2
Patienten	a	b
Kontrollen	c	d

Hierbei stehen a - d für die Häufigkeiten, in denen Allel 1 oder 2 in Patienten bzw. Kontrollpersonen vorkommen. Es gilt:

$$\text{Relatives Risiko} = \frac{a/(a+c)}{b/(b+d)}$$

Das relative Risiko gibt in diesem Beispiel die Erhöhung des Risikos für den Träger von Allel 1 an. Es wird daher vorwiegend bei prospektiven Studien angewandt. In Fall-Kontroll-Studien wird dagegen meist das Odds Ratio (OR) als Risikomaßzahl verwendet. Die zeitliche Komponente, die zudem meist unbekannt ist, wird hierbei nicht berücksichtigt. Das OR gibt im Gegensatz zum relativen Risiko die relative Chance an, beim Vorliegen eines bestimmten Allels eine Erkrankung zu entwickeln. Das OR berechnet sich über die Tabelle als Kreuzprodukt, wobei gilt:

$$\text{Odds Ratio} = \frac{(a \cdot d)}{(b \cdot c)}$$

Zur Erklärung einer Assoziation zwischen einem bestimmten Allel und einer Krankheit gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten:

1. Das Allel selbst trägt direkt durch eine Veränderung der Aminosäuresequenz des kodierten Proteins oder durch eine Veränderung von regulatorischen Funktionen zur Entwicklung der Krankheit bei.
2. Das assoziierte Allel trägt selbst nicht zur Krankheit bei, sondern liegt auf dem Chromosom in enger räumlicher Nähe zu einer direkt am Krankheitsgeschehen beteiligten genetischen Variante, und es besteht ein Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium, LD) zwischen den benachbarten Varianten.

Ein Kopplungsungleichgewicht entsteht in der Evolution dann, wenn bei einer Person eine Mutation auftritt und sich zumindest ein großer Teil von Trägern der Mutation in späteren Generationen von dieser Person herleiten lässt. Das Kopplungsungleichgewicht und damit die Assoziation bleiben in der Evolution jedoch nur erhalten, wenn nicht wiederholt Mutationen bei unabhängigen Personen zu demselben Krankheitsallel geführt haben. Außerdem durfte keine Rekombination zwischen den beiden Loci stattgefunden haben und dem Träger des Allels kein Selektionsnachteil entstanden sein.

Neben dem relativen Risiko, welches das Erkrankungsrisiko für Träger eines bestimmten Allels im Vergleich zu Nichtträgern angibt, ist die Bedeutung eines Allels für die Erkrankungshäufigkeit in der Allgemeinbevölkerung ebenfalls von Interesse. Um diesem Gesichtspunkt Rechnung zu tragen, ist das Konzept der „ätiologischen Fraktion“ entwickelt worden (Khoury et al., 1993). Die ätiologische Fraktion gibt den Anteil der Krankheitsfälle in der Bevölkerung an, der auf das Vorhandensein des assoziierten Allels oder Genotyps zurückzuführen ist.

$$\text{Ätiologische Fraktion} = \frac{f(RR - 1)}{1 + f(RR - 1)}$$

RR = Relatives Risiko

f = Häufigkeit des assoziierten Allels oder Genotyps in der Bevölkerung

2.3.3 Haplotyp „tagging“

Im humanen Genom finden sich mehr als 10 Millionen SNPs mit einer Allelfrequenz über 1% (The International HapMap Consortium, 2003) die aufgrund bestehender Kopplungsungleichgewichte auf eine deutlich geringere Zahl so genannter „tagging“ SNPs (tSNPs) reduziert werden können (Johnson et al., 2001; Steemers & Gunderson, 2007; Becker, 2007). Als Maß für das Kopplungsungleichgewicht dienen „ r^2 “ und „ D' “, wobei für beide Werte von 0 (völlig unabhängige SNPs) bis 1 erreicht werden können (The International HapMap Consortium, 2005; Steemers & Gunderson, 2007). Man spricht von „perfektem“ Kopplungsungleichgewicht bei $r^2 = 1$ (beide SNPs zeigen immer dieselbe Ausprägung) und „vollständigem“ Kopplungsungleichgewicht bei $D' = 1$ (zwischen den SNPs hat keine Rekombination stattgefunden) (Skipper et al.,

2005). Befinden sich mehrere SNPs hintereinander in hohem Kopplungsungleichgewicht zueinander, sind deren Allele in der Vergangenheit nicht (oder nur selten bzw. erst in jüngerer Zeit) durch Rekombination neu kombiniert worden. Es tritt nur eine begrenzte Anzahl der theoretisch möglichen Haplotypen auf. Gabriel et al. (2002) schätzen, dass etwa 300.000 - 1.000.000 Haplotyp tSNPs ausreichen, um einen Großteil der genetischen Varianz einer spezifischen Population zu erfassen.

Genotypisierung mittels Bead Array-Technologie

Für genomweite Assoziationsuntersuchungen (GWAs) gibt es verschiedene Genotypisierungstechnologien. Die beiden bekanntesten Systeme sind die Affymetrix- und die Illumina-Plattform. Die Affymetrix-Plattform basiert auf zufällig gewählten SNPs und einer Oligonukleotid-Amplifizierung der zu untersuchenden DNA (Matsuzaki et al., 2004). Im Jahr 2005 beschrieben Gunderson et al. eine genomweite Genotypisierungstechnologie, die mit einer nicht experimentellen whole-genome-Amplifizierung des Genoms ohne vorausgehende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auskommt. Daneben zeichnet sie sich insbesondere durch die Verwendung von tSNPs aus. Die Datenqualität dieser Bead Array-Technologie von Illumina wird von anderen Technologien meist nicht erreicht. Diese relativ neue Illumina-Plattform sollte auch in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kommen:

Der Bead Array von Illumina (siehe Abbildung 2.3) basiert auf einer direkten Hybridisierung von vervielfältigter, fragmentierter DNA einer Person an 50-mer lange, sequenzspezifische Oligonukleotide. Diese sind wiederum an einen 3 µm großen Bead (eine Kugel) auf dem Chip gekoppelt (Stemers et al., 2006). Jeder Bead befindet sich an einer zuvor genau ermittelten Stelle auf dem Chip (Gunderson et al., 2004). An jeden Bead koppeln nur Oligonukleotide für einen spezifischen SNP. Ein solcher SNP-spezifischer Bead findet sich rund 20 mal auf einem Chip (Stemers & Gunderson, 2007). Ein Chip, mit dem rund 300.000 SNPs genotypisiert werden können, ist demnach mit mehreren Millionen Beads bestückt. Die SNP-Auswahl erfolgte durch Illumina unter Verwendung der HapMap Phase I (HumanHap300 Chip) bzw. I & II (HumanHap550 Chip) Datenbank (The International HapMap Consortium, 2003). Mittlerweile ist durch eine effiziente Nutzung eines Chips die Genotypisierung von bis zu 1 Mio. SNPs pro Chip möglich.

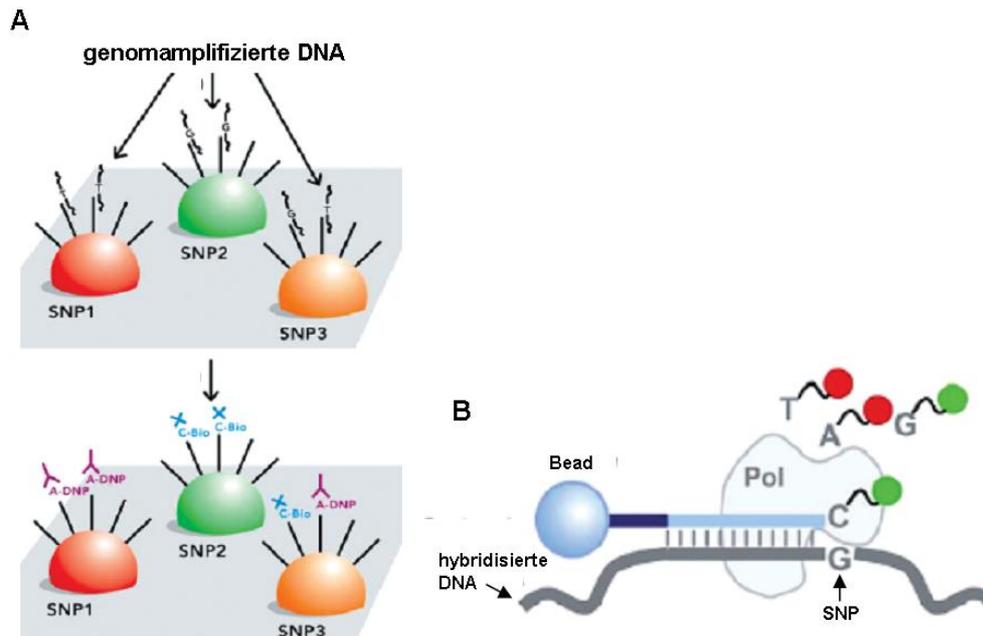


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Illumina Infinium II Assays. A: Übersicht über das Funktionsprinzip des Bead Arrays: Genomamplifizierte, fragmentierte DNA hybridisiert an die komplementären Oligonukleotidsequenzen eines Beads und kann anschließend immunohistochemisch angefärbt werden. B: Einzelbasenverlängerung nach erfolgreicher Hybridisierung der amplifizierten genomischen DNA. Entsprechend des vorliegenden SNPs wird ein markiertes Nucleotid an die Oligonukleotidsequenz eines Beads angefügt und kann entsprechend detektiert werden. Entnommen und modifiziert aus Steemers et al. 2007.

Im Anschluss an die sequenzspezifische Hybridisierung erfolgt eine enzymatische Einzelbasenverlängerung (Single-Base-Extension, SBE) unter Verwendung markierter Nucleotide (Steemers & Gunderson, 2007). Diese markierten Nucleotide werden im Folgeschritt immunohistochemisch angefärbt, wobei die Nucleotide A und T mit roten, und die Nucleotide G und C mit grünen Fluorochromen (Cy5 bzw. Cy3) gefärbt werden. Dieses zwar ökonomische Zweifarbensystem verhindert die Analyse von SNPs mit den Allelen A/T bzw. G/C. Laut Herstellerangaben machen diese genomweit jedoch nur einen Anteil von etwa 17% aus (Steemers & Gunderson, 2007). Die Chips mit den angefärbten Nucleotiden können abschließend mit einem konfokalen Laserscanner (BeadArray Reader) ausgelesen werden. Die Auswertung erfolgt durch die BeadStudio-Software (siehe Abbildung 2.4).

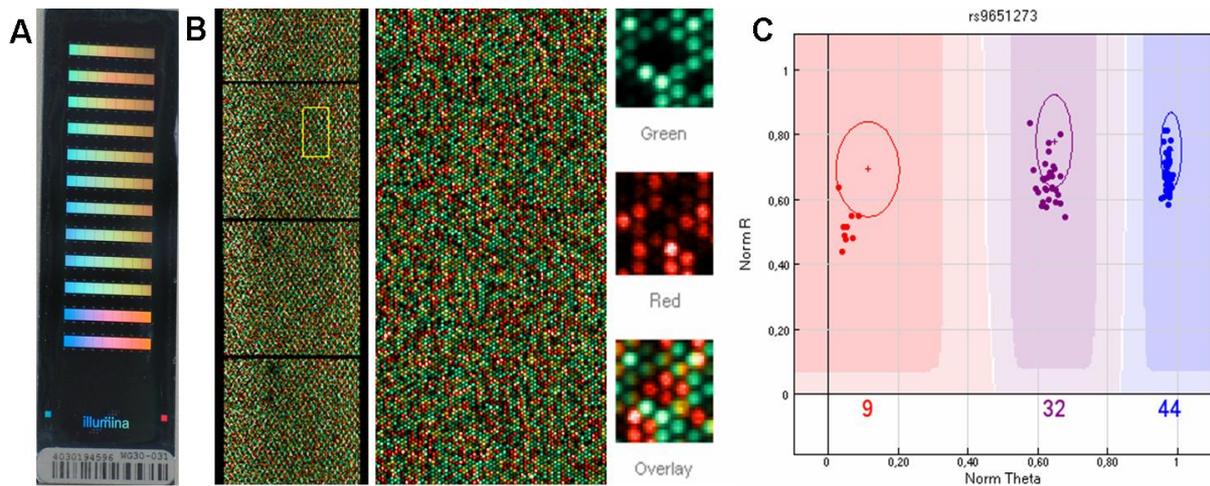


Abb. 2.4: Darstellung eines HumanHap550K Chips und die entsprechende BeadScan/BeadStudio Auswertung. A: HumanHap550K Chip. B: Scanprozedur eines Chips durch das Auslesen der insgesamt 10 Streifen auf dem Chip, die wiederum in Kleinquadrate unterteilt sind. Das gelbe Quadrat markiert den Ausschnitt, der im mittleren Teil der Abbildung B zu sehen ist. Im rechten Teil der Abbildung B sind einzelne Beads stark vergrößert zu erkennen. Die Ergebnisse des grünen und des roten Fluoreszenzdetektionskanals sind gezeigt, wobei die untere Abbildung die Überlagerung der grünen und roten Detektion wieder gibt. Gelb fluoreszierende Beads markieren hierbei heterozygote Genotypen. C: Exemplarische Darstellung eines Clusterplots, wie er im Rahmen der Auswertung durch die BeadStudio-Software dargestellt wird.

In den vergangenen zwei Jahren konnte mit GWAs eine Vielzahl krankheitsassoziierte Loci und Gene identifiziert werden (Duerr et al., 2006; Winkelmann et al., 2007; Samani et al., 2007; Thomson et al., 2007). Die Genotypen für diese Untersuchungen wurden mit den chipbasierten Technologien von Affymetrix bzw. Illumina erhoben. Für die AGA wurde bisher noch keine GWA-Untersuchung publiziert.

Genotypisierung mittels MassExtend-Reaktion

Die in der GWA am stärksten assoziiert gefundenen SNPs sollten in einem unabhängigen Fall-Kontroll-Kollektiv repliziert werden. Die hierfür erforderlichen Genotypisierungen wurden mittels MassExtend-Reaktion und MALDI-ToF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time of Flight Mass Spectrometry) durchgeführt (Tang et al., 1995; Haff & Smirnov, 1997). Dazu wurde die iPLEX Gold MassEXTEND Plattform von Sequenom verwendet (Buetow et al., 2001). Bei dieser Technik wird zunächst eine konventionelle PCR-Reaktion durchgeführt. Pro Reaktionsansatz können hierbei jedoch Amplikons für bis zu 40 SNPs (iPlex Gold) parallel amplifiziert und anschließend analysiert werden. Man bezeichnet den Prozess mehrerer Amplifikationen in einem Reaktionswell als Plex. Damit in der später folgenden SBE keines der überschüssigen Nukleotide ins Amplikon inkorporiert wird, werden diese durch einen Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP)-Verdau durch Dephosphorilierung inaktiviert (Oeth et al., 2005). Im Anschluss daran wird zu den PCR-Reaktionen ein SBE-Mix gegeben, der SNP-spezifische Extensionsprimer enthält. Die verwendeten Extensionsprimer hybridisieren in der Post-PCR SBE-Reaktion unmittelbar vor dem zu untersuchenden SNP an das Amplikon. Hierbei werden aus-

schließlich spezielle massenmodifizierte Dideoxynukleotide verwendet. In der SBE wird analog einer klassischen Sequenzierreaktion nach Sanger et al. (1977) ein einziges Dideoxynukleotid an den Extensionsprimer angefügt, das dem Allel des vorliegenden SNPs entspricht (Haff & Smirnov, 1997; Ross et al., 1998). Die Möglichkeit der Genotypisierung durch eine SBE wurde dabei schon 1989 durch Sokolov beschrieben. In Verbindung mit den speziell designten Primern entstehen so Produkte unterschiedlicher Länge und damit auch mit unterschiedlicher Masse (Blondal et al., 2003). Um störende Kationen aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, folgt eine Aufreinigung des Reaktionsansatzes durch Resin, einem Ionenaustauscherharz (Oeth et al., 2005). Für die abschließende Analyse reicht eine Menge von 15 nl Probenmaterial aus, die mit dem Nanodispenser auf die Matrix eines Sequenom SpectroChip gegeben werden. Als Matrix dient die organische Säure 3-Hydroxypicolinsäure, die in einem 100 bis 1000-fachen Überschuss zum Probenmaterial vorliegt. Neben dem Probenmaterial wird zusätzlich noch ein Kalibrant gespottet, der Oligonukleotide bekannter Massen enthält und das System initial kalibriert. Die Analyse des Probenmaterials findet im Hochvakuum des Massenspektrometers statt (siehe Abbildung 2.5).

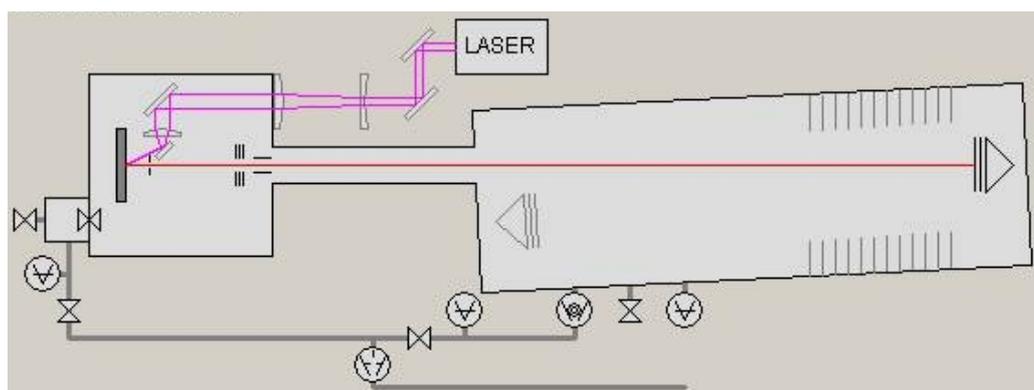


Abb. 2.5: Schematischer Aufbau eines MALDI-ToF Massenspektrometers. Durch einen Laserimpuls werden die Analytmoleküle aus der Matrix geschlagen und ionisiert. In einem elektrischen Feld fliegen sie unterschiedlich schnell bis zum Detektor (rechtes Ende der roten Linie). Die Flugzeit ist dabei proportional zu Masse der Moleküle.

Durch einen nur wenige Nanosekunden dauernden kurzwelligen Laserimpuls werden die Moleküle des Probenmaterials durch die Matrix ionisiert, wobei sie die Energie erhalten, sich aus der Matrix zu lösen (Desorption/Ionisation). Die einfach positiv geladenen Analytmolekül-Ionen können nun im Vakuum-Flugrohr des Massenspektrometers, in einem elektrischen Feld beschleunigt werden (Cotter, 1992; Ragoussis et al., 2006). Massenabhängig haben die Moleküle dabei unterschiedliche Flugzeiten, bis sie auf den Detektor treffen. Je größer die Masse, desto länger die Flugzeit (Prinzip der Trägheit der Masse) (Ragoussis et al., 2006). Bei der Messung der Flugzeit (Time of Flight) handelt es sich um eine hochpräzise elektronische Zeitmessung. Die Technik ermöglicht es, Massen in einem Bereich von 4.500 - 9.000 Da zu detektieren (Ragoussis et al., 2006). Durch die entsprechende Software (Typer 3.4) werden abschließend die unterschiedli-

chen Flugzeiten in Massen und damit in Genotypen umgerechnet und graphisch dargestellt (siehe Abbildung 2.6).

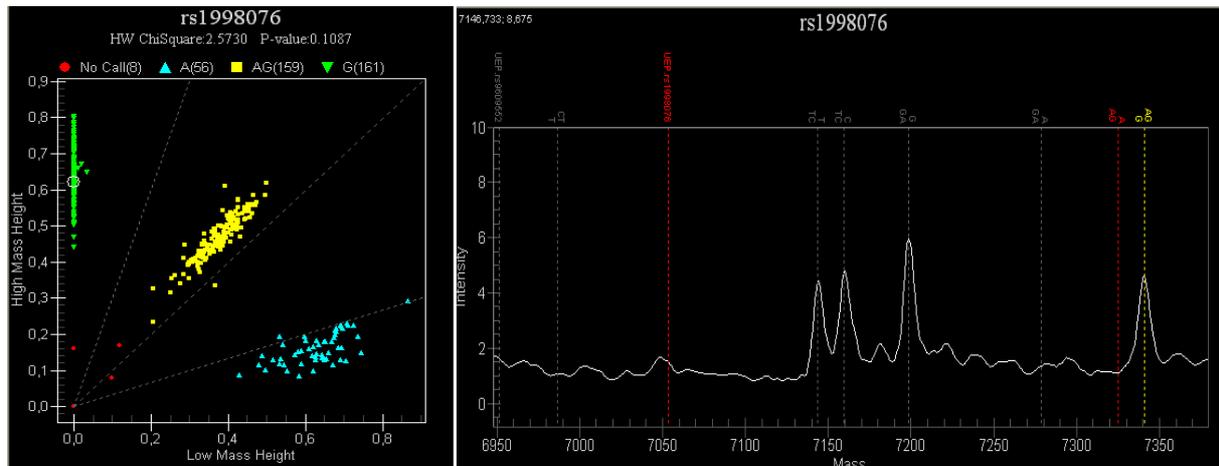


Abb. 2.6: Exemplarische Darstellung einer Genotypisierung mittels MassExtend-Technologie. In der linken Darstellung ist der Clusterplot für den SNP rs1998076 exemplarisch dargestellt. Die Individuen mit dem homozygoten Genotyp „AA“ sind als blaue Dreiecke dargestellt, homozygote Personen mit dem Genotyp „GG“ sind als grüne Dreiecke zu sehen. Heterozygote „AG“-Individuen bilden den mittleren Cluster aus gelben Vierecken. Die Software kalkuliert aus den Genotypen das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (oben). Auf der rechten Seite ist das Spektrum zu der markierten homozygoten Person mit dem Genotyp „GG“ (siehe: linker Cluster Plot weiß eingekreist) dargestellt. Bei der Masse von 7050 Da (X-Achse) ist die Masse des Extensionsprimers aufgeführt (rot markiert), der nahezu nicht mehr detektiert werden konnte. Im weiteren Verlauf lassen sich die Massen anderer Allele erkennen (grau), bevor bei 7340 Da die erwartete Masse für das „G“-Allel (gelb) durch einen Intensitätsspeak zu erkennen ist. Für das „A“-Allel bei 7325 Da wurde keine Masse detektiert.

2.4 Das *AR*-Gen als Kandidatengen für die AGA

Das *AR*-Gen liegt auf Xq11-q12. Es besteht aus 8 Exons und erstreckt sich über 180 kb. Zwei alternative *AR*-Transkripte sind bekannt, bei denen ein kurzer bzw. ein extrem langer 3'UTR zu Transkriptlängen von 4,3 bzw. 11 kb führen (Jenster et al., 1992). Es gibt keine weiteren *AR*-Gene oder Pseudogene (Kokontis & Liao, 1999). Der offene Leserahmen des *AR*-Gens hat eine Länge von etwa 2,8 kb und Exon 1 bildet die N-terminale transaktivierende Domäne des Transkriptionsfaktors (Roy et al., 2001). In Exon 1 befinden sich zwei strukturelle Polymorphismen. Dabei handelt es sich um einen Polyglycin kodierenden GGN-Repeat und einen Polyglutamin kodierenden CAG-Repeat. In der europäischen Normalbevölkerung reichen die Repeatlängen von 10 - 31 GGN-Repeats (Lumbroso et al., 1997) und von 8 bis 35 CAG-Repeats (Coetzee & Ross, 1994).

Im *AR* ist ein großes Spektrum von genetischen Varianten bekannt (Übersicht in Gottlieb et al., 2004). Sie reichen von häufigen Varianten mit moderaten, teilweise widersprüchlichen Beiträgen zu komplexen Erkrankungen bis hin zu Mutationen, die verantwortlich für monogene Erkrankungen sind (Übersicht in Rajender et al., 2007). Zu Letzteren zählen CAG-Repeatlängen von mehr als 40 Wiederholungen, die zum Kennedy-Syndrom (MIM 313200) führen (La Spada et al.,

1991; Doyu et al., 1993). Das Kennedy-Syndrom ist eine neurodegenerative Muskelerkrankung des Mannes, bei der es im Erwachsenenalter zunehmend zur Schwächung der Extremitäten-, sowie der Mund-, Schlund- und Kehlkopfmuskulatur kommt. Missense- und Nonsense-Mutationen im *AR* können im Androgen-Insensitivitäts-Syndrom (AIS, MIM 300068) resultieren (Übersicht in Gottlieb et al., 2004). Das AIS führt zur Feminisierung der betroffenen Männer und kann als komplette, partielle oder milde Form auftreten. Die Betroffenen entwickeln weibliche primäre und sekundäre Geschlechtsmerkmale bei männlichem Chromosomensatz.

Eine Vielzahl von Missense- und Nonsense-Mutationen im *AR* konnte in Prostatakrebsgewebe gefunden werden (Edwards et al., 1999; Übersicht in Gottlieb et al. 2004). Von den Mutationen wird ein Beitrag zur Tumorgenese angenommen. Des Weiteren ist ein kurzer CAG-Repeat (< 18 Repeats) mit Prostatakrebs assoziiert berichtet worden (Chamberlain et al., 1994; Hakimi et al. 1997; Linja et al., 2001; Ferro et al., 2002; Ding et al., 2004). Auf der funktionellen Ebene führt ein kurzer CAG-Repeat zu einer erhöhten Transaktivierungseigenschaft des AR (Chamberlain et al., 1994; Tut et al., 1997; Callewaert et al., 2003). Auch kürzere GGN-Repeats zeigten Assoziation mit Prostatakrebs (Hsing et al., 2000; Chang et al., 2002). Die genaue Bedeutung der Repeat-Varianten für die Entwicklung des Prostatakrebs ist bislang nicht eindeutig geklärt (Avila et al., 2001; Übersicht in Rajender et al., 2007).

Radpour et al. (2007) konnten kürzlich eine Assoziation zwischen einem langen GGN-Repeat und Kryptorchidismus (hierbei senken sich die Hoden nicht in den Hodensack ab) sowie Hypospadie (hierbei verläuft die Harnröhre auf der falschen Seite des Penis) bei iranischen Patienten zeigen. Für längere GGN-Repeats konnte bei Frauen eine Assoziation mit Gebärmutterkrebs gezeigt werden (Sasaki et al., 2005).

In den letzten Jahren konnten auch mehrere Assoziationen zwischen der AGA und Polymorphismen am *AR*-Locus gezeigt werden: Sawaya und Shalita publizierten 1998 die erste Assoziation zwischen dem CAG-Repeat in Exon 1 des *AR* und der AGA. Dazu passt auch der Befund, dass Patienten mit Kennedy-Syndrom ein verringertes Risiko für die Entwicklung einer AGA haben (Sinclair et al. 2007). Ellis et al. (2001) zeigten eine Assoziation zwischen AGA und der Kombination von kurzen CAG- und GGN-Repeats (p -Wert = 0,03) sowie einem Restriktionspolymorphismus (*StuI* (=rs6152), p -Wert = 4×10^{-6}) in Exon 1 des *AR*. Letzterer konnte in unabhängigen Untersuchungen repliziert werden (Hayes et al., 2005; Levy-Nissenbaum et al., 2005; Hillmer et al., 2005). In einer umfangreichen Arbeit von Hillmer et al. (2005) wurden 42 genetische Varianten in einer Region von 4,4 Mb um den *AR* auf Assoziation mit AGA getestet. Eine Region von rund 1 Mb zeigte starke Assoziation mit dem niedrigsten p -Wert von $2,1 \times 10^{-12}$ für rs10521339. Unter den assoziierten Markern befand sich auch der hochpolymorphe GGN-Repeat in Exon 1 des *AR*, wohingegen der CAG-Repeat keine Assoziation aufwies. Benachbarte

Kandidatengene waren nicht mehr in dem Bereich der stärksten Assoziation. Zusammenfassend kann der *AR* als erstes gesichertes Gen betrachtet werden, das zur Entstehung der AGA beiträgt. Durch die Sequenzierung der kodierenden Sequenz, der Exon-Intron-Übergänge, des Promotors und des 3'-UTR des *AR* von Betroffenen mit assoziiertem Haplotyp und nicht Betroffenen mit nicht assoziiertem Haplotyp konnte durch Hillmer et al. (2005) keine neue Variante nachgewiesen werden, die einen Beitrag zur AGA leisten könnte. Das legte folgende alternative Hypothesen nahe:

1. Eine Variante in einem bisher unbekanntem regulatorischen Bereich des *AR* könnte Einfluss auf die Expression des *AR* haben.
2. Eine intronische Variante hat einen Einfluss auf das Spleißen des *AR*.
3. Der im Gegensatz zum CAG-Repeat mit AGA assoziierte GGN-Repeat stellt die funktionelle Variante dar.

Eigene Untersuchungen (unveröffentlichte Daten) konnten keinen Einfluss von Varianten im regulatorischen Bereich auf die Expression des *AR* zwischen Personen mit Risikohaplotyp und Personen ohne Risikohaplotyp zeigen. Es konnten zudem keine Spleißvarianten in diesen Vergleichsgruppen identifiziert werden. Der GGN-Repeat stellt daher einen guten Kandidaten dar, die kausale Variante am *AR*-Locus zu sein.

2.5 Der polymorphe Glycin-Repeat in Exon 1 des *AR*-Gens

Der GGN-Repeat liegt in der transaktivierenden Domäne des als Transkriptionsfaktor fungierenden *AR* (Roy et al., 2001; Übersicht in Gottlieb et al., 2004). Die beiden in der europäischen Bevölkerung häufigsten GGN-Repeatlängen, GGN23 und GGN24 (Aschim et al., 2004; Hillmer et al., 2005) machen rund 85% der auftretenden Repeatlängen aus. Eine vollständige Deletion des GGN-Repeats bewirkt - ebenso wie die Deletion des CAG-Repeats - eine erhöhte Transaktivierungsfunktion des *AR* (Migliaccio et al., 2000; Litvinov et al., 2004). Die Länge des GGN-Repeats zeigt ebenfalls einen Einfluss auf die Transaktivierungseigenschaft des *AR*. Zum Zeitpunkt der Durchführung der experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Dissertation waren allerdings keine Daten für die in der Bevölkerung häufigsten Repeatlängen berichtet (Gao et al., 1996; Ding et al., 2005; Werner et al., 2006).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Der *AR* ist das erste mehrfach unabhängig bestätigte Gen, das einen Beitrag zur Entstehung der AGA leistet. Assoziationsanalysen mit einer großen Zahl genetischer Varianten und Ergebnisse von Sequenzierungen legen nahe, dass der Polyglycin kodierende GGN-Repeat in Exon 1 die ursächliche Variante im *AR* darstellt.

Ein Ziel dieser Arbeit war daher, den Einfluss verschiedener GGN-Repeatlängen auf die Expression und Aktivität des *AR* zu testen. Zu diesem Zweck sollte der *AR* mit unterschiedlichen GGN-Repeatlängen in Säugerzellen exprimiert werden. Die funktionellen Eigenschaften der unterschiedlichen *AR*-Allele sollten in einem androgenresponsiven Reporter-gen-Assay verglichen werden. Eventuelle Unterschiede sollten durch die Quantifizierung der *AR*-Transkripte und *AR*-Proteine näher charakterisiert werden. Für die Untersuchungen sollten geeignete Expressionsvektoren kloniert werden, die den humanen *AR* mit unterschiedlichen GGN-Repeatlängen in Säugerzellen exprimieren. Neben der assoziierten Repeatlänge von GGN23 sollten die Repeatlänge GGN24 als zweithäufigstes Allel, sowie die Repeatlängen GGN10 und GGN27 als die beiden Extreme in der deutschen Bevölkerung untersucht werden. Die Analysen sollten mittels quantitativer Real-Time RT-PCR, ELISA und einen Luziferase-Reporter-Assay durchgeführt werden. Die Studie ist mittlerweile veröffentlicht (Brockschmidt et al., 2007).

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung weiterer Gene, die an der Entstehung der AGA beteiligt sind. Zu diesem Zweck sollte eine genomweite Assoziationsuntersuchung (GWA) durchgeführt werden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist noch keine GWA zur AGA publiziert. Hierfür sollten von AGA betroffene Personen und populationsbasierte Kontrollen für mehr als 550.000 SNPs mittels Illumina Bead Array-Technologie genotypisiert werden. Die SNPs, die in der Fall-Kontroll-Studie die besten Hinweise auf Assoziation zeigen, sollten in einem unabhängigen Kollektiv repliziert werden. Auf diese Weise soll die Basis für die Identifizierung neuer für die AGA ursächlicher Gene gelegt werden.

3. MATERIAL & METHODEN

3.1 Geräte

Autoklav

- Systec D-150, Systec GmbH
- Varioklav® 135 S Dampfsterilisator, H+P Labortechnik GmbH

Automatischer Sequenzierer

- 3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH (Applied Biosystems)
- ABI Prism 377 DNA Sequencer (96-er lane upgrade), Perkin Elmer Applied Biosystems

Brutschrank

- HERA *cell* 240, Heraeus GmbH
- B 6060, Heraeus GmbH

DNA-Bank/Verwaltung

- 2D CYPHER™ Tubes, ABgene
- 2DCYPHER™ 1,2ml Cluster Tube Racks, ABgene
- 2D CYPHER™ SmartScan Solo, ABgene
- SmartScan™ 96, ABgene

Elektrophoresekammern

- WIDE MINI-SUB® CELL GT, Bio-Rad Laboratories GmbH
- Mini VE Complete SE300-10A-1.0 vertical electrophoresis system, Hoefer™ Inc.
- Fastblot B44, Whatman Biometra®

Gel-Dokumentations-System

- Gel Doc™ XR System, Bio-Rad Laboratories GmbH

Genotypisierungssysteme

- BeadStation 500GX System, Illumina® Inc.
- Infinium Plus Whole-Genome Genotyping Starter-Manual Option Package, Illumina® Inc.
- MassARRAY™ Nanodispenser, SAMSUNG Techwin Co. Ltd. für Sequenom®
- MassARRAY™ Compact Analyzer, Bruker Daltonics Inc. für Sequenom®

Homogenisator

- Polytron® PT 1600 E, Kinematica AG

Mikroplattenreader

- GENIOS Pro, TECAN
- DYNEX MRX II, DYNEX Technologies

Mikroskop

- Axiovert 40C, Carl Zeiss AG

nicht elektrische Geräte

- Med. Nadelhalter EN 11H, Everhards GmbH
- Neubauer improved Zählkammer ohne Federklemme, BRAND GmbH & Co. KG

Nukleinsäure-Isolierung

- ABI Prism™ 6100 Nucleic Acid PrepStation, Applied Biosystems

Nukleinsäure-Messgeräte

- NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab Biotechnologie

pH-Meter

- inoLab pH 720, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co. KG

Pipettierhilfen

- Biomek® NX MC, Laboratory Automation Workstation, Beckman Coulter GmbH
- Biomek® NX S8G Laboratory Automation Workstation, Beckman Coulter GmbH
- Multipette® plus, Eppendorf AG
- Transferpette®, BRAND GmbH & Co. KG
- Transferpette®-8, BRAND GmbH & Co. KG
- Transferpette®-8/-12 electronic, BRAND GmbH & Co. KG
- micro-classic Pipettierhelfer, BRAND GmbH & Co. KG
- accu-jet® pro, BRAND GmbH & Co. KG
- Finnpipette® 16-Kanal, Thermo Electron Corp. über VWR International GmbH
- Cell Mate II, Matrix Technologies Corp., Thermo Scientific

Pumpensysteme

- PC 2004 Vario, Vacuubrand GmbH & Co. KG
- MZ 2C Membran Vacuum Pumpe, Vacuubrand GmbH & Co. KG

Schüttel-, Misch- und Heizgeräte

- REAX 2, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
- UNIMAX 1010, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
- TITRAMAX 101, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
- LD-76, Labinco B.V.
- Series 25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific GmbH
- ARE Heating Magnetic Stirrer, VELP® Scientifica srl.
- HM 2300 CD, Hulme-Martin Heat Sealers Ltd.
- Vortex Genie 2, Scientific Industries Inc.

Spannungsgeräte

- PowerPac Universal™ Power Supply, Bio-Rad Laboratories GmbH
- PowerPac Basic™ Power Supply, Bio-Rad Laboratories GmbH

Sterile Werkbank

- HERA*safe*, Heraeus GmbH

Sterilisationsofen

- UT 6000, Heraeus GmbH

Thermocycler

- PTC-200, MJ Research
- ABI Prism®7900HT Fast real-Time PCR System (TaqMan), Applied Biosystems

Thermomixer

- Thermomixer comfort, Eppendorf AG

Trockenschrank

- T 20 P, Heraeus GmbH

Waagen

- TE3102S, Sartorius AG
- TE3135-DS, Sartorius AG

Wasserbad

- WNB 29, memmert® GmbH & Co. KG

Zentrifugen

- Megafuge 1.0 R, Heraeus GmbH
- Biofuge *stratos*, Heraeus GmbH
- Biofuge *fresco*, Heraeus GmbH
- Biofuge *pico*, Heraeus GmbH
- Concentrator 5301, Eppendorf AG
- Vacuum Zentrifuge VR-mini, Heto über Thermo Fisher Scientific Inc.

3.2 Chemikalien

Soweit möglich, wurden Chemikalien mit der Qualitätsbezeichnung „pro analysis“ verwendet.

- 40% Acrylamid, Bio-Rad Laboratories GmbH
- 40% Acrylamid/Bisacrylamidlösung 29:1 & 19:1, Bio-Rad Laboratories GmbH
- AG 1-X8 Resin, Bio-Rad Laboratories GmbH
- Agar granulated, Difco Lab
- Agarose low EEO (Agarose Standard), AppliChem GmbH
- Ammoniumchlorid (NH_4Cl), Merck KGaA
- Ammoniumpersulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) (APS), Sigma-Aldrich
- Ampicillin (Natrium Salz), Sigma-Aldrich
- Bacto Tryptone, Difco Lab
- Bromphenolblau, Sigma-Aldrich
- Calciumchlorid (CaCl_2), Merck KGaA
- Charcoal, Dextran Coated, Sigma-Aldrich
- Chloroform (CHCl_3), Sigma-Aldrich
- Cycloheximid ($\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_4$) (CHX), Sigma-Aldrich
- Diethyl-Pyrocacbonat ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$) (DEPC), Sigma-Aldrich
- Dihydrotestosteron ($\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_2$) (DHT; 5 α -Androstan-17 β -ol-3-on), Sigma-Aldrich
- Dimethylsulfoxid ($\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$) (DMSO), Sigma-Aldrich
- (5-Brom-4-chlor-3-indolyl)- β -D-galactosid (X-Gal), Stratagene
- D(+)-Glukose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), Merck KGaA
- 1,4-Dithiothreitol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$) (DTT), Carl Roth GmbH & Co. KG
- Essigsäure ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) (Eisessig), Merck KGaA
- Ethanol absolut ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (EtOH) (100%), AppliChem GmbH
- Ethidiumbromid ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) (EtBr) (1%), Merck KGaA
- Ficoll™ 400, Amersham Pharmacia Biotech AB
- Formamid (CH_3NO), AppliChem GmbH
- Glycerol ($\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$), BRL Life Technologies, Inc.
- Glycin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$), Serva
- Isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$), AppliChem GmbH
- Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), Sigma-Aldrich
- Kaliumchlorid (KCl), Merck KGaA

- Kaliumhydrogencarbonat (KHCO₃), Merck KGaA
- Magnesiumchlorid (MgCl₂), Merck KGaA
- Magnesiumsulfat (MgSO₄), Merck KGaA
- Manganchlorid (MnCl₂), Sigma-Aldrich
- β-Mercaptoethanol (C₂H₆OS) (β-ME), Serva
- N,N'-Methylen Bisacrylamid (C₇H₁₀N₂O₂) (Bisacrylamid), Serva
- Natriumacetat (CH₃COONa), Merck KGaA
- Natriumchlorid (NaCl), Merck KGaA
- Natriumhydroxid (NaOH), Merck KGaA
- Natriumhypochlorit (NaOCl) (13%), AppliChem GmbH
- PIPES (C₈H₁₆N₂Na₂O₆S₂), Sigma-Aldrich
- Phenol (C₆H₆O), Sigma-Aldrich
- Ponceau (C₂₂H₁₂N₄Na₄O₁₃S₄), Sigma-Aldrich
- Salzsäure (HCl) (32%), Merck KGaA
- 10% Sodiumdodecylsulfat (C₁₂H₂₅NaO₄S) (SDS), Bio-Rad Laboratories GmbH
- TEMED (C₆H₁₆N₂), Sigma-Aldrich
- Titriplex III (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ * 2 H₂O) (EDTA), Merck KGaA
- Tris, ICN Biomedicals
- Tris-BASE (NH₂C(CH₂OH)₃) (Trizma), Sigma-Aldrich
- Trizol®, Invitrogen
- Tween® 20 (C₅₈H₁₁₄O₂₆), AppliChem GmbH
- Ultrasol F, MEDICENT GmbH
- Urea (CH₄N₂O) (Harnstoff), Serva
- Yeast Extract, Difco Lab

3.3 Ergänzende Materialien zur Analyse von Nukleinsäuren

- AmpliTaq- DNA-Polymerase [5 U/μl], Applied Biosystems
- 5 x Big Dye Terminator 3.1 Sequencing Buffer, Applied Biosystems
- BioTherm DNA Polymerase [5 U/μl], GeneCraft
- Deoxiribonukleosidtriphosphate (dNTPs) [je 10 mM] (als Gebrauchslösung in H₂O verdünnt auf je 1,25 mM), GeneCraft
- dNTPs [10 mM], Nexttec GmbH
- DNA-Längenstandard (GS 500 ROX), Applied Biosystems
- DNA-Längenstandards 100 bp und 1 kb, GeneCraft
- DNA-Längenstandards 100 bp und 1 kb, New England Biolabs GmbH
- DNase I, Qiagen GmbH
- HotStar Taq DNA Polymerase [5 U/μl], Qiagen GmbH
- MassRuler DNA Ladder, Low Range (100 bp) und High Range (1 kb), MBI Fermentas
- MgCl₂ [50 mM], GeneCraft
- MgCl₂ [25 mM], Qiagen GmbH
- 2 x PCR Prämix MasterAmp Puffer G, Biozym
- 10 x PCR Puffer mit MgCl₂ [15 mM], GeneCraft
- 10 x PCR Puffer mit MgCl₂ [15 mM], Qiagen GmbH
- 10 x PCR Puffer ohne MgCl₂, GeneCraft
- Pronase E, Roche Molecular Biochemicals
- Proteinase K, Qiagen GmbH
- Ready Reaction Mix 3.1, Applied Biosystems
- Restriktions-Endonukleasen *Kpn*I und *Cpo*I, MBI Fermentas
- RNAlater™, Ambion
- T4-DNA-Ligase, Roche Molecular Biochemicals

3.4 Ergänzende Materialien zur Analyse von Proteinen

- AL4 Fixierer, Kodak
- BioMax Film, Kodak
- Horseradish Peroxidase conjugated (HRP) anti-Rabbit Antikörper, Jackson ImmunoResearch Laboratories
- Horseradish Peroxidase conjugated (HRP) anti-Mouse Antikörper, Jackson ImmunoResearch Laboratories
- LX 24 Entwickler, Kodak
- Mouse anti- β -Actin Antikörper, Sigma-Aldrich
- Natural Nonfat Dry Milk (Milchpulver), Safeway
- Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Transfermembran HybondTM-P, Amersham Biosciences GmbH
- Precision Plus ProteinTM Standard Dual Color, Bio-Rad Laboratories GmbH
- Protean[®] Blot Paper XL size, Bio-Rad Laboratories GmbH
- Rabbit anti-AR Antikörper, Santa Cruz Biotechnology

3.5 Ergänzende Materialien für Zellkultur

- Amphotericin B (500 x), Roche Molecular Biochemicals
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), CAMBREX Bio Science
- Fetales Kälberserum (FKS), Biochrom AG
- LipofectamineTM 2000, Invitrogen
- OptiMEM, Invitrogen
- Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (100 x), Invitrogen
- Phosphate buffered saline (PBS) 10 x, Invitrogen
- Trypsin-EDTA (1 x), Sigma-Aldrich

3.6 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Verdünnungen und Lösungen wurden, wenn nicht anders aufgeführt, mit H₂O dest. hergestellt.

10% Ammoniumpersulfat (APS):

10% Ammoniumpersulfat in H₂O dest., Lagerung: -20°C

Ampicillinstocklösung:

50 mg Ampicillin/ml in H₂O dest., sterilfiltriert, Lagerung: -20°C

5% Block-Lösung:

5 g Milchpulver, PBST add 100 ml

Bromphenol-Blaupuffer:

10 ml 10 x TBE, 10 ml 0,1% Bromphenolblau, 40 ml 20% Ficoll ad 100 ml mit H₂O dest.

EDTA [1 mM], 0,1% DEPC:

500 μ l 0,5 M EDTA ad 250 ml mit H₂O dest., 250 μ l DEPC

95% Formamid/1 mM EDTA:

9,5 ml 100% Formamid, 480 μ l H₂O, 20 μ l EDTA

Frischblutlysispuffer:

155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA (pH 7,0)

IPTG-Stocklösung:

500 mg IPTG in 20 ml H₂O dest., Lagerung: -20°C

Kernlysispuffer:

10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 400 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 8,0)

LB (Luria-Bertani)-Medium, pH 7,0:

5 g Bacto Tryptone, 2,5 g Yeast Extract, 2,5 g NaCl ad 500 ml mit H₂O dest., autoklavieren

LB-Agar für Agarplatten mit Ampicillin:

500 ml LB-Medium und 9 g Agar, auf 50°C abkühlen lassen, 0,5 ml Ampicillin [50 mg/ml] zugeben, auf 10 cm Kulturschalen verteilt

1 x Lysis Buffer:

1:1 Mischverhältnis aus 2 x Nucleic Acid Purification Lysis Solution und 1 x PBS

Medium für HeLa-Zellen:

500 ml DMEM, 50 ml FKS, 5 ml Pen/Strep, 1 ml Amphotericin

Natriumacetat [3 M], pH 5,2:

123 g Natriumacetat ad 500 ml mit H₂O dest., pH Einstellung auf 5,2 mit Eisessig

Natriumhydroxid [0,1 M] für RNA-Arbeiten:

1 g NaOH ad 250 ml mit H₂O dest., 250 µl DEPC, ü.N. bei 37°C schütteln, dann autoklavieren

0,4% Natriumhypochlorit:

15,4 ml NaOCl, 484,6 ml H₂O

4,5% PAA-Gel für Fragmentlängenanalyse:

pro Gel: 5,6 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamidlösung (29:1), 18 g Urea, 24,9 ml H₂O dest., 6 ml 10 x TBE-Puffer, Lösung entgasen, 250 µl 10% APS, 35 µl TEMED

5% PAA-Sammelgel für SDS-PAGE:

Für zwei Gele: 1,25 ml 40% Acrylamid, 0,65 ml 1% Bisacrylamid, 1,25 ml 1 M Tris pH 6,8, 100 µl 10% SDS, 6,3 ml H₂O dest., 150 µl 10% APS, 8 µl TEMED

10% PAA-Trenngel für SDS-PAGE:

Für zwei Gele: 5,93 ml 40% Acrylamid, 3,1 ml 1% Bisacrylamid, 9 ml 1 M Tris pH 8,8, 240 µl 10% SDS, 5,56 ml H₂O dest., 150 µl 10% APS, 13 µl TEMED

0,2% PBST:

4 g Tween 20, 200 ml 10 x PBS, H₂O ad 2000 ml

0,1% Ponceau-Lösung:

100 µl Ponceau, 5 ml Eisessig, H₂O add 100 ml

3 x Protein-Probenpuffer für SDS-PAGE:

0,3 M DTT, 6% SDS, 240 mM Tris pH 6,8, 30% Glycerol, 0,02% Bromphenolblau

10 x Proteinpuffer:

577 g Glycin, 121 g Tris-BASE, H₂O ad 4000 ml

1 x Protein-Laufpuffer für SDS-Page:

100 ml 10 x Proteinpuffer, 10 ml 10% SDS, 890 ml H₂O

1 x Protein-Transferpuffer:

30 ml 10 x Proteinpuffer, 270 ml H₂O

SOB-Medium:

2% Bacto Trypton, 0,5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, pH 6,7-7,0

SOC-Medium:

2% Bacto Tryptone, 0,5% Bacto Hefe Extrakt, 10 mM NaCl, 2,3 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glukose

Steroidhormon-gestripptes Medium für HeLa-Zellen:

500 ml DMEM, 50 ml gestripptes FKS, 5 ml Pen/Strep, 1 ml Amphotericin

TB-Puffer:

10 mM PIPES, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, steril filtrieren

10 x TBE-Puffer:

0,01 M EDTA pH 8,4 mit NaOH [5 M], 1M Tris, 0,9 M Borsäure; Invitrogen, Leek, Niederlande

Tris-Cl [10 mM] (optional mit 0,1% DEPC für RNA-Arbeiten):

0,6 g Tris-BASE auf 500 ml autoklaviertes H₂O, optionale pH Einstellung mit Salzsäure

Tris-EDTA (TE⁻⁴):

0,1 mM EDTA, 10 mM Tris·Cl pH 8,0

X-Gal-Stocklösung:

20 mg X-Gal in 1 ml Dimethylformamid, Lagerung: -20°C

3.7 Kommerzielle Systeme (Kits)

- AMPure Kit, Agencourt Bioscience Corporation
- CleanSEQ Kit, Agencourt Bioscience Corporation
- Custom TaqMan® Gene Expression Assay “Kojak”, Applied Biosystems
- Custom TaqMan® Gene Expression Assay “Charlie-B”, Applied Biosystems
- Custom TaqMan® Gene Expression Assay “Pax1-Cust”, Applied Biosystems
- Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega GmbH
- GenElute™ Agarose Spin Columns, Sigma-Aldrich
- GFX PCR DNA and Gel Purification Kit, Amersham Biosciences GmbH
- Infinium II Whole-Genome Genotyping Kit mit HumanHap300v1-1 Genotyping BeadChips, Illumina® Inc.
- Infinium II Whole-Genome Genotyping Kit mit HumanHap300-DUOv2 Genotyping BeadChips, Illumina® Inc.
- Infinium II Whole-Genome Genotyping Kit mit HumanHap550v3 Genotyping Bead-Chips, Illumina® Inc.
- iPLEX™ Gold Reagent Kit, Sequenom®
- Luer-Adapter, Sarstedt
- Multifly Set zur Blutentnahme, Sarstedt
- NR Sandwich AR Kit (ELISA), Active Motif
- Nucleobond PC Prep 100 Kit, MACHEREY-NAGEL AG
- QIAprep® Spin Miniprep Kit, Qiagen GmbH
- Rapid DNA Ligation Kit, Roche Molecular Biochemicals
- RNeasy Micro Kit, Qiagen GmbH
- RNeasy Fibrous Tissue Midi Kit, Qiagen GmbH
- RNase-free DNase Set, Qiagen GmbH
- TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG, Applied Biosystems
- TaqMan® Gene Expression Assay “Hs00171172_m1” (AR), Applied Biosystems
- TaqMan® Endogenous Control Assay Human Cyc “4326316E” (Cyclophilin), Applied Biosystems
- TaqMan® Endogenous Control Assay Human β2M “4326319E” (β-2-Mikroglobulin), Applied Biosystems
- S-Monovette Serums-Röhrchen, Sarstedt
- S-Monovette Heparin-Röhrchen, Sarstedt
- S-Monovette EDTA-Röhrchen, Sarstedt
- SpectroCHIP® Arrays and Clean Resin Kit, Sequenom®

- Super Script First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen
- Super Script III First-Strand Synthesis SuperMix, Invitrogen
- SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, Perbio Science Deutschland GmbH
- TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen
- Total RNA Chemistry for Cultured Cells, Blood and PBMC, Applied Biosystems
- Vacutainer-Adapter, Becton Dickinson GmbH

3.8 Verwendete Zellen und Vektorsysteme

prokaryotische Zellen

- Escherichia coli (*E. coli*) TOP10F'
- Escherichia coli DH5 α

immortalisierte Zelllinien

- HeLa-Zellen (humane Cervix-Karzinom-Zellen)

Vektorsysteme

- pSG5-AR (John Isaacs, Cellular and Molecular Medicine, Baltimore, USA; Litvinov et al., 2004)
- pGre2-Luc (R. Lanz, Molecular & Cellular Biology, Houston, USA)
- phRL (Promega GmbH, Mannheim)
- pCR®2.1-TOPO (Invitrogen, Leek, Niederlande)

3.9 Software und Datenbanken

ABgene

- ABgene 2D CYPHER™ Pilot Databases
- ABgene SmartScan 96
- ABgene SmartScan Solo

Applied Biosystems

- <http://home.appliedbiosystems.com/>
- File Builder 3.0
- GeneScan 3.1.2
- Genotyper 2.5
- SDS 2.2.2
- 3130xl Data Collection v3.0

BCM Search Launcher

- <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/Options/readseq.html>

Beckman-Coulter

- Biomek® Software 3.2

Bio-Rad

- Quantity One®

Chip Bioinformatics Tools

- <http://snpper.chip.org/>

Conor McCarthy

- Chromas Version 1.43

DNASTAR Inc.

- SeqMan II Version 5.0

DYNEX Technologies

- DYNEX Revelation 4.22

Ensembl	- http://www.ensembl.org/index.html
HapMap	- http://www.hapmap.org/ - HaploView 4.0
Illumina	- BeadScan - BeadStudio 2.0
Mathews, Zuker, Turner	- RNAstructure 4.3
MWG	- http://www.mwg-biotech.de/
NCBI	- http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Peqlab	- NanoDrop® ND-100 v3.3.0
Primer 3	- http://frodo.wi.mit.edu/
Qiagen	- http://www1.qiagen.com/
Restriktionskartierung	- http://www.restrictionmapper.org/
Sequenom	- https://www.realsnp.com/default.asp - Assay Design 3.1 - Typer 3.4 - SpectroPoint - RT-Workstation 3.3 - FLEXcontrol
Paul Stothard	- http://bioinformatics.org/sms/index.html
TECAN	- Xfluor4GeniosPro V4.53
UCSC Genome Bioinformatics	- http://genome.ucsc.edu/

3.10 Nukleinsäuren

3.10.1 Probandenmaterial

Das „Kollektiv der androgenetischen Alopezie“ (ANA) wurde in der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Düsseldorf rekrutiert. Die von der androgenetischen Alopezie (AGA) Betroffenen wurden auf der Basis des Klassifizierungsstandards von Hamilton (1951) und Norwood (1975) (Abb. 2.2) rekrutiert. Für die Aufnahme in das ANA-Kollektiv als Indexpatient (Betroffener) war ein Alter von unter 40 Jahren und ein AGA Phänotyp innerhalb der 10% am schwersten Betroffenen einer Altersgruppe maßgeblich, was durch die rekrutierenden Dermatologen beurteilt wurde. Die klinische Untersuchung der Probanden beinhaltete damit eine Bestandsaufnahme des Haupthaars sowie eine fotografische Dokumentation des Haarstatus. Die klinischen Daten

wurden in eine Datenbank aufgenommen. Von jedem Probanden wurden 30 ml EDTA-Blut für die DNA-Extraktion entnommen.

Das ANA-Kollektiv besteht aus 3 Untergruppen:

1. Die AGA-Familien (ANA-001-01; 001 = Familie 1, 01 = Individuum), bei denen der von AGA betroffene Indexpatient stets die Individuumsnummer „01“ hat, der Vater des Indexpatienten die „02“ und die Mutter die „03“. Geschwister wurden ebenfalls rekrutiert, soweit sie dieselben Kriterien wie für den Indexpatienten erfüllten. Sie werden fortlaufend ab „04“ aufwärts bezeichnet. Der Haarstatus der Eltern wird nicht dokumentiert.
2. Die AGA-Unverwandten (ANA-As, auch einzelne ANA-Indexpatienten), die ohne Eltern oder Geschwister rekrutiert werden.
3. Die AGA-Nicht-Betroffenen, männliche Personen im Alter über 60 Jahre ohne AGA.

Das ANA-Kollektiv umfasste zum Zeitpunkt der Analysen 1706 Individuen:

	Indexe	Väter	Mütter	Geschwister	Kontrollen
AGA-Familien	373*	353	353	137	-
AGA-Unverwandte	250	-	-	-	-
AGA-Nicht-Betroffene	-	-	-	-	240

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des ANA-Kollektivs. * = Die Überzahl an Indexpersonen erklärt sich aus dem Ausschluss oder dem Fehlen von Eltern (unvollständige Trios bzw. Familien).

Das Kollektiv der Haarspenderkontrollen wurde im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn rekrutiert. Alle männlichen Probanden waren zum Zeitpunkt der Spende zwischen 20 und 40 Jahren alt. Den Probanden wurden 35 ml Blut entnommen (10 ml EDTA-Blut, 10 ml Heparin-Blut, 10ml für Serum und 2 x 2,5 ml RNA stabilisiertes Blut). Der Haarstatus wurde nicht dokumentiert. Neben der DNA und RNA aus Blut wurden bei 113 der 121 Probanden etwa 50 Haare mittels eines medizinischen Nadelhalters aus dem Okzipitalbereich des Kopfes gewonnen. Aus den proximalen Haarschäften wurde RNA isoliert. Da die Genexpression im Tagesverlauf variabel ist, wurde die Materialentnahme ausschließlich vormittags (d.h. zwischen Frühstück und Mittagessen) durchgeführt.

Das Kollektiv der Blutspenderkontrollen setzte sich aus Probanden zusammen, die im Rahmen einer gewöhnlichen Blutspende zum Universitätsklinikum Bonn kamen. Diesen Probanden wurden nach 30 ml EDTA-Blut entnommen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich DNAs männlicher Personen herangezogen.

Um einen ethnisch homogenen genetischen Hintergrund für diese Kollektive zu gewährleisten, wurden ausschließlich gesunde Probanden aus Deutschland mit deutscher Abstammung rekrutiert, wobei die Herkunft der Großeltern maßgeblich war. Genehmigungen der Ethikkommissionen der Universität Bonn und Düsseldorf zur Probandenrekrutierung lagen ebenso vor wie eine schriftliche Einverständniserklärung jedes einzelnen Probanden zur Teilnahme an der Studie.

Die für die genomweite Assoziationsuntersuchung verwendeten Universalkontrollen sind ein zufällig gewähltes Subkollektiv von 400 Personen aus dem insgesamt 4.500 Personen umfassenden, populationsbasierten Kollektiv von Männern und Frauen zwischen 45 und 75 Jahren, die durch das Universitätsklinikum Essen im Rahmen der „Heinz Nixdorf RECALL-Studie“ (<http://www.recall-studie.uni-essen.de/>) rekrutiert wurden. Der Haarstatus wurde für unsere Untersuchungen im Rahmen der Heinz Nixdorf Studie fotografisch dokumentiert.

	Individuen	Männlich	Weiblich	RNA (Blut)	RNA (Haarschaft)
Blutspenderkontrollen	188	188	-	-	-
Haarspenderkontrollen	121	121	-	121	113
Universalkontrollen	383	224	159	-	-

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Blutspenderkontrollen-, Haarspenderkontrollen- und des Universalkontrollen-Kollektivs.

3.10.2 cDNA Panels

Die kommerziell erhältlichen Human Multiple-Tissue cDNA (MTC™) Panels I, II sowie das Human Fetal MTC™ Panel (Takara Bio Europe/Clontech) wurden verwendet.

3.10.3 Synthetische Oligonukleotide (Primer und Sonden)

Primer für Sequenomexperimente (Vorwärts- (F-), Rückwärts- (R-) und Extensionsprimer) wurden von der Firma Metabion in Martinsried synthetisiert. Die verwendeten Primer und Sonden für die TaqMan-Assays wurden von Applied Biosystems (ABI, Darmstadt) hergestellt, ebenso der mit dem Programm Primer 3 entworfene fluoreszenzmarkierte Primer für die Fragmentlängenanalyse am Sequenziergerät (GGC F2/R2). Alle übrigen Primer wurden von der genomischen Sequenz ausgehend für die cDNA/DNA-Untersuchungen mit dem Programm Primer 3 generiert und von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Für die Auswahl der Primer wurden folgende Parameter im Primer 3-Programm angegeben: Die Schmelztemperatur sollte bei 60°C liegen, die Primer sollten 18 bis 22 Nukleotide lang sein und der GC-Gehalt wurde auf 50 - 65% festgelegt. Es sollten keine Möglichkeiten zur Sekundärstrukturbildung bestehen und geringe 3'- und 5'-Selbstkomplementaritäten. Im Anhang I sind alle verwendeten Primer aufgeführt.

3.11 Molekularbiologische Methoden

3.11.1 Isolierung von RNA

Allgemeines zu Arbeiten mit RNA

RNA ist für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse sehr anfällig, insbesondere weil RNasen ubiquitär vorkommen, sehr stabil sind und selbst nach Autoklavierung schnell renaturieren können (Sela et al., 1957). Daher müssen für Arbeiten mit RNA der Arbeitsplatz, alle Gerätschaften und Chemikalien RNase frei sein. Aus diesem Grund wurden bei RNA-Arbeiten grundsätzlich Handschuhe getragen, die zusätzlich mit 70% EtOH abgewaschen wurden, ebenso wie die verwendeten Pipetten und der Arbeitsplatz mit EtOH vorbehandelt wurden. RNase freie Pipettenspitzen konnten kommerziell über die Firma Biozym erworben werden. Alle eingesetzten Chemikalien wurden ausschließlich für Arbeiten mit RNA verwendet. Das verwendete Wasser war entweder RNase freies Wasser aus den kommerziell erworbenen Kits oder 0,1% DEPC-Wasser, das über Nacht (ü.N.) bei 37°C geschüttelt und anschließend autoklaviert worden war. DEPC selbst ist ein starker RNase-Inhibitor (Fedorcsak & Ehrenberg, 1966). Thermisch geeignete Gerätschaften wurden vor RNA-Arbeiten bei trockener Hitze für 4 Stunden bei 180°C sterilisiert.

Isolierung von Gesamt-RNA aus proximalen Haarschäften

Für die Isolierung von RNA wurden die proximalen Haarschäfte mit einer Schere in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geschnitten, so dass sie direkt in 1 ml vorgelegte RNAlater™-Lösung fielen. Bei RNAlater™ handelt es sich um eine kommerziell erhältliche Lösung, welche das RNA-Profil der Zellen *ex vivo* bei Raumtemperatur (RT) stabilisiert. Qualität und Quantität der RNA konnten so bis zur Weiterverarbeitung aufrechterhalten werden. Die RNA der Haarproben wurde spätestens zwei Tage nach Entnahme der Haare extrahiert.

Zur Isolierung der Haar-RNA wurde das RNeasy Micro Kit von Qiagen verwendet. Zunächst kommt es zu einer Lyse des Gewebes durch Detergenzien und Proteinase K. Im nächsten Schritt bindet die RNA in Gegenwart hoher chaotroper Salzkonzentrationen an eine für die RNA-Bindung spezifische Silica-Gel-Membran. Um im späteren Versuchsablauf gegebenenfalls störend wirkende DNA-Rückstände zu hydrolysieren, wurde ein zusätzlicher DNase-Verdau durchgeführt. Abschließend wurde die RNA nochmals gewaschen, bevor sie eluiert wurde.

Für die Isolierung wurde ein selbst ausgearbeitetes Protokoll verfolgt.

Durchführung:

1. In RNAlater™ gelagerte Haarschäfte (in 1,5 ml-Reaktionsgefäß) für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren.
2. RNAlater™-Überstand vorsichtig abnehmen.

3. Gewebe lysieren: 300 µl RLT-Pufferlösung auf die Haarschäfte geben.
4. Homogenisieren: Reaktionsgefäß für ca. 1 min vortexen.
5. 590 µl RNase freies Wasser zugeben.
6. 20 µl Proteinase K Solution (20 mg/ml) zugeben und mit der Pipette vermischen.
7. Reaktionsgefäß für 10 - 15 min bei 55°C im Thermomixer bei ca. 500 rpm inkubieren.
8. 3 min bei 13.000 rpm zentrifugieren.
9. Überstand (ca. 900 µl) mit einer Pipette in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
10. 1/2 Volumen (450 µl) 96 - 100% EtOH zum gesäuberten Lysat geben und mit der Pipette vermischen. Nicht zentrifugieren!
11. 700 µl Probe auf ein RNeasy mini column (in 2 ml Sammelröhrchen) geben und 15 sec bei 11.000 rpm zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
12. Schritt 11 mit dem Rest der Probe wiederholen.
13. 350 µl RW1-Puffer auf die Säule geben und 15 sec bei 11.000 rpm zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
14. DNase I Inkubationsmix herstellen: 1.500 Kunitz-Einheiten DNase I in 550 µl RNase freiem Wasser lösen. DNase I Stocklösung im Verhältnis 1:8 mit RDD Puffer durch vorsichtiges Invertieren zum DNase I Inkubationsmix verdünnen.
15. 80 µl DNase I Inkubationsmix direkt auf die Silica-Gel-Membran geben und für 15 min bei RT inkubieren lassen.
16. 350 µl RW1-Puffer auf die Säule geben und 15 sec bei 11.000 rpm zentrifugieren. Durchlauf samt Sammelröhrchen verwerfen.
17. Die Säule in ein neues Sammelröhrchen überführen. 500 µl RPE-Puffer auf die Säule geben, Säule verschließen und 15 sec bei 11.000 rpm zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
18. Schritt 16 für 2 min bei 11.000 rpm wiederholen. Durchlauf samt Sammelröhrchen verwerfen.
19. Die Säule in ein neues Sammelröhrchen geben und 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.
20. Zur Elution der RNA die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geben und 75 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran pipettieren. Die Säule verschließen und 1 min bei 11.000 rpm zentrifugieren.
21. Das Eluat mit einer Pipette aufnehmen und erneut auf die Membran pipettieren. Abermals bei 11.000 rpm für 1 min zentrifugieren.

Isolierung von Gesamt-RNA aus einer Kopfhautbiopsie

Die Kopfhautbiopsie wurde 8 Tage vor der Isolierung von einer 22 jährigen, männlichen Person mit Haarstatus II nach der Norwood und Hamilton Klassifizierung (Abb. 2.2) aus dem Grenzbe-
reich der Geheimratsecken durch die Dermatologen des Universitätsklinikums Düsseldorf ent-
nommen und in RNAlater™ gekühlt gelagert. Die Biopsie hatte ein Gewicht von 29 mg. Die
RNA der Kopfhautbiopsie wurde mit dem RNeasy Fibrous Tissue Midi Kit von Qiagen isoliert.

Durchführung:

1. In RNAlater™ gelagerte Kopfhautbiopsie (in 1,5 ml-Reaktionsgefäß) mit Skalpell halbieren und bei 13.000 rpm abzentrifugieren.
2. RNAlater™-Überstand vorsichtig abnehmen und das Gewebestück in ein 15 ml Falcon-Tube überführen.
3. Gewebe lysieren: 2 ml RLT-Pufferlösung mit β-ME auf die Biopsie geben.
4. Homogenisieren: Reaktionsgefäß für ca. 2 min mit Homogenisator zerstückeln.
5. 4 ml RNase freies Wasser zugeben.
6. 65 µl Proteinase K Lösung (20 mg/ml) zugeben und mit der Pipette vermischen.

7. Reaktionsgefäß für 20 min bei 55°C im Wasserbad inkubieren.
8. 5 min bei 4.000 rpm zentrifugieren.
9. Überstand (ca. 6 ml) mit einer Pipette in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführen.
10. 1/2 Volumen (3 ml) 96 - 100% EtOH zum gesäuberten Lysat geben und mit der Pipette vermischen. Nicht zentrifugieren!
11. 3 ml der Probe auf ein RNeasy Midi column (in 15 ml Sammelröhrchen) geben und 5 min bei 4.000 rpm zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
12. Schritt 11 mit weiteren 3 ml der Probe wiederholen.
13. Schritt 11 mit dem Rest der Probe wiederholen.
14. 2 ml RW1-Puffer auf die Säule geben und 5 min bei 4.000 rpm zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
15. 160 µl DNase I Inkubationsmix (siehe Isolierung von Gesamt-RNA aus Haarschäften) direkt auf die Silica-Gel-Membran geben und für 15 min bei RT inkubieren lassen.
16. 2 ml RW1-Puffer auf die Säule geben und 5 min inkubieren lassen. Anschließend 5 min bei 4.000 rpm zentrifugieren. Durchlauf samt Sammelröhrchen verwerfen.
17. Die Säule in ein neues Sammelröhrchen überführen. 2,5 ml RPE-Puffer auf die Säule geben, Säule verschließen und 2 min bei 4.000 rpm zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
18. Schritt 17 für 5 min bei 4.000 rpm wiederholen. Durchlauf samt Sammelröhrchen verwerfen.
19. Zur Elution der RNA die Säule in ein neues Sammelröhrchen geben und 150 µl RNase freies Wasser direkt auf die Membran pipettieren. Die Säule verschließen, 1 min inkubieren lassen und dann für 3 min bei 4.000 rpm zentrifugieren.
20. Schritt 19 mit weiteren 150 µl RNase freiem Wasser wiederholen.

Isolierung von Gesamt-RNA aus Haut

Wie von Chomczynski und Sacchi (1987) beschrieben, wird mit Hilfe von Trizol, einer monophasischen Guanidinthiocyanat-Phenol-Lösung, und nach Zugabe von Chloroform die Gesamt-RNA in einem Schritt isoliert. RNA, DNA und Proteine werden aufgrund ihres unterschiedlichen Löslichkeitsverhaltens in organische und wässrige Lösungen aufgetrennt. Proteine lösen sich in der organischen Phase, RNA in wässriger Phase und DNA wegen ihrer amphoteren Eigenschaften in der Interphase. Die RNA wird dann mit Isopropanol aus der wässrigen Phase präzipitiert. Zur Entfernung von Phenolresten, welche nachfolgende enzymatische Reaktionen negativ beeinflussen könnten, wird die RNA in Ethanol gewaschen und anschließend in DEPC-Wasser resuspendiert.

Guanidinthiocyanat ist ein chaotropes Detergenz, das Zellen schnell und vollständig lysiert, indem es Proteine denaturiert. Außerdem hemmt es die Aktivität von RNasen, so dass es für die Isolierung von RNA besonders gut geeignet ist.

Für die praktische Durchführung wurden eine Pinzette, ein Mörser und der dazugehörige Pistill gründlich gewaschen und 4 h bei 180°C gebacken. Das bei -70°C gelagerte, ca. 4 mm³ große Stück menschliches Hautgewebe wurde auf Trockeneis gelegt. Bis zur Überführung des Gewebestückes in Trizol musste unbedingt darauf geachtet werden, dass es nicht auftaut. In einem solchen Fall würden RNasen aktiv werden, welche die RNA abbauen. In den sterilen Mörser wurde flüssiger Stickstoff gefüllt. Pistill und Mörser wurden ca. 10 sec vorgekühlt. Die Gewebeprobe

wurde dazugegeben und vorsichtig zermörsert. Mit einem Rest flüssigem Stickstoff wurde das zermahlene Gewebe in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Verdampfen des flüssigen Stickstoffs wurde 1 ml Trizol zugegeben und gevortext. Durch mehrmaliges Aufziehen durch zwei Kanülen (\varnothing 0,9 mm und \varnothing 0,6 mm) in eine 10 ml Spritze wurde das Gemisch homogenisiert. Der Inhalt wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 200 μ l Chloroform wurde gevortext und 2 - 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 15 min bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige, RNA-enhaltende Phase wurde abgenommen, mit 600 μ l Isopropanol versetzt, gevortext und 15 min bei RT stengelassen. Es wurde 10 min bei 4°C und 12.000 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in RNase freiem Wasser gelöst.

Zum Entfernen von verbliebener DNA wurde zusätzlich noch eine Aufreinigung in einem RNeasy mini column durchgeführt. Dazu wurde die Haut-RNA wie in der Durchführung der „Isolierung von Gesamt-RNA aus proximalen Haarschäften“ ab Punkt 10 beschrieben behandelt.

Isolierung von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen

Die RNA aus transfizierten HeLa-Zellen wurde mittels ABI PRISM 6100 Nucleic Acid PrepStation und dem Total RNA Chemistry for Cultured Cells, Blood and PBMC Kit (Applied Biosystems) nach dem Standardprotokoll extrahiert. Dazu wurde zunächst das Medium aus den 12-Well-Zellkulturplatten abgesaugt. Zur Zellyse wurden 300 μ l 1 x Lysis Buffer (ABI) pro Well pipettiert. Das Homogenisieren wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren der Lösung erreicht, wobei adhärende Zellen mit der Pipettenspitze vom Plattenboden gekratzt wurden.

Alle Folgeschritte wurden mit der ABI PRISM 6100 PrepStation durchgeführt:

Schritt	Beschreibung	Volumen [μ l]	Position auf 6100	Zeit [sec]	Vakuum [%]
1	Anfeuchten der Wells mit RNA Purification Wash Solution 1	40	Waste	-	-
2	Beladen mit homogenisierten Zellkultur-Lysaten	300	Waste	120	20
3	1. Waschschrift mit RNA Purification Wash Solution 1	500	Waste	120	20
4	1. Waschschrift mit RNA Purification Wash Solution 2	650	Waste	180	80
5	DNase I Verdau mit Absolut RNA Wash Solution	50	Waste	900	0
6	2. Waschschrift mit RNA Purification Wash Solution 2	400	Waste	300	0
7	Entfernen der Flüssigkeit aus Schritt 5 und 6	0	Waste	120	20
8	3. Waschschrift mit RNA Purification Wash Solution 2	300	Waste	120	20
9	4. Waschschrift mit RNA Purification Wash Solution 2	300	Waste	120	20
10	Membrantrocknung	0	Waste	300	90
11	Touch off: Positionswechsel zu Collection Position		Waste		
12	Elution mit Nucleic Acid Purification Elution Solution	150	Collection	120	20

3.11.2 Isolierung von DNA

Allgemeines zu Arbeiten mit DNA

Im Gegensatz zu RNA ist DNA nicht für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse anfällig. Für Arbeiten mit DNA bedürfen Reagenzien und Geräte keinen hochqualitativen Reinheitsgrad. Sterile Puffer und Wasser sind hierbei ausreichend. Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße sollten autoklaviert sein.

DNA-Isolierung aus Blut, Aufbereitung und Verwaltung

Hochmolekulare menschliche DNA wurde aus kernhaltigen Leukozyten von frischem Blut, dem EDTA als Antikoagulans zugesetzt wurde, isoliert. Es wurde die Aussalzmethode nach Miller et al. (1988) angewendet: 10 ml Frischblut wurden mit 30 ml Frischblutlysispuffer versetzt, mehrfach invertiert, 15 min auf Eis lysiert und 15 min bei 4°C und 1.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Leukozytenpellet wurde zweimal vorsichtig mit je 5 ml Kernlysispuffer gewaschen, in 10 ml Kernlysispuffer resuspendiert, mit 660 µl 10% SDS und 500 µl Pronase E (20 mg/ml) versetzt und ü.N. bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Es wurden 3,2 ml gesättigte NaCl-Lösung (6 M) zugegeben. Die Reaktionsgefäße wurden kräftig geschüttelt, 10 min bei 4.000 rpm und RT zentrifugiert, mehrmals invertiert und erneut 10 min bei 4.000 rpm und RT zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde verworfen. Der Überstand wurde mit 1 Volumen 100% Isopropanol versetzt und leicht geschwenkt, bis die DNA ausfiel. Die präzipitierte DNA wurde mit einem sauberen Glashaken aus der Lösung „gefischt“ und nach Waschen in 70% Ethanol in 400 µl TE⁻⁴ (pH 8,0) gelöst und als DNA-Stock bei -70°C gelagert.

Als Arbeitsverdünnungen wurden zwei verschiedene Konzentrationen hergestellt, eine 100 ng/µl Verdünnung in TE⁻⁴ sowie eine Verdünnung von 20 ng/µl in H₂O. Die 100 ng/µl Verdünnung wurde bei -20°C gelagert, die 20 ng/µl Verdünnung bei etwa 4°C. Alle Arbeitsverdünnungen wurden mit dem 2D-Barcode-System von ABgene verwaltet.

DNA-Isolierung aus Bakterienkultur (Plasmid-Präparation)

Die Isolierung von Plasmid-DNA zum Zweck der Restriktionsanalyse, Klonierung oder Transfektion in Säugerzellen wurde unter Verwendung des Qiagen QIAprep® Spin Miniprep Kit bzw. des Nucleobond PC Prep 100 Kit (Midi) von MACHEREY-NAGEL durchgeführt. Im Mini- und Midi-Maßstab wurden hierfür angeimpfte Übernachtskulturen von 3 ml (Mini) bzw. 50 ml (Midi) in LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin herangezogen. Beide Systeme basieren auf einer alkalischen Lyse der Bakterien, Trennung der Nukleinsäuren vom Zelldebris mittels Zentrifugation und Waschen der DNA, während diese an eine Silica basierte Membran gebunden ist.

Durchführung QIAprep Miniprep:

1. 1,9 ml einer 3 ml Übernachtskultur in 2 ml Reaktionsgefäß überführen und 15 sec zentrifugieren.
2. Überstand dekantieren und Bakterien-Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendieren.
3. 250 µl Puffer P2 zugeben. Reaktionsgefäß 6 x invertieren und 3 min inkubieren.
4. 350 µl Puffer N3 zugeben und Reaktionsgefäß sofort 6 x invertieren.
5. 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren.
6. Überstand in ein QIAprep Spin Column geben.
7. 60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
8. 500 µl Puffer PB auf die Säule geben und 60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
9. 750 µl Puffer PE auf die Säule geben und 60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
10. 60 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren.
11. Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß stecken und 50 µl Puffer EB auf die Silica-Membran pipettieren. 1 min inkubieren, dann 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren.

Durchführung Nucleobond Midiprep für High- bzw. Low-Copy Plasmide:

1. 50 ml Übernachtskultur in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführen und 15 min bei 4°C und 4.000 rpm zentrifugieren. Überstand verwerfen.
2. Bakterien-Pellet in **4/8** ml Puffer S1 inkl. RNase A resuspendieren.
3. **4/8** ml Puffer S2 zur Suspension geben und Reaktionsgefäß 8 x invertieren. Maximal 5 min inkubieren.
4. **4/8** ml Puffer S3 (4°C) zugeben. Reaktionsgefäß sofort 8 x invertieren, danach 5 min auf Eis inkubieren.
5. Suspension bei 10.000 g und 4°C für 45 min zentrifugieren.
6. Suspension durch mit Puffer N2 angefeuchteten Nucleobond Filter filtrieren.
7. Nucleobond AX 100 Säule mit 2,5 ml Puffer N2 äquilibrieren. Durchlauf verwerfen.
8. Filtrat aus Schritt 6 auf Säule geben.
9. Säule mit **15/20** ml Puffer N3 waschen.
10. Elution der DNA mit 5 ml Puffer N5 (50°C vorgewärmt).
11. Präzipitation der DNA durch Zugabe von 3,5 ml 100% Isopropanol (RT).
12. Reaktionsgefäß 45 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugieren. Überstand verwerfen.
13. Pellet in 2 ml 70% EtOH waschen. 30 min bei 10.000 g und RT zentrifugieren.
14. EtOH vorsichtig abnehmen und Pellet 5 - 10 min antrocknen lassen.
15. Pellet in 150 µl 10 mM Tris oder H₂O dest. lösen.

3.11.3 Aufreinigung von Nukleinsäuren**Aufreinigung von amplifizierter DNA aus Reaktionsansätzen**

DNA-Fragmente aus Reaktionsansätzen müssen aufgereinigt werden, wenn sie sequenziert werden sollen oder wenn gelöste Substanzen Folgereaktionen beeinträchtigen können, wie z.B. Puffer aus einem Verdau. Proben für Sequenzierungen wurden mit den AMPure und CleanSEQ Kits der Firma Agencourt aufgereinigt, welche auf der „Solid Phase Reversible Immobilization“ (SPRI™) Technologie beruhen (DeAngelis et al., 1995). Hierbei bindet DNA unter spezifischen Puffer-Bedingungen an paramagnetische Partikel (Magnetbeads). Über eine Magnetplatte werden diese Partikel an der Reaktionsgefäßwand fixiert, womit die DNA von Kontaminanten befreit

und mit EtOH gewaschen werden kann. Mit H₂O löst sich die DNA wieder von den Partikeln und geht in Lösung über.

Nicht für Sequenzierung bestimmte DNA-Fragmente wurden mit dem GFX PCR DNA and Gel Purification Kit von Amersham aufgereinigt. Auch dieses Kit basiert auf der Silica-Gel-Technik.

Durchführung AMPure-Aufreinigung nach PCR vor Cycle Sequencing:

1. Pro Volumen PCR-Reaktion 1,8 Volumen AMPure Buffer mit resuspendierten Magnetbeads zur PCR-Reaktion pipettieren.
2. Durchmischen der Lösung durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren.
3. Reaktionsgefäß für 5 - 10 min auf Magnetplatte stellen.
4. Magnetbead freie Lösung mit Pipette aufnehmen und verwerfen.
5. 200 µl 70% EtOH ins Reaktionsgefäß pipettieren und 30 sec inkubieren lassen.
6. Magnetbead freien EtOH mit Pipette aufnehmen und verwerfen. Schritt 5 und 6 ein zweites Mal wiederholen.
7. Reaktion für 20 - 30 min lufttrocknen lassen.
8. 40 µl TE⁴ zugeben und DNA durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren in Lösung bringen.

Durchführung CleanSEQ-Aufreinigung vor Sequenzierung:

1. 10 µl CleanSEQ mit resuspendierten Magnetbeads pro Reaktionswell pipettieren.
2. 85% EtOH entsprechend des PCR Reaktionsvolumen pipettieren:

Volumen PCR Reaktion	Volumen 85% EtOH
5 µl	31 µl
10 µl	42 µl
15 µl	52 µl
20 µl	62 µl

3. Durchmischen der Lösung durch siebenmaliges Auf- und Abpipettieren.
4. Reaktionsgefäß für 3 min auf Magnetplatte stellen.
5. Magnetbeadfreie Lösung mit Pipette aufnehmen und verwerfen.
6. 100 µl 85% EtOH ins Reaktionsgefäß pipettieren und 30 sec inkubieren lassen.
7. Magnetbeadfreien EtOH mit Pipette aufnehmen und verwerfen.
8. Reaktion für etwa 10 min lufttrocknen lassen.
9. 40 µl H₂O zugeben, DNA 5 min lösen lassen.

Durchführung GFX PCR DNA and Gel Purification Kit:

1. 500 µl Capture Puffer auf eine GFX-Säule geben, die in einem Sammelröhrchen steckt.
2. DNA-Probe auf die Säule pipettieren und kurz mit dem Puffer durchmischen.
3. 30 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
4. 500 µl Wash Puffer auf die Säule pipettieren und 30 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
5. Schritt 4 ein weiteres Mal wiederholen. Säule in ein neues Sammelröhrchen geben.
6. Zur Elution der DNA, 50 µl H₂O dest. direkt auf die Membran pipettieren und 1 min inkubieren lassen.
7. 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren.

Aufreinigung von amplifizierter DNA aus Agarosegelen

Aus Agarosegelen aufzureinigende DNA-Fragmente wurden mit dem GenElute Agarose Spin Columns Kit (Sigma) aufgereinigt. Dazu werden die DNA-Fragmente zunächst unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht, dann mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktions-

gefäß überführt. Der ausgeschnittene Agarosegel-Block wird mittels Skalpell weiter zerkleinert und auf ein GenElute Agarose Spin Column (Silica-Gel-Säule) überführt, welche in einem Sammelröhrchen steckt.

Durchführung:

1. 100 µl TE⁴ auf die Säule geben und kurz abzentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
2. Gelfragment auf die Säule geben und 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren. Eluat verwahren.
3. 10% des Durchlaufvolumens an 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zum Eluat geben.
4. 2,5 Volumen 100% EtOH hinzugeben und bei -20°C für mindestens 30 min präzipitieren lassen.
5. 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen.
6. Pellet mit 100 µl 70% EtOH waschen. Überstand vorsichtig abnehmen.
7. Pellet in 20 µl H₂O dest. lösen.

3.11.4 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von DNA und RNA

Die Bestimmung von DNA und RNA-Qualität und -Quantität erfolgte durch photometrische Messung bei 260 und 280 nm mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer. Ein wesentlicher Vorteil dieses Systems ist die geringe Menge an benötigtem Probenmaterial von nur 1 µl.

Beim NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer können mit der zugehörigen Software die nukleinsäurespezifischen Absorptionseigenschaften voreingestellt werden. Grundsätzlich weisen Nukleinsäuren bei 260 nm ein Absorptionsmaximum auf. Proteine, Ethanol sowie in der Lösung verbliebene Salze absorbieren bei 280 nm. Aus der optischen Dichte bei 260 nm lässt sich mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes die RNA-Konzentration bestimmen. Der Quotient der Absorption bei 260 nm/280 nm lässt Aussagen über die Reinheit der isolierten RNA zu. Ein Wert um 2,0 weist auf eine reine RNA-Präparation hin (Current Protocols in Molecular Biology, 2001, Appendix A.3D.1). Bei einem kleineren Quotienten von 1,7 bis 1,8 handelt es sich um DNA.

Im Rahmen der Plasmid-Klonierungsarbeiten wurde zusätzlich auf eine vergleichende Konzentrationsbestimmung nach Elektrophorese mittels quantitativer Mass-Leiter (MBI Fermentas) zurückgegriffen. Dabei konnte die Konzentration der aufgetragenen Proben durch Vergleich mit unterschiedlich stark fluoreszierenden Leiter-Banden visuell abgeschätzt werden.

3.11.5 Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Um ein geeignetes Template für die DNA-Polymerase in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu erhalten, musste die RNA revers zu cDNA transkribiert werden. Für die RT-PCR wird eine retrovirale Reverse Transkriptase verwendet, die an einzelsträngige RNA einen komplementären DNA-Strang synthetisiert. RNAs, deren Konzentration sich für den entsprechenden Versuch als zu gering erwiesen, wurden vor der reversen Transkription mittels Speed-Vac aufkonzentriert.

Als Primer für die RT-PCR wurden Oligo(dT) Primer verwendet, die komplementär zu den „Poly-A Schwänzen“ der mRNAs sind, welche sich an den 3'-Enden fast aller eukaryotischen mRNAs befinden. Jedem Ansatz wurde RNase OUT™ zugegeben, welche als RNase-Inhibitor fungiert und damit eine optimale cDNA Ausbeute ermöglicht. Die RT-PCR wurde mit Hilfe des SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (ausschließlich Zellkultur-RNAs) bzw. SuperScript™ First Strand Synthesis System von Invitrogen durchgeführt.

Durchführung SuperScript™ First Strand Synthesis System pro Ansatz:

1. Maximal 5 µg RNA (maximal 8 µl Volumen) mit 1 µl 10 mM dNTP Mix und 1 µl Oligo(dT) Primer zusammen pipettieren. Auf 10 µl mit RNase freiem H₂O auffüllen.
2. Ansatz 5 min bei 65°C inkubieren, dann für mindestens 1 min auf Eis stellen.
3. Prämix aus 2 µl 10 x RT-PCR Puffer, 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNase OUT™ (RNase Inhibitor) vorbereiten.
4. 9 µl des Prämixes zum Reaktionsansatz pipettieren, mischen und abzentrifugieren.
5. Inkubation des Ansatzes für 2 min bei 42°C.
6. 1 µl SuperScript™ II (Reverse Transkriptase) zum Ansatz geben und 50 min bei 42°C inkubieren lassen.
7. Reaktion für 15 min bei 70°C beenden, dann auf Eis stellen.
8. Ansatz abzentrifugieren, 1 µl RNase H zugeben und für 20 min bei 37°C inkubieren. Fertige cDNA auf Eis stellen oder bis zur Verwendung bei -20°C bzw. 4°C lagern.

Durchführung SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix pro Ansatz:

1. 560 ng jeder RNA (maximal 6 µl Volumen) mit 1 µl Oligo(dT) und 1 µl Annealing Buffer zusammen pipettieren. Gegebenfalls auf 8 µl mit RNase/DNase-freiem H₂O auffüllen.
2. Ansatz 5 min bei 65°C inkubieren, danach für mindestens 1 min auf Eis stellen.
3. 10 µl 2 x First-Strand Reaction Mix und 2 µl SuperScript™ III/RNase OUT™ Enzym Mix zum Ansatz pipettieren, kurz vortexen, dann abzentrifugieren.
4. Inkubation des Ansatzes für 50 min bei 50°C.
5. Reaktion für 5 min bei 85°C beenden, dann auf Eis stellen.

3.11.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von Mullis und Faloona (1987) eingeführte PCR ermöglicht es, einen DNA-Abschnitt, der ursprünglich in nur einer oder wenigen Kopien vorliegt, millionenfach zu amplifizieren. Der zyklische Temperaturwechsel von 90 - 95°C (Denaturierung), 45 - 65°C (Hybridisierung der Primer) und 72°C (DNA-Synthese durch die thermostabile Taq-Polymerase) ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung eines bekannten Sequenzabschnitts. Genomische DNA oder revers transkribierte cDNA wird als Ausgangsmaterial (Template) für die PCR eingesetzt.

Ein Standard-PCR-Ansatz hatte ein Volumen von 15 μl und folgende Zusammensetzung:

	Mengenangaben	Endkonzentrationen
PCR-Mix	7,7 μl H ₂ O dest.	
	1,5 μl 10 x PCR-Puffer ohne MgCl ₂	1 x Puffer
	1,5 μl Nukleotidgemisch	1,25 mM je dNTP
	0,45 μl MgCl ₂ [50 mM]	1,5 mM
	0,75 μl DMSO	5%
	0,75 μl F-Primer [10 pmol/ μl]	0,5 pmol/ μl
	0,75 μl R-Primer [10 pmol/ μl]	0,5 pmol/ μl
	0,1 μl Taq-DNA-Polymerase [5 U/ μl]	0,5 U in 15 μl
DNA	1,5 μl ([20 ng/ μl] bei genomischer DNA)	2,0 ng/ μl (bei genomischer DNA)
Endvolumen	15,0 μl	

Alle Komponenten des PCR-Mixes wurden gemäß der Anzahl der PCR-Reaktionen als Prämix zusammen pipettiert und gemischt. Jeweils 13,5 μl dieses Mixes wurden auf die Reaktionsgefäße verteilt, in die zuvor 1,5 μl DNA gegeben wurde.

Die Standard-PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Programm im Thermocycler:

	5 min	95°C	Initialer Denaturierungsschritt
35 Zyklen	30 sec	95°C	Denaturierung
	30 sec	60°C	Primer-Anlagerung
	30 sec	72°C	Primer-Verlängerung
	5 min	72°C	Finaler Verlängerungsschritt

Im Anhang I A sind die verwendeten Primer mit ihren ggf. vom Standardprotokoll einer PCR abweichenden Bedingungen aufgeführt.

3.11.7 Quantitative Real-Time PCR mittels TaqMan

Eine quantitative PCR ist, wie sie hier als Real-Time PCR mittels TaqMan durchgeführt wurde, eine hochsensible Methode zum Nachweis von Transkripten und deren Quantifizierung (Livak et al., 1995, Nolan et al., 2006). Nach jedem Zyklus innerhalb einer solchen PCR wird die Zahl der amplifizierten PCR-Produkte erfasst, womit die Amplifizierung in „Echtzeit“ verfolgt werden kann. Durch den Vergleich des Amplifizierungsverlaufs eines ubiquitär und gleichmäßig in einem Gewebe exprimierten Gens (Referenzgen) mit Amplifizierungsverläufen von unbekannt exprimierten Transkripten, kann auf die ursprünglich vorhandene Template Menge geschlossen werden. Die Wahl von geeigneten Referenzgenen ist dabei von entscheidender Bedeutung für die Quantifizierung (Bustin, 2002). Probenübergreifend lassen sich so u.a. Expressionsunterschiede eines Gens in verschiedenen Geweben nachweisen.

Die Quantifizierung wird über eine transkriptspezifische Hybridisierungs-Sonde (TaqMan-Sonde) ermöglicht. Jeder Assay ist dabei so entwickelt worden, dass keine genomischen DNA-Fragmente detektiert werden. Die TaqMan-Sonden hybridisieren auf Exon-Exon Grenzen und die flankie-

renden Primer damit zwangsläufig in verschiedenen Exons. Auf diese Weise werden nur Transkripte detektiert, keine genomische DNA. An ihrem 5' Ende ist die TaqMan-Sonde mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (meist FAM oder VIC) gekoppelt, an ihrem 3'-Ende trägt sie einen nicht fluoreszierenden Quencher (MGB = Minor Groove Binder). Dabei ist das Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Prinzip maßgeblich (Abb. 3.1). Jede Sonde kann spezifisch an eine cDNA-Sequenz bzw. ein Amplikon hybridisieren. Dies geschieht während der Annealing-Phase eines jeden Zyklus. Dabei hat die Sonde eine um etwa 10°C erhöhte Schmelztemperatur als die beiden Primer, so dass diese vor den Primern an den Zielstrang hybridisiert, was entscheidend für die Detektion eines Fluoreszenzsignals ist. Unmittelbar im Anschluss binden die transkriptspezifischen Primern der entsprechenden PCR-Reaktion. Der Reporter emittiert nach Anregung durch das TaqMan-Gerät Licht einer spezifischen Wellenlänge. Solange sich Reporter und Quencher in unmittelbarer Nähe zueinander befinden, wird die Licht-Emission des Reporters auf den nicht-fluoreszierenden Quencher übertragen, der diese Energie absorbiert. Im Zuge der Extensionsreaktion der PCR fährt die Taq-Polymerase über den Zielstrang und erreicht nach kürzester Zeit die hybridisierte Sonde, die sie durch ihre 5' - 3' Exonuklease-Eigenschaft zerstückelt (Hydrolyse der Sonde) (Bustin, 2000). Dadurch werden Reporter und Quencher, die durch die Nukleotide der Sonde aneinander gebunden waren, voneinander getrennt. Die durch den Reporter emittierte, spezifische Wellenlänge kann nun durch das TaqMan-Gerät detektiert werden. Die Intensität des detektierten Fluoreszenzsignals ist proportional zur Anzahl der vorhandenen DNA-Stränge und somit auch proportional zur Menge des Ausgangsmaterials. Für die Quantifizierung ist dabei der ct-Wert maßgeblich, der die detektierten Fluoreszenzsignale widerspiegelt. Der ct-Wert (cycle threshold = Zyklus-Schwellenwert) ist der Zeitpunkt bzw. Zyklus, in dem die Amplifikation des Zielfragments in die exponentielle Phase übergeht. Der ct-Wert wird über einen Schwellenwert automatisch ermittelt, der für alle Proben gleichermaßen gilt.

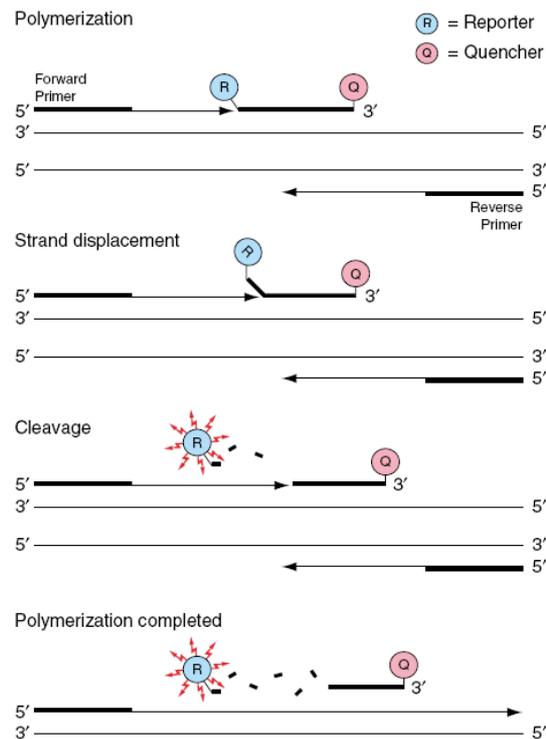


Abbildung 3.1: Schematische Übersicht über das FRET-Prinzip. Entnommen aus Applied Biosystems TaqMan Universal PCR Master Mix Protokoll.

Die PCR-Ansätze wurden nach folgendem Rezept zusammen pipettiert:

	Reagenz	Volumen pro Well
PCR-Mix	TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (2x)	10 µl
	20 x Assay Mix	1 µl
	cDNA verdünnt in H ₂ O	9 µl
Endvolumen		20 µl

In der Durchführung muss absolut exakt pipettiert werden. Kleinste Veränderungen oder Kontaminationen im Reaktionsansatz führen bei diesem hoch sensiblen Vorgang zu nicht reproduzierbaren, falschen Resultaten (Ding & Cantor, 2003).

Folgendes Standard-Amplifikationsprogramm wurde verwendet:

	Temperatur	Dauer	
initialer Schritt	95°C	10 min	Denaturierung
40 Zyklen	95°C	15 sec	Denaturierung
	60°C	1 min	Primer-Anlagerung & Extension

Die Oligo-Sequenzen finden sich in Anhang I A, soweit sie von ABI zur Verfügung standen. ABI-Custom Expressions Assays sind mit den entsprechenden cDNA-Sequenzen der ESTs bzw. Gene in Anhang II zu finden.

Für die zellkulturspezifische Quantifizierung von RNA wurden pro Reaktionsansatz 100 ng cDNA eingesetzt und jede cDNA eines Zellkultur-Reaktionswells als Triplikat quantifiziert.

Die Transkriptnachweise im Rahmen der Folgeuntersuchungen zur genomweiten Assoziationsstudie (GWA) wurden als Einzelbestimmungen durchgeführt. Dabei wurden jeweils 5 µl der

cDNAs aus den MTC-Panels verwendet, was etwa 5 ng entsprach. Um die Expressionen der Panel-cDNAs mit unseren eigenen cDNAs vergleichen zu können, wurden die eigenen cDNAs aus Kopfhaut, Haarschaft und Haut in einem gesonderten Lauf zunächst mit der endogenen Kontrolle Cyclophilin an die cDNAs der MTC-Panels angeglichen. Die eigenen cDNAs wurden in folgender Menge eingesetzt: Haarschaft cDNA 1000 ng, Haut cDNA 600 ng und Kopfhaut cDNA 1200 ng.

3.11.8 Herstellung fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte

Zur Ermittlung der Probanden-Genotypen hinsichtlich der Länge des Glycin-Repeats (GGN-short tandem repeat, GGN-Repeat) in Exon 1 des *AR*, musste eine Fragmentlängenanalyse durchgeführt werden. Dazu wurden entsprechende PCR-Produkte mit einem fluoreszenzmarkierten Primer (siehe Anhang I A) synthetisiert und anschließend hinsichtlich ihrer Fragmentlänge auf dem automatischen Sequenzierer (ABI 377) analysiert.

Der PCR-Mix für den GGN-Repeat wurde mit dem MasterAmp-Puffer G von Biozym und der AmpliTaq-DNA-Polymerase von ABI hergestellt.

Der Reaktionsmix für diese PCR-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

	Mengenangaben pro Reaktion
PCR-Mix	7,88 µl H ₂ O dest. 12,5 µl 2x PCR Prämix Master Amp Puffer G 1,25 µl F-Primer [10 pmol/µl] 1,25 µl R-Primer [10 pmol/µl] 0,12 µl AmpliTaq-DNA-Polymerase [5 U/µl]
DNA	2,0 µl [20 ng/µl]
Endvolumen	25,0 µl

Abweichungen von dem unter 3.11.6 angegebenen Standard-PCR-Protokoll sind im Anhang I A vermerkt.

3.11.9 Enzymatische Spaltung von PCR-Produkten durch Restriktions-Endonukleasen

Zur Spaltung von PCR-Produkten und Plasmiden wurden Restriktions-Endonukleasen der Firmen MBI-Fermentas verwendet. Dazu wurde die DNA im vom Hersteller angegebenen, enzymespezifischen Puffer für 3 - 14 h mit der gewählten Restriktions-Endonuklease bei einer für das Enzym optimalen Temperatur verdaut. Abhängig von der Dauer des Verdaus und den vom Hersteller empfohlenen Angaben, wurden zwischen 0,2 - 1,5 U Enzym pro µg DNA verwendet. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Vollständigkeit des Verdaus auf einem Agarosegel nach Gelelektrophorese mit einem DNA-Längenstandard überprüft.

Zur Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme wurde das Computer-Programmpaket Restriktionsmapper verwendet. Nach Eingabe der Zielsequenz konnte ein simulierter Restriktionsverdau mit einer großen Anzahl bekannter Restriktions-Endonukleasen durchgeführt werden.

3.11.10 Agarosegelelektrophorese

Die Qualität und Ausbeute einer PCR-Reaktion wurde in der Regel auf einem 1,5% Agarosegel überprüft.

Agarose bildet nach dem Erstarren ein Netzwerk, in dem die verschieden großen, durch die Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Fragmente aufgrund des Molekularsiebeffektes unterschiedlich schnell zur Anode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA im elektrischen Feld ist abhängig von der angelegten Spannung, der Größe der DNA-Fragmente und der Agarosekonzentration. Das hier verwendete 1,5% Agarosegel eignet sich gut zum Auftrennen 200 - 500 bp großer DNA-Fragmente. In der Gelmatrix befindliches Ethidiumbromid interkaliert in die DNA-Doppelhelix und fluoresziert bei UV-Bestrahlung. Nach der Elektrophorese wurde das Gel daher mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm in der Gel-Dokumentations-Einheit durchleuchtet, so dass die DNA-Fragmente als orange leuchtende Banden sichtbar wurden. Durch Vergleich der Banden mit dem Längenstandard konnte beurteilt werden, ob das DNA-Fragment die erwartete Größe hatte.

Für ein 1,5% Agarosegel wurden 1,2 g Agarose in 80 ml 1 x TBE gegeben, bis zur vollständigen Lösung aufgekocht, auf 50°C abgekühlt und 6 µl 1% Ethidiumbromid zugesetzt. Die Gellösung wurde in einen Gelträger gegossen, in den zuvor Kämme eingesetzt wurden. Das Gel wurde bis zum Erstarren horizontal gelagert. Nach Entfernen der Kämme wurde das Gel in eine mit 1 x TBE gefüllte Gelelektrophoresekammer (Bio-Rad) gelegt. 5 µl der PCR-Produkte wurden mit der gleichen Menge Proben-Blaupuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. In eine weitere Tasche wurden 10 µl einer 100 bp DNA-Leiter bzw. 1 kb DNA-Leiter als Längenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V. Die Verwendung von höher oder niedriger konzentrierten Gelen ergibt sich entsprechend der hier dargelegten Vorgehensweise unter Verwendung von mehr oder weniger Agarose

3.11.11 Nicht radioaktive Fragmentlängenanalyse von PCR-Produkten am automatischen Sequenzierer mittels Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese

Für die Fragmentlängenanalyse wurden fluoreszenzmarkierte PCR-Produkte über denaturierende, d.h. Harnstoff (Urea) enthaltende Gele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Glasplatten für die Elektrophorese wurden zunächst mit einem Detergenz (Extran) behandelt, mit H₂O dest. gespült

und mit Isopropanol gereinigt. Danach wurden die Abstandhalter (0,2 mm) aufgelegt und die Glasplatten in eine dafür vorgesehene Apparatur eingespannt.

Die Herstellung des PAA-Gels erfolgte, indem zunächst eine 40% Acrylamid-Lösung (29:1) mit H₂O dest. hergestellt und durch einen 0,2 µm Filter abfiltriert wurde. Diese Lösung konnte bei 4°C aufbewahrt werden. Zur Herstellung wurden 18 g Urea in 24 ml H₂O dest. gelöst und anschließend mit 5,6 ml der 40% Acrylamid-Lösung gemischt. Diese Lösung wurde danach durch einen 0,2 µm Filter filtriert und mittels einer Pumpe entgast. Daraufhin wurde die Lösung in ein Becherglas überführt, mit 6 ml 10 x TBE-Puffer, 250 µl 10% APS sowie 35 µl TEMED versetzt und anschließend sofort zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Bei der nun folgenden Reaktion wird das Monomer Acrylamid mittels einer radikalischen Kettenreaktion mit dem Quervernetzungsreagenz N,N'-Methylenbisacrylamid co-polymerisiert. Das Polyacrylamid ist chemisch inert, die Porengröße hängt von der anteiligen Zusammensetzung der Komponenten Acrylamid und Bisacrylamid ab. Nach Einsetzen der Kämme polymerisierte das Gel binnen einer Stunde in horizontaler Lage.

Für die Elektrophorese wurde das Gel vertikal in den ABI 377 eingespannt und eine obere und untere Pufferkammer mit 1 x TBE gefüllt. Die optimale Lauftemperatur betrug 51°C, so dass das Gel zunächst vorgeheizt werden musste. In einem Kontrolllauf (Pre-Run) maß der Laser, ob sich Verunreinigungen auf der Glasplatte befanden. Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgetragen. Dazu wurden 2,5 µl jedes PCR-Produktes mit 2 µl einer Lösung – bestehend aus einem internen DNA-Längenstandard (GS-500 Rox) und einem farbigen Ladebuffer – bei 95°C für 2 min denaturiert. Anschließend wurden jeweils 2,5 µl in die Geltaschen pipettiert. Die Laufzeit hing von der Fragmentgröße ab und betrug etwa 3 Stunden bei 2.400 V.

Der mit den PCR-Produkten aufgetragene interne Längenstandard (GS-500 Rox) ist fluoreszenzmarkiert, kann jedoch von anders markierten Proben unterschieden werden. Die bekannten Fragmentlängen des Standards dienten der Erzeugung einer Kalibrierungskurve. Mit Hilfe dieser Kurve konnten die Längen unbekannter PCR-Produkte extrapoliert werden. Als Referenz wurde eine DNA aus dem ANA-Kollektiv (ANA-001-03) parallel analysiert, deren Fragmentlänge durch Sequenzierung bekannt war. Anhand des internen Längenstandards und der Referenz-DNA fand eine automatische Bestimmung der Genotypen durch die Softwareprogramme Genescan Analysis Version 3.1.2 und Genotyper Version 2.5 (ABI) statt.

3.11.12 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Zur Überprüfung einer ordnungsgemäßen Amplifizierung und Ligation wurden die klonierten Fragmente der pSG5-AR-Plasmide vor der Transfektion sequenziert. Des Weiteren wurde der

genomische, kodierende Bereich zweier ESTs sequenziert ebenso wie Kontrollsequenzierungen zweifelhafter Sequenomergebnisse durchgeführt wurden.

Die Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977) auf dem automatischen Kapillar-Sequenziergerät 3130xl Genetic Analyser (ABI) durchgeführt.

Nach erfolgter konventioneller PCR (siehe 3.11.6) wird zunächst das Amplikon mit dem AMPure-Kit aufgereinigt (siehe 3.11.3). Das aufgereinigte PCR-Produkt wird in einer Cycle-Sequenzier-Reaktion (Kettenabbruchmethode) als Template eingesetzt. Bei der Plasmidsequenzierung ist eine PCR nicht notwendig, ebenso entfällt die Aufreinigung. Durch zyklisches Erhitzen und Abkühlen wird bei der Kettenabbruchmethode das doppelsträngige DNA-Template denaturiert, gefolgt von der Anlagerung des Sequenzier-Primers (siehe Anhang I A) und der anschließenden Verlängerung durch die Taq-DNA-Polymerase bis zum Einbau eines Dideoxynukleosidtriphosphats (ddNTPs). Ein ddNTP führt zum Abbruch der Synthese, da keine 3'-OH-Gruppe vorhanden ist, die für die Kondensation mit dem Phosphat des nächsten Deoxynukleosidtriphosphats (dNTPs) nötig ist. Neben den dNTPs sind alle vier ddNTPs, jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern versehen, in jedem Reaktionsansatz enthalten. Nach der Cycle-Sequenzier-Reaktion liegen alle möglichen Abbruchprodukte vor, die jeweils das fluoreszenzmarkierte ddNTP endständig tragen, das der Base des zu sequenzierenden PCR-Produktes komplementär ist. Vor der Analyse im Sequenziergerät, werden die Proben noch mit dem CleanSEQ-Kit aufgereinigt (siehe 3.11.3). Für die Analyse sind 10 µl Probenflüssigkeit ausreichend. Im Sequenziergerät werden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt und beim Durchlaufen einer Laser-schranke detektiert. Durch die unterschiedlichen Fluoreszenzen und die genaue Auftrennung kann jeder Position eine Base zugeordnet werden.

Der Reaktionsmix für die Cycle-Sequenzier-Reaktion setzte sich wie folgt zusammen:

	Mengenangaben pro Reaktion
Cycle-Sequencing-Mix	12,75 µl H ₂ O dest. 3,75 µl 5 x Big Dye Terminator 3.1 Sequencing Buffer 0,5 µl Ready Reaction Mix 3.1 1,0 µl Primer F oder R [3,2 pmol/µl]
Template	2,0 µl [>10 ng PCR Template oder 300 ng Plasmid]
Endvolumen	20,0 µl

Das Protokoll der Cycle-Sequenzier Reaktion:

	1 min	96°C	initialer Denaturierungsschritt
25 Zyklen	10 sec	96°C	Denaturierung
	5 sec	50°C	Primer-Anlagerung
	4 min	60°C	Primer-Verlängerung

Die Sequenziererergebnisse wurden mit der Software Chromas und SeqMan II ausgewertet.

3.11.13 Genotypisierung mittels Bead Array-Technologie

Für die GWA wurde die chipbasierte Illumina Bead Array Genotypisierungsplattform verwendet (siehe 2.3.3). Dazu wurden die Infinium II Whole-Genome Genotyping Kits für HumanHap300v1-1 und HumanHap550v3 verwendet, bei denen pro Chip das Genom einer Person analysiert werden kann (Single Sample Chip). Auf dem HumanHap300-DUOv2 Chip, der ebenfalls verwendet wurde, können zwei Personen simultan analysiert werden.

Mit dem HumanHap300v1-1 werden genomweit 317.503 SNPs analysiert. Er weist in Bereichen von 10 kb um ein Gen, im Major Histocompatibility Complex (Komplex von Histokompatibilitätsgenen) sowie in konservierten Regionen eine erhöhte SNP-Dichte auf und analysiert zusätzlich noch 7.300 nicht-synonyme SNPs, also SNPs, die einen Aminosäureaustausch bewirken. Der durchschnittliche Abstand der SNPs zueinander beträgt 9,27 kb.

Der HumanHap300-DUOv2 (318.237 SNPs) unterscheidet sich von der SNP-Zusammensetzung des HumanHap300v1-1 dahingehend, dass er rund 700 zusätzliche SNPs analysiert, insgesamt aber nur 6.663 nicht-synonyme SNPs. Der durchschnittliche Abstand der SNPs zueinander beträgt 9,25 kb.

Der HumanHap550v3 analysiert 561.466 SNPs, darunter alle des HumanHap300-Chips. Der durchschnittliche Abstand der SNPs zueinander beträgt 5,3 kb. Die SNP-Dichte ist damit deutlich erhöht. Unter den SNPs sind 7.107 nicht-synonyme SNPs und 163 mitochondriale SNPs. Zusätzlich werden rund 4.200 SNPs aus bekannten CNV-Regionen typisiert. Ebenso finden sich erstmals Y-chromosomale (10) und pseudoautosomale (15) SNPs auf einem Chip.

Durchführung:

Der Illumina Bead Array wird am Beispiel der Single Sample Chips beschrieben. Das Protokoll für die DUO-Chips unterscheidet sich nur unwesentlich von der hier aufgeführten Durchführung. Alle benötigten Reagenzien werden vor Verwendung durchgemischt und bei 1.300 rpm abzentrifugiert. Parallel wird ein Tracking-Worksheet zur Protokollierung jedes Arbeitsschritts ausgefüllt.

Zu Beginn der Durchführung wird eine whole-genome-Amplifizierung angesetzt.

1. Pro Ansatz 15 µl 0,1 M NaOH in eine mit Barcode versehene 0,8 ml Microtiter (MIDI)-Platte pipettieren. Dazu Samplezahl-abhängig nur in die Spalten 1, 5 und 9 pipettieren (max. 24 Samples pro Platte).
2. 15 µl einer 50 ng/µl Verdünnung DNA (=750 ng) zwecks Denaturierung zur NaOH-Lösung pipettieren und 10 min bei RT inkubieren lassen.
3. 270 µl WG#-MP1 (Neutralisierungslösung) pro Ansatz pipettieren.
4. 300 µl WG#-AMM (Amplifikations-Mix) pro Ansatz pipettieren.
5. MIDI-Platte mit Gummimatte versiegeln, mindestens 10 x zum Mischen invertieren und bei 1.300 rpm abzentrifugieren.
6. Platte im Illumina Hyb Oven für 20 - 24h bei 37°C inkubieren lassen.

Im zweiten Schritt wird die amplifizierte DNA enzymatische fragmentiert und aufreinigt.

7. Platte für 1 min bei 600 rpm abzentrifugieren. Gummimatte vorsichtig entfernen.
8. Jeden Reaktionsansatz einer Plattenspalte auf die drei folgenden Spalten der MIDI-Platte verteilen (je 150 µl).
9. 50 µl WG#-FRG (Fragmentationsreagenz) pro Reaktionswell pipettieren und Platte mit Gummimatte versiegeln.
10. Platte für 1 min bei 1.600 rpm vortexen, dann bei 600 rpm abzentrifugieren.
11. Platte für 1 h bei 37°C im Heizblock inkubieren, danach bei 600 rpm abzentrifugieren und Gummimatte vorsichtig entfernen.
12. 100 µl WG#-PA1 pro Reaktionswell pipettieren und Platte erneut mit Gummimatte verschließen.
13. Platte 1 min bei 1.600 rpm vortexen, dann 1 min bei 600 rpm abzentrifugieren.
14. Platte 5 min bei 37°C auf Heizblock inkubieren, anschließend 1 min bei 600 rpm abzentrifugieren und Gummimatte vorsichtig entfernen.
15. 300 µl 100% Isopropanol pro Reaktionswell pipettieren. Erneut mit Gummimatte versiegeln und zum Mischen mindestens 10 x invertieren.
16. Platte 30 min bei 4°C im Kühlschrank inkubieren.
17. Platte 40 min bei 4.000 rpm und 4°C zentrifugieren.
18. Gummimatte im Anschluss sofort entfernen und Überstand des blauen Pellets durch Invertieren verwerfen.
19. Invertierte Platte auf absorbierenden Papiertüchern für etwa 1 min ausschlagen, dann fest auf die Papiertücher aufdrücken um Flüssigkeitsreste weitestgehend zu entfernen.
20. Pellets in invertierter Platte 1 h bei RT trocknen lassen.
21. 45 µl WG#-RA1 pro Reaktionswell pipettieren
22. Platte mit Alumatte abdecken und mit Heat-Sealer versiegeln, dann 1 h bei 48°C im Illumina Hyb Oven inkubieren.
23. Versiegelte Platte 1 min bei 1.800 rpm vortexen, dann bei 1.300 rpm abzentrifugieren.

Hier beginnt die Vorbereitung der Chips für die Hybridisierung. Dazu müssen zuvor die „Glass Back Plates“ (Abdeck-Glasplatten) mit 70% EtOH gesäubert und anschließend getrocknet werden. Zusätzlich werden zwei Inkubationsbäder vorbereitet. Eines mit 200 ml 100% EtOH, das andere mit 200 ml WG#-PB1. Das Chamber Rack muss auf 22°C vorgekühlt werden. Der Heizblock wird auf 95°C und der Illumina Hyb Oven auf 48°C vorgeheizt.

24. Rote Gummimatten in die Hybridisierungskammern legen. Eine Hybridisierungskammer kann maximal 4 Chips aufnehmen.
25. 200 µl WG#-PB2 pro Feuchtigkeitsreservoir (8 Stück) einer Hybridisierungskammer pipettieren. Hybridisierungskammer verschließen und bei RT aufbewahren.
26. Den Chiphalter in das EtOH gefüllte Inkubationsbad stellen.
27. BeadChips nacheinander vollständig entpacken und in den Chiphalter stecken (in EtOH).
28. BeadChips im EtOH durch 10 x Heben und Senken des Chiphalters waschen. Waschschrift 2 x in 5 minütigen Abständen wiederholen.
29. Chiphalter mit BeadChips in WG#PB1 Inkubationsbad überführen.
30. BeadChips im WG#PB1 durch 10 x Heben und Senken des Chiphalters waschen. Waschschrift 2 x in 2,5 minütigen Abständen wiederholen.

Nun kann mit der Denaturierung der Samples (MIDI-Platte) für 20 min bei 95°C auf dem Heizblock begonnen werden. Zwischenzeitlich können die Durchflußkammern zusammengesetzt werden:

31. Zum Trocknen der Chips den Chiphalter mit BeadChips für 1 min bei 1.300 rpm abzentrifugieren.
32. Die Träger der Durchflußkammern in das „Single-Sample Alignment Fixture“ setzen und pro Träger einen der BeadChips einlegen.

33. Einen Spacer auf jeden BeadChip legen und den Alignment Bar anbringen.
34. Abdeck-Glasplatte mit der Einsparung Richtung Barcode (innenliegend) auflegen und bis zum Alignment Bar schieben.
35. Fertige Durchflußkammern mittels zweier Metallklemmen fixieren.
36. Alignment Bar entfernen und überstehende Enden der Spacer mit einer Schere abschneiden.
37. Durchflußkammern in die Hybridisierungskammern setzen und unter den Abzug bringen.

Nach Beendigung des Denaturierungsschritts die MIDI-Platte aus dem Heizblock nehmen und bei 1.300 rpm abzentrifugieren. Die Versiegelung durch die Alumatte vorsichtig entfernen. Die unter 8. separierten Ansätze wieder in einem Well vereinigen. Platte nochmals bei 1.300 rpm abzentrifugieren und unter den Abzug bringen. Nun werden die Chips für den Hybridisierungsschritt beladen.

38. Durchflußkammern ins Chamber Rack einsetzen.
39. 150 µl 100% Formamid in die innenliegende Einsparung der Abdeckglasplatte (Reservoir) pipettieren.
40. 150 µl WG#RA1 ins Reservoir pipettieren und 1 x wiederholen.
41. 160 µl eines DNA-Samples pro Chip pipettieren. Zuordnung DNA-Sample zu Chip (Barcode) genau festhalten. 1 min warten, bis keine DNA-Lösung mehr im Reservoir ist.
42. Durchflußkammern aus dem Chamber Rack entnehmen, ausgelaufenes WG#RA1 auf Papiertuch abtupfen und Durchflußkammern in Hybridisierungskammer legen. Deckel aufsetzen und mit Schnappverschluss schließen.
43. Hybridisierungskammer im Illumina Hybridisierungssofen für 16 h bei 48°C unter Schwenkmodus Stufe 5 hybridisieren lassen.

Für den nächsten Tag muss das WG#-XC4 Reagenz durch Zugabe von 330 ml 100% EtOH angesetzt werden. Nach EtOH-Zugabe die Flasche für 15 sec intensiv schütteln und 1 h über Kopf stellen. Flasche anschließend nochmals intensiv schütteln und in aufrechter Position ü.N. bei RT inkubieren lassen. Am nächsten Morgen letztmals intensiv schütteln. Im Folgenden finden die Einzelbasenextension und die Färbung der markierten Nukleotide statt.

44. 95% Formamid/1 mM EDTA frisch ansetzen.
45. Chamber Rack auf 44°C vorheizen, Temperatur auf verschiedenen Positionen überprüfen und vorhandene Luftblasen durch aufrechtes Drehen gegen den Uhrzeigersinn verdrängen.
46. Benötigte Reagenzien für 5 min bei 4.000 rpm abzentrifugieren.
47. Hybridisierungskammer aus dem Hybridisierungssofen nehmen und Durchflußkammern nacheinander ins Chamber Rack einsetzen.
48. 150 µl WG#-RA1 pro Reservoir pipettieren und für 30 sec inkubieren lassen. 5 x wiederholen.
49. 450 µl WG#-XC1 pro Reservoir pipettieren und für 10 min inkubieren lassen.
50. 450 µl WG#-XC2 pro Reservoir pipettieren und für 10 min inkubieren lassen.
51. 200 µl WG#-TEM (Two Colour Extensionsmix) pro Reservoir pipettieren und für 15 min inkubieren lassen.
52. 450 µl 95% Formamid/EDTA pro Reservoir pipettieren und für 1 min inkubieren lassen. 1 x wiederholen, dann 5 min inkubieren lassen.
53. Chamber Rack auf 32°C (bzw. auf die auf dem LTM-Röhrchen vermerkte Temperatur) herunterkühlen. Derweil 450 µl WG#-XC3 pro Reservoir pipettieren und 1 x wiederholen. Anschließend warten, bis Chamber Rack 32°C erreicht hat.
54. 250 µl WG#-LTM (Labeling Two Colour Mastermix) pro Reservoir pipettieren und 10 min inkubieren lassen.
55. 450 µl WG#-XC3 pro Reservoir pipettieren und 1 min inkubieren lassen. 1 x wiederholen, dann 5 min warten.

56. 250 µl WG#-ATM (Anti-Stain Two Colour Mastermix) pro Reservoir pipettieren und 10 min inkubieren lassen.
57. 450 µl WG#-XC3 pro Reservoir pipettieren und 1 min inkubieren lassen. 1 x wiederholen, dann 5 min warten.
58. 250 µl WG#-LTM pro Reservoir pipettieren und 10 min inkubieren lassen.
59. 450 µl WG#-XC3 pro Reservoir pipettieren und 1 min inkubieren lassen. 1 x wiederholen, dann 5 min warten.
60. 250 µl WG#-ATM pro Reservoir pipettieren und 10 min inkubieren lassen.
61. 450 µl WG#-XC3 pro Reservoir pipettieren und 1 min inkubieren lassen. 1 x wiederholen, dann 5 min warten.
62. 250 µl WG#-LTM pro Reservoir pipettieren und 10 min inkubieren lassen.
63. 450 µl WG#-XC3 pro Reservoir pipettieren und 1 min inkubieren lassen. 1 x wiederholen, dann 5 min warten.

Abschließend erfolgt die Vorbereitung der Chips für den Scan.

64. Durchflußkammern aus dem Chamber Rack nehmen und horizontal auf die Laborbank legen.
65. 310 ml WG#-PB1 zum Waschen der Chips in das Waschbad mit Chiphalter geben.
66. Flow Through Chamber mit Spezialspatel nach und nach vorsichtig auseinanderbauen. Dabei Chips nur an der Außenkante berühren und sofort in den Chiphalter in WG#-PB1 einsetzen.
67. Chiphalter mit Chips 10 x Heben und Senken, dabei Wasseroberfläche durchbrechen. Anschließend 5 min in WG#-PB1 inkubieren lassen.
68. Chiphalter in das Waschbad mit WG#-XC4 überführen und Chips durch 10 x Heben und Senken waschen, dabei Wasseroberfläche durchbrechen. Anschließend 5 min inkubieren lassen.
69. In einer fließenden, durchgehenden Bewegung den gesamten Chiphalter mit Chips aus dem WG#-XC4 heben, so dass der Chiphalter mit den Chips in horizontaler Position mit der Hybridisierungsseite nach oben auf der Laborbank abgesetzt werden kann.
70. BeadChips nacheinander aus dem Chiphalter entnehmen und auf einem Tube-Rack für 50 - 55 min unter Vakuum (-1 Bar) trockenen lassen.
71. Unterseite der Chips mit 70% EtOH getränkten Papiertüchern abwaschen.
72. Scan der BeadChips mittels BeadArray Reader und BeadScan Software.

Insgesamt wurden 296 AGA-Betroffene mit Illumina-BeadChips genotypisiert. Dabei wurden 121 Personen mit dem HumanHap300v1-1 Chip typisiert, 29 mit dem HumanHap300-DUOv2 und 146 mit dem HumanHap550v3. Alle Universalkontrollen (383 Probanden) wurden mit dem HumanHap550v3 analysiert.

3.11.14 Genotypisierung mittels MassExtend-Reaktion

Der Sequenom iPLEX Gold Assay unter Nutzung der MassExtend-Reaktion und MALDI-ToF-Technologie (siehe 2.3.3) wurde genutzt, um die Ergebnisse der GWA zu validieren. Dazu wurden die ausgewählten SNPs mit dem SNPper-Tool der CHIP Bioinformatics-Webseite mit ihren flankierenden Sequenzen exportiert. Diese Datei wurde im nächsten Schritt mit dem Tool PreXTEND der Sequenom RealSNP-Internetseite zwecks SNP Validierung und Amplikon Pre-Design weiter prozessiert. Die RealSNP-Exportdatei wurde danach in die Assay Design 3.1 Soft-

ware geladen, mit der alle benötigten Oligonukleotide (F-/R-Primer und Extensionsprimer) ermittelt werden. Für das Assay Design wurden die „SBE Mass Extend“ Standardeinstellungen für iPLEX mit einem Multiplexlevel von 36 gewählt. Die Oligonukleotide wurden abschließend zur Synthese in Auftrag gegeben (siehe Anhang I B).

In Vorbereitung auf die Sequenom-Experimente mussten 384-Well Platten mit DNAs aus dem Replikationskollektiv zusammengestellt werden. Dazu wurden die AGA-Nicht-Betroffenen ($n = 240$), die AGA-Betroffenen ($n = 327$) sowie die Eltern und Geschwister der Betroffenen ($n = 823$, davon 226 Trios und 127 Familien mit mehr als einem Betroffenen) heraus gesucht. Die Eltern und Geschwister der zuvor genomweit untersuchten Betroffenen waren dabei enthalten. Zusätzlich wurden die Haarspenderkontrollen ($n = 121$) analysiert.

Über das ABgene System wurden Experimentier-Racks mit den entsprechenden 20 ng/ μ l Verdünnungen angelegt. Aus diesen wurden 96-Well Verdünnungsplatten mit einer DNA-Konzentration von 2,5 ng/ μ l mittels Pipettierroboter angelegt. Aus diesen Verdünnungsplatten wurden 4 μ l (= 10 ng) pro Well einer 384-Well Platte mittels Pipettierroboter überführt. Die DNA-Platten wurden anschließend abzentrifugiert und ü.N. bei RT eingetrocknet. Neben den Analyse-DNAs wurden pro 384-Well Platte auch Positiv-, Negativ- und Replikationskontrollen aufgetragen.

In der Vorbereitung auf die Plexe wurden Verdünnungen der PCR-Primer und Extensionsprimer in ausreichender Menge angelegt: Für den PCR-Primer-Mix wurden F- und R-Primer mit einer Endkonzentration von jeweils 500 nM zusammen gegeben. Die Extensionsprimer wurden massenabhängig in vier Gruppen unterteilt und in gruppenabhängigen Konzentrationen (7 μ M; 9,3 μ M; 11,6 μ M und 14 μ M) dem SBE-Mastermix zugefügt. Dabei gilt: Je kleiner die Masse, desto geringer die benötigte Konzentration. Die Gruppierung der Extensionsprimer erfolgte durch das Primer Adjustment Tool der Typer 3.4 Software und findet sich in Anhang I B wieder.

Durchführung:

Der Sequenom Chip Assay wird am Beispiel einer 384-Platte beschrieben. Alle benötigten Reagenzien werden vor Verwendung durchmischt und abzentrifugiert.

Herstellung des PCR-Mix:

	Mengenangaben pro Reaktionsansatz	Mengenangabe pro Platte (x 480)
PCR-Mix	2,7 μ l H ₂ O dest. 0,625 μ l 10 x Puffer Qiagen [15 mM MgCl ₂] 0,25 μ l dNTPs Nextec [je 10 mM] 0,325 μ l MgCl ₂ [25 mM] 1,0 μ l PCR-Primer-Mix [je 500 nM] 0,1 μ l Hotstar Taq-DNA-Polymerase [5 U/ μ l]	1296 μ l H ₂ O dest. 300 μ l 10 x Puffer Qiagen [15 mM MgCl ₂] 120 μ l dNTPs Nextec [je 10 mM] 156 μ l MgCl ₂ [25 mM] 480 μ l PCR-Primer-Mix [je 500 nM] 48 μ l Hotstar Taq-DNA-Polymerase [5 U/ μ l]
DNA	10 ng (eingetrocknet)	
Endvolumen	5,0 μ l	2400 μ l

Für die Verteilung des PCR-Mix auf die 384-Well Platte wurde der Pipettierroboter verwendet. Dazu wurden manuell 25 µl des PCR-Mix pro Well einer 96-Well Platte pipettiert. Der Roboter entnahm 4 x 5 µl pro Well, um sie auf die 384-Well Platte zu pipettieren.

Das Standard-PCR-Protokoll für die PCR war:

	15 min	95°C	initialer Denaturierungsschritt
45 Zyklen	20 sec	95°C	Denaturierung
	30 sec	56°C	Primer-Anlagerung
	1 min	72°C	Primer-Verlängerung
	3 min	72°C	finaler Verlängerungsschritt

Im Anschluss an die PCR wurde eine Positivkontrolle zur Überprüfung auf ein Kontrollgel aufgetragen. Zeigte sich die erwartete Bande, wurde der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)-Mix angesetzt. Durch den SAP-Verdau werden noch freie dNTPs dephosphoryliert und damit neutralisiert, so dass sie in der SBE-Reaktion nicht mehr zur Verfügung stehen.

	Mengenangaben pro Reaktionsansatz	Mengenangabe pro Platte (x 480)
SAP-Mix	1,53 µl H ₂ O dest.	734,4 µl H ₂ O dest.
	0,3 µl SAP	144 µl SAP
	0,17 µl 10 x SAP-Puffer	81,6 µl 10 x SAP-Puffer
Endvolumen	2,0 µl	960 µl

Für die Verteilung des SAP-Mix auf die 384-Well Platte wurde der Pipettierroboter verwendet. Dazu wurden manuell 10 µl des SAP-Mix pro Well einer 96-Well Platte pipettiert. Der Roboter entnahm 4 x 2 µl pro Well, um sie auf die 384-Well Platte zu pipettieren.

Das Standard-SAP-Protokoll war:

40 min	37°C	SAP-Verdau
5 min	85°C	SAP-Inaktivierung

Nun folgte die SBE-Reaktion, in der sequenzspezifisch eine Base an die Extensionsprimer angefügt wird. Die massenabhängige Anpassung der Extensionsprimer in dieser Reaktion sorgt für ein ausreichend gutes Signal-to-Noise Ratio (Signal-Hintergrund Verhältnis), da mit zunehmender Masse eines Extensionsprimers das entsprechende Signal schwächer wird.

Der SBE-Reaktionsmix setzt sich wie folgt zusammen:

	Mengenangaben pro Reaktionsansatz	Mengenangabe pro Platte (x 490)
PCR-Mix	0,619 µl H ₂ O dest.	303,31 µl H ₂ O dest.
	0,2 µl 10 x iPLEX Gold Puffer	98 µl 10 x iPLEX Gold Puffer
	0,2 µl Termination Mix	98 µl Termination Mix
	0,94 µl SBE-Mastermix	460,6 µl SBE-Mastermix
	0,041 µl iPLEX Gold Enzym (Sequenase)	20,09 µl iPLEX Gold Enzym (Sequenase)
Endvolumen	2,0 µl	980 µl

Für die Verteilung des SBE-Reaktionsmix auf die 384-Well Platte wurde der Pipettierroboter verwendet. Dazu wurden manuell 10 µl des SBE-Reaktionsmix pro Well einer 96-Well Platte pipettiert. Der Roboter entnahm 4 x 2 µl pro Well, um sie auf die 384-Well Platte zu pipettieren. Das Standard-SBE-Reaktions-Protokoll war:

		30 sec	94°C	initialer Denaturierungsschritt
45 Zyklen	1 x	5 sec	94°C	Denaturierung
	5 Zyklen	5 sec	52°C	Primer-Anlagerung
		5 sec	80°C	Primer-Verlängerung
		3 min	72°C	finaler Verlängerungsschritt

Bevor das SBE-Reaktions-Produkt auf einen Sequenom-SpectroCHIP gespottet werden konnte, musste eine Resinaufreinigung des Produkts stattfinden. Das Resin bewirkt eine Entsalzung des Produkts für bessere Analyse-Bedingungen. Dazu wurde eine Spezialplatte mit Einbuchtungen für 384 x 6 mg Resin ausgestrichen und getrocknet. Anschließend wurden pro Well der 384-Well PCR-Platte 16 µl H₂O pipettiert. Die Platte wurde anschließend invertiert und auf die Resin-Spezialplatte gesetzt. Die aufeinander liegenden Platten wurden umgedreht und das Resin aus der Spezialplatte in die 384-Well PCR-Platte mit den SBE-Reaktions-Produkten geklopft. Diese Platte wurde in ein Plattenmischgerät eingespannt, wo sie 5 min lang kontinuierlich invertiert wurde. Abschließend wurde die Platte 6 min bei 4.000 rpm zentrifugiert, bevor die SBE-Reaktions-Produkte mit dem Nanodispenser unter Verwendung der SpectroPoint Software auf den Sequenom-SpectroCHIP gespottet wurden. Der gespottete Chip wurde hiernach im Sequenom Analyser mit der MassARRAY RT-Workstation 3.3 Software über MALDI ToF analysiert.

3.12 Zellbiologische Methoden

3.12.1 Klonierungsarbeiten in *E. coli*

Herstellung und Aufbewahrung chemisch kompetenter Bakterien

Von einer frisch auf einer LB-Agarplatte ausgestrichenen DH5α *E. coli*-Stammkultur, die ü.N. kultiviert wurde, wurden ca. 10 Kolonien in 250 ml SOB-Medium übergeimpft. Die Kultur wurde bei 18°C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 bei 230 rpm im Thermomixer inkubiert, anschließend 10 min auf Eis gestellt und danach 10 min bei 1.500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in TB-Puffer (80ml) resuspendiert, erneut auf Eis für 10 min inkubiert und danach zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 20 ml TB-Puffer resuspendiert, unter leichtem Schwenken mit DMSO (Endkonzentration: 7%) versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und daraufhin in Aliquots von 50 bzw. 200 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -70°C.

Ligation von PCR-Produkten mittels Topoisomerase

Zur Klonierung von PCR-Produkten in Plasmide wurde das TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen benutzt. Das System macht sich die terminale Transferaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase, mit der die PCR-Produkte synthetisiert werden, zunutze, welche zu 3'-Adeninüberhängen führt. Der Vektor wird vom Hersteller in linearisierter Form geliefert. Er besitzt 3'-Thyminüberhänge, die mit den Adeninüberhängen der PCR-Produkte während der Ligation hybridisieren. Eine Topoisomerase mit Ligase-Aktivität stellt die kovalente Bindung zwischen PCR-Produkt und Vektor her.

Für die Ligation wurden zunächst PCRs zur Amplifizierung eines Abschnitts von Exon 1 des *AR* mit 10, 23, 24 und 27 GGN-Repeats (*AR*-GGC Clon F/R, siehe Anhang I A) durchgeführt. Die Templates zu diesen PCRs lieferten die in der Fragmentlängenanalyse typisierten Blut- und Haarspenderkontrollen mit den entsprechenden Repeatlängen. In der Ligation wurden 1 - 4 µl PCR-Produkt, 1 µl Salt Solution und 1 µl TOPO Vektor in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit H₂O dest. auf 6 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert und dann auf Eis gestellt.

Transformation von *E. coli* nach TOPO TA Klonierung

Als Transformation bezeichnet man bei Bakterien den Vorgang, bei dem neue genetische Information, die auch als zusätzliche DNA in Form von Plasmiden vorliegen kann, aufgenommen wird. In unseren Untersuchungen verwendeten wir chemisch kompetente TOP10F' *E. coli*.

Um die Identifizierung transformierter Zellen zu ermöglichen, werden die auf dem pCR®2.1-TOPO-Vektor liegenden Antibiotika-Resistenzgene gegen Ampicillin und Kanamycin als phänotypische Selektionsmarker benutzt. Das Plasmid besitzt zusätzlich ein Fragment des *LacZ*-Gens, welches aus dem *Lac*-Operon von *E. coli* stammt, in dem *LacZ* die β -Galactosidase, *LacY* die Permease und *LacA* die Transacetylase kodieren. Durch einen Repressor wird die Expression des Operons unterdrückt. IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) ist ein Induktor, der die Repression aufhebt und zur Transkription der Gene, im Falle des pCR®2.1-Plasmids zur Transkription von *LacZ*, führt. Die β -Galactosidase ist in der Lage, X-Gal [(5-Brom-4-chlor-3-indolyl)- β -D-galactosid] in das blaue 5-Brom-4-chlor-indigo zu spalten.

LacZ des Plasmids ist von den angesprochenen, endständigen Thyminüberhängen unterbrochen. Religiert das Plasmid ohne Einschluss eines Inserts, so wird das Leseraster nicht unterbrochen und *LacZ* wird transkribiert. Wird ein PCR-Produkt an den Thyminüberhängen inkloniert, so kann es ein Stop-Codon enthalten oder das Leseraster verschieben, so dass *LacZ* nicht exprimiert wird. Auf Agarplatten mit X-Gal und IPTG sind Kolonien ohne inkloniertes PCR-Produkt blau. In diesen Fällen kann die β -Galactosidase exprimiert, und die farblose Verbindung X-Gal in das blaue Präzipitat gespalten werden. Ist ein PCR-Produkt in den Vektor inkloniert, so kann die

β -Galactosidase nicht synthetisiert werden, die Kolonien bleiben weiß. Auf diese Weise ist eine Auswahl von Kolonien mit Insert (Blau-Weiß-Selektion) möglich.

Die Transformation wurde durchgeführt, indem 50 μ l kompetente *E. coli*-Suspension (Stamm TOP10F⁺) auf Eis aufgetaut, 2 μ l 0,5 M β -Merkaptoethanol (β -ME) und 2 μ l des Ligationsansatzes hinzu gegeben, und der Ansatz 30 min auf Eis gestellt wurde. Die Inkubation ermöglicht der mit dem PCR-Fragment ligierten Vektor-DNA die Bindung an die Zellmembran. Hierbei vermitteln zweiwertige Kationen in der Suspension der kompetenten Zellen eine Annäherung der negativ geladenen DNA an die Zellmembran. Anschließend wurde das Gefäß für 30 s bei 42°C erwärmt (Hitzeschock) und sofort wieder für 2 min auf Eis gestellt. Durch den Hitzeschock wird die Zellmembran destabilisiert und eine Aufnahme der Fremd-DNA ermöglicht. Es wurden 250 μ l SOC-Medium zugegeben und die Reaktionsgefäße 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 80 μ l auf IPTG und X-Gal bestrichene Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37°C aufbewahrt.

Bei erfolgreicher Ligation des PCR-Produktes in den Vektor und erfolgreicher Transformation sind auf den Agarplatten blaue und weiße Kolonien gewachsen.

Zur Analyse der Klonierungen wurden je 3 ml LB-Kulturen [50 μ g/ml Ampicillin] mit weißen Kolonien angeimpft und ü.N. kultiviert. Die Plasmide wurden wie unter 3.11.2 beschrieben (DNA-Isolierung aus Bakterienkultur) präpariert und mit T7 und M13-R Primern sequenziert. Zusätzlich wurde mit 1 μ l der DNA eine PCR mit den fluoreszenzmarkierten Primern aus 3.11.8 durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden einer Fragmentlängenanalyse am Sequenzer (siehe 3.11.11) unterzogen. Bestätigte sich hier die gewünschte Fragmentlänge, konnte das entsprechende Plasmid für die Umklonierung verwendet werden.

Umklonierung von unterschiedlich langen GGN-Repeatlängen Allelen

Für die Umklonierung wurden die einzigen *CpoI*- bzw. *KpnI*-Schnittstellen 5' und 3' vom GGN-Repeat verwendet. Durch den sequenziellen Verdau der in pCR®2.1 subklonierten AR-Fragmente konnten die entsprechenden GGN-Repeatlängen aus dem Plasmid ausgeschnitten und in den ebenfalls *CpoI*/*KpnI* verdauten pSG5-AR eingefügt werden.

Um eine Übertragung von störenden Puffern oder Salzen zu vermeiden, wurden die Fragmente nach dem ersten Verdau mit dem GFX PCR DNA and Gel Purification Kit aufgereinigt. Nach dem zweiten Verdau wurden die DNAs auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach etwa 6 Stunden konnten die gewünschten Fragmente mit Hilfe eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten werden und mit dem GenElute Agarose Spin Column Kit aufgereinigt werden.

Unmittelbar im Anschluss an die Aufreinigung wurde die Ligation durchgeführt. Unter Verwendung des Rapid DNA Ligation Kits wurden 0,5 - 3 µl Plasmid DNA (100 ng), 4 - 6 µl Insert-DNA (10 ng), 2 µl DNA Dilution Puffer (5 x) und 10 µl Ligase Puffer (2 x) zusammen pipettiert und mit H₂O dest. auf 20 µl aufgefüllt. Vektor- und Insert-DNA lagen hierbei in einem molaren Verhältnis von 1:3 vor. Als Kontrolle für die Selbstligation diente ein Ansatz, der nur Vektor-DNA ohne Insert enthielt. Abschließend wurde 1 µl DNA Ligase [5U/µl] hinzugegeben und der Ansatz ü.N. bei 22°C inkubiert.

Transformation von *E. coli* nach Ligation

Für eine höhere Ausbeute von transformierten Klonen wurde bei der Transformation nach „konventioneller“ Ligation etwas anders verfahren als nach Ligation durch Topoisomerase. Hier wurden 8 µl des Ligationsansatzes zu 200 µl auf Eis aufgetauten DH5α *E. coli*s gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 45 sec bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium wurde für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Das Reaktionsgefäß wurde daraufhin für 10 sec zentrifugiert, 80% des Überstands dekantiert und das Pellet resuspendiert. Die Resuspension (ca. 150 µl) wurden auf einer Ampicillin-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag konnten die durch die Ampicillinresistenz des Plasmids gewachsenen Kolonien gepickt werden und als 3 oder 50 ml LB-Kulturen [50 µg/ml Ampicillin] weiter kultiviert werden, bevor mit Hilfe der in 3.11.2 erwähnten Mini- bzw. Midi-Prep-Kits die Plasmide aufgereinigt werden konnten. Zur Überprüfung der Plasmide konnten Testverdaus angesetzt werden, bei denen bekannte Fragmentlängen zu erwarten waren.

3.12.2 Analyse in Zellkultur

Kultivierung von adhärent wachsenden Säugerzellen

Säugerzellen in Kultur sind besonders empfindlich gegenüber Kontaminationen durch Bakterien und Pilze, und aus diesem Grund musste ausnahmslos mit sterilen Geräten und Lösungen an der Sterilwerkbank gearbeitet werden. Um den Nährstoffansprüchen der Zellen zu genügen, wird das jeweilige Medium (DMEM) mit Wachstumsfaktoren versetzt, die in Form von fetalem Kälberserum (FKS) zugegeben werden. Penicillin, Streptomycin und Amphotericin sollen die Kultur zusätzlich vor möglichem Bakterien- und Pilzbefall schützen. Alle verwendeten Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Die Notwendigkeit eines Mediumwechsels deutete sich anhand der Farbänderung des Mediums an, sobald die Nährstoffe verbraucht waren und Stoffwechselprodukte den pH-Wert des Mediums verändert haben. War eine 10 cm-Kulturschale konfluent bewachsen, so mussten die Zellen auf weitere Schalen verteilt (gesplittet) werden. Dazu wurde zu-

nächst das alte Medium abgesaugt. Danach wurden 8 ml 1 x PBS zum Waschen der Zellen auf die Kultur gegeben und im Anschluss wieder entfernt. Die Zellen wurden dann mit 1 ml Trypsin vom Boden der Kulturschale abgelöst. Nach 2 - 5 min Inkubationszeit wurde ein entsprechend dem Teilungsverhältnis großes Volumen an Vollmedium zugegeben, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mittels serologischer Pipette resuspendiert. Von dieser Suspension wurde 1 ml in eine neue Kulturschale gegeben, in die zuvor 9 ml Vollmedium vorgelegt worden waren. Die Zellen wurden jeweils montags und donnerstags gesplittet: Montags 1:6 und donnerstags 1:8. Bei der Verwendung von Multiwell-Kulturschalen wurde mit entsprechend kleineren Volumina gearbeitet. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in 95% FKS und 5% DMSO in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Transiente Transfektion von Mammalia Zellen

Zur Untersuchung von RNAs und Proteinen *in vivo* bedient man sich der Transfektion von Säugerzellen in Zellkultur. Bei den verwendeten Expressionsplasmiden befindet sich die gewünschte cDNA unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors. Bei dem hier verwendeten Plasmid wird der AR in Abhängigkeit vom SV40 Promotor exprimiert und mit einem SV40-Polyadenylationssignal versehen, was eine effiziente Expression gewährleistet.

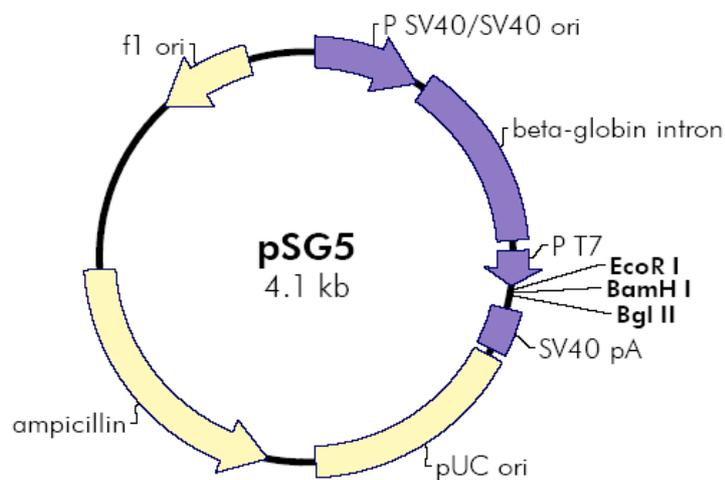


Abbildung 3.2: Das pSG5-Vektorplasmid. Die Multiple Cloning Site (MCS) wird durch die Restriktionsschnittstellen von *EcoRI*, *BamHI* und *BglII* gebildet. Für eine effiziente *in vivo* Expression des inklonierten AR sorgen der SV40 Promotor 5' sowie das SV40 Polyadenylierungssignal 3' von der MCS.

Die transiente Transfektion von adhärennten HeLa-Zellen erfolgte durch das chemische Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 von Invitrogen. Lipofectamine ist ein kationisches Lipid mit dem die DNA Komplexe bildet und in Säugerzellen gelangt.

Zunächst wurden die Zellen am ersten Tag trypsiniert, resuspendiert und in einer Neubauer Zählkammer gezählt, bevor 250.000 Zellen (für AR Proteinstabilitätsversuch) bzw. 210.000 Zellen (ELISA- und Expressionsversuch) in 12-Well-Platten ausgesät wurden.

Im ELISA- und Expressionsversuch wurden die Zellen neben dem AR-Expressionsplasmid mit zwei weiteren Plasmiden co-transfiziert. Dabei handelte es sich zum einen um das Plasmid „pGre2-Luc“, das für die Firefly (Glühwürmchen; *Photinus pyralis*)-Luziferase kodiert, welche direkt hinter einem AR-sensitiven Promotor liegt. Entsprechend der Menge vorhandenen ARs und aktivierenden Hormons konnten in einer Lumineszenzanalyse entsprechende Signale der Firefly-Luziferase detektiert werden. Zur Normalisierung variabler Transfektionseffizienzen wurde darüber hinaus ein weiteres Plasmid mit dem konstitutiv exprimierten Reportergen Renilla (Weichkoralle; *Renilla reniformis*)-Luziferase co-transfiziert (phRL).

Pro Ansatz wurden 500 ng pSG5-AR, 500 ng pGre2-Luc und 12,5 ng phRL eingesetzt und auf Reaktionsgefäße verteilt. Als Negativkontrolle diente das pSG5-Vektorplasmid ohne AR-Insert (pSG5 ohne AR). Unter der Sterilbank wurde ein Prämix aus OptiMEM und Lipofectamine hergestellt, bei dem pro Ansatz 100 µl OptiMEM mit jeweils 3 µl Lipofectamine gemischt wurden. Dieser inkubierte 5 min bei RT, während pro Ansatz 100 µl OptiMEM auf jedes Plasmidgemisch gegeben wurden. Im Folgenden wurden pro Ansatz 100 µl des OptiMEM/Lipofectamine-Gemischs zu den Plasmid/OptiMEM-Ansätzen gegeben und diese für 20 min bei RT inkubiert. Gegen Ende der Inkubationszeit wurde das Medium aus den Wells der Kulturschale aspiriert, jedes Well einmal mit 1 ml OptiMEM gewaschen und 1 ml OptiMEM vorgelegt. Anschließend wurden jeweils 205 µl des Plasmid/Lipofectamine-Gemischs vorsichtig zu den Zellen pipettiert. Dieser Ansatz wurde 6 h bei 37°C inkubiert, bevor das Transfektionsmedium abgesaugt wurde und Steroidhormon-gestripptes Medium mit bzw. ohne Dihydrotestosteron (DHT) zugegeben wurde. Die einzelnen AR-Konstrukte wurden mit Steroidhormon-gestripptem Medium mit DHT als Triplikate und ohne DHT als Duplikate inkubiert. Die Konzentration des DHTs betrug 1 nM, wobei als Negativkontrolle im Medium ohne DHT eine entsprechende Menge EtOH eingesetzt wurde. 21 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet.

Für den Proteinstabilitätsversuch wurde pro Ansatz ausschließlich mit 500 ng pSG5-AR transfiziert. Die Transfektion erfolgte zunächst analog zum Vorgehen im ELISA- und Expressionsversuch. Alle Wells wurden nach der 6 h Inkubation zunächst mit Steroidhormon-gestripptem Medium mit DHT inkubiert. 24 h nach Transfektionsstart wurde das Steroidhormon-gestrippte Medium mit DHT durch Steroidhormon-gestripptes Medium mit DHT und 100 ng/µl CHX bzw. EtOH (Negativkontrolle) ausgetauscht. Die einzelnen AR-Konstrukte wurden mit Steroidhormon-gestripptem Medium mit DHT und CHX als Triplikate bzw. mit DHT und EtOH als Duplikate inkubiert. Jeder Versuchsansatz wurde für weitere 0 h; 2,5 h; 5 h bzw. 8 h in Steroidhormon-gestripptem Medium mit DHT und CHX bzw. EtOH inkubiert.

Strippen von FKS (=Herstellen eines Steroid und Thyroid-Hormon freien Serums):

1. Serum langsam in Wasserbad bei RT auftauen.
2. 50 ml H₂O dest. zu 50 g Bio-Rad AG 1-X8 Resin geben und 10 min bei RT rühren.
3. Überstand verwerfen, Waschschrift wiederholen.
4. 25 g des Resins zu 500 ml Serum geben.
5. 5 h bei RT rühren lassen.
6. Überstand in eine neue Flasche kippen.
7. 25 g frisches Resin sowie 10 ml Dextran beschichtete Aktivkohle in H₂O (1:1) zugeben.
8. Ü.N. bei 4°C rühren.
9. 10 min bei 4°C und 1.000 rpm zentrifugieren.
10. Überstand in ein neues Gefäß schütten.
11. Erneut 10 ml Dextran beschichtete Aktivkohle zugeben.
12. 1 h in 55°C Wasserbad schütteln.
13. 10 min bei 1.000 rpm und 4°C zentrifugieren.
14. 2 x filtrieren (durch 0,2 µm Filter).

Quantifizierung von AR-Protein mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

AR-Protein aus Zellkultur wurde mit dem NR Sandwich AR Kit (Active Motif) quantifiziert. Dieses Kit macht sich den immunologischen Nachweis über Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Technik zunutze. In der Sandwich-AR-ELISA Methode werden zwei AR-spezifische Antikörper eingesetzt, die an unterschiedliche Epitope des AR-Proteins (Antigen) binden. Der erste AR-Antikörper (AR-Capture Antibody) bildet die Matrix jedes Well-Bodens der ELISA-Platte und ist in der Lage, den AR spezifisch aus dem Substrat zu binden. Der zweite AR-Antikörper (AR-Detection Antibody) bindet ebenfalls an den AR. Auf diese Weise ist ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entstanden, der die Bezeichnung „Sandwich“ begründet. Über einen dritten, Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase, HRP)-gekoppelten Antikörper, der wiederum den AR-Detection Antibody bindet, kann durch eine enzymatische Farbreaktion der AR quantifiziert werden. Die Farbtintensität ist dabei proportional zur Menge vorhandenen AR-Proteins.

Durchführung:

1. Medium aus Zellkultur-Wells absaugen und Zellen mit 1 ml PBS waschen. PBS absaugen.
2. Ernten und Homogenisieren der Zellen: pro Well 250 µl 1 x PLB pipettieren und 15 min auf Schüttler bei 100 rpm lysieren. Anschließend durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren Zellen homogenisieren. Noch adhärende Zellen dabei mit der Pipettenspitze vom Plattenboden kratzen.
3. 50 µl Zellysate pro ELISA-Well pipettieren, Platte abkleben und 1h bei 100 rpm auf Schüttler inkubieren.
4. Wells 3 x mit 200 µl 1 x Washpuffer waschen. Dazu pro Waschschrift Platte über Waschbecken invertieren und anschließend auf Papiertüchern ausschlagen.
5. 50 µl AR-Detection Antibody (1:200 Verdünnung in Diluent Puffer) pro Well pipettieren, Platte abkleben und 1h bei 100 rpm auf Schüttler inkubieren.
6. Wells 3 x mit 200 µl 1 x Washpuffer waschen. Dazu pro Waschschrift Platte über Waschbecken invertieren und anschließend auf Papiertüchern ausschlagen.
7. 50 µl HRP-gekoppelten Antikörper (1:1000 Verdünnung in Diluent Puffer) pro Well pipettieren, Platte abkleben und 1h bei 100 rpm auf Schüttler inkubieren.

8. Wells 4 x mit 200 μ l 1 x Washpuffer waschen. Dazu pro Waschschrift Platte über Waschbecken invertieren und anschließend auf Papiertüchern ausschlagen.
9. 100 μ l Developing Solution pro Well pipettieren und etwa 10 min in lichtgeschützter Umgebung inkubieren lassen, bis erste Wells einen Farbumschlag zu Dunkelblau aufweisen.
10. 100 μ l Stop Solution zu jedem Well geben.

Nach Zugabe der Stop Solution ($\text{pH} < 7$) kommt es durch das saure Milieu zu einem Farbumschlag von blau nach gelb und zu einer Beendigung der Entwicklung. Die Absorption der Wells wurde direkt im Anschluss mit dem DYNEX MRX II Mikroplatten Photometer (DYNEX Technologies) bei 450 und 630 nm gemessen.

Lumineszenzanalyse von transient transfizierten Zellen

Zur Analyse der transienten Transfektion der Säugerzellen und der daraus resultierenden Protein-Expression wurde der Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega) verwendet. Das System macht sich die unterschiedlichen Enzymeigenschaften und Substratspezifitäten der Firefly- und Renilla-Luziferase zunutze. Die Lichterzeugung der Firefly-Luziferase beruht auf der Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Oxidation des Luziferins, wohingegen die Renilla-Luziferase Coelenterazin in Coelenteramid umsetzt und Licht freisetzt. Das Luciferase Assay Reporter II Reagenz enthält Luziferin und ATP, das Stop & Glo Reagenz beendet die Firefly-Luziferase Reaktion und enthält Coelenterazin.

Hierfür wurden die Zellysate aus dem ELISA-Experiment verwendet. Jeweils 50 μ l Lysat pro Well wurden im Platten-Reader GeniosPro analysiert.

Durchführung:

Die folgenden Schritte wurden im Platten-Reader automatisch für jedes Well vollzogen:

1. 50 μ l Luciferase Assay Reporter II (LAR II) wurden ins erste Well dispensiert.
2. 1,75 sec nach Ende der Dispension wurde für 5 sec die Firefly-Luziferase Aktivität gemessen.
3. 50 μ l Stop & Glo Reagenz wurden dispensiert.
4. 1,75 sec nach Ende der Dispension wird für 5 sec die Renilla-Luziferase Aktivität gemessen.

Western-Blot-Analyse

Im Western-Blot werden in einem Proteingemisch einzelne Proteine immunologisch sichtbar gemacht. Dafür muss zuvor zwecks Auftrennung der Proteine eine diskontinuierliche sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt werden. Bei dieser erfolgt die Trennung von Proteinen in denaturierenden Polyacrylamidgelen primär in Abhängigkeit von der molekularen Masse des jeweiligen Proteins (Laemmli, 1970), da aufgrund des ionischen Detergenz SDS die Proteine denaturiert werden und eine ihrem Molekulargewicht proportionale negative Ladung erhalten. Zwischen zwei Glasplatten im Abstand von 1,5 mm wurde

zunächst das Trenngel mit einem Gehalt von 10% Polyacrylamid bis etwa 2 cm unterhalb der möglichen Oberkante gegossen. Danach wurde die Gellösung mit 0,1% SDS-Lösung überschichtet. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde die SDS-Lösung abgegossen und ein 5% Sammelgel aufgegossen. Dieses ist niedervernetzt und dient der Konzentration der Proteine in einer Ebene. Im dichter vernetzten, alkalischen Trenngel erfolgt die Auftrennung der unterschiedlichen Proteine, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im Trenngel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes ist. Als Molekulargewichtsstandard diente der Precision Plus Protein™ Standard Dual Color (Bio-Rad). Die Proben (40 µl Lysat aus dem ELISA-Experiment) wurden vor dem Auftragen mit 3 x Protein-Probenpuffer versetzt (20 µl), 5 min bei 95°C erhitzt und in die Geltaschen geladen (je 40 µl). Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer (Mini VE Complete System, Hoefer) bei 30 mA pro Gel im Sammelgel und bei 40 mA im Trenngel. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn der Farbstoff die untere Gekante erreicht hatte. Nach dieser größenabhängigen Auftrennung der Proteine, konnten sie auf PVDF-Membranen transferiert werden.

Die PVDF-Membran wurde zunächst für 15 sec in Methanol inkubiert und in Transferpuffer gelegt. Das Polyacrylamidgel wurde luftblasenfrei auf die mit Transferpuffer getränkte PVDF-Membran zwischen je ein extra dickes Blot-Papier (Bio-Rad) und in eine Elektrotransfer-Apparatur (Fastblot B44, Whatman Biometra) gelegt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 25 V, für 35 min. Danach wurde die Membran 2 - 5 min mit einer 0,1% Ponceau-Lösung gefärbt. Anschließend wurde diese Membran mehrfach kurz mit H₂O entfärbt und konnte getrocknet werden. Die Membran wurde gescannt und konnte für die Immunreaktion nach dem Chemilumineszenz-Verfahren eingesetzt werden.

Dazu wurde eine getrocknete PVDF-Membran durch eine kurze Inkubation in Methanol aktiviert und zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen 1 h in Block-Lösung inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation für 1 h mit entsprechenden Primärantikörpern in Block-Lösung (Rabbit anti-AR Antikörper in 1:500 Verdünnung, Mouse anti-β Actin Antikörper in 1:15.000 Verdünnung), gefolgt von 3 Waschschritten mit PBST für je 5 min und der Inkubation mit entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (HRP anti-Rabbit bzw. -Mouse) für 1 h in Block-Lösung (Verdünnungsfaktor 1:30.000). Die Membran wurde dreimal für 20 min mit PBST gewaschen. Der Nachweis von spezifisch detektierten Proteinen wurde mittels einer Chemilumineszenzreaktion (SuperSignal West Dura, Perbio) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit der in klarer Folie eingeschlagenen Membran wurde eine Autoradiographie belichtet.

3.13 Statistische Methoden

3.13.1 Statistik in Fall-Kontroll-Studien und familienbasierten Tests

Die statistischen Methoden wurden hier im Wesentlichen im Rahmen von Fall-Kontroll-Studien angewendet. Bei genetischen Fall-Kontroll-Studien vergleicht man die Frequenz von Allelen oder Genotypen in den entsprechenden Kollektiven. Ein signifikanter Frequenzunterschied eines Allels oder Genotyps an einem Markerlocus zwischen Fällen und Kontrollen könnte letztendlich ein Hinweis darauf sein, dass das Allel direkt oder indirekt eine Rolle bei der Entstehung der Erkrankung spielt.

Familienbasierte Tests ermöglichen eine noch genauere Assoziationsberechnung, da sie populationspezifische Stratifikationseffekte vermeiden, indem sie die nicht vererbten Allele der Eltern der betroffenen Personen als Kontrollallele nutzen (Balding et al., 2007).

Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy-Weinberg-Equilibrium, HWE)

Das HWE geht von einer idealen Population aus, in der sich über Generationen hinweg weder Allelfrequenzen noch Genotypfrequenzen verändern. Alle Allele werden unabhängig voneinander weiter gegeben, die Frequenzen befinden sich in einem Gleichgewicht. Evolution kann in dieser idealen Population demnach nicht stattfinden, womit das HWE nur modellhaften Charakter besitzt. Trotzdem findet es Anwendung, um allelspezifische Imbalancen in einer untersuchten Population aufzudecken, die in Form einer Abweichung vom HWE aufgedeckt werden können, nicht aber zwangsläufig auch als fehlerhafte Genotypisierung gesehen werden müssen (Balding et al., 2007).

Chi²-Test (χ^2 -Test)

Der genotyp- oder allelbasierte χ^2 -Test überprüft zwei oder mehr Verteilungen hinsichtlich ihrer Gemeinsamkeiten. An die betrachteten Verteilungen werden nahezu keine Bedingungen (wie z.B. normalverteilte Daten) gestellt. Die Nullhypothese dieses Tests lautet: „Die geprüften Verteilungen entstammen der gleichen Grundgesamtheit“ was bedeutet, dass es theoretisch keinen Unterschied zwischen Probanden mit und ohne AGA hinsichtlich eines analysierten Allels geben sollte. Die Prüfgröße χ^2 erlaubt, die Wahrscheinlichkeit p ($p\chi^2$) dafür abzuschätzen, dass die Nullhypothese vermutlich gilt. Kleine p -Werte ($\leq 0,05$) bedeuten, dass die Nullhypothese signifikant zurückgewiesen wird und ein signifikanter Unterschied zwischen den Probandenkollektiven vorliegt. Größere p -Werte zeigen an, dass keine signifikanten Unterschiede bestehen. Darüber hinaus gilt: Je größer χ^2 ist, desto kleiner ist der p -Wert zur Bestätigung der Nullhypothese und umgekehrt (Ziegler & König, 2006). Der χ^2 -Test ist nur dann geeignet, wenn das HWE eingehalten wird (Sasieni, 1997).

Odds Ratio (OR)

Das OR gibt das Chancenverhältnis zwischen zwei betrachteten Gruppen an und ist nicht mit dem Relativen Risiko zu verwechseln, welches eine Wahrscheinlichkeit angibt.

Dieses Chancenverhältnis gibt wieder, ob beim Vorliegen eines bestimmten Allels eine Erkrankung in einer Gruppe von Betroffenen häufiger auftritt als in einer Vergleichsgruppe, die dieses Allel ebenfalls trägt, jedoch nicht betroffen ist, also inwieweit Allelträger erkranken bzw. Nicht-Allelträger erkranken. Die Berechnung ist mittels einer einfachen Vierfeldertafel möglich, wobei sich das OR definitionsgemäß aus dem Quotienten der beiden Chancenverhältnisse ergibt (Produkt aus Betroffenen mit Allel A und Nicht-Betroffenen mit Allel B / Produkt aus Nicht-Betroffenen mit Allel A und Betroffenen mit Allel B). Im Gegensatz dazu ergibt sich das Relative Risiko aus dem Quotienten der Erkrankungsfrequenzen der jeweiligen Gruppen (Thomas, 2004). Ein OR von < 1 bedeutet, dass die Chance zur Erkrankung in der zweiten Gruppe größer ist, als in der ersten. Ein OR von 1 stellt ein ausgeglichenes Verhältnis dar, wohingegen ein Wert von über 1 bedeutet, dass die Chancen in der ersten Gruppe größer sind. Das OR ist ein gutes Maß, um den Beitrag eines Allels für eine Erkrankung auszudrücken (Ziegler & König, 2006) und wird meistens auf Basis des Risikoallels angegeben.

Cochran-Armitage-Trend-Test (ATT)

Der ATT ist der gebräuchlichste genotypbasierte Test auf Assoziation. Der bereits erwähnte χ^2 -Test ist nicht in der Lage, einen Trend in einem Datensatz zu berücksichtigen. Der genotypbasierte ATT (Armitage, 1955) wird daher gewählt, um bereits einen Trend in den Untersuchungskollektiven erkennen zu können. Er ist nicht vom HWE abhängig. Biologisch gesehen ist dieser Test geeigneter als viele andere, da das Individuum einen Genotypen und nicht ein Allel trägt (Ahn, 2006).

Allele-Frequency-Difference-Test (AFD)

Der AFD-Test ist der einfachste Test auf Assoziation. Er entspricht dem klassischen Vierfelder-Test, in dem die Häufigkeiten eines betrachteten Allels zwischen Betroffenen und Nicht-Betroffenen ausgezählt werden und auf Assoziation gerechnet werden. Er wurde im Rahmen der GWA für das X-Chromosom angewendet, da Männer bezüglich des X-Chromosoms nur ein Allel besitzen, womit genotypbasierte Tests wie der ATT nicht verwendet werden können.

Transmission-Disequilibrium-Test (TDT)

In einem TDT nach Spielman et al. (1993) wird getestet, ob von Eltern ein bestimmtes Allel einer Variante signifikant häufiger an betroffene Kinder weitergegeben (transmittiert) wird, als es die

Vererbung nach Mendel erwarten lässt. Jedes Allel hat dabei grundsätzlich die gleiche Wahrscheinlichkeit, von einem heterozygoten Elternteil an ein betroffenes Kind weiter gegeben zu werden. Es wird kein genetisches Modell vorausgesetzt. Wenn ein bestimmtes Allel das Erkrankungsrisiko erhöht, wird es häufiger an die betroffenen Kinder transmittiert, als durch Zufall zu erwarten wäre (Thomas, 2004). Der TDT umgeht dabei das Stratifikationsproblem durch Verwendung „interner“ Kontrollen (die nicht transmittierten Allele der Eltern), welches in populationsbasierten Fall-Kontroll-Studien vorzufinden ist (Spielman et al., 1993). Der Phänotyp der Eltern ist dabei unerheblich. Um den TDT anwenden zu können, muss zumindest ein Elternteil heterozygot für die betrachtete Variante sein. Die Anzahl solcher informativer Trios (Eltern mit einem betroffenen Kind) muss groß sein, damit die statistische Aussagekraft (allgemein als „Power“ bezeichnet) hoch ist. Daher sollten die Allelfrequenzen der untersuchten Varianten möglichst hoch und die Anzahl der zur Verfügung stehenden Trios möglichst groß sein.

Bonferroni-Korrektur

Bei der Bonferroni-Korrektur handelt es sich eine Korrektur für multiple statistische Tests. Statistisch gesehen ist bei einem gesetzten Signifikanzniveau von $p = 0,05$ einer von 20 Tests alleine durch Zufall signifikant (Balding et al., 2007). Bonferroni postulierte deshalb, dass ein Statistiker bei n Tests (Hypothesen) eines Datensatzes das Signifikanzniveau für jede Einzelbetrachtung mit $1/n$ neu berechnen sollte, als würde nur eine einzige Hypothese analysiert werden. In der Praxis bedeutet dies, dass bei einem Signifikanzniveau von $p = 0,05$ das Signifikanzniveau mit $0,05/n$ angeglichen werden muss. Durch diese „konservative“ Korrektur können falsch positive Betrachtungen ausgeschlossen werden (Balding et al., 2007).

3.13.2 Kruskal-Wallis-Test

Dieser Test wurde angewendet, um statistisch den Unterschied der untersuchten Glycinlängen (kodiert vom GGN-Repeat) auf die Eigenschaften des AR zu berechnen.

Bei dem Kruskal-Wallis-Test handelt es sich um eine nichtparametrische (d.h. modellfreie) Varianzanalyse, die Mittelwerte mehrerer unabhängiger Stichproben verschiedener Testgruppen vergleicht (Kruskal & Wallis, 1952). Letztendlich ist er eine Erweiterung des Mann-Whitney-U-Tests, der nur zwei Testgruppen vergleichen kann (Mann & Whitney, 1947). Er findet vornehmlich Anwendung, wenn die erhobenen Messwerte nicht einer Normalverteilung entsprechen und/oder die Varianzen innerhalb einer Testgruppe stark unterschiedlich sind. Beim Kruskal-Wallis-Test wird ein „H-Wert“ berechnet und mit dem theoretischen χ^2 -Wert verglichen. Ist der „H-Wert“ größer als der theoretische χ^2 -Wert, besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen (<http://www.lrz-muenchen.de>).

4. ERGEBNISSE

4.1 Glycinspezifische *AR*-Expression

4.1.1 *AR* GGN-Repeatlängen in der Bevölkerung

Der im Exon 1 des *AR* befindliche polymorphe GGN-Repeat weist unterschiedliche Längen auf. Zur Ermittlung der in der Allgemeinbevölkerung auftretenden GGN-Repeatlängen wurden 188 männliche Blutspenderkontrollen hinsichtlich ihrer GGN-Repeatlänge genotypisiert. Dazu wurden PCRs zur Herstellung fluoreszenzmarkierter Amplikons durchgeführt, die anschließend der Fragmentlängenanalyse auf dem automatischen Sequenzierer zugeführt wurden.

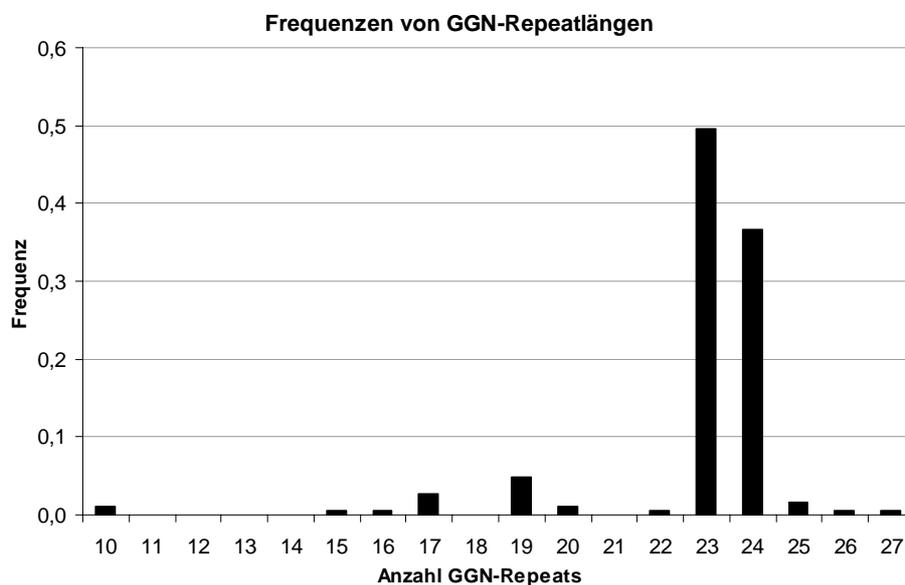


Abb. 4.1: GGN-Repeatlängen in 188 deutschstämmigen Männern. Auf der X-Achse sind die GGN-Repeatlängen aufgeführt, die Y-Achse zeigt die entsprechenden Frequenzen. Die höchste Frequenz wurde durch die Repeatlänge von 23 GGN-Repeats erzielt (49,5%). Mit 36,7% erreichte die Repeatlänge von 24 GGN-Repeats die zweithöchste Frequenz. Die kürzeste Repeatlänge betrug 10 GGN-Repeats, die längste wies 27 Repeats auf.

Abbildung 4.1 zeigt die GGN-Repeatlängen, wie sie in 188 Blutspenderkontrollen ermittelt wurden. Die kürzeste GGN-Repeatlänge betrug 10, die längste 27 Repeats. Am häufigsten wurden die Repeatlängen 23 (49,5%) und 24 Repeats (36,7%) gefunden. Zusammen machen diese 86,2% aller gefundenen Repeatlängen aus. Die GGN-Repeatlänge von 19 Repeats zeigte eine Häufigkeit von 4,8%, 17 Repeats von 2,7%. Die Repeatlängen von 11 bis 14 sowie 18 und 21 wurden nicht gefunden. Alle übrigen Repeatlängen erreichten Frequenzen von etwa 1%.

4.1.2 GGN-Repeatlängen-abhängige *AR*-Transaktivierungseigenschaft

Die mit AGA assoziierte GGN-Länge von 23 Repeats, welche in der Bevölkerung zugleich die häufigste Repeatlänge war, sollte zusammen mit der zweithäufigsten Repeatlänge von 24 Repeats

und dem jeweils kürzesten und längsten ermittelten GGN-Repeat (10 und 27 Repeats) hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die Transaktivierungseigenschaft des AR funktionell untersucht werden. Diese wurden in insgesamt drei unabhängigen transienten Transfektionen von HeLa-Zellen mit je drei Messungen untersucht. Die AR-Transaktivierung wurde dabei indirekt über das Firefly-Reporterplasmid Gre2-Luc analysiert und mit der Transfektionskontrolle phRL verrechnet. Pro Reaktionsansatz wurde die Firefly- und Renilla-Luziferaseaktivität gemessen. Die Normalisierung der Firefly-Luziferaseaktivität wurde durch Division mit der entsprechenden Renilla-Luziferaseaktivität erreicht. Innerhalb eines Experiments wurden die normalisierten Firefly-Luziferaseaktivitäten einer GGN-Repeatlänge aus drei Ansätzen gemittelt. Die Ergebnisse aus drei Experimenten wurden miteinander verrechnet. Die Luziferaseaktivität des AR mit einer GGN-Repeatlänge von 23 Repeats bei Zugabe von DHT wurde als 100% gesetzt und die AR-Luziferaseaktivitäten der anderen GGN-Repeatlängen relativ dazu betrachtet. Die p-Werte wurden mittels Kruskal-Wallis-Test berechnet.

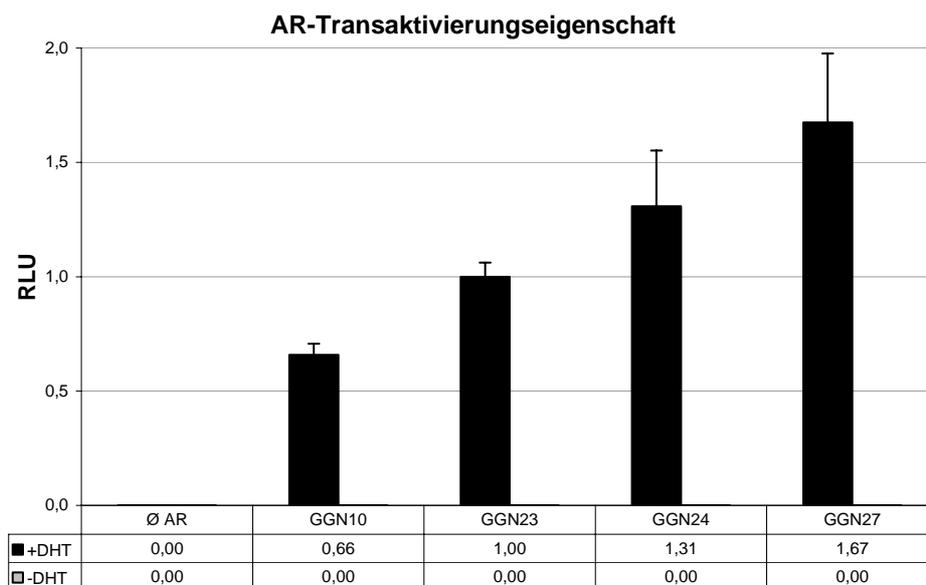


Abb. 4.2: Die AR-Transaktivierungseigenschaft in Abhängigkeit von untersuchten GGN-Repeatlängen. HeLa-Zellen wurden mit einem Androgen responsiven Luziferaseplasmid und einem AR-Expressionsplasmid mit unterschiedlich langen GGN-Repeatlängen transient transfiziert. Die Zellen wurden mit und ohne DHT inkubiert. Die Luziferaseaktivität in den Zellextrakten wurde durch einen Luziferase-Reporterassay quantifiziert und die Messungen mit einer Transfektionskontrolle normalisiert. Hier sind die verrechneten Daten aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die relativen Luziferaseaktivitäten (RLU) der untersuchten GGN-Repeatlängen sind als Balken mit den zugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

In Abbildung 4.2 ist die GGN-Repeatlängen-abhängige Firefly-Luziferaseaktivität aus drei Experimenten, d.h. jeweils neun Messungen, dargestellt. Ohne DHT konnte in keinem der Versuchsansätze Firefly-Luziferaseaktivität und damit AR-Transaktivierung nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle ohne AR zeigte bei 1 nM DHT ebenfalls keine AR-Transaktivierung. Alle vier untersuchten GGN-Repeatlängen wiesen dagegen DHT-induzierte AR-Transaktivierung auf. Die Transaktivierungseigenschaft des AR war dabei umso größer, je länger die GGN-Repeatlänge

war. GGN10 zeigte mit 66% die geringste AR-Transaktivierungseigenschaft. Relativ zu der auf 100% gesetzten AR-Transaktivierungseigenschaft von GGN23 zeigten GGN24 131% und GGN27 167% AR-Transaktivierung. Die Transaktivierung verhielt sich dabei nicht linear: Während die GGN23-Repeatlänge eine etwa 1,52-fach stärkere Transaktivierung als GGN10 (mit 13 Repeatlängen Unterschied) aufwies, erreichte die GGN24-Repeatlänge bei einem Unterschied von nur einem Repeat im Vergleich zu GGN23 bereits eine 1,31-fache stärkere Transaktivierung. Zwischen den Repeatlängen von GGN24 und GGN27 war bei drei Repeatlängen Unterschied eine 1,27-fach stärkere Transaktivierung zu verzeichnen. Nach Kruskal-Wallis-Analyse wurde ein signifikanter Unterschied der GGN-Repeatlängen-abhängigen AR-Transaktivierungseigenschaft in Gegenwart von DHT mit einem p-Wert von 3×10^{-6} berechnet.

4.1.3 GGN-Repeatlängen-abhängige Quantifizierung von AR-Protein

Zur Klärung, ob die unterschiedlichen GGN-Repeat-abhängigen Transaktivierungseigenschaften des AR auf unterschiedliche Proteinmengen zurückzuführen waren, wurden die AR-Proteine aus 4.1.2 mittels ELISA quantifiziert. Dazu wurden die pro Reaktionsansatz gemessenen ELISA-Absorptionen mit der Renilla-Luziferaseaktivität normalisiert. Die Werte wurden über ihre Replikate gemittelt und relativ zu GGN23 mit DHT dargestellt. Die Ergebnisse aus drei Experimenten wurden miteinander verrechnet. Auf eine signifikante Abweichung der Varianzen wurde mittels Kruskal-Wallis-Test untersucht.

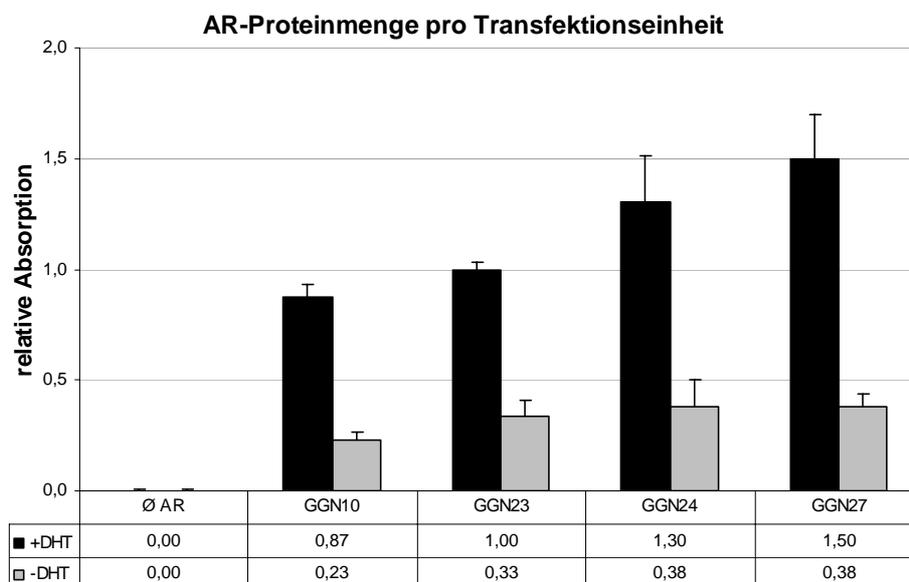


Abb. 4.3: Die AR-Proteinmenge pro Transfektionseinheit in Abhängigkeit von unterschiedlichen GGN-Repeatlängen. Die Proteinmengen wurden mittels ELISA in den Zellextrakten aus 4.1.2 quantifiziert und die Messungen mit der Transfektionskontrolle normalisiert. Hier sind die Daten aus drei unabhängigen Experimenten verrechnet dargestellt. Die relativen Absorptionswerte der untersuchten GGN-Repeatlängen sind als Balken mit den zugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

Abbildung 4.3 zeigt das in Abhängigkeit von der GGN-Repeatlänge quantifizierte AR-Protein aus HeLa-Zellen. In der Negativkontrolle ohne AR konnte sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von DHT keine Absorption gemessen werden, womit kein AR-Protein detektiert wurde. Bei allen vier untersuchten GGN-Repeatlängen wurden mit und ohne DHT die Absorptionen, d.h. AR-Proteine, gemessen.

Analog zu den AR-Transaktivierungseigenschaften konnte in Gegenwart von DHT mit zunehmender Länge des GGN-Repeats mehr Protein gemessen werden. Dabei zeigte sich auch hier ein nicht linearer Trend: Der Proteinmengenunterschied zwischen GGN23 (100%) und GGN24 (130%) war größer als jener zwischen GGN10 (87%) und GGN23 bzw. zwischen GGN24 und GGN27 (150%). Zwischen den beiden Allelen GGN23 und GGN24 liegt der kleinste Repeatlängenunterschied vor, jedoch der größte Unterschied in den resultierenden Proteinmengen. In Gegenwart von DHT zeigte die Varianz der Proteinmengen einen p-Wert von 2×10^{-6} in der Kruskal-Wallis-Analyse.

Die gemessenen Proteinmengen in Abwesenheit von DHT zeigten keinen eindeutigen Trend. Sie waren deutlich geringer als in Gegenwart von DHT. Die geringste Proteinmenge wurde (ebenfalls im Vergleich zur Proteinmenge GGN23 mit DHT) bei GGN10 mit 23% gemessen, die höchsten bei GGN24 und 27 mit jeweils 38%. GGN23 lag bei 33%. In Abwesenheit von DHT zeigten die GGN-Repeatlängen-abhängigen Proteinmengen ebenfalls signifikante Unterschiede mit einem p-Wert von 0,017.

4.1.4 GGN-Repeatlängen-abhängige pro-Protein AR-Transaktivierungseigenschaft

Die Untersuchung der AR-Transaktivierungseigenschaft und der AR-Proteinmenge in ein und demselben Lysat ermöglichte die Berechnung der pro-Protein AR-Transaktivierungseigenschaft. Dazu wurden die gemessenen relativen Lumineszenzwerte der AR-Transaktivierungseigenschaft-Messungen durch den entsprechenden Absorptionswert der Quantifizierung des AR-Proteins geteilt. Diese wurden für alle drei Experimente verrechnet. Abschließend wurden die Ergebnisse relativ zur GGN-Repeatlänge 23, welche auf 100% gesetzt wurde, dargestellt. Auf signifikante Abweichungen wurde mittels Kruskal-Wallis-Analyse getestet.

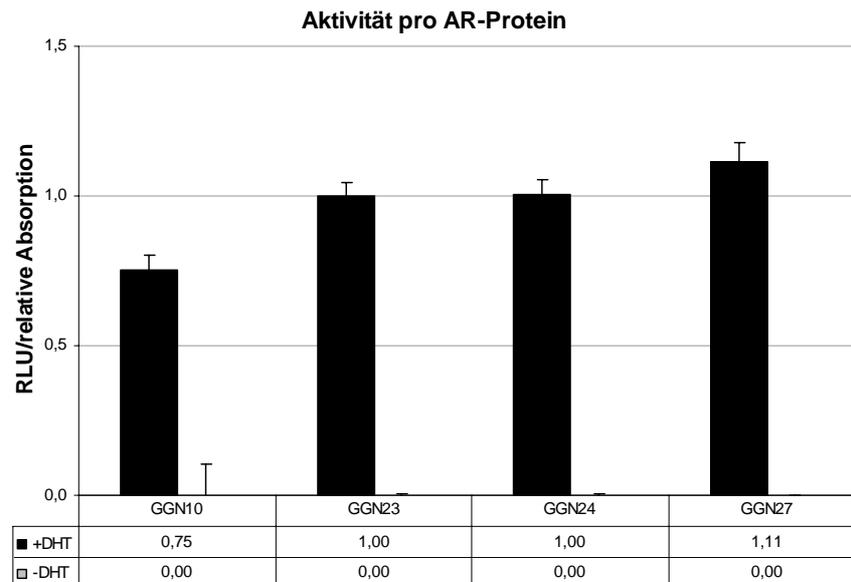


Abb. 4.4: Die GGN-Repeatlängen-abhängige pro-AR-Proteinaktivität. Die Aktivität pro AR-Protein wurde durch Verrechnung der Luziferaseaktivitäten aus 4.1.2 mit den quantifizierten Proteinmengen aus 4.1.3 durch Division ermittelt. Die Daten aus drei unabhängigen Experimenten sind miteinander verrechnet dargestellt. Die relativen Luziferaseaktivitäten (RLU) pro AR-Protein der untersuchten GGN-Repeatlänge sind als Balken mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt.

In Abbildung 4.4 ist die GGN-Repeatlängen-abhängige Transaktivierungseigenschaft pro AR-Protein zu sehen. In Abwesenheit von DHT wurde zwar AR-Protein detektiert, es konnte jedoch keine AR-Transaktivierungseigenschaft verzeichnet werden, womit die pro-Proteinaktivitäten bei 0% lagen. In Gegenwart von DHT zeigten längere GGN-Repeats höhere pro-Protein AR-Transaktivierungseigenschaften als kürzere GGN-Repeatlängen. Die Korrelation war hier weitgehend linear: GGN10 zeigte 75% proteinspezifische Aktivität im Vergleich zu GGN23 (100%). Der Unterschied beider Allele beträgt 13 Repeats und resultiert in einer rund 1,3-fach verminderten pro-Protein Transaktivierung von AR mit GGN10. GGN23 und GGN24 ergaben vergleichbare Transaktivierungseigenschaften vom AR. Die pro-Protein AR-Transaktivierung von GGN27 (111%) war um das 1,1-fache höher als die von GGN24. In Gegenwart von DHT konnte mittels Kruskal-Wallis-Analyse ein signifikanter pro-Protein AR-Transaktivierungsunterschied mit einem p-Wert von 2×10^{-5} berechnet werden.

4.1.5 GGN-Repeatlängen-abhängige Quantifizierung von AR-mRNA

Zur Untersuchung, ob die unterschiedlichen AR-Proteinmengen aus 4.1.3 auf unterschiedliche AR-mRNA Mengen zurückzuführen waren, wurde die Auswirkung der GGN-Repeatlänge auf die Expression des AR-Transkripts untersucht. Es wurden drei unabhängige transiente Transfektionen von HeLa-Zellen durchgeführt. Die RNA wurde isoliert und in Form revers transkribierter cDNA mittels Real-Time RT-PCR relativ quantifiziert. Jede cDNA eines Zellkulturansatzes wurde als Triplikat für den AR sowie die endogenen Kontrollen Cyclophilin und β -2-Mikro-

globulin quantifiziert. Die Expression des *AR* wurde mit den endogenen Kontrollen Cyclophilin und β -2-Mikroglobulin normalisiert. Dazu wurden die Mittelwerte über alle ct-Werte beider endogenen Kontrollen gebildet. Der ct-Wert der entsprechenden endogenen Kontrolle eines Reaktionsansatzes wurde durch den Mittelwert geteilt, womit man einen Angleichfaktor erhielt. Die Angleichfaktoren von Cyclophilin und β -2-Mikroglobulin jedes Reaktionsansatzes wurden abermals zu einem Mittelwert verrechnet. Zur Normalisierung der *AR*-Expression wurde der *AR* ct-Wert durch den gemittelten Angleichfaktor aus Cyclophilin und β -2-Mikroglobulin geteilt. Der so normalisierte ct-Wert des *AR* der exponentiellen PCR wurde durch die Verrechnung $1/2^{ct}$ in die ursprüngliche Transkriptmenge zurückgerechnet. Durch Multiplikation mit dem arbiträren Faktor 100.000.000 wurde eine sinnvolle Dimension erreicht. Die Expressionen der verschiedenen *AR*-Konstrukte wurden relativ zueinander kalkuliert, wobei der Reaktionsansatz GGN23 mit DHT auf 100% gesetzt wurde. Der Test auf Varianz wurde mit der Kruskal-Wallis-Analyse durchgeführt.

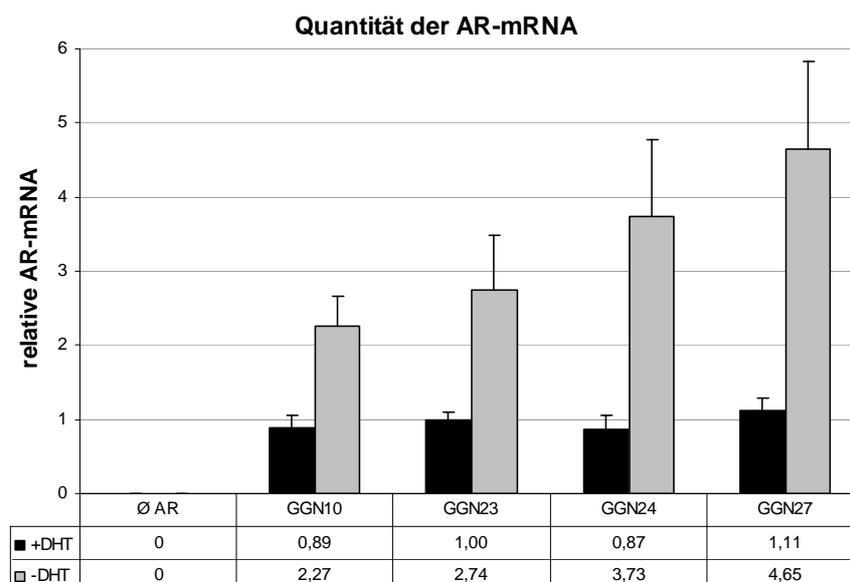


Abb. 4.5: GGN-Repeatlängen-abhängige *AR*-mRNA Quantifizierung. HeLa-Zellen wurden mit einem androgen responsiven Luziferaseplasmid und einem *AR*-Expressionsplasmid mit unterschiedlich langen GGN-Repeatlängen transient transfiziert. Die Zellen wurden mit und ohne DHT inkubiert. *AR*-Transkripte wurden mittels Real-Time RT-PCR quantifiziert. Die ermittelten Messwerte wurden durch die endogenen Kontrollen β -2-Mikroglobulin und Cyclophilin normalisiert. Hier sind die Daten aus drei unabhängigen Experimenten verrechnet dargestellt. Die relativen *AR*-mRNA Mengen der untersuchten GGN-Repeatlängen sind als Balken mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt.

Abbildung 4.5 zeigt die in Abhängigkeit von GGN-Repeatlängen quantifizierte *AR*-mRNA aus drei unabhängigen Experimenten. In Gegenwart von DHT zeigte sich eine relativ gleichmäßige *AR*-mRNA Menge bei allen untersuchten GGN-Repeatlängen mit Ausnahme der Negativkontrolle ohne *AR*, die keine *AR*-Expression zeigte. Unter der auf 100% gesetzten Expression der GGN-Repeatlänge von 23 Repeats befanden sich GGN10 (89%) und GGN24 (87%). Die GGN-Repeatlänge von 27 Repeats zeigte eine mRNA-Quantität von 111%. Die Kruskal-Wallis-

Analyse der GGN-Repeatlängen-abhängigen *AR*-mRNA Menge in Gegenwart von DHT wies eine signifikante Varianz mit einem p-Wert von 0,019 auf.

In Abwesenheit von DHT wurden deutlich erhöhte *AR*-mRNA Mengen gemessen: Die relativen Expressionen von GGN10 (227%) und GGN23 (274%) wiesen mehr als verdoppelte *AR*-mRNA Mengen auf, GGN24 (373%) und GGN27 (465%) sogar mehr als die dreifache bzw. vierfache Menge. In Abwesenheit von DHT wiesen kürzere GGN-Repeatlängen weniger *AR*-Transkripte auf als längere Repeats. Dieser Trend war nicht linear: Der Expressionsunterschied zwischen GGN10 und GGN23 betrug den Faktor 1,21, der zwischen GGN24 und GGN27 den Faktor 1,25. Zwischen GGN23 und GGN24 hingegen, mit nur einem GGN-Repeat Unterschied, betrug der Expressionsunterschied den Faktor 1,36. Der Expressionsunterschied zwischen GGN23 und GGN24 ist der größte der drei aufgeführten Intervalle, obwohl der Repeatlängenunterschied der geringste ist. Die Negativkontrolle ohne *AR* zeigte auch ohne DHT keine *AR*-Expression. In der Analyse der Daten „in Abwesenheit von DHT“ wurde eine signifikante Varianz in dieser Gruppe mit einem p-Wert von 0,0048 nach Kruskal-Wallis-Analyse berechnet.

4.1.6 GGN-Repeatlängen-abhängige *AR*-Proteinstabilität

Um zu testen, ob die GGN-Repeatlängen-abhängigen Proteinmengen auf eine unterschiedliche Proteinstabilität zurückzuführen waren, wurde eine Proteinstabilitätsbestimmung in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dazu wurde die Translation von Proteinen in transient transfizierten HeLa-Zellen durch Cycloheximid (CHX) unterbunden und die *AR*-Proteinmenge nach 0h; 2,5h; 5h und 8h mittels ELISA quantifiziert. Zur Normalisierung wurde der ELISA-Absorptionswert eines Reaktionsansatzes zum jeweils untersuchten Zeitpunkt durch den entsprechenden Absorptionswert zum Zeitpunkt $t=0$ geteilt. Die Ergebnisse aller drei Experimente wurden miteinander verrechnet und relativ zur GGN-Repeatlänge 23 dargestellt. Die Varianzen wurden mittels Kruskal-Wallis-Test analysiert. Zusätzlich wurden die Proteinmengen mittels Westernblot analysiert, wobei β -Aktin als interne Referenz diente.

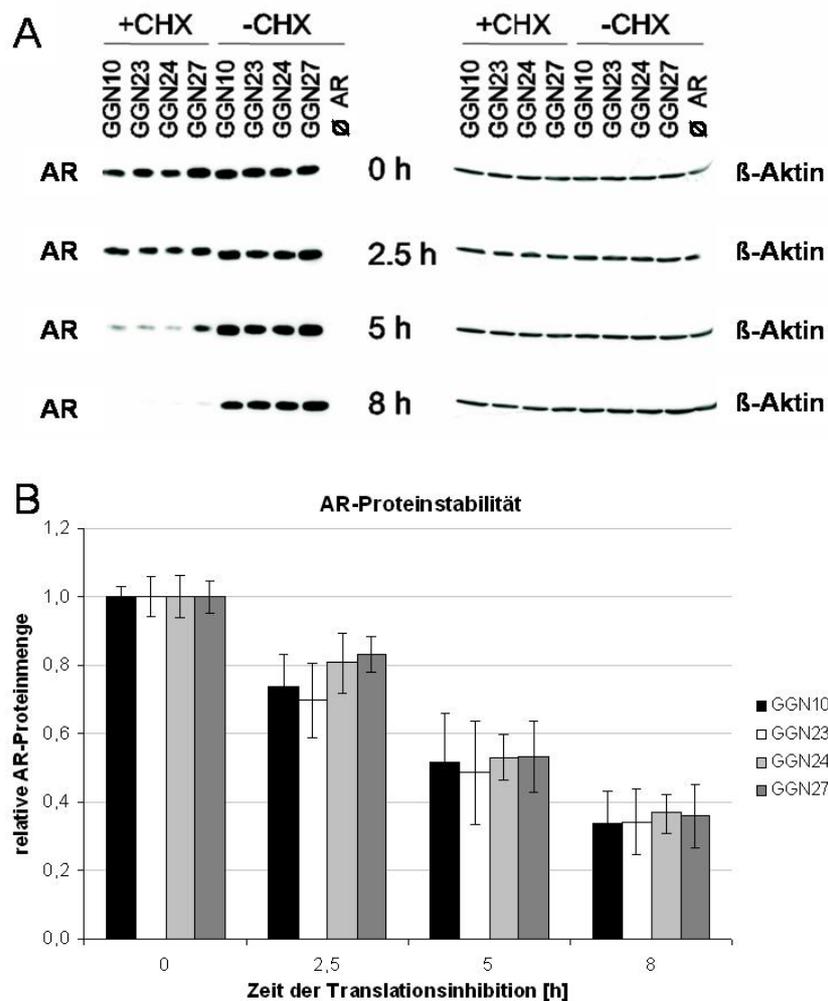


Abb. 4.6: GGN-Repeatlängen-abhängige AR-Proteininstabilität. (A) Westernblot mit AR- und β -Aktin (als interne Referenz) spezifischen Antikörpern von Zellysaten transient mit AR transfizierter HeLa-Zellen nach Inkubation mit DHT und mit bzw. ohne CHX für die angezeigten Zeiten (X-Achse). Repräsentativ dargestellt ist eines von insgesamt drei Experimenten. (B) AR-Protein Quantifizierung durch ELISA von CHX inkubierten HeLa-Zellen. Hier sind die Daten aus drei unabhängigen Experimenten verrechnet dargestellt. Die relativen Absorptionswerte vom AR mit den untersuchten GGN-Repeatlängen sind als Balken mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt.

Abbildung 4.6 zeigt die GGN-Repeatlängen-abhängige AR-Proteininstabilität aus der Westernblot-Analyse (A) und dem ELISA-Experiment (B). Im Westernblot konnte gezeigt werden, dass mit Verlängerung der CHX-Inkubationszeit die AR-Proteinmenge zunehmend geringer wurde. Ein GGN-Repeatlängen-abhängiger AR-Proteininstabilitätsunterschied war nicht erkennbar. Ohne CHX blieben die AR-Proteinmengen über alle Zeitpunkte hinweg relativ konstant (Abbildung 4.6 A). Die β -Aktin-Proteinmengen (Ladekontrolle aufgrund recht hoher Stabilität) blieben über alle Zeitpunkte hinweg sowohl mit als auch ohne CHX unverändert.

Hinsichtlich der Proteininstabilität zeigte sich im ELISA-Experiment kein konsistenter Unterschied zwischen den untersuchten GGN-Allelen. Nach 2,5h wies das Protein mit GGN23 die geringste Stabilität auf, zum Zeitpunkt 8h wurde jedoch bei GGN10 die geringste Proteinmenge detektiert. Nur 2,5h nach Translationsinhibition zeigte sich in der Kruskal-Wallis-Analyse ein signifikanter

Unterschied mit einem p-Wert von 0,025. Zu keinem anderen Zeitpunkt konnten weitere signifikante Unterschiede zwischen den GGN-Repeatlängen-abhängigen AR-Proteinmengen gefunden werden.

4.1.7 GGN-Repeatlängen, ihre vorhergesagten Strukturen und freien Energien

Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen RNA-Mengen der verschiedenen GGN-Allele können allelspezifische Faltungsunterschiede sein. Aus diesem Grund wurde die Sekundärstruktur der GGN-Repeatlängen mithilfe der Software RNAstructure 4.3 analysiert. Dazu wurden die untersuchten GGN-Repeatlängen zusammen mit der 5' flankierenden Sequenz von 10 Basen und der 3' flankierenden Sequenz von 42 Basen in die Software eingegeben.

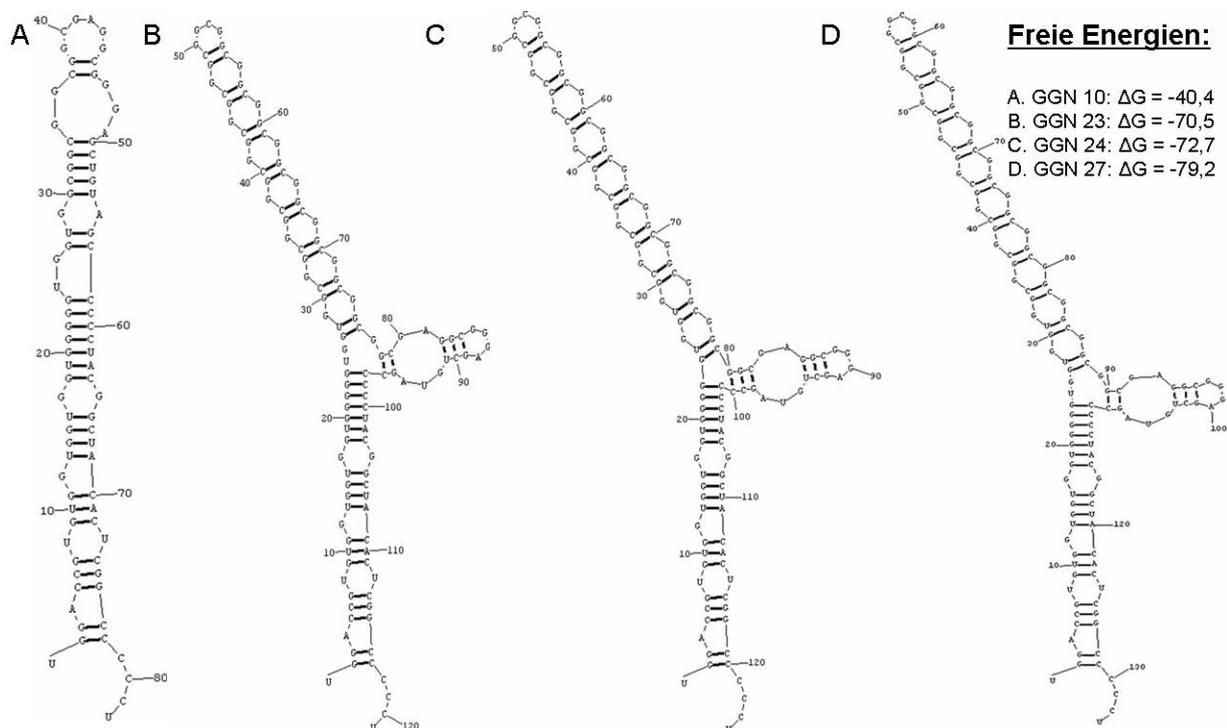


Abb. 4.7: Vorhergesagte Struktur und freie Energie der AR-mRNA bezüglich der unterschiedlichen GGN-Repeatlängen. Die unterschiedlichen GGN-Repeats wurden mit den 5' und 3' flankierenden Sequenzen in die Software RNAstructure 4.3 eingegeben. Durch sie wurde die Struktur der unterschiedlichen Sequenzen mit den zugehörigen freien Energien ΔG ermittelt.

Abbildung 4.7 zeigt die Sekundärstruktur der GGN-Repeats mit den flankierenden Sequenzen und ihre jeweilige freie Energie ΔG . Die freie Energie ist ein Maß für die Stabilität eines Zustandes. Je kleiner ΔG ist, desto stabiler ist der Zustand. Reaktionen laufen beispielsweise spontan ab, wenn $\Delta G < 0$ ist. Wenn $\Delta G > 0$ ist, kann eine Reaktion nur durch Energiezufuhr erzwungen werden. Erwartungsgemäß führten unterschiedliche GGN-Repeatlängen zu unterschiedlichen Sekundärstrukturen. Während sich die Sequenzen für GGN23, -24 und -27 nur unwesentlich voneinander unterschieden und alle eine leicht „geknickte“ Struktur aufwiesen, war die Struktur für GGN10 die einzige, die eine Längskonformation einnahm. ΔG war weitestgehend linear: Die

kurze Repeatlänge von GGN10 zeigte den am wenigsten negativen ΔG -Wert von -40,4, gefolgt von GGN23 mit einem ΔG von -70,5. ΔG unterschied sich damit um den Faktor 1,75 bei 13 Repeatlängen Unterschied. Es folgten GGN24 mit einem ΔG von -72,7, was zu GGN23 den Faktor 1,03 ausmachte, und GGN27 mit einem ΔG von -79,2. Bei drei GGN-Repeatlängen Unterschied zu GGN24 entspricht das einem Faktor von 1,09.

4.2 Genomweite Assoziationsuntersuchung und ihre Validierung

4.2.1 Genomweite Assoziation mittels Illumina Infinium II

Für die genomweite Assoziationsuntersuchung (GWA) wurden 296 AGA-Betroffene und 383 populationsbasierte Universalkontrollen mittels Illumina Bead Array genotypisiert. Die hier verwendeten Probanden waren die am stärksten Betroffenen des Bonner Kollektivs. Von den meisten Kontrollpersonen war die Kopfbehaarung fotografisch dokumentiert. Hierauf beruhend wurden 36 Männer mit weit fortgeschrittener AGA (Haarstatus VI und VII nach der Norwood und Hamilton Skala (Abbildung 2.1)) aus dem Kontrollkollektiv ausgeschlossen. Auf diese Weise wurden die Kollektive bezüglich des Phänotyps stärker stratifiziert, womit die statistische Aussagekraft (Power) der Fall-Kontroll-Studie erhöht werden sollte. Die Genotypisierungsrate aller Proben lag über 95%, so dass keine Probe ausgeschlossen werden musste. Es wurden nur SNPs in der Analyse berücksichtigt, die sowohl bei den Betroffenen als auch bei den Universalkontrollen eine Detektionsrate (Callrate) von $> 95\%$ aufwiesen. Des Weiteren wurden alle SNPs aus dem Datensatz verworfen, die bei den Universalkontrollen signifikant vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abwichen. Als Signifikanzschwelle wurde hier ein p-Wert von $< 10^{-7}$ verwendet, was einem nach Bonferroni korrigierten Signifikanzniveau von etwa $p = 0,05$ (bei 550.000 Tests) entsprach. Darüber hinaus wurden SNPs entfernt, bei denen die Frequenz des selteneren Allels (Minor Allele Frequency = MAF) in den Kontrollen $< 1\%$ war. Aufgrund dieser Qualitätskriterien wurden 29.756 der insgesamt 561.466 SNPs aus der Analyse ausgeschlossen. Dies betraf 28.537 autosomale, 1.115 X-chromosomale, 4 Y-chromosomale und 100 mitochondriale SNPs.

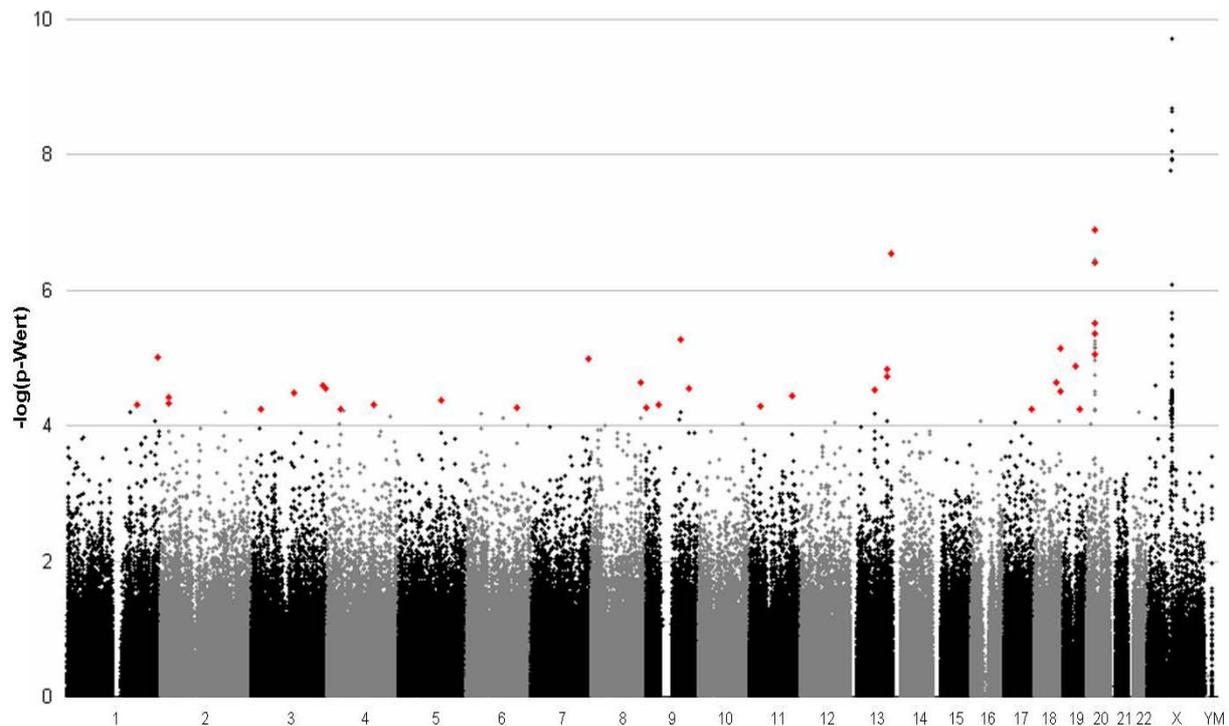


Abb. 4.8: GWA-Ergebnisse für AGA Loci. In dieser Abbildung sind 531.710 SNP-Datenpunkte aufgetragen, die alle Qualitätskriterien erfüllt haben und auf Assoziation getestet wurden. Auf der X-Achse sind die Chromosomen aufgetragen. Das X-Chromosom (X) enthält alle pseudoautosomalen SNPs, die im Datensatz für das Y-Chromosom (Y) nicht mehr auftauchen. „M“ steht für mitochondriale SNPs. Für alle Autosomen zeigt die y-Achse den negativen \log_{10} -Wert des pATT-Werts. Für die Geschlechtschromosomen „X“ und „Y“ (inklusive der pseudoautosomalen SNPs), sowie für die mitochondrialen SNPs ist der negative \log_{10} -Wert des AFD p-Werts gezeigt. 35 SNPs (rot hervorgehoben) haben die Einschlusskriterien für die Replikation mittels Sequenom erfüllt.

Abbildung 4.8 stellt die Ergebnisse der GWA, basierend auf den nominalen Armitage-Trend-Test p-Werten (pATT) für alle Autosomen bzw. den nominalen Allele-Frequency-Difference-Test p-Werten (pAFD) für die Geschlechtschromosomen und die mitochondrialen SNPs graphisch dar. Die Y-Achse gibt den negativen \log_{10} -Wert des pATT-Werts bzw. des pAFD-Werts wieder. Auf dem X-Chr. wiesen auffällig viele SNPs nominal hochsignifikante pAFD-Werte bis $p < 10^{-9}$ auf, von denen acht einer Korrektur nach Bonferroni standhielten, womit sie genomweite Signifikanz aufwiesen. Alle SNPs konnten dabei einem Locus zugeordnet werden, dem bereits bekannten *AR*-Locus (Chr. X, 65.300.000 bp - 67.000.000 bp, NCBI build36), der von den weiteren Analysen ausgeschlossen wurde. Geschlechtschromosomal oder mitochondrial zeigte sich kein weiterer SNP mit auffälligen pAFD-Werten.

Autosomal wiesen in einer Region auf Chr. 20 eine Vielzahl von SNPs p-Werte von 10^{-5} - 10^{-7} auf. Einzelne SNPs mit $p_{ATT} < 10^{-5}$ fanden sich auch auf den Chr. 1, 9 und 13. In 19 der 22 Autosomen wurden SNPs mit p-Werten von $< 10^{-4}$ gefunden, nur die Chr. 14, 15 und 21 zeigten keine pATT-Werte in diesem Bereich. Über alle Autosomen hinweg wurden einige Hundert SNPs mit p-Werten $< 10^{-3}$ gefunden. Keiner der pATT-Werte autosomaler SNPs hielt einer Korrektur nach Bonferroni stand und zeigte damit genomweite Signifikanz.

Am Chr. 20 Locus fanden sich insgesamt 18 SNPs mit p -Werten $< 10^{-5}$. Basierend auf den genomweiten Analysedaten wurde dieser Bereich durch genotypisierte SNPs eingegrenzt (Chr. 20, 21.571.171 bp - 22.321.597 bp). Der Genotypisierungsdatensatz der Universalkontrollen aus dieser Region wurde in HaploView 4.0 hinsichtlich seiner Kopplungsungleichgewicht (LD)-Blockstruktur untersucht. Dazu wurde die Konfidenzintervalldefinition nach Gabriel et al. (2002) und ein r^2 von 0,8 als LD-Schwellenwert verwendet. Zusätzlich wurde in der UCSC-Datenbank nach bekannten Genen und Transkripten für diesen genomischen Bereich gesucht.

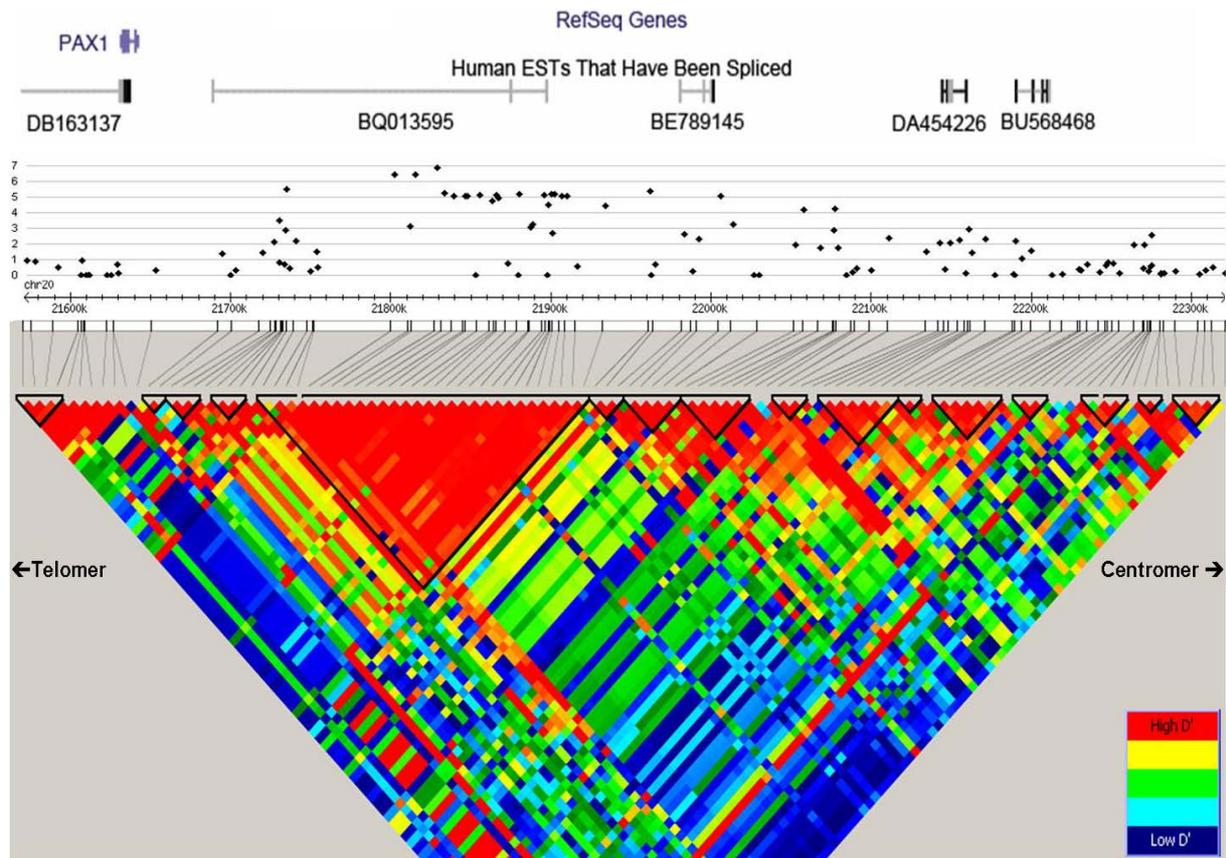


Abb. 4.9: Assoziierter Chr. 20 Locus (21.571.171 bp - 22.321.597 bp) im Kontext von UCSC-Daten und Universalkontrollen-Haploview LD-Blöcken. Der obere Teil der Abbildung stellt die in der UCSC-Datenbank gefundenen Gene, mRNAs und Expressed Sequence Tags (ESTs) dar. Der mittlere Teil zeigt die in der GWA Studie genotypisierten SNPs für den ausgewählten Bereich maßstabsgetreu auf, wobei die Y-Achse den negativen \log_{10} -Wert des p_{ATT} -Werts wiedergibt. Der untere Teil zeigt die LD-Blockstrukturen dieses Genomabschnitts basierend auf den genotypisierten Universalkontrollen. Die Farbe „Rot“ steht dabei für Bereiche mit starkem Kopplungsungleichgewicht (hoher D' -Wert) bei paarweisem Vergleich, blau für Bereiche mit schwachem LD. Die schwarzen Dreiecke stehen für die vorhergesagten LD-Blockstrukturen basierend auf einem r^2 von 0,8 nach den Konfidenzintervalldefinitionen von Gabriel et al. (2002).

Wie in Abbildung 4.9 zu sehen ist, erstreckte sich die assoziierte Region auf Chr. 20 von 21.730.000 bp - 22.280.000 bp. Der Kernbereich mit fast allen SNPs mit $p_{ATT} < 10^{-5}$ lag zwischen 21.800.000 bp - 21.910.000 bp. Dieser Bereich konnte einem einzigen LD-Block zugeordnet werden (großes rotes Dreieck, schwarz umrandet). In Richtung Centromer wurden die Assoziationssignale zunehmend schwächer, ebenso wie die LD-Blockstruktur ein niedrigeres Kopplungsungleichgewicht aufwies. In Richtung Telomer von diesem Kernbereich war noch ein

einzigster SNP (rs6137444 bei 21.733.639 bp, NCBI build36) mit einem $p_{ATT} < 10^{-5}$. Dieser SNP wies ein r^2 von 0,56 zu rs1998076 (Chr. 20, 21.828.045 bp, NCBI build36) auf, der am Chr. 20 Locus die stärkste Assoziation aufwies.

In dem Assoziationskernbereich, in dem ein hohes LD herrscht, konnte in der UCSC-Datenbank nur ein EST gefunden werden (BQ013595, im Weiteren als „Kojak“ benannt). In Richtung Centromer, dem Bereich, in dem das LD abnahm, zeigte sich noch ein weiterer EST (BE789145 im Weiteren als „Charlie-B“ bezeichnet). Das einzige Gen in der Nähe des Kernbereichs war *PAX1*, welches weniger als 100 kb in Richtung Telomer lag.

4.2.2 Replikation der Assoziation

Die in der GWA gefundenen Assoziationen müssen in einer weiteren, möglichst unabhängigen Untersuchung repliziert werden. Hierdurch können falsch positive Befunde identifiziert und reale Assoziationen validiert werden. In GWA-Studien ist die Auswahl der SNPs für die Replikation ein kritischer Schritt. Einerseits soll die Chance groß sein, dass wahre Assoziationen gefunden werden, wozu möglichst viele SNPs typisiert werden müssen, andererseits muss die Studie finanzierbar bleiben. Die Kriterien für den Einschluss von SNPs aus der GWA in die Replikation waren:

1. Alle tagging SNPs ($r^2 < 0,8$) aus der assoziierten Region von Chr. 20 (21.700.000 bp - 22.100.000 bp, NCBI build36) mit einem $p_{ATT} < 10^{-5}$ (= 4 SNPs).
2. Zur Absicherung bei einem Genotypisierungsausfall ein SNP, der im „perfekten“ LD ($r^2 = 1$) zum SNP mit dem niedrigsten p_{ATT} aus der Chr. 20 Region (rs1998076) steht, nämlich rs2180439 (= 1 SNP).
3. Genomweit die besten 30 SNPs (auf Basis des nominalen p-Werts). Hierfür wurden der p_{ATT} für die autosomalen SNPs und p_{AFD} für die gonosomalen und mitochondrialen SNPs herangezogen. Diesbezüglich wurde der bereits untersuchte X-chromosomale Bereich um den *AR* (65.300.000 bp - 67.000.000 bp, NCBI build36) ausgeschlossen.

dbSNP ID	Chr.	Position [bp]	Gen	Allele	MAF Betroffene	MAF Kontrollen	pATT nom.	OR (95% c.i.)	Risiko Allel
rs11584662	1q	184847447		G/T	0,417 (T)	0,467 (G)	4,92E-05	1,60 (1,28 - 1,99)	G
rs4658627*	1q	242577799	C1orf100	A/G	0,172 (A)	0,308 (A)	9,60E-06	2,14 (1,51 - 3,02)	G
rs2551182	2p	24293921	ITSN2	C/T	0,128 (T)	0,061 (T)	4,75E-05	2,29 (1,54 - 3,39)	T
rs10495747	2p	24368500	ITSN2	C/T	0,149 (C)	0,075 (C)	3,78E-05	2,16 (1,50 - 3,10)	C
rs6550859*	3p	24385419	THRB	A/G	0,390 (G)	0,468 (A)	5,72E-05	1,77 (1,34 - 2,34)	A
rs6804475	3q	113152321	PHLDB2	A/G	0,246 (A)	0,352 (A)	3,22E-05	1,66 (1,30 - 2,12)	G
rs9856948	3q	189240095		C/T	0,419 (C)	0,304 (C)	2,51E-05	1,65 (1,31 - 2,08)	C
rs13079866	3q	196641541	CENTB2	A/G	0,061 (G)	0,131 (G)	2,84E-05	2,33 (1,56 - 3,49)	A
rs11725633	4p	37868359		C/T	0,368 (T)	0,483 (T)	5,57E-05	1,60 (1,28 - 2,00)	C
rs10001582	4q	124578020		A/C	0,364 (A)	0,478 (A)	4,91E-05	1,60 (1,28 - 2,01)	C
rs1464766*	5q	111641241	EPB41L4A	A/G	0,243 (A)	0,372 (A)	4,14E-05	1,84 (1,35 - 2,51)	G
rs4896028	6q	134580872		A/G	0,309 (G)	0,209 (G)	5,35E-05	1,69 (1,32 - 2,18)	G
rs11975187*	7q	153863909	DPP6	A/G	0,490 (A)	0,359 (G)	1,02E-05	1,86 (1,41 - 2,46)	G
rs6986303	8q	134547711	ST3GAL1	A/G	0,309 (A)	0,205 (A)	2,33E-05	1,74 (1,35 - 2,24)	A
rs880013	9p	1425496		C/T	0,474 (T)	0,415 (C)	5,28E-05	1,56 (1,25 - 1,95)	C
rs300639	9p	32776553	LOC401498	C/T	0,067 (T)	0,021 (T)	4,83E-05	3,45 (1,85 - 6,42)	T
rs10992241	9q	93931599		C/T	0,156 (C)	0,262 (C)	5,31E-06	1,92 (1,44 - 2,54)	T
rs1139488	9q	115193721	ALAD	C/T	0,306 (C)	0,418 (C)	2,77E-05	1,63 (1,29 - 2,05)	T
rs1009070*	11p	29484237		A/G	0,106 (G)	0,038 (G)	5,20E-05	3,05 (1,78 - 5,24)	G
rs500629	11q	113550770	ZBTB16	G/T	0,346 (G)	0,241 (G)	3,62E-05	1,66 (1,30 - 2,12)	G
rs7319347*	13q	66977210		C/T	0,072 (C)	0,173 (C)	3,00E-05	2,70 (1,66 - 4,38)	T
rs9300398	13q	96690316	MBNL2	C/T	0,363 (T)	0,252 (T)	1,46E-05	1,69 (1,33 - 2,15)	T
rs4771987	13q	96699391	MBNL2	A/G	0,429 (G)	0,315 (G)	1,88E-05	1,63 (1,30 - 2,05)	G
rs4976846	13q	108619212	MYO16	A/G	0,095 (G)	0,201 (G)	2,92E-07	2,39 (1,71 - 3,34)	A
rs11655206*	17q	72501171		C/T	0,497 (T)	0,361 (T)	5,60E-05	1,74 (1,32 - 2,30)	T
rs3786343	18q	59798875	SERPINB8	C/T	0,458 (T)	0,340 (T)	2,27E-05	1,64 (1,31 - 2,05)	T
rs17817969*	18q	70473226	ZNF407	C/T	0,223 (T)	0,117 (T)	7,16E-06	2,17 (1,51 - 3,11)	T
rs17818946*	18q	70519734	ZNF407	A/G	0,170 (G)	0,082 (G)	3,06E-05	2,30 (1,52 - 3,47)	G
rs4805229	19q	33692043		C/T	0,380 (T)	0,268 (T)	1,34E-05	1,67 (1,32 - 2,12)	T
rs3786939*	19q	44888022	LGALS14	A/G	0,301 (A)	0,184 (A)	5,79E-05	1,91 (1,39 - 2,61)	A
rs6137444	20p	21733639		C/T	0,264 (C)	0,383 (C)	3,11E-06	1,74 (1,37 - 2,21)	T
rs2180439	20p	21801100		C/T	0,292 (C)	0,429 (C)	3,85E-07	1,82 (1,45 - 2,30)	T
rs6075852"	20p	21814151		A/G	0,292 (A)	0,429 (A)	3,50E-07	1,83 (1,45 - 2,31)	G
rs1998076	20p	21828045		A/G	0,282 (A)	0,427 (A)	1,30E-07	1,90 (1,50 - 2,41)	G
rs6137473"	20p	21832693		A/G	0,321 (G)	0,445 (G)	5,58E-06	1,70 (1,35 - 2,13)	A
rs1884592"	20p	21838690		C/T	0,331 (C)	0,454 (C)	8,58E-06	1,68 (1,34 - 2,11)	T
rs6137476"	20p	21845656		A/G	0,331 (A)	0,454 (A)	8,58E-06	1,68 (1,34 - 2,11)	G
rs6047731"	20p	21847141		A/G	0,331 (G)	0,454 (G)	8,58E-06	1,68 (1,34 - 2,11)	A
rs6113424"	20p	21854780		A/G	0,331 (G)	0,455 (G)	7,05E-06	1,69 (1,35 - 2,12)	A
rs2024885"	20p	21865393		A/G	0,331 (A)	0,455 (A)	7,05E-06	1,69 (1,35 - 2,12)	G
rs6035995"	20p	21879683		A/G	0,331 (G)	0,455 (G)	6,97E-06	1,69 (1,35 - 2,13)	A
rs201543"	20p	21894928		A/G	0,331 (A)	0,455 (A)	7,05E-06	1,69 (1,35 - 2,12)	G
rs2207878"	20p	21899847		A/G	0,331 (G)	0,457 (G)	6,19E-06	1,70 (1,35 - 2,13)	A
rs6047768"	20p	21901649		A/G	0,331 (G)	0,457 (G)	6,09E-06	1,70 (1,35 - 2,13)	A
rs6047769"	20p	21906049		A/G	0,333 (A)	0,457 (A)	8,47E-06	1,68 (1,34 - 2,12)	G
rs1555264"	20p	21909410		A/G	0,332 (G)	0,455 (G)	8,64E-06	1,68 (1,34 - 2,11)	A
rs201571	20p	21961514		C/T	0,289 (C)	0,411 (C)	4,31E-06	1,72 (1,36 - 2,17)	T
rs6113491	20p	22005415		A/C	0,359 (C)	0,483 (C)	8,63E-06	1,66 (1,33 - 2,08)	A

Tab. 4.1: GWA Ergebnisse mit allen SNPs des Chr. 20 Locus ($p_{ATT} < 10^{-5}$) und den 30 besten genomweit assoziierten SNPs ($p_{ATT} < 10^{-5}$). Die dbSNP-IDs sowie die chromosomalen Angaben beziehen sich auf die humane Referenzsequenz von März 2006 (hg18, dbSNP126). Der pATT ist nominal. * = SNPs, die sich nur auf dem 550K-Chip befanden und daher nur für 146 Betroffene typisiert wurden; " = für die Replikation getagte SNPs; MAF = Minor Allel Frequency; OR = Odds Ratio; c.i. = Konfidenzintervall.

Tabelle 4.1 zeigt die 30 nominal signifikantesten genomweiten SNPs und alle SNPs am Chr. 20 Locus (21.571.171 bp - 22.321.597 bp) mit einem $p_{ATT} < 10^{-5}$. In der GWA zeigte rs1998076 (Chr. 20, 21.828.045 bp, NCBI build36) mit einem $p_{ATT} = 1,30 \times 10^{-7}$ den niedrigsten p-Wert und rs300639 (Chr. 9, 32.776.553 bp, NCBI build36) das höchste Odds Ratio (OR) mit 3,45 (1,85 - 6,42). Das OR wurde auf Basis des Risikoallels (letzte Spalte Tabelle 4.1) berechnet. Nahezu alle übrigen ORs hatten einen Wert zwischen 1,6 und 2,0.

Durch das „Taggen“ der SNPs mit einem $p_{ATT} < 10^{-5}$ am Chr. 20 Locus konnte die Zahl der in der Replikation zu typisierenden SNPs für diesen Locus von 18 auf 4 reduziert werden. Insgesamt gingen 35 SNPs in die Replikation ein. Im Rahmen des Plexdesigns wurde rs11655206 (Chr. 17, 72.501.171 bp, NCBI build36) durch das Tool PreXTEND der Sequenom RealSNP-Webseite verworfen. Durch die Assay Design 3.1 Software wurden drei Plexe ausgegeben, wobei der letzte Plex nur einen SNP beinhaltet. Aus Effizienzgründen wurde dieser verworfen (rs4805229, Chr. 19, 33.692.043 bp, NCBI build36). Unter den genomweit am besten assoziierten SNPs war kein nicht-synonymer SNP.

In der Replikation wurden 327 von AGA-Betroffene und 240 AGA-Nicht-Betroffene auf der Sequenomplattform mittels Sequenom iPlex Gold genotypisiert. Die gewonnenen Daten wurden einer Qualitätskontrolle unterzogen, wie sie bereits unter 4.2.1 erläutert wurde. Acht Betroffene und sechs Nicht-Betroffene erreichten die individuelle Genotypisierungsrate von 95% nicht und wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die SNPs rs1139488 (Chr. 9, 115.193.721 bp, NCBI build36) und rs4976846 (Chr. 13, 108.619.212 bp, NCBI build36) wurden wegen starker Abweichung vom HWE (HWE p-Wert der Kontrollen $< 0,05$) von der Analyse ausgeschlossen. Im Sequenom-Experiment war rs13079866 (Chr. 3, 196.641.541 bp, NCBI build36) ein Genotypisierungsausfall.

dbSNP ID	Chr.	Position [bp]	Allele	MAF Betroffene	MAF Kontrollen	pATT nom.	pATT corr.	OR (95% c.i.)	Risiko Allel Replikation	Risiko Allel GWA
rs10992241	9q	93931599	C/T	0,289 (C)	0,201 (C)	8,68E-04	2,78E-02	0,62 (0,46 - 0,82)	C	T
rs6137444	20p	21733639	C/T	0,277 (C)	0,404 (C)	1,57E-05	5,01E-04	1,76 (1,37 - 2,27)	T	T
rs2180439	20p	21801100	C/T	0,303 (C)	0,485 (C)	1,37E-09	4,39E-08	2,17 (1,70 - 2,78)	T	T
rs1998076	20p	21828045	A/G	0,301 (A)	0,479 (A)	3,69E-09	1,18E-07	2,13 (1,66 - 2,73)	G	G
rs201571	20p	21961514	C/T	0,314 (C)	0,483 (C)	2,21E-08	7,08E-07	2,05 (1,60 - 2,62)	T	T
rs6113491	20p	22005415	A/C	0,364 (C)	0,447 (A)	8,13E-10	2,60E-08	2,17 (1,70 - 2,77)	A	A

Tab. 4.2: SNPs, die in der Replikation signifikante Assoziation zeigten. pATT nom. = nominaler pATT; pATT corr. = nach Bonferroni für 32 genotypisierte SNPs korrigierter pATT.

Tabelle 4.2 zeigt die replizierten Assoziationen aus der GWA (Übersicht aller SNPs der Replikation in Anhang III). Als repliziert wurden SNPs angesehen, die einen $p_{ATT} < 0,05$ erreichten. Von den 32 erfolgreich genotypisierten SNPs der Replikation wiesen 6 SNPs hochsignifikante Assoziationen auf. Darunter waren alle 5 SNPs aus der getaggten Chr. 20 Region der GWA. Die stärkste Assoziation zeigte rs6113491 mit einem nominalen pATT von $8,13 \times 10^{-10}$, der wie alle

übrigen replizierten Assoziationen einer Korrektur nach Bonferroni standhielt (p_{ATT} von $2,6 \times 10^{-8}$). Hierbei wurde für 32 SNPs korrigiert.

Das OR wurde in der Replikation auf Basis des GWA-Risikoallels berechnet. Für alle abermals signifikant assoziierten SNPs der Chr. 20 Region blieb das Risikoallel in der Replikation dasselbe. Das OR der 5 SNPs auf Chr. 20 war durchweg leicht erhöht und schwankte von 1,76 (rs6137444) bis 2,17 (rs6113491 und rs2180439). Für rs10992241 (Chr. 9) konnte das Risikoallel durch einen deutlichen Frequenzunterschied zur GWA nicht repliziert werden. Dies spiegelte sich auch im OR wider, welches jetzt unter 1 lag.

Neben der nicht familienbasierten Replikation wurde noch ein Transmission-Disequilibrium-Test (TDT) mit 352 informativen AGA-Familien (352 Väter und 352 Mütter mit 491 betroffenen Kindern) für die 6 replizierten Assoziationen durchgeführt. Die Callrate aller genotypisierten Probanden lag bei $\geq 95\%$. Drei AGA-Familien wurden wegen Mendel-Inkonsistenzen ausgeschlossen.

dbSNP ID	Chr.	Position [bp]	Allele	Chi ² -TDT	pChi ² nom.	pChi ² corr.	OR (95% c.i.)	Risiko Allel TDT	Risiko Allel GWA
rs10992241	9q	93931599	C/T	1,73	0,19	1,13	1,15 (0,93 - 1,43)	T	T
rs6137444	20p	21733639	C/T	12,19	4,79E-04	2,88E-03	1,40 (1,16 - 1,69)	T	T
rs2180439	20p	21801100	C/T	24,55	7,22E-07	4,33E-06	1,61 (1,33 - 1,95)	T	T
rs1998076	20p	21828045	A/G	22,73	1,87E-06	1,12E-05	1,59 (1,31 - 1,92)	G	G
rs201571	20p	21961514	C/T	19,01	1,30E-05	7,79E-05	1,54 (1,26 - 1,86)	T	T
rs6113491	20p	22005415	A/C	18,76	1,48E-05	8,88E-05	1,49 (1,24 - 1,79)	A	A

Tab. 4.3: SNPs, die im TDT signifikante Assoziation zeigten. pChi² nom. = nominaler pChi²; pChi² corr. = nach Bonferroni für 6 genotypisierte SNPs korrigierter pChi².

In Tabelle 4.3 sind die Analysedaten nach TDT-Analyse zu sehen. Alle Assoziationen des Chr. 20 Locus konnten auch hier repliziert werden. Die p-Werte der Assoziation waren weniger signifikant als in der nicht familienbasierten Replikation und erreichten nominale p-Werte von $7,22 \times 10^{-7}$ (rs2180439) bis $4,79 \times 10^{-4}$ (rs6137444). Für 6 SNPs hielten diese Assoziationen einer Bonferroni-Korrektur stand. Das OR, welches auch hier auf dem Risikoallel der GWA beruhte, war ebenfalls etwas geringer und erreichte Werte zwischen 1,40 (rs6137444) und 1,61 (rs2180439). Der SNP rs10992241 auf Chr. 9 erreichte in dieser familienbasierten Replikation keinen signifikanten p-Wert mehr.

Für eine abschließende Gegenüberstellung wurden alle genotypisierten Kollektive in verschiedenen Konstellationen zueinander analysiert. Dies geschah auf Basis der 6 in der Replikation assoziierten SNPs. Alle weiteren Analysen beziehen sich auf erfolgreich genotypisierte Individuen (Callrate $\geq 95\%$) in Abhängigkeit von der Anzahl der zum Teil bereits im Vorfeld betrachteten SNPs.

A

nominaler pATT-Wertvergleich über alle Kollektivkonstellationen

dbSNP ID	Betroffene Replikation vs Universalkontrollen ¹	Betroffene gesamt vs Universalkontrollen ²	Betroffene GWA vs Universalkontrollen ³	Betroffene Replikation vs Nicht-Betroffene ⁴	Betroffene gesamt vs Nicht-Betroffene ⁵	Betroffene GWA vs Nicht-Betroffene ⁶
rs10992241	0,29	0,10	5,31E-06	8,68E-04	0,25	0,06
rs6137444	5,16E-05	1,21E-07	3,11E-06	1,57E-05	6,78E-08	5,92E-07
rs2180439	1,95E-06	2,48E-09	3,85E-07	1,37E-09	3,39E-13	1,66E-10
rs1998076	1,98E-06	3,02E-09	1,30E-07	3,69E-09	1,53E-12	5,82E-10
rs201571	1,91E-04	4,12E-07	4,31E-06	2,21E-08	1,28E-12	4,16E-11
rs6113491	9,05E-06	5,49E-08	8,63E-06	8,13E-10	2,91E-13	1,81E-10

B

Odds Ratio (95% c.i.) Vergleich über alle Kollektivkonstellationen

dbSNP ID	Betroffene Replikation vs Universalkontrollen ¹	Betroffene gesamt vs Universalkontrollen ²	Betroffene GWA vs Universalkontrollen ³	Betroffene Replikation vs Nicht-Betroffene ⁴	Betroffene gesamt vs Nicht-Betroffene ⁵	Betroffene GWA vs Nicht-Betroffene ⁶
rs10992241	1,14 (0,89 - 1,45)	1,20 (0,97 - 1,49)	1,92 (1,44 - 2,54)	0,62 (0,46 - 0,82)	1,17 (0,90 - 1,52)	1,36 (0,98 - 1,87)
rs6137444	1,60 (1,27 - 2,02)	1,70 (1,39 - 2,08)	1,74 (1,37 - 2,21)	1,76 (1,37 - 2,27)	1,85 (1,48 - 2,32)	2,00 (1,53 - 2,61)
rs2180439	1,73 (1,38 - 2,16)	1,81 (1,49 - 2,20)	1,82 (1,45 - 2,30)	2,17 (1,70 - 2,78)	2,27 (1,82 - 2,83)	2,41 (1,85 - 3,12)
rs1998076	1,73 (1,38 - 2,17)	1,81 (1,48 - 2,20)	1,90 (1,50 - 2,41)	2,13 (1,66 - 2,73)	2,22 (1,78 - 2,77)	2,35 (1,81 - 3,05)
rs201571	1,54 (1,23 - 1,93)	1,66 (1,36 - 2,02)	1,72 (1,36 - 2,17)	2,05 (1,60 - 2,62)	2,21 (1,77 - 2,75)	2,41 (1,85 - 3,12)
rs6113491	1,66 (1,33 - 2,07)	1,69 (1,40 - 2,05)	1,66 (1,33 - 2,08)	2,17 (1,70 - 2,77)	2,22 (1,79 - 2,76)	2,28 (1,77 - 2,94)

Tab. 4.4 A & B: Nominaler pATT- (A) und OR-Wertvergleich (Konfidenzintervall 95%) (B) über verschiedene Samplekonstellationen hinweg.

1 = 320 Betroffene aus Replikationssample gegen 342 Universalkontrollen, basierend auf 6 SNP-Callrate.

2 = 590 Betroffene (aus GWA und Replikation) gegen 342 Universalkontrollen, basierend auf 6 SNP-Callrate.

3 = 296 Betroffene aus GWA gegen 342 Universalkontrollen, basierend auf 561.466 SNP-Callrate.

4 = 319 Betroffene aus Replikationssample gegen 234 ANA-Ks, basierend auf 32 SNP-Callrate.

5 = 590 Betroffene (aus GWA und Replikation) gegen 235 ANA-Ks, basierend auf 6 SNP-Callrate.

6 = 270 Betroffene aus GWA gegen 235 ANA-Ks, basierend auf 6 SNP-Callrate.

Tabelle 4.4 gibt einen Überblick über verschiedene Kollektivzusammensetzungen im Hinblick auf nominale pATT-Werte (A) und OR (B) (basierend auf dem Risikoallel der GWA). Die vergleichenden Kollektive beschreiben von links nach rechts einen Gradienten bezüglich der Haarlosigkeit. Links werden die Betroffenen ohne die am stärksten Betroffenen gegen die populationsbasierten Universalkontrollen verglichen, rechts werden die extrem stark Betroffenen mit den Nicht-Betroffenen verglichen. Der SNP rs10992241 zeigte nur im Vergleich Betroffene GWA gegen Universalkontrollen und Betroffene Replikation gegen Nicht-Betroffene p-Werte $< 0,05$ auf (A). Das OR (B) dieses SNP erreichte in diesen Konstellationen seine Extremwerte (von 0,62 und 1,92), die mit ihren 95% Konfidenzintervallen nicht die 1 umschlossen. In allen übrigen Betrachtungen umschloss das Konfidenzintervall des ORs den Wert 1.

Die 5 SNPs am Chr. 20 Locus wiesen über alle Konstellationen hinweg hoch signifikante pATT-Werte auf (A). Dabei war die Assoziation am stärksten, wenn Betroffene gegen Nicht-Betroffene

verglichen wurden. Hier wurde ein p-Werte von $2,91 \times 10^{-13}$ erreicht (rs6113491, 590 Betroffene gegen 235 Nicht-Betroffene). Die höchsten p-Werte wurden dagegen in der Konstellation „Betroffene Replikation vs. Universalkontrollen“ mit pATT-Werten von $1,91 \times 10^{-4}$ bis $1,95 \times 10^{-6}$ erzielt. Das OR (B) spiegelte diesen Trend ebenfalls wider und lag bis auf zwei Ausnahmen für rs6137444 in allen Konstellationen „Betroffene vs. Nicht-Betroffene“ durchweg bei ≥ 2 . Bei der Gegenüberstellung von Betroffenen gegen Universalkontrollen wurde ein OR von maximal 1,90 (rs1998076) erreicht und zeigte die insgesamt geringsten Werte in der Gegenüberstellung von „Betroffene Replikation vs. Universalkontrollen“.

Aufgrund der signifikanten Assoziation am Chr. 20 Locus wurde eine Haplotypanalyse durchgeführt. In dieser wurden alle vorkommenden Haplotypen der 5 Chr. 20 SNPs analysiert. In diese Analyse wurden alle Betroffenen (590) und alle Nicht-Betroffenen (235) einbezogen.

Locus	rs6137444	rs2180439	rs1998076	rs201571	rs6113491	Risiko Haplotyp	Frequenz Betroffene	Frequenz Nicht-Betroffene	pChi ² nom.	pChi ² corr.*
H1	X	X				TT	0,674	0,504	1,51E-10	3,01E-09
H2	X		X			TG	0,673	0,504	1,53E-10	3,05E-09
H3	X			X		TT	0,615	0,436	3,55E-11	7,10E-10
H4	X				X	TA	0,565	0,384	3,15E-11	6,31E-10
H5		X	X			TG	0,709	0,520	3,76E-13	7,52E-12
H6		X		X		TT	0,645	0,443	4,92E-14	9,85E-13
H7		X			X	TA	0,595	0,393	9,92E-14	1,98E-12
H8			X	X		GT	0,645	0,447	1,59E-13	3,18E-12
H9			X		X	GA	0,595	0,397	3,16E-13	6,33E-12
H10				X	X	TA	0,641	0,447	4,84E-13	9,69E-12
H11	X	X	X			TTG	0,674	0,508	3,13E-10	6,27E-09
H12	X	X		X		TTT	0,613	0,433	3,51E-11	7,03E-10
H13	X	X			X	TTA	0,563	0,385	8,35E-11	1,67E-09
H14		X	X	X		TGT	0,646	0,446	1,02E-13	2,04E-12
H15		X	X		X	TGA	0,596	0,395	1,79E-13	3,57E-12
H16			X	X	X	GTA	0,596	0,397	2,71E-13	5,42E-12
H17	X	X	X	X		TTGT	0,613	0,436	6,63E-11	1,33E-09
H18	X	X	X		X	TTGA	0,564	0,388	1,39E-10	2,79E-09
H19		X	X	X	X	TGTA	0,596	0,395	1,59E-13	3,18E-12
H20	X	X	X	X	X	TTGTA	0,564	0,388	1,34E-10	2,68E-09

Tab. 4.5: Haplotypanalyse. * = Bonferronikorrektur für 20 Analysen. Die SNPs sind analog zu ihrer chromosomalen Position aufgeführt.

Die Haplotypanalyse dargestellt in Tabelle 4.5 listet alle möglichen SNP-Konstellationen auf Chr. 20 mit den zugehörigen pChi²-Werten auf. Alle Haplotypkonstellationen hielten einer Korrektur nach Bonferroni stand, das heißt sie wiesen auch nach Korrektur hochsignifikante Assoziationen mit p-Werten von $6,27 \times 10^{-9}$ bis $9,85 \times 10^{-13}$ auf. Der p-Chi² von $9,85 \times 10^{-13}$ wurde bei dem Haplotyp „H6“ (rs2180439 und rs201571) beobachtet, der Signifikanzunterschied war jedoch nur marginal verschieden im Vergleich mit einer Vielzahl weiterer Haplotypen.

4.2.3 Resequenzierung der genomischen Sequenzen von „Kojak“ und „Charlie-B“

Zur Identifizierung der potenziell kausalen Variante(n) am Chr. 20 Locus wurden die transkribierten Sequenzen der beiden ESTs „Kojak“ und „Charlie-B“ sequenziert. Dazu wurden die auf der NCBI-Webseite abgelegten Sequenzen der jeweiligen Exons durch flankierende Primer in 84 Universalkontrollen amplifiziert und anschließend mit dem Kapillar-Sequenzierer sequenziert. Die Exons wurden dazu vom Poly-A-Signal ausgehend rückwärts alphabetisch benannt (Exon „Z“, Exon „Y“, Exon „X“, Exon „W“). Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit der Software Chromas und SeqMan II.

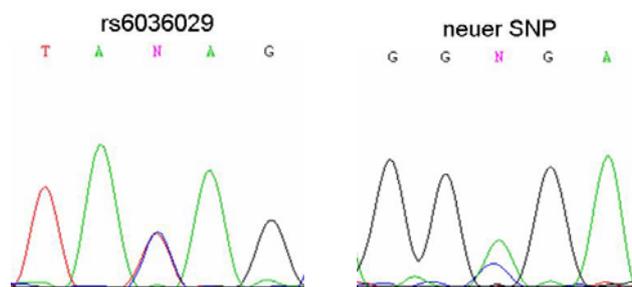


Abb. 4.10: Sequenzierungsergebnisse. Dargestellt sind die identifizierten Varianten.

Abbildung 4.10 zeigt die gefundenen genetischen Varianten. Beide Polymorphismen wurden in Exon „X“ von „Charlie-B“ gefunden. Bei dem ersten SNP handelte es sich um einen bereits annotierten T/C-Austausch mit der Bezeichnung rs6036029 (Chr. 20, 21.997.177 bp, NCBI build36). Dieser fand sich bei 43 der 84 Universalkontrollen (51%), was sich mit der angegebenen Frequenz bei NCBI deckte.

Der zweite SNP wurde in einer einzigen Kontrollperson (weiblich) gefunden. Bei diesem SNP handelte es sich um einen A/C-Austausch (Chr. 20, 21.997.224 bp, NCBI build36), der bisher noch nicht in der NCBI-Datenbank abgelegt wurde.

4.2.4 Expressionsanalyse der Kandidatengene *PAX1*, „Kojak“ und „Charlie-B“

Basierend auf den Assoziationsbefunden am Chr. 20 Locus war unklar, welches der drei Transkripte (*PAX1*, „Kojak“ oder „Charlie-B“) den Beitrag zur Entstehung der AGA leistet. Ein Anhaltspunkt kann in solchen Situationen die Analyse der gewebespezifischen Expression liefern. Man erwartet von einem zur Haarlosigkeit beitragenden Gen eine Expression in der (Kopf)-Haut oder im Haarschaft. Aus diesem Grund wurde eine quantitative Expressionsanalyse der drei Transkripte mit verschiedenen humanen Geweben mittels TaqMan durchgeführt. Hierzu wurden die kommerziell erwerblichen Human Multiple-Tissue cDNA (MTC) Panels I, II sowie das Human Fetal MTC™ Panel (Takara Bio Europe/Clontech) und selbst extrahierte RNA aus Haut, Kopfhaut und Haarschaft verwendet. Die gewebespezifischen Expressionen der drei Kandidaten

wurden mit der endogenen Kontrolle Cyclophilin normalisiert. Die Expressionen wurden als Einzelbestimmungen ermittelt.

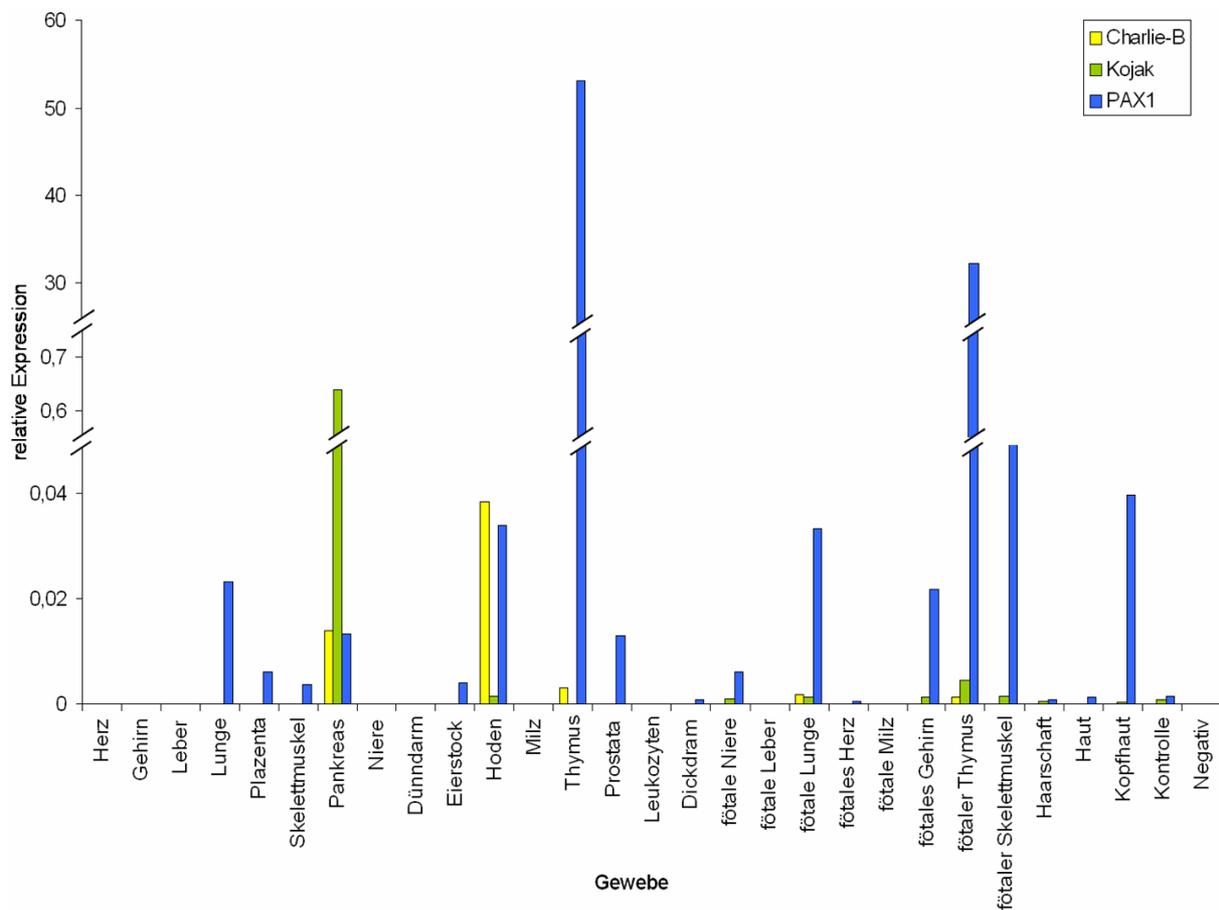


Abb. 4.11: Gewebespezifische Expressionsanalyse. Auf der X-Achse sind die unterschiedlichen humanen Gewebe aufgeführt, die Y-Achse gibt die relativen Expressionswerte wieder.

In Abbildung 4.11 sind die Ergebnisse der gewebespezifischen Expressionen für *PAX1*, „Kojak“ und „Charlie-B“ dargestellt. Die relative Expression dieser Transkripte in den untersuchten Geweben war sehr unterschiedlich. Die stärkste Expression für *PAX1* wurde in Thymus gefunden, wo ein relativer Expressionswert von über 50 (bzw. über 30 in fötalem Thymus) beobachtet wurde. „Kojak“ zeigte eine schwächere relative Expression von rund 0,6 in Pankreas. „Charlie-B“ zeigte die stärkste Expression im Hoden mit einem relativen Expressionswert von rund 0,04. In unseren eigenen cDNAs aus Haarschaft, Haut und Kopfhaut zeigte nur *PAX1* eine nennenswerte Expression in Kopfhaut. Hier erreichte die relative Expression einen Wert von rund 0,04.

5. DISKUSSION

5.1 Die Suche nach genetischen Ursachen für komplex vererbte Erkrankungen und die Bedeutung des AR-Locus für die AGA

Die Humangenetik verfolgt das Ziel, die Ursachen von Erkrankungen auf genetischer Ebene zu erforschen. Insbesondere bei familiärer Häufung einer Krankheit kann von einem genetischen Hintergrund ausgegangen werden. Zur Identifizierung der genetischen Ursachen bedient man sich zytogenetischer und molekulargenetischer Methoden. Bei vielen monogenen Erkrankungen sind die genetischen Ursachen mittlerweile bekannt. Bei genetisch komplexen Erkrankungen wie z.B. der AGA gestaltet sich die Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen oder Loci jedoch schwieriger: Eine unbekannte Zahl von Genen trägt unterschiedlich stark zur Erkrankung bei.

Der Identifizierung und Lokalisierung kausaler genetischer Faktoren bei komplexen Erkrankungen wird im Rahmen der genetischen Epidemiologie nachgegangen, die ein Schwerpunkt der humangenetischen Forschung ist. Dies ist nur mit entsprechend großen Patientenkollektiven und geeigneten Methoden möglich. In der molekulargenetischen Forschung bedient man sich diesbezüglich Kopplungs- und Assoziationsuntersuchungen. Greenberg (1993) unterscheidet bei komplexen Erkrankungen zwischen Loci, die für die Krankheitsentstehung unbedingt notwendig sind und Loci, die das Risiko (Empfänglichkeit) für die Krankheitsentstehung erhöhen, jedoch nicht unbedingt notwendig für die Entwicklung der Erkrankung sind. Kopplungsuntersuchungen sind zur Detektion notwendiger Loci ideal, zur Identifizierung von Empfänglichkeits-Loci allerdings weniger gut geeignet. Dies gilt insbesondere dann, wenn das assoziierte Allel nur einen begrenzten Beitrag zur Krankheitsentstehung leistet. Zur Identifizierung solcher Gene in einem komplexen Zusammenhang haben sich Assoziationsuntersuchungen als eine effektive Strategie erwiesen (Risch & Merikangas, 1996; Ackerman et al., 2005; Becker, 2007). In der jüngsten Zeit haben chipbasierte genomweite Assoziationsuntersuchungen (GWAs) bei komplexen Erkrankungen zur Identifizierung neuer krankheitsrelevanter Gene bzw. Loci geführt, so z.B. bei Untersuchungen zu dem nicht insulinabhängigen Diabetes mellitus Typ II (Sladek et al., 2007; Steinthorsdottir et al., 2007) oder zur rheumatoiden Arthritis (Plenge et al., 2007). Das „Wellcome Trust Case Control Consortium“ (2007) publizierte die bisher umfassendste GWA-Studie, in der sieben Volkserkrankungen untersucht wurden. Insgesamt wurden 14.000 von einer der Erkrankungen Betroffene (~2.000 pro Erkrankung) und rund 3.000 Kontrollen analysiert. Hierbei konnten insgesamt 24 unabhängige nominal signifikante Assoziationssignale ($p < 5 \times 10^{-7}$) in sechs der Erkrankungen identifiziert werden: Jeweils eine für bipolare affektive Störung und koronare Herzer-

krankungen, jeweils drei für rheumatoide Arthritis und Typ II Diabetes, sieben für Typ I Diabetes und neun für den Morbus Crohn. Zudem wurden noch weitere 58 SNPs mit p-Werten zwischen 10^{-5} und 10^{-7} identifiziert, die Hinweise auf weitere Suszeptibilitätsloci geben. In dieser Studie erreichten diese jedoch nicht die gewählte Signifikanzschwelle von $p < 5 \times 10^{-7}$.

Varianten der DNA-Sequenz, die in Assoziationsuntersuchungen getestet werden, können in kodierenden oder regulatorischen Bereichen von Krankheitsgenen liegen. Sie können entweder über die veränderte Aminosäuresequenz für ein funktionell verändertes Protein verantwortlich sein oder über Varianten in den regulatorischen Sequenzen (z.B. Promotor- oder Enhancerbereiche, 3'-UTRs oder Erkennungsstellen für das Spleißen) den Grad der Expression oder das Spleißmuster verändern. Nicht-kodierende und nicht-regulatorische Varianten stehen in der Regel mit der kausalen Variante im Kopplungsungleichgewicht, d.h. zwischen der assoziierten und der kausalen Variante haben nur selten Rekombinationen stattgefunden. Dadurch wird die kausale Variante indirekt identifiziert. Sie darf hierbei jedoch nicht unabhängig bei verschiedenen Personen durch Neumutation entstanden sein. Hierdurch wäre das Kopplungsungleichgewicht zwischen assoziierter und kausaler Variante so „unperfekt“, dass die kausale Variante nicht mehr identifiziert werden könnte. Falschpositive Befunde können in einer Assoziationsuntersuchung nicht ausgeschlossen werden. Diese kommen zumeist durch Zufall (besonders bei zu kleinen Untersuchungskollektiven) oder durch populationsspezifische Stratifikationseffekte zustande und können meist in einer unabhängigen Replikation identifiziert werden.

Durch unsere Arbeitsgruppe wurde die bislang einzige genomweite Kopplungsuntersuchung für die AGA durchgeführt (Hillmer et al., 2008). Hierbei konnten genomweit 14 Kopplungsregionen identifiziert werden. Unter ihnen zeigte der *AR*-Locus auf Xq11-q12 die stärkste Kopplung (NPL-Score = 2,67; p-Wert = 0,0039). Der Kopplungsbefund bestätigt die große Bedeutung des *AR*-Locus für die AGA.

In unabhängigen Studien wurden Assoziationen zwischen Varianten im kodierenden Bereich des *AR* und der AGA beschrieben. So publizierten Sawaya und Shalita bereits 1998 die erste Assoziation hinsichtlich des CAG-Repeats in Exon 1 des *AR* und der AGA. Wenige Jahre später fanden Ellis et al. (2001) eine Assoziation zwischen AGA und einer Kombination von kurzen CAG- und GGN-Repeats (p-Wert = 0,03) sowie eine Assoziation mit rs6152 (p-Wert = 4×10^{-6}) jeweils in Exon 1 des *AR*. Letzterer konnte in drei unabhängigen Analysen bestätigt werden (Hayes et al., 2005; Levy-Nissenbaum et al., 2005; Hillmer et al., 2005). In den Assoziationsuntersuchungen unserer Arbeitsgruppe am *AR*-Locus (Hillmer et al., 2005) wurden neben rs6152 zusätzlich 38 SNPs und 3 Längenpolymorphismen untersucht. Davon zeigten sich Marker in einem Bereich von einem Mb 5' bis 0,35 Mb 3' vom *AR*-Start-Codon mit p-Werten bis zu 1×10^{-12} hochsignifikant assoziiert. In diesem genomischen Abschnitt befindet sich neben dem *AR* ein weiteres be-

kanntes Gen, *XEDAR* (X-linked ectodysplasin A2 isoform receptor). *XEDAR* liegt randständig am centromerischen Ende in einem Bereich, in dem die Signifikanz der Assoziation deutlich nachließ. Es zeigte sich zudem extrem schwach in Haarschäften des Follikels exprimiert (unveröffentlichte Daten). Es ist daher unwahrscheinlich, dass *XEDAR* das für die Entstehung von AGA verantwortliche Gen dieses Locus darstellt. Von den untersuchten Markern ändert nur der CAG- und GGN-Repeat die Proteinstruktur des AR, wobei in unserer Studie nur der GGN-Repeat eine Assoziation mit der AGA aufwies. Der CAG-Repeat schied somit für die AGA als funktionell relevante Variante aus. Ellis et al. (2007) konnten kürzlich die Assoziation mit dem GGN-Repeat in einem australischen Kollektiv nicht replizieren. Sinclair et al. (2007) fanden bei Personen mit Kennedy-Syndrom (verlängerter CAG-Repeat) ein verringertes Risiko zur Entwicklung einer AGA. Der AR ist mit seinen signifikanten Assoziationsbefunden unzweifelhaft das erste AGA-Gen, umstritten ist jedoch, welche Rolle den kodierenden Varianten zufällt.

Durch die Sequenzierung der kodierenden Sequenz, der Exon-Intron-Übergänge, des Promotors und Teilen des 3'-UTRs des AR von Betroffenen mit assoziiertem Haplotyp und Nicht-Betroffenen mit nicht assoziiertem Haplotyp konnte durch Hillmer et al. (2005) keine Mutation mit kausaler Bedeutung für die AGA gefunden werden. Veränderungen des AR mit funktioneller Relevanz können daher am ehesten den polymorphen CAG- und GGN-Repeats zugewiesen werden. Der CAG-Repeat war bereits Gegenstand vieler funktioneller Untersuchungen, die alle darauf hindeuten, dass ein langer CAG-Repeat zu einer verminderten AR-Transaktivierungseigenschaft führt (Mhatre et al., 1993; Chamberlain et al., 1994; Kazemi-Esfarjani et al., 1995; Gao et al., 1996; Nakajima et al., 1996; Buchanan et al., 2004; Wang et al., 2004; Ding et al., 2004). Sinclair et al. (2007) zeigten ein verringertes Risiko für die Entwicklung einer AGA bei Männern mit Kennedy-Syndrom (> 40 CAG Repeats). Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass zur Entwicklung einer AGA eine erhöhte AR-Transaktivierungseigenschaft vorliegen muss. Eine replizierbare Assoziation zwischen AGA und dem CAG-Repeat liegt jedoch nicht vor.

5.2 Einfluss des polymorphen GGN-Repeats auf die Expression, Funktion und Stabilität des AR

Der GGN-Repeat liegt in der N-terminalen, transaktivierenden Domäne des AR und könnte damit - ebenso wie der CAG-Repeat - die Funktion des AR-Proteins beeinflussen und einen Beitrag zur Entwicklung der AGA leisten. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war der GGN-Repeat die einzige potentiell funktionelle Variante im AR, die mit AGA assoziiert war. Ein Ziel dieser Arbeit war daher ein funktioneller Vergleich des assoziierten GGN23 mit dem bei Nicht-Betroffenen häufigeren GGN24 (Hillmer et al., 2005). Die Genotypisierung von Blutspenderkontrollen-DNAs für den polymorphen GGN-Repeat ermöglichte es, die populationsspezifische Frequenzverteilung verschiedener GGN-Allele zu ermitteln. Dazu wurden 188 männliche deutschstämmige Blutspenderkontrollen genotypisiert. Es zeigte sich, dass die Allele GGN23 (49,5%) und GGN24 (36,7%) in der Bevölkerung am häufigsten vorliegen. Zusammen machen sie 86,2% der gefundenen Allele aus. Als kürzeste GGN-Repeatlänge wurden GGN10, als längste GGN27 detektiert. Dieses Ergebnis deckt sich mit denen anderer Untersuchungen, womit GGN23 und GGN24 in der europäischen Bevölkerung am häufigsten gesehen werden können (Lumbroso et al., 1997; Aschim et al., 2004; Hillmer et al., 2005; Lundin et al., 2003). Für die funktionelle Untersuchung verschiedener GGN-Repeats sollten daher neben dem Risikoallel GGN23 und dem protektiven Allel GGN24 die extremen Allele GGN10 und GGN27 untersucht werden. Für den GGN-Repeat sind erst wenige funktionelle Studien publiziert. Sie zeigten für verschiedene Repeatlängen einen Einfluss auf die AR-Transaktivierung (Gao et al., 1996; Ding et al., 2005; Werner et al., 2006), untersuchten jedoch nicht die beiden häufigsten Repeatlängen der europäischen Bevölkerung (GGN23 und GGN24) (Aschim et al., 2004; Hillmer et al., 2005; Lundin et al., 2007). Eben diesen beiden Repeatlängen konnten schon unterschiedliche Effekte in Assoziationsstudien zugeschrieben werden (Ellis et al., 2001; Aschim et al., 2004; Ferlin et al., 2004; Hillmer et al., 2005). Eine erste funktionelle Untersuchung mit den Repeatlängen GGN23 und GGN24 wurde erst kürzlich durch Lundin et al. (2007) publiziert.

Zur Untersuchung, inwieweit der GGN-Repeat eine funktionelle Variante darstellen könnte, haben wir die Eigenschaften von ARs mit den GGN-Repeatlängen 10, 23, 24 und 27 in HeLa-Zellen verglichen (Brockschmidt et al., 2007). Die transaktivierende Eigenschaft des AR wurde hierbei durch Zugabe von DHT ins Kulturmedium induziert und indirekt über die Luziferaseaktivität des AR-responsiven Reporterplasmids Gre2-Luc gemessen. In Abwesenheit von DHT konnte keine Luziferaseaktivität detektiert werden, womit sichergestellt war, dass kein endogener AR die Messungen beeinflusste. In Gegenwart von DHT zeigte sich, dass mit zunehmender GGN-Repeatlänge die AR-Transaktivierungseigenschaft zunahm, so dass sie bei GGN27 am

größten war. Diese Beobachtung deckte sich mit der Feststellung von Gao et al. (1996), die bei deletiertem GGN-Repeat des AR eine verminderte Transaktivierungseigenschaft gegenüber einem GGN von 23 Repeats zeigten. Diese Tendenz wurde auch in der Arbeit von Werner et al. (2006) festgestellt, in der die AR-Transaktivierungseigenschaft von deletiertem GGN-Repeat über GGN10, GGN16 bis hin zu GGN25 zunahm. Ding et al. (2005) dagegen berichteten in ihrer Untersuchung von GGN19 bis GGN23 von einer inversen Korrelation zwischen Transaktivierungseigenschaft und GGN-Repeatlänge. Lundin et al. (2007), die GGN10, -23, -24 und -27 funktionell untersuchten, fanden die größte AR-Transaktivierungseigenschaft für den GGN23. GGN10, -24 und -27 wiesen verminderte AR-Transaktivierungseigenschaften auf. Die Ergebnisse waren jedoch über fünf verschiedene Hormonkonzentrationen hinweg (0 - 100 mM DHT) nicht konsistent: Bei einer Konzentration von 0,1 mM DHT wies nicht GGN23 sondern GGN24 die größte AR-Transaktivierungseigenschaft auf. Die Ergebnisse von Lundin et al. (2007) unterschieden sich zudem grundlegend von unseren, da GGN23 in unseren Untersuchungen immer eine geringere Transaktivierungseigenschaft als GGN27 aufwies. Unter Verwendung des synthetischen Androgens Methyltrienolon (R1881) anstelle von DHT, welches einen stabilisierenden Effekt auf das AR-Protein bewirkt (Ding et al., 2005) bzw. eine stabilere Bindung als DHT zum AR-Protein aufweist (Lundin et al., 2007), zeigte sich eine noch inkonsistentere AR-Transaktivierungseigenschaft bei Lundin et al. (2007), auch wenn über alle R1881-Konzentrationen hinweg stets GGN23 die größte Transaktivierung aufwies. GGN10, -24 und -27 zeigten kein konsistentes Bild. In unseren Versuchen wurde nicht mit R1881 gearbeitet, die Ergebnisse aller Einzelversuche zeigten jedoch unter Verwendung von DHT ein konsistentes Bild. Der p-Wert von $p = 3 \times 10^{-6}$ über alle GGN-Repeatlängen in Gegenwart von DHT in unserer Untersuchung zeigte, dass ein signifikanter Transaktivierungsunterschied zwischen den GGN-Allelen vorliegt. Besonders auffällig war in unseren Analysen der nicht lineare AR-Transaktivierungsunterschied zwischen den untersuchten GGN-Repeatlängen. Zwischen GGN23 und GGN24 lag bei nur einem GGN Unterschied bereits eine 1,3-fach stärkere Transaktivierung vor, während sich zwischen GGN10 und GGN23 bei 13 Repeats Unterschied eine nur 1,5-fache Verstärkung zeigte. Es scheint, dass sich eine funktionelle Veränderung des AR nicht kontinuierlich mit jedem zusätzlichen GGN-Repeat verändert, sondern dass ein funktioneller Sprung zwischen dem GGN23 und GGN24 liegt. Ein solcher Sprung ist - wenn auch mit umgekehrtem Effekt - ebenfalls durch Lundin et al. (2007) gezeigt worden. Insbesondere bei allen R1881-Konzentrationen war er zwischen GGN23 und GGN24 sehr ausgeprägt ($\geq 44\%$ geringere AR-Transaktivierungseigenschaft von GGN24). In beiden Studien war der GGN-Repeatlängen-abhängige AR-Transaktivierungsunterschied zwischen GGN23 und GGN24 am deutlichsten. Für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien können unterschiedliche Ver-

suchsparameter eine Erklärung sein: Lundin et al. (2007) und Ding et al. (2005) verwendeten beide in ihren Untersuchungen ein Plasmid mit CMV Promotor zur Expression des AR und ein prostataspezifisches Antigenpromotor Reporterplasmid (pGL3). Bei dem von uns verwendeten Plasmid (pSG5-AR) wird der AR in Abhängigkeit vom SV40 Promotor exprimiert und mit einem SV40-Polyadenylationssignal versehen. Als Reporterplasmid verwendeten wir pGRE2-Luc, welches über zwei Glukokortikoid- (Androgen-) responsive Elemente verfügt. Für diese konnte eine sehr gute Androgenresponsivität gezeigt werden (Alléra et al., 1998). Während Ding et al. (2005) mit DU145-Zellen arbeiteten (Prostatakarzinom-Zelllinie) und Lundin et al. (2007) COS-1-Zellen (Nierenzellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze) verwendeten, arbeiteten wir mit HeLa-Zellen (humane Cervix-Karzinom-Zellen). Das pGL3-Reporterplasmid ist insbesondere bei Verwendung mit COS-1-Zellen hochvariabel in seiner Kopienzahl, was zu einer zusätzlichen Expression des Reportergens führen kann (Promega Technical Manual, pGL3 Luciferase Reporter Vectors, Part# TM033, 01/07, www.promega.com). Hierdurch kann das Ergebnis von Lundin et al. (2007) beeinflusst worden sein, auch wenn dieser Umstand nicht die erhöhte AR-Transaktivierungseigenschaft von GGN23 erklärt. Zudem implizieren die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien auch, dass unterschiedliche Zellsysteme mit verschiedenen Umweltbedingungen und andersartigen AR-responsiven Promotoren zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen können (Simon & Mueller, 2006). Es ist denkbar, dass in einem Zellsystem ein co-Faktor exprimiert wird, der spezifisch an den vom GGN-Repeat kodierten Polyglycinrepeat bindet. Möglicherweise sind die Bindungseigenschaften bei den verschiedenen Polyglycinlängen sehr unterschiedlich und resultieren in allelspezifischen Aktivitäten, die in anderen Zellsystemen nicht auftreten.

Zur Überprüfung, ob die unterschiedlichen AR-Transaktivierungseigenschaften auf unterschiedliche Proteinmengen zurückzuführen waren, wurde die AR-Proteinmenge mittels ELISA quantifiziert und die Transaktivierungseigenschaft pro AR-Protein berechnet. In Gegenwart von DHT war eine Zunahme der AR-Proteinmenge bei längeren GGN-Repeats zu verzeichnen. Wie schon zuvor bezüglich der AR-Transaktivierungseigenschaft war auch hier der Trend nicht linear: Der größte Proteinmengenunterschied wurde zwischen GGN23 (100%) und GGN24 (130%) bei nur einem Repeat Unterschied registriert, der geringste zwischen GGN10 (87%) und GGN23 (100%) bei 13 Repeats Unterschied. Die Verrechnung zur GGN-Repeatlängen-abhängigen Transaktivierungseigenschaft pro AR-Protein zeigte jedoch, dass die Transaktivierungseigenschaft pro AR-Protein weitestgehend linear war. Ein Unterschied pro AR-Protein zwischen GGN23 und GGN24 konnte nicht nachgewiesen werden (beide 100%), der größte Unterschied zeigte sich zwischen GGN10 und GGN23 (1,3-facher pro AR-Protein Transaktivierungsunterschied), und GGN24 wies zu GGN27 einen 1,1-fachen Transaktivierungsunterschied auf. Die unterschiedli-

chen AR-Transaktivierungseigenschaften zwischen GGN23 und GGN24 bei nahezu gleicher pro AR-Proteinaktivität war damit auf unterschiedliche AR-Proteinmengen zurückzuführen. Die Gesamtbetrachtung aller Repeatlängen (GGN10 - GGN27) zeigte jedoch, dass neben dem Proteinmengenunterschied ebenfalls eine unterschiedliche pro AR-Proteinaktivität vorliegt, auch wenn diese zwischen GGN23 und GGN24 nur marginal war. Erwartungsgemäß wurde im Rahmen der Proteinquantifizierung auch AR-Protein in Abwesenheit von DHT detektiert. Die Bindung des Liganden scheint eine Stabilisierung des Proteins zu bewirken, da in Gegenwart von DHT höhere Proteinkonzentrationen vorliegen. Dieser Effekt wurde bereits von Zhou et al. (1995) beschrieben. Durch den nicht vorhandenen Liganden (DHT) konnte das AR-Protein jedoch nicht aktiv werden, womit eine Transkription von Downstream-Genen ausblieb. Aufgrund dessen konnte in Abwesenheit von DHT trotz vorhandenem AR-Protein keine Luziferaseaktivität registriert werden.

Auch Ding et al. (2005) quantifizierten die AR-Proteinmenge und berechneten die pro AR-Protein Transaktivierungseigenschaft. Hier zeigte sich, wie schon bei der Repeatlängen-abhängigen AR-Transaktivierungseigenschaft, eine umgekehrte Korrelation: Kurze GGN-Repeats zeigten viel AR-Protein und lange wenig. In der Verrechnung konnten sie bei jeweils nur einem Repeat Unterschied keinen pro AR-Protein Transaktivierungsunterschied feststellen. Lundin et al. (2007) quantifizierten ebenfalls AR-Protein. Sie kamen zu dem Schluss, dass die erhöhte AR-Transaktivierungseigenschaft von GGN23 nicht auf eine veränderte Proteinmenge zurückzuführen war, da das AR-Protein mit GGN23 eine der geringsten Proteinmengen bei stärkster Transaktivierung aufwies. Demnach sollte die Transaktivierung auf einer erhöhten pro AR-Aktivität beruhen, was im Widerspruch zu unseren Ergebnissen und denen von Ding et al. (2005) steht. Auch in diesem Zusammenhang scheinen die unterschiedlichen Versuchsparmeter (siehe oben) der verschiedenen Studien die plausibelste Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse zu sein.

Nachdem festgestellt werden konnte, dass unterschiedliche AR-Transaktivierungseigenschaften im Wesentlichen auf unterschiedlichen Proteinmengen beruhen, sollte überprüft werden, ob die AR-Proteinmengen durch unterschiedliche GGN-abhängige Transkriptionseffizienzen bzw. Transkriptstabilitäten hervorgerufen werden. Dazu wurde aus den Zelllysaten die RNA isoliert und in Form revers transkribierter cDNA mittels Real-Time RT-PCR quantifiziert. Im Allgemeinen wird für quantitative Expressionsanalysen die Verwendung mehrerer endogener Kontrollen empfohlen (Bustin, 2000; 2002; Vandesompele et al., 2002; Radonić et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden die *AR*-Expressionen sowohl mit Cyclophilin als auch mit β -2-Mikroglobulin normalisiert. In Gegenwart von DHT konnten nur geringfügige *AR*-Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen *AR*-mRNAs detektiert werden. Im Gegen-

satz dazu waren in Abwesenheit von DHT deutliche Unterschiede sichtbar: Lange GGN-Repeats resultierten in erhöhter *AR*-Transkriptmenge. Auch hier war die Korrelation nicht linear: Zwischen GGN23 und GGN24 wurde ein großer Unterschied der *AR*-mRNA Menge beobachtet. Die *AR*-mRNA schien nicht für den AR-Proteinmengen Unterschied verantwortlich zu sein. In den transienten Transfektionsexperimenten war die erhöhte *AR*-Transkriptmenge in Abwesenheit von DHT unerwartet, da die *AR*-Expression von einem exogenen SV40 Promotor bestimmt wurde. Möglicherweise ist eine negative Rückkopplung (negativer Feedback-Loop) im Androgen-signalweg für dieses Phänomen verantwortlich. Yeap et al. publizierten bereits 1999 eine Arbeit bezüglich der *AR*-mRNA Regulation und konnten dabei zelltypspezifische Mechanismen aufzeigen: In LNCaP-Zellen (Zellen aus Lymphknotenmetastase eines humanen Prostatakarzinoms) nahm die endogene *AR*-mRNA Menge in Gegenwart von DHT ab, indem die Transkription des *AR* um 50% reduziert wurde, die RNA-Stabilität nahm im Gegenzug jedoch zu. Für Brustkrebszellen (MDA453) konnte dagegen gezeigt werden, dass die Transkription unverändert blieb, die Stabilität der *AR*-mRNA dagegen abnahm (Yeap et al., 1999). Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass es in Gegenwart von Androgenen zu einer zelltypspezifischen Selbstregulation der *AR*-Transkription kommt und die Proteinmenge durch den Stabilitätsgewinn nach DHT-Bindung zunahm (Übersicht in Yeap et al., 2004). Alimirah et al. (2006) zeigten in ihrer Arbeit zudem, dass aktiver AR als Transkriptionsfaktor die eigene Expression durch Hochregulierung anderer Gene indirekt unterbinden kann. Dabei zeigten sie zunächst, dass eine gezielte Expression von *AR* in PC-3-Zellen (humane epitheliale Prostatakarzinomzellen), welche nur eine geringe *AR*-Expression zeigen, zu einer Hochregulierung anderer Gene führt (hier *IFI16*, ein regulatorisches Protein, für welches sie eine Interaktion mit der DNA-bindenden Domäne des AR zeigen konnten). Zudem beobachteten sie, dass eine erhöhte Expression von *IFI16* in LNCaP-Zellen, welche wiederum kaum *IFI16* exprimieren, zu einer verringerten *AR*-Expression führt. Es ist daher möglich, dass auch in unseren Untersuchungen zelltypspezifische co-Faktoren regulatorische Wirkung entfalten und Einfluss auf die Expression des *AR* nehmen, auch wenn dieser unter der Kontrolle des SV40 Promotors exprimiert wird. Die androgenabhängige AR-Selbstregulation konnte auch durch unsere Untersuchung bestätigt werden und lieferte zugleich die Erklärung für die relativ gleichmäßigen *AR*-mRNA Mengen in Gegenwart von DHT. In Abwesenheit von DHT scheint dagegen die *AR*-mRNA mit zunehmender GGN-Repeatlänge hoch reguliert zu sein bzw. weist sie eine erhöhte Stabilität auf. Es gibt einige Argumente, die für eine GGN-Repeatlängen-abhängige Stabilisierung der *AR*-mRNA sprechen. So konnte für den CAG-Repeat in COS-Zellen gezeigt werden, dass mit zunehmender Länge des CAG-Repeats die Transkription - und damit die *AR*-mRNA - abnimmt (Choong et al., 1996). Zudem stellt der CAG-Repeat eine Bindungsstelle für AR-stabilisierende Proteine dar, wobei er sich mit zuneh-

mender Länge stabilisierend auf die *AR*-mRNA auswirkt und ΔG abnimmt (ΔG ist ein Maß für die Stabilität eines Zustandes, wobei kleinere Werte für erhöhte Stabilität stehen) (Übersicht in Yeap et al., 2004). Die Autoren postulieren weiter, dass mit zunehmender CAG-Repeatlänge interagierende Proteine im Cytoplasma eine Stabilisierung der *AR*-mRNA bewirken. Für den GGN-Repeat ist eine ähnliche Auswirkung auf die Transkriptmenge denkbar. Neben dem Einfluss von stabilisierenden Faktoren, die mit dem GGN-Repeat interagieren können, könnte die Länge des GGN-Repeats eine Konformationsänderung der mRNA bewirken, so dass unterschiedlich stabile Sekundärstrukturen erreicht werden. Die Software-basierte Vorhersage der Sekundärstrukturen und freien Energie ΔG der GGN-Repeatlängen zeigte in unserer Untersuchung analog dem CAG-Repeat (siehe Choong et al., 1996) eine Zunahme der mRNA Stabilität bei längeren GGN-Repeats durch eine Abnahme der freien Energie ΔG . Demnach hat die Länge des GGN-Repeats einen Einfluss auf die Stabilität der mRNA-Struktur, was in Abwesenheit von DHT die unterschiedlichen mRNA Mengen erklären könnte. Ein GGN-Repeatlängen-abhängiger Einfluss auf die *AR*-Transkription selbst scheint dagegen eher unwahrscheinlich, da diesbezüglich vor allem Varianten in regulatorischen Elementen wie dem Promotor oder Transkriptionsfaktoren von Bedeutung sind.

Da in Gegenwart von DHT nahezu keine *AR*-mRNA Unterschiede zu verzeichnen waren, sollte untersucht werden, ob die GGN-Repeatlängen-abhängigen Proteinmengen auf eine unterschiedliche Proteinstabilität zurückgeführt werden konnten. Dazu wurde eine Proteinstabilitätsbestimmung durchgeführt. Hierbei zeigte sich sowohl im Westernblot wie auch im ELISA-Experiment kein GGN-Repeatlängen-abhängiger Proteinstabilitätsunterschied: Die Proteinmengen nahmen relativ zueinander über alle Messzeitpunkte hinweg gleichmäßig ab. Die Bindung des Liganden führt bekanntermaßen zu einer Stabilisierung des AR (Zhou, et al., 1995; Übersicht in Yeap et al., 2004; Ding et al., 2005). Der GGN-Repeat, welcher in der transaktivierenden Domäne lokalisiert ist, scheint jedoch keinen Einfluss auf die Ligandenbindung zu nehmen, und demnach auch nicht auf die Stabilität des AR-Proteins. Demnach konnte der Proteinmengenunterschied nicht auf eine veränderte AR-Proteinstabilität zurückgeführt werden.

5.3 Neuer AGA-Locus auf Chr. 20p11

Der *AR* ist das bisher einzige bestätigte Gen, das einen Beitrag zur Entstehung der AGA leistet. Bislang wurde erst eine genomweite Kopplungsuntersuchung zur AGA mit 95 deutschstämmigen Familien durchgeführt (Hillmer et al., 2008), in der vier neue Loci neben dem *AR*-Locus identifiziert werden konnten: 3q21-q29, 11q14-q25, 18p11-q23 und 19p13-q13. Hierbei zeigte der Locus auf Chr. 3q den deutlichsten Befund. Im anschließenden Fine-Mapping in einem erweiterten Kollektiv wurde nur auf Chr. 3q26 genomweite Signifikanz (p -Wert = 0,00055, NPL-Score = 3,97) gefunden. Das zur Entstehung der AGA beitragende Gen auf Chr. 3q26 konnte jedoch nicht identifiziert werden.

Zur Identifizierung neuer Gene bzw. Loci für die AGA führten wir eine genomweite Assoziationsuntersuchung (GWA) durch. Hierbei wurden genomweit über 550.000 SNPs bei 296 Betroffenen und 383 Universalkontrollen analysiert. Die Kriterien für die Rekrutierung der von AGA betroffenen Personen waren so gewählt, dass unser Gesamtkollektiv die 10% am stärksten Betroffenen umfasste. Für die genomweite Assoziationsanalyse wurden hiervon wiederum die am stärksten Betroffenen ausgewählt. Von den Universalkontrollen wurden Männer ausgeschlossen, die eine fortgeschrittene AGA hatten (Haarstatus VI und VII nach der Norwood und Hamilton Skala (Abbildung 2.1)). Das Kontrollkollektiv reduzierte sich dadurch um 36 Personen auf 347. Diese Stratifizierungen sollten die „Power“ der Fall-Kontroll-Studie zur Detektion von Assoziationen erhöhen.

In der GWA wurden autosomal und mitochondrial keine SNPs identifiziert, die nach Bonferroni-Korrektur genomweite Signifikanz zeigten. Gonosomal wies nur der *AR*-Locus auf dem X-Chromosom genomweit hochsignifikante Assoziation auf (p -Werte bis $4,2 \times 10^{-11}$ für rs1041668). Er wurde für die weiteren Analysen ausgeschlossen (Chr. X: 65.300.000 bp - 67.000.000 bp, NCBI build36). Auf den Autosomen wurden insgesamt 22 SNPs identifiziert, die p ATT-Werte von $< 10^{-5}$ aufwiesen. Von diesen waren alleine 18 SNPs auf Chr. 20p11 lokalisiert (Chr. 20: 21.700.000 bp - 22.100.000 bp, NCBI build36). 15 SNPs konnten einem einzigen LD-Block zugeordnet werden (Chr. 20, 21.740.000 bp - 21.930.000 bp, NCBI build36). Dieser Block wird zu weiten Teilen von einem gespleißten „Expressed Sequence Tag“ (EST) (Adams et al., 1992) überspannt (BQ013595 = „Kojak“). „Kojak“ (Chr. 20: 21.690.672 bp - 21.899.421 bp, NCBI build36) besteht aus drei Exons mit einer Gesamtlänge von 588 bp. Ein weiterer gespleißter EST (BE789145 = „Charlie-B“) grenzt proximal unmittelbar an diesen Bereich an (Chr. 20: 21.982.749 bp - 22.003.238 bp, NCBI build36), liegt jedoch immer noch im Bereich der stärksten Assoziation. „Charlie-B“ weist vier Exons auf, die eine Gesamtlänge von 600 bp ausmachen. Das einzige bekannte Gen in diesem Bereich ist das distal von diesem Locus gelegene *PAX1*-Gen (Paired Box Gen 1, Chr. 20: 21.634.297 bp - 21.644.620 bp, NCBI build36), welches ursprünglich

über die homologe Maus cDNA auf diesen Locus kartiert werden konnte (Schnittger et al., 1992). Anders als durch McGaughran et al. (2003) zunächst veröffentlicht, setzt sich *PAX1* aus fünf Exons zusammen (Adham et al., 2005), die insgesamt 2.838 bp ausmachen. Das *PAX1*-Gen gehört zu einer Familie hochkonservierter Entwicklungskontrollgene. Sie kodieren für Transkriptionsfaktoren und finden sich in einer Vielzahl von Organismen. Allen gemein ist eine 128 Aminosäuren lange DNA-bindende Domäne, die „paired“-Domäne. Für *PAX*-Gene konnte gezeigt werden, dass sie für die humane Embryogenese und die Gewebeentwicklung bzw. Organogenese essentiell sind (Read & van Heyningen, 1994). Neben ihrer Funktion als Transkriptionsfaktoren wird vermutet, dass sie eine Rolle bei der Signaltransduktion zwischen verschiedenen Geweben spielen, was zu einer positionsspezifischen Regulation der Zellproliferation führen könnte (McGaughran et al., 2003). Daneben gelten sie als Schlüsselfaktoren bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Stammzellen während der Entwicklung (Übersicht in Chi & Epstein, 2002). Bisher konnten genomweit 9 *PAX*-Gene identifiziert werden, die wiederum in vier Subgruppen unterteilt werden (McGaughran et al., 2003). Aufgrund der Homologien in ihren strukturellen Domänen werden *PAX1* und *PAX9* einer Subgruppe zugeteilt. Im Mausembryo werden sie in der sich entwickelnden Wirbelsäule, den Gliedmaßen und dem Thymus exprimiert (Deutsch et al., 1988; Neubüser et al., 1995). Bannykh et al. (2003) konnten in ihren Untersuchungen eine verringerte Expression von *PAX1* und *PAX9* in zwei an Jarcho-Levin-Syndrom (MIM 277300) verstorbenen Embryonen zeigen. Das Jarcho-Levin-Syndrom zeichnet sich durch Skelettfehlbildungen insbesondere Segmentierungsdefekten der Wirbel und Rippen aus. *PAX1* wurde auch mit bestimmten Arten von Nervenkanaldefekten (insbesondere Spina bifida (MIM 182940)) in Verbindung gebracht (Balling et al., 1988; Helwig et al., 1995; Hol et al., 1996), Volcik et al. (2002) konnten jedoch keine Assoziation zwischen Spina bifida und den *PAX*-Genen zeigen. Da die *Pax1*-mutierte Maus (Missense-Mutation im Gen, durch die die DNA-Bindungsaffinität des Proteins abnimmt) phänotypische Ähnlichkeiten mit Patienten mit dem humanen Klippel-Feil-Syndrom (Klippel M. & Feil A., 1912) aufweist, wurde diesbezüglich von McGaughran et al. (2003) nach Mutationen im *PAX1*-Gen in 63 von Klippel-Feil-Syndrom Betroffenen gesucht. Sie identifizierten in ihren Untersuchungen in acht von 63 Patienten Sequenzvarianten in *PAX1*, die sich nur in zwei von 303 Kontrollchromosomen nachweisen ließen und postulierten daher, dass Mutationen in der *PAX1*-Sequenz mit dem Klippel-Feil-Syndrom assoziiert sein könnten und *PAX1* einen Beitrag zur Entstehung des Syndroms leisten kann. Die *Pax1*-Maus weist segmentale Anomalien entlang des axialen Skeletts auf, wo auch *Pax1* exprimiert wird, neben dem Thymus (McGaughran et al., 2003). Beim Klippel-Feil-Syndrom fehlt u.a. die Segmentierung der Halswirbel, wodurch der Hals verkürzt und immobil wird. Neben weiteren syndromspezifischen Merkmalen liegt hier auch ein Haarphänotyp vor: Der Haaransatz am Hinterkopf ist sehr niedrig

(Klippel M. & Feil A., 1912; Tracy et al., 2004). Aufgrund des Haarphänotyps beim Klippel-Feil-Syndrom, sowie der den *PAX*-Genen zugeschriebenen Funktion einer „Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Stammzellen“ (Übersicht in Chi & Epstein, 2002) (Dermalpapillen-Zellen sind Stammzellen), scheint das *PAX1*-Gen ein gutes Kandidatengen zu sein. Zudem findet sich kein weiteres bekanntes Gen an diesem Locus.

Die übrigen vier SNPs mit p_{ATT} -Werten von $p < 10^{-5}$ fanden sich auf unterschiedlichen Chromosomen und konnten nicht repliziert werden. Für beide 5α -Reduktasen (Typ I: *SRD5A1* auf Chr. 5p15: 6.686.500 bp - 6.722.675 bp sowie Typ II: *SRD5A2* auf Chr. 2p23: 31.603.160 bp - 31.659.544 bp, NCBI build36), welche Testosteron in DHT umwandeln (Chen et al., 2005), wurden keine nominal signifikanten Assoziationen gefunden. Damit lieferten beide 5α -Reduktasen keinen Hinweis darauf, dass sie einen bedeutenden Beitrag zur AGA leisten könnten. Dies entsprach den negativen Assoziationsbefunden von Ellis et al. (1998). Der von Hillmer et al. (2008) identifizierte Locus auf 3q26 (Chr. 3: 161.200.000 bp - 184.200.000 bp, NCBI build36) lieferte keine weiteren Hinweise auf mögliche Kandidatengene. In diesem Bereich zeigte kein SNP einen $p_{ATT} < 10^{-4}$. Fünf SNPs in diesem Intervall hatten p_{ATT} -Werte $< 10^{-3}$. Sie liegen jeweils mindestens 2 Mb auseinander, sind also nicht im LD zueinander. Wegen ihrer nur moderaten p -Werte sind diese SNPs nicht in die Replikationsuntersuchung eingegangen, für spätere Studien stellen sie jedoch lohnende Kandidaten dar. Auch das *LIPH*-Gen auf 3q27, welches als kausales Gen für die autosomal-rezessive Form der Hypotrichose identifiziert werden konnte (Ali et al., 2007), zeigte in der GWA keine besondere Auffälligkeiten (der einzige SNP im *LIPH*-Gen: rs9790230, Chr. 3: 186.717.237 bp (intronisch) mit $p = 0,049$).

Für die Replikation musste aus der Vielzahl nominal signifikanter SNPs eine praktikable Anzahl ausgewählt werden. Der Chr. 20 Locus sollte aufgrund des hohen Kopplungsungleichgewichts durch „tagging“ SNPs erfasst werden, wodurch die 18 SNPs mit $p < 10^{-5}$ auf vier reduziert werden konnten. Der SNP rs2180439 ist im „perfekten“ LD zu dem SNP mit dem niedrigsten p -Wert in der GWA (rs1998076) und wurde zum Ausschluss eines technisch bedingten Genotypisierungsausfalls in die Replikation eingeschlossen. Zu den fünf SNPs auf dem Chr. 20 Locus wurden die 30 SNPs mit den nominal niedrigsten p_{ATT} -Werten in die Replikation aufgenommen. Für die Untersuchung wurden alle Betroffenen unseres AGA-Kollektivs verwendet, die zuvor nicht in die GWA eingesetzt worden waren (327 Individuen). Damit waren in diesem Kollektiv die weniger stark Betroffenen vertreten. Als Kontrollen wurden die Nicht-Betroffenen verwendet (240 Individuen), d.h. Männer älter als 60 Jahre ohne AGA. Die Nicht-Betroffenen repräsentieren in etwa die extremen 20% der Verteilung in Europäern. Durch die im Vergleich zur GWA verwendeten stratifizierten Kollektive (jetzt etwas weniger stark Betroffene gegen Nicht-Betroffene) erwarteten wir ähnliche bis stärkere genetische Effekte. In der Replikation

(siehe auch Anhang III) zeigten sechs SNPs signifikante Ergebnisse, darunter alle fünf vom Chr. 20 Locus mit dem niedrigsten p_{ATT} von $8,13 \times 10^{-10}$ für rs6113491. Darüber hinaus hatte rs10992241 (Chr. 9: 93.931.599 bp, NCBI build36) einen p_{ATT} von $8,68 \times 10^{-4}$. Hier zeigte sich aber eine Veränderung des Risikoallels zwischen GWA und Replikation. In der GWA war „T“ das Risikoallel, in der Replikation war „C“ das Risikoallel. Das OR für rs10992241 „T“ zeigte gegensätzliche Effekte in der GWA (OR = 1,92 (c.i. 1,44 - 2,54)) und in der Replikation (OR = 0,62 (c.i. 0,46 - 0,82)). Die TDT-Analyse (Spielman et al., 1993), in der die nicht transmittierten Allele der Eltern von betroffenen Kindern als Kontrollen betrachtet werden können, zeigte keine Signifikanz für rs10992241 ($p \chi^2 = 0,19$). Die deutlichen Frequenzunterschiede von rs10992241 in den Betroffenen bei der GWA und der Replikation deuten darauf hin, dass der nicht signifikante Befund für rs10992241 auf die gemeinsame Betrachtung der Betroffenen im TDT zurückzuführen ist. Sowohl der Wechsel des Risikoallels zwischen GWA und Replikation, als auch die Ergebnisse des TDT legen nahe, dass rs10992241 nicht assoziiert ist.

Die fünf SNPs auf Chr. 20 zeigten in der Replikation die gleichen Tendenzen wie in der GWA. Die nominalen p_{ATT} -Werte waren etwas niedriger und wiesen Werte bis $8,13 \times 10^{-10}$ (rs6113491) auf. Vier der fünf SNPs zeigten genomweite Signifikanz nach Bonferroni-Korrektur (für 32 SNPs, Anzahl erfolgreich genotypisierter SNPs der Replikation). Auch die genomweite Signifikanzschwelle von 9×10^{-8} für 550.000 Tests für nominal signifikante p_{ATT} -Werte wurde von vier der fünf SNPs auf Chr. 20 erreicht. Hier wurden p_{ATT} -Werte bis zu $2,60 \times 10^{-8}$ (rs6113491) erreicht. Das OR stieg für vier der fünf SNPs auf > 2 in der Replikation. Nur rs6137444 wies mit 1,76 (c.i. 1,37 - 2,27) ein OR < 2 auf und war damit nahezu unverändert im Vergleich zum OR der GWA (1,74 (c.i. 1,37 - 2,21)). Durch die Verwendung von Nicht-Betroffenen und der damit zusammenhängenden Erhöhung der „Power“ der Analyse konnte eine Verbesserung der Assoziationsbefunde erzielt werden. Vier der fünf Chr. 20 SNPs zeigten ein deutlich erhöhtes OR. Auch die TDT-Analyse, welche eine annähernd gleiche „Power“ wie die Fall-Kontroll-Studie aufweist (Risch, 2000), bestätigte die Ergebnisse aus GWA und Replikation für die Chr. 20 SNPs. Diese Analyse war nicht unabhängig, da je ein Indexpatient der Familien bereits in der GWA bzw. Replikation getestet worden war. Der TDT ist jedoch weniger anfällig für Populations-Stratifikationseffekte, wie in Zusammenhang mit rs10992241 gezeigt werden konnte, und daher eine gute Kontrolle (Ackerman et al., 2005). Fall-Kontroll-Studien in Verbindung mit familienbasierten Assoziationsuntersuchungen stellen eine gute Möglichkeit dar, tatsächliche Assoziationen zu identifizieren, da beide Methoden gegenseitig für Korrekturen sorgen: Der TDT korrigiert für Populations-Stratifikation in der Fall-Kontroll-Studie, welche ihrerseits wieder Segregationsverzerrungen in der familienbasierten Assoziationsuntersuchung korrigiert (Ackerman et al., 2005). Der Assoziationsbefund auf Chr. 20 konnte damit erfolgreich bestätigt werden.

Von den 30 nominal signifikantesten SNPs für die Replikation konnten zwei nicht in die Sequenkomplexe integriert werden (Chr. 17: rs11655206 und Chr. 19: rs4805229). Ein weiterer SNP (Chr. 3: rs13079866) war ein technischer Genotypisierungsausfall. In wieweit diese drei SNPs gegebenenfalls eine Assoziation zur AGA aufweisen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden und bleibt zu untersuchen.

Die für die GWA verwendeten Betroffenen waren die am stärksten Betroffenen unseres Kollektivs. Wir erwarteten hier etwas stärkere Effekte als bei den Betroffenen, die in der Replikation analysiert wurden. Die Universalkontrollen der GWA waren wiederum weniger extrem als die Nicht-Betroffenen, die ihrerseits die am wenigsten betroffenen 20% der Altersklasse repräsentieren. Die Chr. 20 SNPs zeigten erwartungsgemäß abnehmende p_{ATT} -Werte von „Replikations-Betroffene gegen Universalkontrollen“ zu „Betroffene GWA gegen Nicht-Betroffene“ bzw. „Betroffene gesamt gegen Nicht-Betroffene“. Bei der Betrachtung „Betroffene gesamt gegen Nicht-Betroffene“ kommt die notwendige „Power“ für die besonders starke Assoziation (p_{ATT} -Werte bis $2,91 \times 10^{-13}$ für rs6113491) durch das große Kollektiv von 623 Betroffenen zustande. Der Vergleich der drei Betroffenen-Kollektive gegenüber den beiden Kontrollkollektiven zeigte eine Abstufung von „Betroffene Replikation“ zu „Betroffene GWA“ und „Betroffene gesamt“, wobei das Gesamtkollektiv die jeweils niedrigsten p -Werte aufgrund der entsprechenden Kollektivgröße aufwies. Sehr ähnlich sind sich die p_{ATT} -Werte zwischen „Betroffene gesamt gegen Universalkontrollen“ und „Betroffene Replikation gegen Nicht-Betroffene“. Hier gleicht sich die „Power“ von „allen Betroffenen gegen Universalkontrollen“ mit der „Power“ der „Nicht-Betroffenen gegen die schwach Betroffenen“ aus der Replikation aus. Bezüglich des OR, bei dem nicht die Anzahl, sondern die Frequenzen der Allele in die Berechnung einfließen, zeigte sich ein etwas anderes Bild. Die Gegenüberstellung der beiden extrem stratifizierten Kollektive („Betroffene GWA gegen Nicht-Betroffene“) zeigte die höchsten OR-Werte mit bis zu 2,41 (c.i. 1,85 - 3,12) für rs2180439 und rs201571. Eine Stratifizierung bezüglich des AGA-Phänotyps kann auf Basis des Risikoallels mit dem OR daher am besten nachvollzogen werden. Im Gesamtkollektiv war rs10992241, wie schon in der TDT-Analyse, nicht assoziiert. Ausschließlich in den Kollektiven von GWA und Replikation wurden signifikante Werte erzielt. In allen übrigen Kollektivzusammenstellungen konnten keine nominal signifikanten p_{ATT} -Werte mehr erzielt werden. Das OR mit dem 95%-Konfidenzintervall umschloss stets 1, womit diesem SNP auch in diesem Zusammenhang kein Beitrag zur AGA zugewiesen werden konnte.

Die Zusammenfassung mehrerer SNPs zu einem Haplotyp kann es ermöglichen, Subgruppen von Chromosomen (mit bestimmtem Haplotyp) zu benennen, auf denen die kausale Variante liegt (Schork et al., 2000; Morris & Kaplan, 2002). Aus Haplotypen lassen sich damit weitere Informationen bezüglich der nicht identifizierten kausalen Variante ableiten (Beatty et al., 2005).

Die Analyse aller möglichen SNP-Konstellationen im Gesamtkollektiv am Chr. 20 Locus lieferte hochsignifikante Ergebnisse, ohne dass eine bestimmte SNP-Kombination besonders auffällig war. Alle Bonferroni-korrigierten $p\text{Chi}^2$ -Werte waren $< 10^{-8}$. Der Haplotyp mit rs2180439 und rs201571 wies den niedrigsten p-Wert von $9,85 \times 10^{-13}$ auf. Letztendlich war das Kopplungsungleichgewicht an diesem Locus so hoch, dass es nicht möglich war, eine SNP-Kombination zu benennen, deren Haplotyp deutlich bessere Assoziationsergebnisse als die der anderen Kombinationen zeigte. Die Haplotypen mit rs2180439 und rs201571 bzw. rs2180439 und rs6113491 sind sicherlich gut geeignet, um Personen für ein Sequenzierprojekt auszuwählen.

Zur weiteren Aufklärung dieses Locus wurde die kodierende Sequenz der beiden ESTs „Kojak“ und „Charlie-B“ in 84 Universalkontrollen sequenziert. Wir erhofften uns hierdurch gegebenenfalls unbekannte Sequenzvariationen zu finden, welche einen kausalen Beitrag zur Entstehung einer AGA leisten könnten. In „Kojak“ konnte in keinem der drei Exons eine Sequenzveränderung gefunden werden. In „Charlie-B“ wurden nur in Exon „X“ (das erste beschriebene Exon) Sequenzvarianten gefunden. Bei dem gefundenen T/C-Austausch (Chr. 20: 21.997.177 bp, NCBI build36) handelte es sich um einen bereits annotierten SNP (rs6036029), der in unserer Sequenzierung dieselbe Frequenz aufwies, wie bereits in der NCBI-Datenbank für Europäer vermerkt. Er ist nur zu einem der fünf assoziierten SNPs aus GWA bzw. Replikation in grenzwertigem LD ($r^2 = 0,81$ für rs201571). Die Real-Time RT-PCR Untersuchungen zeigten keine Expression von „Charlie-B“ in der Kopfhaut. Der SNP rs6036029 hat daher keine besonders hohe Priorität bei der Suche nach der kausalen Variante. Ein weiterer SNP (A/C-Austausch) konnte ebenfalls in Exon „X“ identifiziert werden (Chr. 20: 21.997.224 bp, NCBI build36). Er war noch nicht in den Datenbanken beschrieben und wurde im Rahmen unserer Sequenzierung auch nur in einer einzigen Person heterozygot gefunden. Aufgrund der niedrigeren Frequenz ist es extrem unwahrscheinlich, dass diese Variante die kausale Variante für AGA an diesem Locus ist.

Es wird in der Regel angenommen, dass ein Gen, das zu einer Erkrankung beiträgt, in dem von der Krankheit betroffenen Gewebe exprimiert wird. Für den *AR* konnte gezeigt werden, dass er in primären Zelllinien von Dermalpapillen-Zellen aus haarloser Kopfhaut gegenüber Zellen aus behaarter Kopfhaut deutlich stärker exprimiert war (Sawaya & Price, 1997; Hibberts et al., 1998). Die genetische Relevanz des *AR* für die AGA wurde durch diese Beobachtung unterstrichen. In welchen Geweben „Kojak“, „Charlie-B“ und *PAX1* exprimiert werden, wurde in quantitativen PCR-Experimenten untersucht. Hierzu wurden neben den kommerziell erwerblichen MTC-Panels mit insgesamt 24 verschiedenen cDNAs selbst isolierte und revers transkribierte cDNAs aus Haut, Kopfhaut und Haarschaft analysiert. Durch die Normalisierung der Expressionen mit der endogenen Kontrolle Cyclophilin konnte die Expression von „Kojak“, „Charlie-B“ und *PAX1* gewebespezifisch miteinander verglichen werden. Die mit Abstand stärkste Expression

überhaupt wurde von *PAX1* in Thymus (adult und fötal) detektiert. Diese wurde bereits von Deutsch et al. (1988) an Mausembryonen gezeigt und wird auch in unterschiedlichen Datenbanken zur humanen Expression beschrieben. *PAX1* wies im fötalen Skelettmuskel relativ zu den anderen Geweben die dritthöchste Expression auf. Im adulten Skelettmuskel konnte *PAX1* dagegen kaum noch nachgewiesen werden. Diese Beobachtung ist in Einklang mit der beschriebenen Bedeutung des Gens für die Embryogenese (Bannykh et al., 2003; Read & van Heyningen, 1994). Es zeigte in Haut und Haarschaft nahezu keine Expression, in Kopfhaut war es dagegen deutlich detektierbar exprimiert und wies über alle Gewebe hinweg die insgesamt vierthöchste Expression auf. Dies war ein wichtiger Hinweis darauf, dass *PAX1* ein geeignetes Kandidatengen für die AGA darstellt, zumal es das einzige beschriebene Gen in unmittelbarer Nähe zu dem assoziierten Locus darstellt. Für „Kojak“ konnte bisher nur eine Expression in Plazenta gezeigt werden (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.364555>), welche wir in unserer Analyse nicht bestätigen konnten. Die stärkste Expression wies „Kojak“ in unserer Untersuchung in Pankreas auf. In Haut, Kopfhaut und Haarschaft war keine Expression detektierbar. Eine Expression von „Charlie-B“ ist in Lunge und Lungentumoren beschrieben (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/ESTProfileViewer.cgi?uglist=Hs.385748>). Auch hier konnten wir die Angaben der Datenbank nicht bestätigen. In adultem Lungengewebe war keine „Charlie-B“-Expression zu verzeichnen, in fötaler Lunge war die Expression extrem schwach. Die stärkste Expression verzeichneten wir in Hoden und Pankreas. In Haut, Kopfhaut und Haarschaft konnten wir dagegen keine Expression nachweisen. Von den hier untersuchten Transkripten ist *PAX1* das einzige, das eine Expression in der Kopfhaut zeigte. *PAX1* ist damit der wahrscheinlichste Kandidat für den zur Entstehung der AGA beitragenden Effekt auf Chr. 20. Die funktionelle Aufbereitung dieses Locus wird zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der AGA beitragen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die androgenetische Alopezie (AGA) ist die häufigste Form von Haarausfall, von der bis zum Alter von 80 Jahren rund 80% der Männer betroffen sind (Hamilton et al., 1951). Das Androgenrezeptor-Gen (*AR*) ist bislang das einzige Gen, für das eine replizierte Assoziation mit AGA nachgewiesen werden konnte. Durch unsere Arbeitsgruppe konnte weder im kodierenden Bereich des *AR* noch in der Promotorregion eine bisher unbekannt funktionelle Variante identifiziert werden. Des Weiteren wurden auch keine Speißvarianten identifiziert. Der GGN-Repeat in Exon 1 vom *AR* ist die einzige mit AGA assoziierte kodierende Variante am *AR*-Locus. Die GGN-Repeatlänge von 23 und 24 Wiederholungen sind die bei Europäern häufigsten Allele. GGN23 ist das AGA-Risikoallel, das GGN-Allel mit 24 Repeats wird deutlich häufiger bei Kontrollen beobachtet. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob unterschiedliche GGN-Allele, insbesondere die Repeatlängen von GGN23 und GGN24, unterschiedliche transaktivierende Eigenschaften des AR bewirken und so einen Beitrag zur Entwicklung der AGA leisten.

Dazu wurde anhand eines Reporter-gen-Assays die GGN-Repeatlängen-abhängige AR-Transaktivierungseigenschaft untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante, nicht lineare Zunahme der AR-Transaktivierung mit zunehmender GGN-Repeatlänge mit einem funktionellen Sprung zwischen GGN23 und GGN24. Zur Überprüfung, ob die unterschiedlichen AR-Transaktivierungseigenschaften auf unterschiedliche Proteinmengen zurückzuführen waren, wurde das AR-Protein mittels ELISA quantifiziert. Hier zeigte sich ebenfalls ein signifikanter, nicht linearer Proteinmengenunterschied analog zur AR-Transaktivierungseigenschaft, womit zumindest ein Teil der Aktivitätsunterschiede auf verschiedene AR-Proteinmengen zurückzuführen waren. Die Höhe der Transaktivierungseigenschaft pro AR-Protein zeigte einen weitestgehend linearen Trend: Kurze GGN-Repeats wiesen eine geringe proteinspezifische AR-Transaktivierung auf, längere Repeats dagegen höhere. Die Höhe der AR-Transaktivierungseigenschaft geht somit teilweise auf eine Repeatlängen-abhängige pro AR-Proteinaktivität zurück. Der funktionelle Sprung zwischen GGN23 und GGN24 wird jedoch maßgeblich durch die unterschiedlichen Proteinmengen bewirkt. Zur Klärung, ob die unterschiedlichen Proteinmengen auf unterschiedliche Transkriptionseffizienzen, RNA-Stabilitäten oder Proteininstabilitäten zurückzuführen waren, wurde zunächst eine quantitative AR-Expressionsanalyse durchgeführt. Hier zeigten sich bei allen untersuchten GGN-Repeatlängen in Gegenwart von DHT gleichmäßige *AR*-mRNA Mengen, womit von einer hormonabhängigen Selbstregulation der *AR*-mRNA auszugehen ist. In Abwesenheit von DHT zeigte sich wieder ein nicht linearer Trend: Eine GGN-Repeatverlängerung geht mit einer zunehmenden *AR*-mRNA

Menge einher. Die Software-unterstützte Analyse der GGN-Repeats auf RNA-Ebene lieferte eine erhöhte thermodynamische Stabilität mit zunehmender Repeatlänge als eine mögliche Erklärung. Der GGN-Repeat zeigte keinen Einfluss auf die Stabilität des AR-Proteins.

Für den AR konnte somit ein GGN-Repeatlängen-abhängiger funktioneller Unterschied gezeigt werden, bei dem mit zunehmender GGN-Repeatlänge eine erhöhte AR-Transaktivierung einhergeht. Dieser Unterschied ist im Wesentlichen auf eine erhöhte Proteinmenge zurückzuführen, die Transaktivierungseigenschaft pro AR-Protein leistet dagegen nur einen geringen Beitrag.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Kandidatengene durch eine genomweite Assoziationsuntersuchung (GWA). Die in dieser Arbeit durchgeführte GWA ist die bisher einzige zur AGA. Durch sie konnte eine Vielzahl nominal signifikanter SNPs identifiziert werden, von denen 35 in einer unabhängigen Replikation überprüft wurden. Es konnten sechs SNPs mit genomweiter Signifikanz repliziert werden. In der Replikation war für rs10992241 das Allel „C“ assoziiert, in der GWA jedoch das Allel „T“. Dieser SNP wurde daher nicht als assoziiert betrachtet. Die übrigen fünf SNPs waren auf Chr. 20p11 lokalisiert und identifizierten damit einen neuen Suszeptibilitätslocus für die AGA. Eine Gegenüberstellung der verwendeten, verschieden stark betroffenen Kollektive bestätigte die Bedeutung dieses Locus durch eine Zunahme des Odds Ratios bei der Analyse der extremen Kollektive. Eine Haplotypanalyse zeigte die beste Assoziation mit rs2180439 und rs201571. Zwei ESTs, BQ013595 („Kojak“) und BE789145 („Charlie-B“), überspannten bzw. überlappten unmittelbar diesen Locus. Sequenzanalysen der genomischen kodierenden Sequenz konnten jedoch keine potenziell kausalen Varianten identifizieren. In einer Expressionsanalyse wurde das nächstgelegene Gen *PAX1* (telomerisch lokalisiert) zusammen mit den beiden ESTs untersucht. Hier zeigte nur *PAX1* eine deutliche Expression in Kopfhaut, wohingegen in Haut und Haarschaft keine Expression zu verzeichnen war. In den für AGA relevanten Geweben zeigten beide ESTs nahezu keine Expression. Auf Chr. 20p11 ist daher *PAX1* der beste Kandidat, das zur Entstehung der AGA beitragende Gen zu sein. Die Aufklärung des funktionellen Zusammenhangs zwischen *PAX1* und AGA wird zum besseren Verständnis der Haarbiologie beitragen.

7. AUSBLICK

In der vorliegenden Arbeit wurde durch eine genomweite Assoziationsanalyse ein neues Kandidatengen für die AGA identifiziert und ein bereits bekanntes kausatives Gen funktionell untersucht. So konnte zunächst ein funktioneller Unterschied zwischen AR-Proteinen mit unterschiedlichen GGN-Repeatlängen gezeigt werden. Die AR-Transaktivierungseigenschaft nahm mit länger werdendem GGN-Repeat zu, was im Wesentlichen auf eine erhöhte Proteinmenge zurückgeführt werden konnte. Hierdurch konnte ein Beitrag zur Aufklärung der AGA-Entstehung geleistet werden, das Ergebnis liefert jedoch auch Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen:

Wir konnten in unseren Untersuchungen bislang keine Erklärung für die unterschiedlichen AR-Proteinmengen liefern: Weder die AR-Proteinstabilität noch die *AR*-mRNA Menge (in Gegenwart von aktivem AR-Protein) konnten zur Klärung beitragen. Es ist aber möglich, dass die verschiedenen AR-Proteinmengen auf einer unterschiedlichen GGN-Repeatlängen-abhängigen Translationseffizienz beruhen. Hierzu könnte eine Translationseffizienzuntersuchung mit einem gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem für weitere Aufklärung sorgen, welche kommerziell erhältlich sind. Mit diesem System kann die Transkriptions- und Translationzeit nach Zugabe des *AR*-Expressionsplasmids zu unterschiedlichen Zeitpunkten beendet werden. Durch die Quantifizierung des translatierten AR-Proteins mittels Westernblot oder ELISA ist eine Bestimmung der GGN-spezifischen Translationseffizienzen möglich.

Ebenso wie hier für den GGN-Repeat gezeigt wurde, konnte auch für den CAG-Repeat ein Einfluss auf die Funktion des AR nachgewiesen werden (Mhatre et al., 1993; Chamberlain et al., 1994; Kazemi-Esfarjani et al., 1995; Gao et al., 1996; Nakajima et al., 1996; Buchanan et al., 2004; Wang et al., 2004; Ding et al., 2004). Eine Untersuchung verschiedener CAG- und GGN-Kombinationen, wie Gao et al. (1996) dies bereits für fünf verschiedene Kombinationen gezeigt haben, wäre ein nächster Schritt zur Aufarbeitung dieser beiden polymorphen Repeats, womit mögliche additive Auswirkungen auf die Funktion des AR geklärt werden können.

Die *AR*-Expressionsmenge zeigte in Abwesenheit von DHT eine nicht lineare Korrelation mit dem GGN-Repeat, die auch bei der AR-Transaktivierung und AR-Proteinmenge in Gegenwart von DHT zu erkennen war. In Gegenwart von aktivem AR-Protein zeigten alle AR-Konstrukte einheitliche Transkriptmengen. Verschiedene Untersuchungen zeigten eine zelltypspezifische Selbstregulation der *AR*-Expression. Für die AGA wäre eine Aufklärung der regulatorischen Mechanismen in Dermalpapillen-Zellen von Betroffenen und Nicht-Betroffenen von großem Interesse. Zunächst können chipbasierte Expressionsanalysen in Dermalpapillen-Zellen konkrete Hinweise auf AR-regulatorische co-Faktoren liefern. Mit den gewonnenen Daten aus unserer genomweiten Assoziationsstudie kann dann eine Interaktionsanalyse von Varianten im *AR* zu

den bekannten *AR*-regulatorischen Faktoren statistisch berechnet werden. Eine Kombination dieser Untersuchungen kann einen wesentlichen Beitrag zur Pathophysiologie der AGA leisten.

Die Daten der genomweiten Assoziationsuntersuchung sind Ansatzpunkt einer Vielzahl weiterer Untersuchungen: In die Replikation gingen neben den SNPs für den Chr. 20 Locus nur die 30 SNPs mit den besten Assoziationsbefunden ein. Die Replikation einer großen Zahl nominal ebenfalls hochsignifikanter SNPs steht noch aus. Dadurch können weitere Suszeptibilitätsloci oder Kandidatengene identifiziert werden. Eine weitere chipbasierte Genotypisierung von Betroffenen würde diesbezüglich die „Power“ erhöhen und damit Hinweise auf zusätzliche Loci konkretisieren.

Aufgrund der nicht vorhandenen Expression von „Kojak“ und „Charlie-B“ in Haar, Haut und Kopfhaut konnten diese beiden ESTs als mögliche Kandidaten ausgeschlossen werden. Der bereits replizierte Locus auf Chr. 20p11 mit dem Kandidatengen *PAX1* bedarf dagegen einer weiteren Aufarbeitung. Hierzu wäre eine Expressionsanalyse von *PAX1* in Kopfhautbiopsien oder Dermalpapillen-Zellen notwendig, in der nach Expressionsunterschieden zwischen von AGA Betroffenen und Nicht-Betroffenen bzw. zwischen Personen mit unterschiedlichen Genotypen für die assoziierten SNPs gesucht wird. Durch eine *in situ* Hybridisierung könnte die Expression von *PAX1* in Kopfhaut morphologisch aufgezeigt und mit Immunfluoreszenz das Pax1-Protein lokalisiert werden. Mit dem Yeast-Two-Hybrid (Hefe-Zwei-Hybrid)-System können zudem Interaktionspartner von PAX1 identifiziert werden. Das *PAX1*-Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor (McGaughan et al., 2003). Durch Transfektionsexperimente in Zellkultur können mit z.B. chipbasierten Expressionsanalysen downstream-Gene identifiziert werden, welche einen direkten Einfluss auf die Haarentwicklung haben könnten.

Die Identifizierung von weiteren Genen und kausalen Varianten wird zum Verständnis der AGA-Entstehung beitragen und zukünftig die gezielte Entwicklung von Medikamenten ermöglichen, wodurch den von AGA Betroffenen geholfen werden kann.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Ackerman H, Usen S, Jallow M, Sisay-Joof F, Pinder M, Kwiatkowski DP (2005) A comparison of case-control and family-based association methods: the example of sickle-cell and malaria. *Ann Hum Genet* 69: 559-65
- Adams MD, Dubnick M, Kerlavage AR, Moreno R, Kelley JM, Utterback TR, Nagle JW, Fields C, Venter JC (1992) Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature* 355: 632-4
- Adham IM, Gille M, Gamel AJ, Reis A, Dressel R, Steding G, Brand-Saberi B, Engel W (2005) The scoliosis (sco) mouse: a new allele of Pax1. *Cytogenet Genome Res* 111: 16-26
- Ahn C (2006) Sample Size and Power Estimation in Case-Control Genetic Association Studies. *Genomics & Informatics* 4: 51-56
- Ahouansou S, Le Toumelin P, Crickx B, Descamps V (2007) Association of androgenetic alopecia and hypertension. *Eur J Dermatol* 17: 220-2
- Ali G, Chishti MS, Raza SI, John P, Ahmad W (2007) A mutation in the lipase H (LIPH) gene underlie autosomal recessive hypotrichosis. *Hum Genet* 121: 319-25
- Alimirah F, Chen J, Xin H, Choubey D (2006) Androgen receptor auto-regulates its expression by a negative feedback loop through upregulation of IFI16 protein. *FEBS Lett* 580: 1659-64
- Alléra A, Wolff M, Daufeldt S, Sinnecker G, Bidlingmaier F Partial androgen insensitivity syndrome (AIS) in patients with a normal androgen receptor (AR) gene sequence is possibly caused by an activated but abnormally working AR 10th International Congress on Hormonal Steroids, Québec City, Canada 1998
- Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, Russell DW (1991) Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism. *Nature* 354: 159-61
- Annese V, Latiano A, Bovio P, Forabosco P, Piepoli A, Lombardi G, Andreoli A, Astegiano M, Gionchetti P, Riegler G, Sturniolo GC, Clementi M, Rappaport E, Fortina P, Devoto M, Gasparini P, Andriulli A (1999) Genetic analysis in Italian families with inflammatory bowel disease supports linkage to the IBD1 locus--a GISC study. *Eur J Hum Genet* 7: 567-73
- Armitage P (1955) Tests for linear trends in proportions and frequencies. *Biometrics* 11: 375-86
- Aschim EL, Nordenskjold A, Giwercman A, Lundin KB, Ruhayel Y, Haugen TB, Grotmol T, Giwercman YL (2004) Linkage between cryptorchidism, hypospadias, and GGN repeat length in the androgen receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5105-9

- Ausubel FM (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc., Cambridge
- Avila DM, Zoppi S, McPhaul MJ (2001) The androgen receptor (AR) in syndromes of androgen insensitivity and in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 76: 135-42
- Balding DJ, Bishop M, Cannings C (2007) *Handbook of Statistical Genetics*, 3rd edn. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, Sussex, England
- Balling R, Deutsch U, Gruss P (1988) undulated, a mutation affecting the development of the mouse skeleton, has a point mutation in the paired box of Pax 1. *Cell* 55: 531-5
- Bannykh SI, Emery SC, Gerber JK, Jones KL, Benirschke K, Masliah E (2003) Aberrant Pax1 and Pax9 expression in Jarcho-Levin syndrome: report of two Caucasian siblings and literature review. *Am J Med Genet A* 120: 241-6
- Beaty TH, Fallin MD, Hetmanski JB, McIntosh I, Chong SS, Ingersoll R, Sheng X, Chakraborty R, Scott AF (2005) Haplotype diversity in 11 candidate genes across four populations. *Genetics* 171: 259-67
- Becker T (2007) Genidentifizierung bei multifaktoriellen Krankheiten. *Medizinische Genetik* 19: 300-3
- Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE (2007) Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat Rev Genet* 8: 639-46
- Bergfeld WF (1995) Androgenetic alopecia: an autosomal dominant disorder. *Am J Med* 98: 95S-98S
- Bienova M, Kucerova R, Fiuraskova M, Hajduch M, Kolar Z (2005) Androgenetic alopecia and current methods of treatment. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat* 14: 5-8
- Birch MP, Messenger AG (2001) Genetic factors predispose to balding and non-balding in men. *Eur J Dermatol* 11: 309-14
- Blondal T, Waage BG, Smarason SV, Jonsson F, Fjalldal SB, Stefansson K, Gulcher J, Smith AV (2003) A novel MALDI-TOF based methodology for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 31: e155
- Botchkarev VA, Kishimoto J (2003) Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling. *J Investig Dermatol Symp Proc* 8: 46-55
- Brant SR, Fu Y, Fields CT, Baltazar R, Ravenhill G, Pickles MR, Rohal PM, Mann J, Kirschner BS, Jabs EW, Bayless TM, Hanauer SB, Cho JH (1998) American families with Crohn's disease have strong evidence for linkage to chromosome 16 but not chromosome 12. *Gastroenterology* 115: 1056-61
- Braun-Falco O, Bergner T (1989) [Androgenetic alopecia in the male. Recent developments]. *Hautarzt* 40: 669-78

- Brockschmidt FF, Nöthen MM, Hillmer AM (2007) The two most common alleles of the coding GGN repeat in the androgen receptor gene cause differences in protein function. *J Mol Endocrinol* 39: 1-8
- Brooks JR, Baptista EM, Berman C, Ham EA, Hichens M, Johnston DB, Primka RL, Rasmuson GH, Reynolds GF, Schmitt SM, Arth GE (1981) Response of rat ventral prostate to a new and novel 5 alpha-reductase inhibitor. *Endocrinology* 109: 830-6
- Brown CJ, Goss SJ, Lubahn DB, Joseph DR, Wilson EM, French FS, Willard HF (1989) Androgen receptor locus on the human X chromosome: regional localization to Xq11-12 and description of a DNA polymorphism. *Am J Hum Genet* 44: 264-9
- Buchanan G, Yang M, Cheong A, Harris JM, Irvine RA, Lambert PF, Moore NL, Raynor M, Neufing PJ, Coetzee GA, Tilley WD (2004) Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor. *Hum Mol Genet* 13: 1677-92
- Buetow KH, Edmonson M, MacDonald R, Clifford R, Yip P, Kelley J, Little DP, Strausberg R, Koester H, Cantor CR, Braun A (2001) High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 581-4
- Bustin SA (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25: 169-93
- Bustin SA (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29: 23-39
- Callewaert L, Christiaens V, Haelens A, Verrijdt G, Verhoeven G, Claessens F (2003) Implications of a polyglutamine tract in the function of the human androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 46-52
- Carey AH, Chan KL, Short F, White D, Williamson R, Franks S (1993) Evidence for a single gene effect causing polycystic ovaries and male pattern baldness. *Clin Endocrinol (Oxf)* 38: 653-8
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES (1999) Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet* 22: 231-8
- Cash TF (1992) The psychological effects of androgenetic alopecia in men. *J Am Acad Dermatol* 26: 926-31

- Cavanaugh JA, Callen DF, Wilson SR, Stanford PM, Sraml ME, Gorska M, Crawford J, Whitmore SA, Shlegel C, Foote S, Kohonen-Corish M, Pavli P (1998) Analysis of Australian Crohn's disease pedigrees refines the localization for susceptibility to inflammatory bowel disease on chromosome 16. *Ann Hum Genet* 62: 291-8
- Chamberlain NL, Driver ED, Miesfeld RL (1994) The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. *Nucleic Acids Res* 22: 3181-6
- Chang BL, Zheng SL, Hawkins GA, Isaacs SD, Wiley KE, Turner A, Carpten JD, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB, Xu J (2002) Polymorphic GGC repeats in the androgen receptor gene are associated with hereditary and sporadic prostate cancer risk. *Hum Genet* 110: 122-9
- Chen Y, Zajac JD, MacLean HE (2005) Androgen regulation of satellite cell function. *J Endocrinol* 186: 21-31
- Chi N, Epstein JA (2002) Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet* 18: 41-7
- Cho JH, Nicolae DL, Gold LH, Fields CT, LaBuda MC, Rohal PM, Pickles MR, Qin L, Fu Y, Mann JS, Kirschner BS, Jabs EW, Weber J, Hanauer SB, Bayless TM, Brant SR (1998) Identification of novel susceptibility loci for inflammatory bowel disease on chromosomes 1p, 3q, and 4q: evidence for epistasis between 1p and IBD1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7502-7
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-9
- Choong CS, Kempainen JA, Zhou ZX, Wilson EM (1996) Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Mol Endocrinol* 10: 1527-35
- Cipriani R, Ruzza G, Foresta C, Veller Fornasa C, Peserico A (1983) Sex hormone-binding globulin and saliva testosterone levels in men with androgenetic alopecia. *Br J Dermatol* 109: 249-52
- Coetzee GA, Ross RK (1994) Re: Prostate cancer and the androgen receptor. *J Natl Cancer Inst* 86: 872-3
- Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R, Hobbs HH (2004) Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science* 305: 869-72
- Consortium TIIH (2003) The International HapMap Project. *Nature* 426: 789-96
- Consortium TIIH (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437: 1299-320
- Consortium TWTCC (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447: 661-78

- Cooper DN, Krawczak M (1993) *Human Gene Mutation*. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK
- Cooper DN, Schmidtke J (1993) *Diagnosis of human genetic disease using recombinant DNA*. Fourth edition. *Hum Genet* 92: 211-36
- Cotter RJ (1992) Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Anal Chem* 64: 1027A-1039A
- Courtois M, Loussouarn G, Hourseau C, Grollier JF (1994) Hair cycle and alopecia. *Skin Pharmacol* 7: 84-9
- Curran ME, Lau KF, Hampe J, Schreiber S, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Stokkers P, Van Deventer SJ, Mirza M, Raedler A, Kruis W, Meckler U, Theuer D, Herrmann T, Gionchetti P, Lee J, Mathew C, Lennard-Jones J (1998) Genetic analysis of inflammatory bowel disease in a large European cohort supports linkage to chromosomes 12 and 16. *Gastroenterology* 115: 1066-71
- Dallob AL, Sadick NS, Unger W, Lipert S, Geissler LA, Gregoire SL, Nguyen HH, Moore EC, Tanaka WK (1994) The effect of finasteride, a 5 alpha-reductase inhibitor, on scalp skin testosterone and dihydrotestosterone concentrations in patients with male pattern baldness. *J Clin Endocrinol Metab* 79: 703-6
- DeAngelis MM, Wang DG, Hawkins TL (1995) Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic Acids Res* 23: 4742-3
- Deutsch U, Dressler GR, Gruss P (1988) Pax 1, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. *Cell* 53: 617-25
- Ding C, Cantor CR (2003) A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3059-64
- Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER (2004) Effect of a short CAG (glutamine) repeat on human androgen receptor function. *Prostate* 58: 23-32
- Ding D, Xu L, Menon M, Reddy GP, Barrack ER (2005) Effect of GGC (glycine) repeat length polymorphism in the human androgen receptor on androgen action. *Prostate* 62: 133-9
- Doyu M, Sobue G, Mitsuma T, Uchida M, Iwase T, Takahashi A (1993) Very late onset X-linked recessive bulbospinal neuronopathy: mild clinical features and a mild increase in the size of tandem CAG repeat in androgen receptor gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56: 832-3

- Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ, Steinhart AH, Abraham C, Regueiro M, Griffiths A, Dassopoulos T, Bitton A, Yang H, Targan S, Datta LW, Kistner EO, Schumm LP, Lee AT, Gregersen PK, Barmada MM, Rotter JI, Nicolae DL, Cho JH (2006) A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 314: 1461-3
- Edwards SM, Badzioch MD, Minter R, Hamoudi R, Collins N, Ardern-Jones A, Dowe A, Osborne S, Kelly J, Shearer R, Easton DF, Saunders GF, Dearnaley DP, Eeles RA (1999) Androgen receptor polymorphisms: association with prostate cancer risk, relapse and overall survival. *Int J Cancer* 84: 458-65
- Ellis JA, Scurrah KJ, Cobb JE, Zaloumis SG, Duncan AE, Harrap SB (2007) Baldness and the androgen receptor: the AR polyglycine repeat polymorphism does not confer susceptibility to androgenetic alopecia. *Hum Genet* 121: 451-7
- Ellis JA, Sinclair R, Harrap SB (2002) Androgenetic alopecia: pathogenesis and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med* 4: 1-11
- Ellis JA, Stebbing M, Harrap SB (1998) Genetic analysis of male pattern baldness and the 5 α -reductase genes. *J Invest Dermatol* 110: 849-53
- Ellis JA, Stebbing M, Harrap SB (2001) Polymorphism of the androgen receptor gene is associated with male pattern baldness. *J Invest Dermatol* 116: 452-5
- Ellis JA, Stebbing M, Harrap SB (2001) Male pattern baldness is not associated with established cardiovascular risk factors in the general population. *Clin Sci (Lond)* 100: 401-4
- Fedorcsak I, Ehrenberg L (1966) Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem Scand* 20: 107-12
- Ferlin A, Bartoloni L, Rizzo G, Roverato A, Garolla A, Foresta C (2004) Androgen receptor gene CAG and GGC repeat lengths in idiopathic male infertility. *Mol Hum Reprod* 10: 417-21
- Ferro P, Catalano MG, Dell'Eva R, Fortunati N, Pfeffer U (2002) The androgen receptor CAG repeat: a modifier of carcinogenesis? *Mol Cell Endocrinol* 193: 109-20
- Ford ES, Freedman DS, Byers T (1996) Baldness and ischemic heart disease in a national sample of men. *Am J Epidemiol* 143: 651-7
- Freeman JL, Perry GH, Feuk L, Redon R, McCarroll SA, Altshuler DM, Aburatani H, Jones KW, Tyler-Smith C, Hurles ME, Carter NP, Scherer SW, Lee C (2006) Copy number variation: new insights in genome diversity. *Genome Res* 16: 949-61
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296: 2225-9

- Gao T, Marcelli M, McPhaul MJ (1996) Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 59: 9-20
- Giles GG, Severi G, Sinclair R, English DR, McCredie MR, Johnson W, Boyle P, Hopper JL (2002) Androgenetic alopecia and prostate cancer: findings from an Australian case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11: 549-53
- Gottlieb B, Beitel LK, Wu JH, Trifiro M (2004) The androgen receptor gene mutations database (ARDB): 2004 update. *Hum Mutat* 23: 527-33
- Greenberg DA (1993) Linkage analysis of "necessary" disease loci versus "susceptibility" loci. *Am J Hum Genet* 52: 135-43
- Griffin JE, Wilson JD (1989) The androgen resistance syndromes: 5 α -reductase deficiency, testicular feminisation and related disorders. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds) *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp 1919-44
- Group FMPHLS (2002) Long-term (5-year) multinational experience with finasteride 1 mg in the treatment of men with androgenetic alopecia. *Eur J Dermatol* 12: 38-49
- Gunderson KL, Kruglyak S, Graige MS, Garcia F, Kermani BG, Zhao C, Che D, Dickinson T, Wickham E, Bierle J, Doucet D, Milewski M, Yang R, Siegmund C, Haas J, Zhou L, Oliphant A, Fan JB, Barnard S, Chee MS (2004) Decoding randomly ordered DNA arrays. *Genome Res* 14: 870-7
- Gunderson KL, Steemers FJ, Lee G, Mendoza LG, Chee MS (2005) A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology. *Nat Genet* 37: 549-54
- Haff LA, Smirnov IP (1997) Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res* 7: 378-88
- Hakimi JM, Schoenberg MP, Rondinelli RH, Piantadosi S, Barrack ER (1997) Androgen receptor variants with short glutamine or glycine repeats may identify unique subpopulations of men with prostate cancer. *Clin Cancer Res* 3: 1599-608
- Halushka MK, Fan JB, Bentley K, Hsie L, Shen N, Weder A, Cooper R, Lipshutz R, Chakravarti A (1999) Patterns of single-nucleotide polymorphisms in candidate genes for blood-pressure homeostasis. *Nat Genet* 22: 239-47
- Hamilton JB (1942) Male hormone stimulation is a prerequisite and an incitant in common baldness. *Am J Anat* 71: 451-80
- Hamilton JB (1951) Patterned loss of hair in man; types and incidence. *Ann N Y Acad Sci* 53: 708-28

- Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Buckler A, Hall J, Stokkers P, van Deventer SJ, Nurnberg P, Mirza MM, Lee JC, Leonard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME (1999) A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* 64: 808-16
- Hawk E, Breslow RA, Graubard BI (2000) Male pattern baldness and clinical prostate cancer in the epidemiologic follow-up of the first National Health and Nutrition Examination Survey. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 523-7
- Hayes VM, Severi G, Eggleton SA, Padilla EJ, Southey MC, Sutherland RL, Hopper JL, Giles GG (2005) The E211 G>A androgen receptor polymorphism is associated with a decreased risk of metastatic prostate cancer and androgenetic alopecia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14: 993-6
- Helwig U, Imai K, Schmahl W, Thomas BE, Varnum DS, Nadeau JH, Balling R (1995) Interaction between undulated and Patch leads to an extreme form of spina bifida in double-mutant mice. *Nat Genet* 11: 60-3
- Herrera CR, D'Agostino RB, Gerstman BB, Bosco LA, Belanger AJ (1995) Baldness and coronary heart disease rates in men from the Framingham Study. *Am J Epidemiol* 142: 828-33
- Hibberts NA, Howell AE, Randall VA (1998) Balding hair follicle dermal papilla cells contain higher levels of androgen receptors than those from non-balding scalp. *J Endocrinol* 156: 59-65
- Hillmer AM, Flaquer A, Hanneken S, Eigelschoven S, Kortüm AK, Brockschmidt FF, Golla A, Metzen C, Thiele H, Kolberg S, Reinartz R, Betz RC, Ruzicka T, Hennies HC, Kruse R, Nöthen MM (2008) Genome-Wide Scan and Fine-Mapping Linkage Study of Androgenetic Alopecia Reveals a Locus on Chromosome 3q26. *Am J Hum Genet* epub:doi:10.1016/j.ajhg.2007.11.014
- Hillmer AM, Hanneken S, Ritzmann S, Becker T, Freudenberg J, Brockschmidt FF, Flaquer A, Freudenberg-Hua Y, Jamra RA, Metzen C, Heyn U, Schweiger N, Betz RC, Blaumeiser B, Hampe J, Schreiber S, Schulze TG, Hennies HC, Schumacher J, Propping P, Ruzicka T, Cichon S, Wienker TF, Kruse R, Nöthen MM (2005) Genetic variation in the human androgen receptor gene is the major determinant of common early-onset androgenetic alopecia. *Am J Hum Genet* 77: 140-8
- Hirso P, Laakso M, Matilainen V, Hiltunen L, Rajala U, Jokelainen J, Keinänen-Kiukaanniemi S (2006) Association of insulin resistance linked diseases and hair loss in elderly men. Finnish population-based study. *Cent Eur J Public Health* 14: 78-81

- Hirso P, Rajala U, Hiltunen L, Jokelainen J, Keinänen-Kiukaanniemi S, Nayha S (2007) Obesity and low-grade inflammation among young Finnish men with early-onset alopecia. *Dermatology* 214: 125-9
- Hol FA, Geurds MP, Chatkupt S, Shugart YY, Balling R, Schrandt-Stumpel CT, Johnson WG, Hamel BC, Mariman EC (1996) PAX genes and human neural tube defects: an amino acid substitution in PAX1 in a patient with spina bifida. *J Med Genet* 33: 655-60
- Hsing AW, Gao YT, Wu G, Wang X, Deng J, Chen YL, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Benichou J, Chang C (2000) Polymorphic CAG and GGN repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: a population-based case-control study in China. *Cancer Res* 60: 5111-6
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411: 599-603
- Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G (1996) Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 379: 821-3
- Imperato-McGinley J, Guerrero I, Gautier T, Peterson RE (1974) Steroid 5 α -reductase deficiency in man: an inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 186: 1213-5
- Jenster G, van der Korput JA, Trapman J, Brinkmann AO (1992) Functional domains of the human androgen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41: 671-5
- Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, Smith AN, Heward J, Di Genova G, Ueda H, Cordell HJ, Eaves IA, Dudbridge F, Twells RC, Payne F, Hughes W, Nutland S, Stevens H, Carr P, Tuomilehto-Wolf E, Tuomilehto J, Gough SC, Clayton DG, Todd JA (2001) Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nat Genet* 29: 233-7
- Kaufman KD (2002) Androgens and alopecia. *Mol Cell Endocrinol* 198: 89-95
- Kaufman KD, Olsen EA, Whiting D, Savin R, DeVillez R, Bergfeld W, Price VH, Van Neste D, Roberts JL, Hordinsky M, Shapiro J, Binkowitz B, Gormley GJ (1998) Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia. Finasteride Male Pattern Hair Loss Study Group. *J Am Acad Dermatol* 39: 578-89
- Kazemi-Esfarjani P, Trifiro MA, Pinsky L (1995) Evidence for a repressive function of the long polyglutamine tract in the human androgen receptor: possible pathogenetic relevance for the (CAG) $_n$ -expanded neuronopathies. *Hum Mol Genet* 4: 523-7

- Khoury MJ, Beaty TH, Chohen BH (1993) *Fundamentals of genetic epidemiology*. Oxford University Press, New York, Oxford
- Kligman AM (1959) The human hair cycle. *J Invest Dermatol* 33: 307-16
- Klippel M, Feil A (1912) Un cas d'absence des vertèbres cervicales avec cage thoracique remontant jusqu'à la base du crâne (cage thoracique cervicale). *Nouvelle iconographie de la Salpêtrière* 25: 223-50
- Kokontis JM, Liao S (1999) Molecular action of androgen in the normal and neoplastic prostate. *Vitam Horm* 55: 219-307
- Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, vol 47, pp 583-621
- Küster W, Happle R (1984) The inheritance of common baldness: two B or not two B? *J Am Acad Dermatol* 11: 921-6
- La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352: 77-9
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5
- Lee AT, Zane LT (2007) Dermatologic manifestations of polycystic ovary syndrome. *Am J Clin Dermatol* 8: 201-19
- Lee HJ, Chang C (2003) Recent advances in androgen receptor action. *Cell Mol Life Sci* 60: 1613-22
- Levy-Nissenbaum E, Bar-Natan M, Frydman M, Pras E (2005) Confirmation of the association between male pattern baldness and the androgen receptor gene. *Eur J Dermatol* 15: 339-40
- Li WH, Sadler LA (1991) Low nucleotide diversity in man. *Genetics* 129: 513-23
- Linja MJ, Savinainen KJ, Saramaki OR, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T (2001) Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 61: 3550-5
- Litvinov IV, Chang C, Isaacs JT (2004) Molecular characterization of the commonly used human androgen receptor expression vector, pSG5-AR. *Prostate* 58: 319-24
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4: 357-62
- Lotufo PA, Chae CU, Ajani UA, Hennekens CH, Manson JE (2000) Male pattern baldness and coronary heart disease: the Physicians' Health Study. *Arch Intern Med* 160: 165-71
- Lucky AW (1985) Topical antiandrogens. What use in dermatology? *Arch Dermatol* 121: 55-6

- Ludwig E (1977) Classification of the types of androgenetic alopecia (common baldness) occurring in the female sex. *Br J Dermatol* 97: 247-54
- Lumbroso R, Beitel LK, Vasiliou DM, Trifiro MA, Pinsky L (1997) Codon-usage variants in the polymorphic (GGN)_n trinucleotide repeat of the human androgen receptor gene. *Hum Genet* 101: 43-6
- Lundin KB, Giwercman A, Dizeyi N, Giwercman YL (2007) Functional in vitro characterisation of the androgen receptor GGN polymorphism. *Mol Cell Endocrinol* 264: 184-7
- Lundin KB, Giwercman A, Richthoff J, Abrahamsson PA, Giwercman YL (2003) No association between mutations in the human androgen receptor GGN repeat and inter-sex conditions. *Mol Hum Reprod* 9: 375-9
- Lundin KB, Giwercman YL, Rylander L, Hagmar L, Giwercman A (2006) Androgen receptor gene GGN repeat length and reproductive characteristics in young Swedish men. *Eur J Endocrinol* 155: 347-54
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835-9
- Mann HB, Whitney, DR (1947) On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *The Annals of Mathematical Statistics* 18: 50-60
- Matilainen V, Koskela P, Keinanen-Kiukaanniemi S (2000) Early androgenetic alopecia as a marker of insulin resistance. *Lancet* 356: 1165-6
- Matilainen VA, Makinen PK, Keinanen-Kiukaanniemi SM (2001) Early onset of androgenetic alopecia associated with early severe coronary heart disease: a population-based, case-control study. *J Cardiovasc Risk* 8: 147-51
- Matsuzaki H, Dong S, Loi H, Di X, Liu G, Hubbell E, Law J, Berntsen T, Chadha M, Hui H, Yang G, Kennedy GC, Webster TA, Cawley S, Walsh PS, Jones KW, Fodor SP, Mei R (2004) Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. *Nat Methods* 1: 109-11
- McGaughran JM, Oates A, Donnai D, Read AP, Tassabehji M (2003) Mutations in PAX1 may be associated with Klippel-Feil syndrome. *Eur J Hum Genet* 11: 468-74
- Mhatre AN, Trifiro MA, Kaufman M, Kazemi-Esfarjani P, Figlewicz D, Rouleau G, Pinsky L (1993) Reduced transcriptional regulatory competence of the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nat Genet* 5: 184-8

- Migliaccio A, Castoria G, Di Domenico M, de Falco A, Bilancio A, Lombardi M, Barone MV, Ametrano D, Zannini MS, Abbondanza C, Auricchio F (2000) Steroid-induced androgen receptor-oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *Embo J* 19: 5406-17
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215
- Morris RW, Kaplan NL (2002) On the advantage of haplotype analysis in the presence of multiple disease susceptibility alleles. *Genet Epidemiol* 23: 221-33
- Mosley JG, Gibbs AC (1996) Premature grey hair and hair loss among smokers: a new opportunity for health education? *Bmj* 313: 1616
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-50
- Nakajima H, Kimura F, Nakagawa T, Furutama D, Shinoda K, Shimizu A, Ohsawa N (1996) Transcriptional activation by the androgen receptor in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *J Neurol Sci* 142: 12-6
- Neubüser A, Koseki H, Balling R (1995) Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1. *Dev Biol* 170: 701-16
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* 1: 1559-82
- Norwood OT (1975) Male pattern baldness: classification and incidence. *South Med J* 68: 1359-65
- Norwood OT (2001) Incidence of female androgenetic alopecia (female pattern alopecia). *Dermatol Surg* 27: 53-4
- Nöthen MM, Cichon S, Vogt IR, Hemmer S, Kruse R, Knapp M, Holler T, Faiyaz ul Haque M, Haque S, Propping P, Ahmad M, Rietschel M (1998) A gene for universal congenital alopecia maps to chromosome 8p21-22. *Am J Hum Genet* 62: 386-90
- Nyholt DR, Gillespie NA, Heath AC, Martin NG (2003) Genetic basis of male pattern baldness. *J Invest Dermatol* 121: 1561-4
- Obana NJ, Uno H (1996) Dermal papilla cells in macaque alopecia trigger a testosterone-dependent inhibition of follicular cell proliferation. In: Van Neste D, Randall VA (eds) *Hair research in the next millennium*. Elsevier, Amsterdam, pp 307-310
- Oeth P, Beaulieu M, Park C, Kosman D, del Mistro G, van den Boom D, Jurinke C (2005) iPLEX Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for Mass ARRAY System Through Single Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators. *Sequenom Application Note*: 1-12

- Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G (2001) Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 276: 4812-8
- Oh BR, Kim SJ, Moon JD, Kim HN, Kwon DD, Won YH, Ryu SB, Park YI (1998) Association of benign prostatic hyperplasia with male pattern baldness. *Urology* 51: 744-8
- Ohmen JD, Yang HY, Yamamoto KK, Zhao HY, Ma Y, Bentley LG, Huang Z, Gerwehr S, Pressman S, McElree C, Targan S, Rotter JI, Fischel-Ghodsian N (1996) Susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16 has a role in Crohn's disease, but not in ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 5: 1679-83
- Oliver RF, Jahoda CAB (1989) The dermal papilla and the maintenance of hair growth. In: Rogers GA, Reis PR, Ward KA, Marshall RC (eds) *The biology of wool and hair*. Chapman and Hall, London, pp 51-67
- Olsen EA, Messenger AG, Shapiro J, Bergfeld WF, Hordinsky MK, Roberts JL, Stough D, Washenik K, Whiting DA (2005) Evaluation and treatment of male and female pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 52: 301-11
- Orentreich D, Orentreich N (1987) Androgenetic alopecia and its treatment. In: Unger WP, Nordström REA (eds) *Hair Transplantation*. Dekker, New York, Basel, pp 1-35
- Osborn D (1916) INHERITANCE OF BALDNESS: Various Patterns Due to Heredity and Sometimes Present at Birth—A Sex-limited Character—Dominant in Man—Women Not Bald Unless They Inherit Tendency from Both Parents. *J Hered*: 347-55
- Parkes M, Satsangi J, Lathrop GM, Bell JI, Jewell DP (1996) Susceptibility loci in inflammatory bowel disease. *Lancet* 348: 1588
- Pawlowski JE, Ertel JR, Allen MP, Xu M, Butler C, Wilson EM, Wierman ME (2002) Liganded androgen receptor interaction with beta-catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells. *J Biol Chem* 277: 20702-10
- Pitts RL (1987) Serum elevation of dehydroepiandrosterone sulfate associated with male pattern baldness in young men. *J Am Acad Dermatol* 16: 571-3
- Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J, Pe'er I, Burt NP, Blumenstiel B, DeFelice M, Parkin M, Barry R, Winslow W, Healy C, Graham RR, Neale BM, Izmailova E, Roubenoff R, Parker AN, Glass R, Karlson EW, Maher N, Hafler DA, Lee DM, Seldin MF, Remmers EF, Lee AT, Padyukov L, Alfredsson L, Coby J, Weinblatt ME, Gabriel SB, Purcell S, Klareskog L, Gregersen PK, Shadick NA, Daly MJ, Altshuler D (2007) Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 39: 1477-82

- Pritchard JK, Cox NJ (2002) The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Hum Mol Genet* 11: 2417-23
- Promega (2007) Promega Technical Manual, pGL3 Luciferase Reporter Vectors
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 856-62
- Radpour R, Rezaee M, Tavasoly A, Solati S, Saleki A (2007) Association of long polyglycine tracts (GGN repeats) in exon 1 of the androgen receptor gene with cryptorchidism and penile hypospadias in Iranian patients. *J Androl* 28: 164-9
- Ragoussis J, Elvidge GP, Kaur K, Colella S (2006) Matrix-assisted laser desorption/ionisation, time-of-flight mass spectrometry in genomics research. *PLoS Genet* 2: e100
- Rajender S, Singh L, Thangaraj K (2007) Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene. *Asian J Androl* 9: 147-79
- Randall VA (1994) Role of 5 alpha-reductase in health and disease. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 8: 405-31
- Read AP, van Heyningen V (1994) PAX genes in human developmental anomalies. *Semin Dev Biol* 5: 323-32
- Rexbye H, Petersen I, Iachina M, Mortensen J, McGue M, Vaupel JW, Christensen K (2005) Hair loss among elderly men: etiology and impact on perceived age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 60: 1077-82
- Risch N, Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273: 1516-7
- Risch NJ (2000) Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 405: 847-56
- Ross P, Hall L, Smirnov I, Haff L (1998) High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 16: 1347-51
- Roy AK, Tyagi RK, Song CS, Lavrovsky Y, Ahn SC, Oh TS, Chatterjee B (2001) Androgen receptor: structural domains and functional dynamics after ligand-receptor interaction. *Ann N Y Acad Sci* 949: 44-57
- Ruhayel Y, Lundin K, Giwercman Y, Hallden C, Willen M, Giwercman A (2004) Androgen receptor gene GGN and CAG polymorphisms among severely oligozoospermic and azoospermic Swedish men. *Hum Reprod* 19: 2076-83
- Rutberg SE, Kolpak ML, Gourley JA, Tan G, Henry JP, Shander D (2006) Differences in expression of specific biomarkers distinguish human beard from scalp dermal papilla cells. *J Invest Dermatol* 126: 2583-95

- Ryu HK, Kim KM, Yoo EA, Sim WY, Chung BC (2006) Evaluation of androgens in the scalp hair and plasma of patients with male-pattern baldness before and after finasteride administration. *Br J Dermatol* 154: 730-4
- Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, Dixon RJ, Meitinger T, Braund P, Wichmann HE, Barrett JH, König IR, Stevens SE, Szymczak S, Tregouet DA, Iles MM, Pahlke F, Pollard H, Lieb W, Cambien F, Fischer M, Ouwehand W, Blankenberg S, Balmforth AJ, Baessler A, Ball SG, Strom TM, Braenne I, Gieger C, Deloukas P, Tobin MD, Ziegler A, Thompson JR, Schunkert H (2007) Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med* 357: 443-53
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7
- Sasaki M, Karube A, Karube Y, Watari M, Sakuragi N, Fujimoto S, Dahiya R (2005) GGC and StuI polymorphism on the androgen receptor gene in endometrial cancer patients. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 100-4
- Sasieni PD (1997) From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 53: 1253-61
- Sawaya ME, Price VH (1997) Different levels of 5alpha-reductase type I and II, aromatase, and androgen receptor in hair follicles of women and men with androgenetic alopecia. *J Invest Dermatol* 109: 296-300
- Sawaya ME, Shalita AR (1998) Androgen receptor polymorphisms (CAG repeat lengths) in androgenetic alopecia, hirsutism, and acne. *J Cutan Med Surg* 3: 9-15
- Scherer SW, Lee C, Birney E, Altshuler DM, Eichler EE, Carter NP, Hurles ME, Feuk L (2007) Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. *Nat Genet* 39: S7-15
- Schnittger S, Rao VV, Deutsch U, Gruss P, Balling R, Hansmann I (1992) Pax1, a member of the paired box-containing class of developmental control genes, is mapped to human chromosome 20p11.2 by in situ hybridization (ISH and FISH). *Genomics* 14: 740-4
- Schnohr P, Lange P, Nyboe J, Appleyard M, Jensen G (1995) Gray hair, baldness, and wrinkles in relation to myocardial infarction: the Copenhagen City Heart Study. *Am Heart J* 130: 1003-10
- Schork NJ, Fallin D, Lanchbury JS (2000) Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet* 58: 250-64
- Sela M, Anfinsen CB, Harrington WF (1957) The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure. *Biochim Biophys Acta* 26: 502-12

- Simon S, Mueller SO (2006) Human reporter gene assays: transcriptional activity of the androgen receptor is modulated by the cellular environment and promoter context. *Toxicology* 220: 90-103
- Sinclair R (1998) Male pattern androgenetic alopecia. *Bmj* 317: 865-9
- Sinclair R, Greenland KJ, Egmond S, Hoedemaker C, Chapman A, Zajac JD (2007) Men with Kennedy disease have a reduced risk of androgenetic alopecia. *Br J Dermatol* 157: 290-4
- Skipper L, Li Y, Bonnard C, Pavanni R, Yih Y, Chua E, Sung WK, Tan L, Wong MC, Tan EK, Liu J (2005) Comprehensive evaluation of common genetic variation within LRRK2 reveals evidence for association with sporadic Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 14: 3549-56
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshzhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P (2007) A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445: 881-5
- Sokolov BP (1989) Primer extension technique for the detection of single nucleotide in genomic DNA. *Nucleic Acids Research* 18: 3671
- Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ (1993) Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet* 52: 506-16
- Sprecher E, Shalata A, Dabhah K, Futerman B, Lin S, Szargel R, Bergman R, Friedman-Birnbaum R, Cohen N (2000) Androgenetic alopecia in heterozygous carriers of a mutation in the human hairless gene. *J Am Acad Dermatol* 42: 978-82
- Stemmers FJ, Chang W, Lee G, Barker DL, Shen R, Gunderson KL (2006) Whole-genome genotyping with the single-base extension assay. *Nat Methods* 3: 31-3
- Stemmers FJ, Gunderson KL (2007) Whole genome genotyping technologies on the BeadArray platform. *Biotechnol J* 2: 41-9
- Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Jonsdottir T, Walters GB, Styrkarsdottir U, Gretarsdottir S, Emilsson V, Ghosh S, Baker A, Snorrardottir S, Bjarnason H, Ng MC, Hansen T, Bagger Y, Wilensky RL, Reilly MP, Adeyemo A, Chen Y, Zhou J, Gudnason V, Chen G, Huang H, Lashley K, Doumatey A, So WY, Ma RC, Andersen G, Borch-Johnsen K, Jorgensen T, van Vliet-Ostaptchouk JV, Hofker MH, Wijmenga C, Christiansen C, Rader DJ, Rotimi C, Gurney M, Chan JC, Pedersen O, Sigurdsson G, Gulcher JR, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K (2007) A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 39: 770-5

- Stough D, Stenn K, Haber R, Parsley WM, Vogel JE, Whiting DA, Washenik K (2005) Psychological effect, pathophysiology, and management of androgenetic alopecia in men. *Mayo Clin Proc* 80: 1316-22
- Tang K, Fu D, Kotter S, Cotter RJ, Cantor CR, Koster H (1995) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of immobilized duplex DNA probes. *Nucleic Acids Res* 23: 3126-31
- Thomas DC (2004) *Statistical Methods in Genetic Epidemiology*. Oxford University Press, Inc., New York
- Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, Donn R, Symmons D, Hider S, Bruce IN, Wilson AG, Marinou I, Morgan A, Emery P, Carter A, Steer S, Hocking L, Reid DM, Wordsworth P, Harrison P, Strachan D, Worthington J (2007) Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet* 39: 1431-3
- Tosti A, Piraccini BM (1999) Androgenetic alopecia. *Int J Dermatol* 38 Suppl 1: 1-7
- Tracy MR, Dormans JP, Kusumi K (2004) Klippel-Feil syndrome: clinical features and current understanding of etiology. *Clin Orthop Relat Res*: 183-90
- Tran D, Sinclair RD (1999) Understanding and managing common baldness. *Aust Fam Physician* 28: 248-50, 252-3
- Tromovitch TA, Glogau RG, Stegman SJ (1985) Medical treatment of male pattern alopecia (androgenic alopecia). *Head Neck Surg* 7: 336-9
- Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, Pinsky L, Yong EL (1997) Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3777-82
- Tyagi RK, Lavrovsky Y, Ahn SC, Song CS, Chatterjee B, Roy AK (2000) Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol Endocrinol* 14: 1162-74
- Unger WP, Unger RH (2003) Hair transplanting: an important but often forgotten treatment for female pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 49: 853-60
- Van Neste D, Fuh V, Sanchez-Pedreno P, Lopez-Bran E, Wolff H, Whiting D, Roberts J, Kopera D, Stene JJ, Calvieri S, Tosti A, Prens E, Guarrera M, Kanojia P, He W, Kaufman KD (2000) Finasteride increases anagen hair in men with androgenetic alopecia. *Br J Dermatol* 143: 804-10
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034

- Volcik KA, Blanton SH, Kruzel MC, Townsend IT, Tyerman GH, Mier RJ, Northrup H (2002) Testing for genetic associations with the PAX gene family in a spina bifida population. *Am J Med Genet* 110: 195-202
- Waldstreicher J, Fiedler V, Hordinsky MK, Swinehart JM, Thiboutot D, Unger W (1994) Effects of finasteride on dihydrotestosterone content of scalp skin in men with male pattern baldness. *J Invest Dermatol* 102: 615
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Rozen S, Hudson TJ, Lipshutz R, Chee M, Lander ES (1998) Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280: 1077-82
- Wang L, Hsu CL, Chang C (2005) Androgen receptor corepressors: an overview. *Prostate* 63: 117-30
- Wang Q, Udayakumar TS, Vasaitis TS, Brodie AM, Fondell JD (2004) Mechanistic relationship between androgen receptor polyglutamine tract truncation and androgen-dependent transcriptional hyperactivity in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 279: 17319-28
- Werner R, Holterhus PM, Binder G, Schwarz HP, Morlot M, Struve D, Marschke C, Hiort O (2006) The A645D mutation in the hinge region of the human androgen receptor (AR) gene modulates AR activity, depending on the context of the polymorphic glutamine and glycine repeats. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 3515-20
- Whiting DA (1993) Diagnostic and predictive value of horizontal sections of scalp biopsy specimens in male pattern androgenetic alopecia. *J Am Acad Dermatol* 28: 755-63
- Whiting DA (1998) Male pattern hair loss: current understanding. *Int J Dermatol* 37: 561-6
- Whiting DA (2001) Possible mechanisms of miniaturization during androgenetic alopecia or pattern hair loss. *J Am Acad Dermatol* 45: S81-6
- Winiarska A, Mandt N, Kamp H, Hossini A, Seltsmann H, Zouboulis CC, Blume-Peytavi U (2006) Effect of 5alpha-dihydrotestosterone and testosterone on apoptosis in human dermal papilla cells. *Skin Pharmacol Physiol* 19: 311-21
- Winkelmann J, Schormair B, Lichtner P, Ripke S, Xiong L, Jalilzadeh S, Fulda S, Putz B, Eckstein G, Hauk S, Trenkwalder C, Zimprich A, Stiasny-Kolster K, Oertel W, Bachmann CG, Paulus W, Peglau I, Eisensehr I, Montplaisir J, Turecki G, Rouleau G, Gieger C, Illig T, Wichmann HE, Holsboer F, Müller-Myhsok B, Meitinger T (2007) Genome-wide association study of restless legs syndrome identifies common variants in three genomic regions. *Nat Genet* 39: 1000-6

- Yeap BB, Krueger RG, Leedman PJ (1999) Differential posttranscriptional regulation of androgen receptor gene expression by androgen in prostate and breast cancer cells. *Endocrinology* 140: 3282-91
- Yeap BB, Wilce JA, Leedman PJ (2004) The androgen receptor mRNA. *BioEssays* 26: 672-82
- Zhou ZX, Lane MV, Kempainen JA, French FS, Wilson EM (1995) Specificity of ligand-dependent androgen receptor stabilization: receptor domain interactions influence ligand dissociation and receptor stability. *Mol Endocrinol* 9: 208-18
- Ziegler A, König IR (2006) *A Statistical Approach to Genetic Epidemiology*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

9. EIGENE PUBLIKATIONEN

Hillmer AM*, **Brockschmidt FF***, Hanneken S, Eigelshoven S, Steffens M, Flaquer A, Herms S, Becker T, Kortüm AK, Nyholt DR, Zhen Zhao Z, Montgomery GW, Martin NG, Mühleisen TW, Alblas MA, Moebus S, Jöckel KH, Bröcker-Preuss M, Erbel R, Reinartz R, Betz RC, Cichon S, Propping P, Baur MP, Wienker TF, Kruse R, Nöthen MM - A genome-wide association scan identifies new susceptibility variants for male pattern baldness on chromosome 20p11 (eingereicht)

Hillmer AM, Flaquer A, Hanneken S, Eigelshoven S, Kortüm AK, **Brockschmidt FF**, Golla A, Metzen C, Thiele H, Kolberg S, Reinartz R, Betz RC, Ruzicka T, Hennies HC, Kruse R, Nöthen MM (2008) Genome-Wide Scan and Fine-Mapping Linkage Study of Androgenetic Alopecia Reveals a Locus on Chromosome 3q26. *Am J Hum Genet* e-pub:doi:10.1016/j.ajhg.2007.11.014

Brockschmidt FF, Nöthen MM, Hillmer AM (2007) The two most common alleles of the coding GGN repeat in the androgen receptor gene cause differences in protein function. *J Mol Endocrinol* 39: 1-8

Abou Jamra R, Sircar I, Becker T, Freudenberg-Hua Y, Ohlraun S, Freudenberg J, **Brockschmidt F**, Schulze TG, Gross M, Spira F, Deschner M, Schmal C, Maier W, Propping P, Rietschel M, Cichon S, Nöthen MM, Schumacher J (2005) A family-based and case-control association study of trace amine receptor genes on chromosome 6q23 in bipolar affective disorder. *Mol Psychiatry* 10: 618-20

Hillmer AM, Hanneken S, Ritzmann S, Becker T, Freudenberg J, **Brockschmidt FF**, Flaquer A, Freudenberg-Hua Y, Jamra RA, Metzen C, Heyn U, Schweiger N, Betz RC, Blaumeiser B, Hampe J, Schreiber S, Schulze TG, Hennies HC, Schumacher J, Propping P, Ruzicka T, Cichon S, Wienker TF, Kruse R, Nöthen MM (2005) Genetic variation in the human androgen receptor gene is the major determinant of common early-onset androgenetic alopecia. *Am J Hum Genet* 77: 140-8

Brockschmidt F (1996) Diabetes mellitus Typ I und Sport am Beispiel eines 10 km Dauerlaufes. *Diabetes aktuell / Hallo-Du* 1: 58-61

* Diese Autoren teilen sich die Erstautorenschaft

10. ANHANG

Anhang I: Tabellarische Übersicht der verwendeten Primer und Sonden zu PCR- bzw. TaqMan-Ansätzen (A) und zu Sequenom Plexen (B).

A: Die linke Spalte gibt die Loci der Primer an. Unter Bezeichnung sind die zum Teil in dieser Arbeit verwendeten Kürzel aufgelistet. In der Spalte Sequenz 5'-3' sind die Sequenzen der Primer und Sonden aufgeführt, gegebenenfalls mit Fluoreszenzmarkierung. Die Spalte „bp“ gibt die zu erwartende Fragmentlänge in Basenpaaren an. Die rechte Spalte beinhaltet Informationen bezüglich vom Standard abweichender PCR-Bedingungen (siehe 3.11.6). Hellgrau unterlegt sind die Primer und Sonden der quantitativen PCR.

Locus	Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	bp	Bemerkung / vom Standard abweichende PCR-Bedingungen
Androgenrezeptor	AR F-Primer	unbekannt	unbekannt	ABI TaqMan-Assay Hs00171172_m1
	AR R-Primer	unbekannt		
	AR Sonde	unbekannt		
Androgenrezeptor	GGC F2	**NED**CCTGGCACACTCTCTTCACA	~247	25 µl Ansatz mit 38 Zyklen bei 68°C Annealing-Temperatur
	GGC R2	GGATAGGGCACTCTGCTCAC		
	AR-GGC CLON F	CAACTTTCCACTGGCTCTGG	~450	Ansatz mit 0,5 mM MgCl ₂ und 61°C Annealing-Temperatur
	AR-GGC CLON R	GGATAGGGCACTCTGCTCAC		
Charlie_B (=EST BE789145)	CHARLIE_B-2EX3F	ACCTGACATCAACGTACAAAGATTCA	89	ABI Custom TaqMan-Assay CHARLIE-B-2EX3
	CHARLIE_B-2EX3R	GCGGCTTCTCCTCTGCAT		
	CHARLIE_B-2EX3M2	CATGGCCACAAGAGTTA		
Charlie_B (=EST BE789145)	CharlieB_genExWF	GATTGGCAATTCCTGTGGAC	356	2,0 mM MgCl ₂ bei 54°C Annealing-Temperatur
	CharlieB_genExWR	TCATTTAAGACTGGTGGTTGCT		
	CharlieB_genExXF	GGTCCCAAGATCCTTTCTGC	496	2,0 mM MgCl ₂ bei 54°C Annealing-Temperatur
	CharlieB_genExXR	TCTGGAGCCAAAAGCAAAT		
	CharlieB_genExYF	TCCAGGCTAGCTTTAGGTGAG	244	2,0 mM MgCl ₂ bei 54°C Annealing-Temperatur
	CharlieB_genExYR	TCTGGACGTCCTTAGGTTCCG		
	CharlieB_genExZF	TGAAGTCATAAGTGTAGGGCTCTAAT	300	2,0 mM MgCl ₂ bei 54°C Annealing-Temperatur
CharlieB_genExZR	TTTAGTGATTGTATTAGTCAGTTCAGG			
Cyclophilin	Cyc F-Primer	unbekannt	unbekannt	ABI TaqMan-Assay 4326316E
	Cyc R-Primer	unbekannt		
	Cyc Sonde	unbekannt		
Kojak (=EST BQ013595)	KOJAK-2EX3F	AGACATACTTTTCTATTACCTTCCAATGATG	87	ABI Custom TaqMan-Assay KOJAK-2EX3
	KOJAK-2EX3R	GGTTCTGACCCTTATTATTGGAAGTCA		
	KOJAK-2EX3M1	AAGTCCCAACAAACTCCA		
Kojak (=EST BQ013595)	Kojak_genExXF	CTGCCCTGTTTTCTTTGGAA	206	2,0 mM MgCl ₂ bei 55°C Annealing-Temperatur
	Kojak_genExXR	TTGCTGAACAAAGCCACTCTT		
	Kojak_genExYF	TTTCAAACGAAAAATGTTCCA	232	2,0 mM MgCl ₂ bei 55°C Annealing-Temperatur
	Kojak_genExYR	AATGGACCTCCCACAAATGA		
	Kojak_genExZF	GGTGAGCATTTTTAGGTTTGG	683	57,8°C Annealing-Temperatur
	Kojak_genExZR	CCCACACAATTGGCTTGAAT		
β-2-Microglobulin	β2M F-Primer	unbekannt	unbekannt	ABI TaqMan-Assay 4326319E
	β2M R-Primer	unbekannt		
	β2M Sonde	unbekannt		
Pax1 (paired box gene 1)	PAX1_CUST-3EX4F	GGCTAGAGAAACCTGCCTTAGAG	72	ABI Custom TaqMan-Assay PAX1_CUST-3EX4
	PAX1_CUST-3EX4R	CGCCCACGGCAGAGA		
	PAX1_CUST-3EX4M1	ACACTCAGTCGGCCTCC		

B: Die linke Spalte gibt die dbSNP-Bezeichnung der Primer an. Es folgen die entsprechende Sequenzen der F-, R- und Extensionsprimer jeweils in 5'-3' Richtung. Die Plex-Zugehörigkeit gibt an, in welchem Plex die Primer zur Anwendung kamen. Die rechte Spalte gibt die pro Plex eingesetzten Primerkonzentrationen der Extensionsprimer an, wie unter 3.11.14 beschrieben. Um die massenabhängigen Extensionsprimer-Konzentrationen und -Gruppenzugehörigkeiten zu verdeutlichen, wurden sie alternierend grau/weiß unterlegt.

Bezeichnung	F-Primer	R-Primer	Extensionsprimer	Plex-Zugehörigkeit	Massenabhängige Extensionsprimer-Konzentration
rs1139488	ACGTTGGATGCCTTCCTTCAACCCCTCTAC	ACGTTGGATGAAGGGCCTCAGCATCTCTTC	CAGCCGCTTCACACC	Plex 1	7 µM
rs500629	ACGTTGGATGGCCCTGTAGATGAGAGCTTC	ACGTTGGATGTTGACCTGGATGTCTTTGGG	TGGGGTCTATGGCAC	Plex 1	7 µM
rs300639	ACGTTGGATGACTGAAAATGAATGATAGA	ACGTTGGATGCTTACACCTGAGTTTCTAC	GGAGGGGGAAGTATT	Plex 1	7 µM
rs11975187	ACGTTGGATGGATTTTGCCAACTGATAGTG	ACGTTGGATGCCATTTTGCATTTCCACCATC	TAAGAGTCACATGCACA	Plex 1	7 µM
rs3786343	ACGTTGGATGTGTTCCCGAATTTGCCTGC	ACGTTGGATGATGGATTATCAGGAGATTC	aAGATTCTGGGATCCA	Plex 1	7 µM
rs11584662	ACGTTGGATGCTGCAATACCATTGCTTCAG	ACGTTGGATGGTAATTGCCAGACAGGTTCC	taCTCTCACTTGTGCAC	Plex 1	7 µM
rs9856948	ACGTTGGATGAGCTGGACAAGATAGATTGG	ACGTTGGATGTCCTGCAACCTTTGCACAAG	GGGTCTGTCTCCAGAGG	Plex 1	9,3 µM
rs17817969	ACGTTGGATGACGGTAACAGTGTAACCTCG	ACGTTGGATGCGTCGACGAAAGCTATTACC	GAAAGCTATTACCCAACAC	Plex 1	9,3 µM
rs3786939	ACGTTGGATGTCCTCCACTCATGAAAGAAC	ACGTTGGATGAACCCAGCTGCTTTGTTGAG	TGCTTTGTTGAGTAATGTC	Plex 1	9,3 µM
rs10992241	ACGTTGGATGAATGCTGAAAGTGGAGTGTC	ACGTTGGATGGGATTAAGAGAGAGAGTTC	tAGAGAGAGTTCCCAATACA	Plex 1	9,3 µM
rs2551182	ACGTTGGATGAAAACCTGCCTAGTTTGGTGG	ACGTTGGATGGAAAGTGGAAAATCACCCC	acgTCACATGGGATAGAGA	Plex 1	9,3 µM
rs11725633	ACGTTGGATGACAGTACAGAGTAGGTGGTG	ACGTTGGATGCAAAGCCCGCTTAGATTTTC	GATTTCTAGCATACCTTTCTT	Plex 1	9,3 µM
rs7319347	ACGTTGGATGCAAAGATGTCCACATTACCC	ACGTTGGATGGGATGATCTCCCATCAAAG	CATTTCTGCCCTGTAAGTTAA	Plex 1	11,6 µM
rs1998076	ACGTTGGATGGGAAATGGTAGCATGTAGTC	ACGTTGGATGCTTTGTCTTCTCATCTGAGT	gATCTGAGTTAACAGATTTGG	Plex 1	11,6 µM
rs4976846	ACGTTGGATGATACCGACACTGTACCCGAG	ACGTTGGATGGACAACAGAACTTTTAGGAC	TTTAGGACATGTCTAATGTCTT	Plex 1	11,6 µM
rs6804475	ACGTTGGATGTCTTGAAGGTACCTTTACCA	ACGTTGGATGTGGCAGTAACCTTAAGGCAG	gggcCCTTAAGGCAGTGAGAGA	Plex 1	11,6 µM
rs10001582	ACGTTGGATGGAATTGGAATAAAATTGTG	ACGTTGGATGTTACATGAATTTCTCCCCCG	cTCTTGAGTTTGTCTAAAAACAT	Plex 1	11,6 µM
rs6113491	ACGTTGGATGAAAATTGGTGGTGCCAGAGG	ACGTTGGATGCTCACCTAAAAGGAAAACC	ccctGAAAACCTGTACCCATTAAG	Plex 1	11,6 µM
rs10495747	ACGTTGGATGCCTGTATCCCTTAGATGCCT	ACGTTGGATGCTGACTCACACAGTGCTTGG	GGTAATCTTAAATGGCAATTGTTA	Plex 1	14 µM
rs4771987	ACGTTGGATGCTACACAATTTGGACAGCAG	ACGTTGGATGTGAACCTTGCCATTACGAC	gggCCATTACGACGATATAGTAGG	Plex 1	14 µM
rs6137444	ACGTTGGATGTATGGATTAGACTGCTAAC	ACGTTGGATGGAGACATTCTGCAGGGAAGC	CAACATAATTGCCTATAAAAAACATC	Plex 1	14 µM
rs13079866	ACGTTGGATGATTGAATAAAATAAACATCTT	ACGTTGGATGTACTTTGAACACTGCTGAC	ccaaTGCTGACAAAAATCTTTCATA	Plex 1	14 µM
rs201571	ACGTTGGATGAAGAGACATCACTTTGTCC	ACGTTGGATGTCCATTACAACTGGAACCCAG	GAACCCAGAAAAACAATGTCTATTTAG	Plex 1	14 µM
rs1009070	ACGTTGGATGTAACCCAGAATGGATATGCC	ACGTTGGATGCATTAGACTATCCCCATCTG	ccTCTGAATACTTTTACACAATGAATC	Plex 1	14 µM
rs17818946	ACGTTGGATGCTCATCCACCAAAAAGAAAGG	ACGTTGGATGGGAAATCTGACTTAATTGTG	cggcAATCTGACTTAATTGTGAAATAC	Plex 1	14 µM
rs4658627	ACGTTGGATGACAACAAGCGTTCATGTACC	ACGTTGGATGTGGTTCGGAATAAATTATA	TGAAAATATTAATAAATTGGTGAACATA	Plex 1	14 µM
rs1464766	ACGTTGGATGAAGTTTGCTATCATCTAGGG	ACGTTGGATGTTCCCTGAGAAGCTGTATAG	TGGTGCACCCCAAG	Plex 2	7 µM
rs6550859	ACGTTGGATGTTTCTCATTAAACCCCTTGC	ACGTTGGATGGATCACTGTTTATAACCTG	CCTGATCTCTCCCTC	Plex 2	9,3 µM
rs9300398	ACGTTGGATGAGCTCTCCCAAGTTACTCTG	ACGTTGGATGCTGGAATCTGTCTTCTAAC	TTCTAACAAAGCTTCCCA	Plex 2	11,6 µM
rs2180439	ACGTTGGATGTGCATCTTCAATTATTGC	ACGTTGGATGTAAGTTGATGCTAGCTGCCG	CTGCCGTTTTGTGTTAT	Plex 2	14 µM
rs880013	ACGTTGGATGATACTGCCACTCTACTATG	ACGTTGGATGATGAGTGAGTTGTGAGGAGG	ACTGAATGGACTACACTTC	Plex 2	14 µM
rs6986303	ACGTTGGATGACTTCTCTTCAAGGAGAC	ACGTTGGATGTGCTCAGTAAACACTTGCAG	ACATGAATGCTCTCTTACTT	Plex 2	14 µM
rs4896028	ACGTTGGATGCCTCTGAACTCTACTAGTTG	ACGTTGGATGCACAAGGTCAAGATATTCAAG	GTCAAGATATTCAAGTCAAT	Plex 2	14 µM

Anhang II: Custom TaqMan Assays

Die cDNA der untersuchten ESTs bzw. Gene ist dargestellt. Die Sequenzen wurden über die NCBI-Datenbank ermittelt. Exon-Exon Grenzen sind rot, die Sonden gelb und die flankierenden Primer grün unterlegt. 5'- und 3'-UTR Sequenzen sind in blauer Schriftfarbe kenntlich gemacht.

Pax1 (Pax1_Cust)

AAATTGATTCCCGCAGCTGCAGCCTCCCGGTGACAGCAATTTCTCCCAATCGGATGAA
 GTTCACCCTGGGCCTGGGGTTCGCGGGCGTGGAGAGTGTCTGGGAGGGGGCAGCAGCGG
 CGGCGGCAGGCCCTGGAGCGGGCGGCAGCGCGCTCCGCTGCCGCGCACAGCGCTCTCC
 AGCCCGCGGCTGGGCCCGCCGCGGCTCTCGGCTCTCGGGCGCCCTCCCTCTATGCCTCTC
 ACGCGGCGGGCGGGCGGCCAAGCTCTCCCGGACTGCGCCGGGCCAGCCCCGGCCACC
 CCGGCCACCCCGGCGCCAGGCAGCTGGCCGGCCCGCTCGCTATGCAAGCAGACGTATGGC
 GAGGTGAACCAGCTGGGCGGTGTGTTTCGTCAACGGCCGCCCCCTGCCAACGCCATCCG
 CTTGCGCATTGTGGAGCTGGCGCAGCTGGGCATCCGACCCTGTGACATCAGTCGGCAGC
 TCCGCGTATCCCACGGCTGCGTGAGCAAGATCCTGGCGCGCTACAACGAGACCGGCTCC
 ATTCTGCCCGGGCCATCGGGGGGAGCAAGCCCCGCGTCACCACTCCCAACGTGGTCAA
 GCACATCCGGGACTACAAGCAAGGAGACCCTGGCATCTTTGCTGGGAGATCCGCGACC
 GGCTGCTGGCCGACGGCTGTGTGACAAGTACAATGTGCCTTCGGTGAGCTCCATCAGC
 CGCATCCTGCGCAACAAGATCGGCAGCCTGGCGCAGCCGGACCGTACGAGGCAAGTAA
 GCAGCCGCCGTGCGCAGCCTACGCTGCCCTACAACCACATCTACCAGTACCCTACCCCA
 GTCCCGTGTGCGCCACGGGCGCCAAGATGGGCAGCCACCCGGGGTCCCGGGCACGGCG
 GGCCACGTGAGCATCCCGCGCTCATGGCCCTCGGCACACTCGGTGAGCAACATCCTGGG
 CATCCGGACGTTTATGGAGCAAACAAGGCCCTGGCTGGGAGCGAAGGCACCGCTTACT
 CTCCCAAGATGGAAGACTGGGCCGGCGTGAACCGCACGGCCTTCCCCGCCACCCCGCA
 GTGAATGGCTAGAGAAACCTGCCTTAGAGGCAGACATTAATACACTCAGTCGGCCCTC
 CACCTCTCTGCCGTGGGGCGCTTTTCTCCCCGCTGCGCCTACCCGGCCTCCAACCAGC
 ACGGCGTGTACAGCGCCCCGGGCGGGCGGCTACCTCGCCCCGGGCCCCCGGTGGCCGCT
 GCGCAAGGTCTCTCTGGCGCCCCCGGGCCGGCTAGCTGTGCATGGCGGGGAACT
 CGCGGCAGCAATGACCTTCAAGCATCCAGCCGAGAAAGCAAGCCTCCAGCTCCGGCAG
 CAAGGCCCGGACGCCCTCAGTAGCTTACACGGACTGCCCATCCCGCCTCGACCTCCT
 AGGGGCAGCTCTCCCCGACCCGAGCCCGGAGGGAACGGCAGGCGGACCCGGGCGCACA
 GGTCTGCGCGGGCCCCGGCAATCGGCACGGGACAGGATCGGAGGACTCGCGGAGGAGG
 AAGCCAGTCCCGGGCCGCGGGTGCACGCCAGCCAGCCCCAGGCCACCCCTGCCT
 TGGCCGACCCACCACACTTCTTTATTGGTCTGGGTTTTTAGGCTTCTCTGAACCTGG
 GTTTTAGACTGCCGTACCCTCCTCACAATCCTTGCTCTGACGTGGCCTCCTTCGCTCTG
 CCAGCTTCAAATTTCTTTTTTGTCACTCCCTTGTCCGTCTCCGTCTCGCCTCTCTCCCT
 GTTTCCTTCCCCCTCTTTCTTTCTCACTCTCCCTCCCTTCCCTTTCTCTTTCCCTTCC
 TCCCTACCTTCCACCCCGGCTTTCCCCGACCTTCCAGGGCTCCCTCTGCCCTTCCACTC
 TCTTTTCTTGTCTCGACCTCTGCTCCAGTCCCGCTTCTTCCCCGCTCTCTCTTTCTA
 GTCCTCTATATGCTATCAGCCCTTTTTCTGGTCCATCCCTGTGCTTCTCTCTCTCT
 GTCTCTGGTTCTACTGTCAAGGGCCCTAGTTCCCTTTGTTTTACTGCTTCCCAACCCT
 CCCTCAGTCCCTGAGAGCCCTAGAGCCATCTCGGTGACAGTCCCTTCTCTGGCACCTGG
 GACTTTGTAGCCTTCACTCCTCTGAGCCACCAGCCCTAATGGAGGGGGGCTCAAACCT
 AGGAAGTGGACAGAAAAGCCACAGCCTTTATTTTTGTATTTTTTTTTGTAATAACAAACCC
 TAAAAAACCTCCATGAAGTGTCTCTCCCGTCGATCCCCGACGATATTGTCTGGAAA
 TCTGTTTTCTTTCTCAGAGCCAGTGGCCGCGGGCTTCTCTTCCCTTCTGAGATGATG
 TCACCCCAAAGAAGACTGGGGTAGGAGTAGGGAGCACAGGGGTGTTGGTGTTCAGT
 GCTTAGAAAACCTGGGTTGTCTGTCAGGTGTCTCTCCACCCCTCCACTCGCAACACTT
 GCTAGGGAATCCGACCAGTGGTAAACACATCAGCACTTTTTGGTGTTCAGGGGTGAGCA
 CATTGTAAATTAAGAACACAGACTGCTTCCAGGTACAAGGTTCAATTTGGACTTCTGG
 TTTGCAAGGGATTGAGGGTTAAAAAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAACAAAA
 CAACCCAGAAAGTATCTTCTAGAGCCAGCCGCAAGAGCTGTGAGCTGCTTCCAAGTTAG
 GCGAGCTGGTGGTGGTACCCTGGACATAATGCAATTCTGTAGTCAGAGCAATATCCCTG
 GCGAGAGCCTGACATCGCCTGTTAAAGGTGGCTGCCTCTGAATAAAGGAAAGCGTCTGA
 AAGGTG

PAX1_CUST-3EX4F
 PAX1_CUST-3EX4M1
 PAX1_CUST-3EX4R

Charlie-B (BE789145)

<p>GAGAGTAAGGCGCATCAGGCAGATACAAAGCATTGCTGAGATTACTGGCACTATATA AACCCTGCACTCCCAGGGAGCAGTAGAAATCTTGAGAATGGATCCATTAGAGTGTAAGG CAGACGTTAAAGATGGAGAAACCAACTTCTAATGACAGCTTGGAGCATCTGGATCTAGT CCCAGACTTTTTAGTTATAATAACTGCAAGAAAAATCTACATCCTGAAAGGGTTGAAC CCATCTTGAAAATGGCAAAATCTCCATCCTGGTGATCACTGGCACCATCACTCCAGTA CAGCCATCACTCTATGGGATCCTGGGCCTGCTTAGCACTAGGAAGGCGAATGGCTTTA AATTATGATTCTGTCTCAAGAGATAAGTCACATTGTTGAAAACCTGACATCAACGTA CAAAGATTCAATAATCATAAAAGGTAACCTCTTGTGGCCATGGGTGCAGTGTCTGCCATGC AGAGGAGAAGCCGCTGGTTGTAGCAGCAACTCCAGCTTACCTGGAGCAAAGTGCATA AAGGAAAGGCCGTGTGAGGACACAGCAAGAAGGCGGCCCTCTGCAACCTGACCAGCAA- GATCTCACCAGAAACCACCCTGCTTGCCTGTGATCTTGGAAATTCTAGCCTCTAGAAC TGTGAAACAATAAACTGTTGTTAAGCcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa</p>	<p>CHARLIE-B-2EX3F CHARLIE-B- 2EX3M2 CHARLIE- B-2EX3R</p>
--	--

Kojak (BQ013595)

<p>ttttttttttTTTTTTTAAAAGTTAATTTAACAAATTCATCTTGTGTTTGCAAGACCA- GACATGTAAGTGTGAGCTTTCGAGCTATTAAGAAAGTAGAGAATGTAATAAAGTGAA GCCCAAATGTCCTTAATACAAAATTAGACAAAATTTTATTTTCAGAGAAAAGAGACAA AAGAAGATGGCTTCCCTCACCATTTCCCAACCACAGTGAATTATTTAATAAGGGCTCGTC CTTGTTAGGATAGCTTGACCATTACTTTGCCATAAAAGGTTGCAATGTGTGCAAGTTAA GAGTGCCAGGAGAAGAGAACAGTAGACTTGGATCCTTTTTGATTGCCAGAGTAGGGAAC AGATAAGCAGACTTTTCTCAGCTTGCACCCTCAGATATTCAGGTTTTCTTAAAAGAA ATGGGGTGGAACAAAGGAGTTCTTTTTTTCTTGGCTGCAATTTCCAAAACATGGTGA AATTCTTAAGACATACTTTTCTATTACCTTCCAATGATGTGAAGTCCCAACAAACTCC ATCTGGATTGAGTTCCAATAATAAGGGTCAGAACCCTTGTCCATACCTTTACAACAGTG GATATGAcctcgtgccgcctcgt</p>	<p>KOJAK-2EX3R KOJAK-2EX3M1 KOJAK-2EX3F</p>
---	---

Anhang III: Ergebnisse der Replikationsanalyse (319 Betroffene und 234 Nicht-Betroffene)

Die SNP-Position beruht auf NCBI build36; pATT nom. = nominaler pATT.

dbSNP ID	Chr.	Position [bp]	MAF Betroffene	MAF Kontrollen	pATT nom.	OR (95% c.i.)
rs6113491	20p	22005415	0,364 (C)	0,447 (A)	8,13E-10	2,17 (1,70 - 2,77)
rs2180439	20p	21801100	0,303 (C)	0,485 (C)	1,37E-09	2,17 (1,70 - 2,78)
rs1998076	20p	21828045	0,301 (A)	0,479 (A)	3,69E-09	2,13 (1,66 - 2,73)
rs201571	20p	21961514	0,313 (C)	0,483 (C)	2,21E-08	2,05 (1,60 - 2,62)
rs6137444	20p	21733639	0,277 (C)	0,404 (C)	1,57E-05	1,76 (1,37 - 2,27)
rs10992241	9q	91971333	0,289 (C)	0,201 (C)	8,68E-04	1,62 (1,22 - 2,15)
rs11725633	4p	38014530	0,422 (T)	0,479 (T)	0,058	1,26 (0,99 - 1,60)
rs4771987	13q	96699391	0,417 (G)	0,363 (G)	0,075	1,25 (0,98 - 1,60)
rs6804475	3q	113152321	0,292 (A)	0,340 (A)	0,081	1,25 (0,97 - 1,62)
rs3786939	19q	44888022	0,202 (A)	0,162 (A)	0,085	1,31 (0,96 - 1,79)
rs880013	9p	1425496	0,431 (C)	0,479 (C)	0,123	1,21 (0,95 - 1,54)
rs500629	11q	113550770	0,307 (G)	0,276 (G)	0,249	1,17 (0,90 - 1,52)
rs9300398	13q	96690316	0,335 (T)	0,303 (T)	0,252	1,16 (0,90 - 1,50)
rs1009070	11p	29484237	0,062 (G)	0,076 (G)	0,35	1,25 (0,78 - 2,00)
rs4896028	6q	134580872	0,268 (G)	0,244 (G)	0,368	1,14 (0,86 - 1,50)
rs10495747	2p	24426647	0,130 (C)	0,115 (C)	0,458	1,15 (0,80 - 1,65)
rs17817969	18q	70473226	0,147 (T)	0,132 (T)	0,483	1,13 (0,80 - 1,60)
rs6986303	8q	134547711	0,288 (A)	0,269 (A)	0,495	1,10 (0,84 - 1,43)
rs10001582	4q	124716175	0,429 (A)	0,409 (A)	0,51	1,09 (0,85 - 1,38)
rs3786343	18q	59798875	0,395 (T)	0,376 (T)	0,527	1,08 (0,85 - 1,38)
rs1464766	5q	111641241	0,324 (A)	0,342 (A)	0,545	1,08 (0,84 - 1,39)
rs11975187	7q	153670624	0,346 (G)	0,363 (G)	0,559	1,08 (0,84 - 1,38)
rs11584662	1q	183312481	0,436 (T)	0,453 (T)	0,573	1,07 (0,84 - 1,36)
rs17818946	18q	70519734	0,108 (G)	0,098 (G)	0,588	1,11 (0,75 - 1,65)
rs6550859	3p	24385419	0,498 (A)	0,483 (A)	0,608	1,06 (0,84 - 1,35)
rs9856948	3q	189240103	0,350 (C)	0,340 (C)	0,735	1,04 (0,81 - 1,34)
rs2551182	2p	24352068	0,099 (T)	0,096 (T)	0,886	1,03 (0,69 - 1,54)
rs7319347	13q	66977210	0,160 (C)	0,162 (C)	0,91	1,02 (0,74 - 1,41)
rs4658627	1q	240837217	0,270 (A)	0,274 (A)	0,911	1,02 (0,78 - 1,33)
rs300639	9p	32776553	0,023 (T)	0,023 (T)	1	1,00 (0,44 - 2,27)

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Bonn, den 18. März 2008

Felix Brockschmidt