

**Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

**Assoziationsuntersuchung zu genetischen Varianten von SV2C und der
Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörung**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Jan Kellner

aus Würzburg

Würzburg, Juli 2009

Referent: Prof. Dr. med. K.P. Lesch

Korreferent: Prof. Dr. med. A. Warnke

Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

17.5.2010

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Tabellen, Abbildungen und Abkürzungen

1.	Einleitung	1
1.1	Aufmerksamkeitsdefizit/ Hyperaktivitätsstörung (ADHS)	1
1.1.1	Definition und Symptomkriterien	2
1.1.2	Epidemiologie und Komorbidität	4
1.1.3	Therapie	6
1.1.4	Neurobiologischer Hintergrund	8
1.1.5	Molekulare Genetik	10
1.2	Neurotransmission	13
1.2.1	Synaptische Vesikel	14
1.2.1.1	Zyklus der SV bei der Neurotransmission	14
1.2.1.2	Aufbau der synaptischen Vesikel	15
1.2.2	SV2C als Kandidatengen	17
1.2.2.1	Die Proteinfamilie SV2	17
1.2.2.2	Struktur und Funktion von SV2C	19
1.2.2.3	SV2C und ADHS	21
1.3.	Zusammenfassung und Zielsetzung	22
2.	Material und Methoden	23
2.1	Material	23
2.1.1	Oligonukleotide	23
2.1.2	Puffer	23
2.1.3	Enzyme	24
2.1.4	Arbeitsgeräte	25
2.1.5	Chemikalien	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Genstruktur von SV2C	27

2.2.2	SNP und Haploblocks	27
2.2.3	Molekulargenetische Methoden	29
2.2.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR)	29
2.2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.3.3	Restriktionsverdau	31
2.2.4	Statistische Methoden	32
2.2.4.1	Transmissions-Disequilibrium-Test	32
2.2.4.2	Hardy-Weinberg Gleichgewicht	33
3.	Ergebnisse	34
4.	Diskussion	38
5.	Zusammenfassung	45
6.	Literaturverzeichnis	47

Danksagungen

Lebenslauf

Verzeichnis der Tabellen

- Tab. 1 Symptomkriterien der hyperkinetischen Störung nach ICD-10 (Forschungskriterien) und die Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung nach DSM-IV
- Tab. 2 Untersuchte Kandidatengene für ADHS
- Tab. 3 Wichtige Neurotransmitter im Gehirn
- Tab. 4 Verwendete PCR-Primer
- Tab. 5 Verwendete Puffer bei PCR und Gel-Elektrophorese
- Tab. 6 Enzyme und Produktlängen für den Restriktionsverdau
- Tab. 7 Verwendete Arbeitsgeräte
- Tab. 8 Verwendete Chemikalien
- Tab. 9 Reaktionsansatz der PCR
- Tab.10 Reaktionsansatz des Restriktionsverdaus (Gesamtvolumen 20 μ l)
- Tab.11 Auswertung der Proben 0455- 0551 des SNP rs30196 anhand des Digest-Gels
- Tab.12 Allelverteilung des Patientenkollektivs
- Tab.13 Transmission disequilibrium test (TDT)
- Tab.14 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Verzeichnis der Abbildungen

- Abb.1 Der Zappel-Philipp von Heinrich Hoffmann (1)
- Abb.2 Heritabilität von ADHS bei monozygoten Zwillingen
- Abb.3 Das Profil der Komorbidität bei ADHS-Patienten
- Abb.4 Zyklus der synaptischen Vesikel
- Abb.5 Aufbau eines synaptischen Vesikels
- Abb.6 Modell eines SV2-Proteins
- Abb.7 Schematischer Aufbau Genstruktur von *SV2C*
- Abb.8 Untersuchte SNP in einem Haploblock des Promotorbereichs von *SV2C*
- Abb.9 Invertierte Fotografie eines PCR-Gels des SNP rs30196
- Abb.10 Invertierte Fotografie eine Digest-Gels mit dem ersten Hälfte der in Abb. 9 gezeigten PCR-Produkten
- Abb.11 Invertierte Fotografie eines Digest-Gels mit dem zweiten Hälfte der in Abb. 9 gezeigten PCR-Produkten
- Abb. 12 P-Werte der untersuchten Polymorphismen

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Alanin
Abb.	Abbildung
aCGH	array comparative genomic hybridization
ad	bis/auf
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitäts-Syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BoNT/(B/G)	Botulinus-Toxin
bp	Basenpaar
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalziumion
CD	Störung des Sozialverhaltens
<i>CHRNA4</i>	nicotinerger Acetylcholin-Rezeptorgen alpha 4
<i>COMT</i>	Catechol-O-Methyltransferase
<i>CSP</i>	Cystein string protein
C-Terminus	Carboxy-Terminus
<i>DAT</i>	Dopamintransporter
<i>DAT-KO</i>	Dopamintransporter-Knockout- Mäuse
<i>DBH</i>	Dopamin-β-Hydroxylase
<i>DDC</i>	Dopa-decarboxylase
dest.	Destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>DRD2</i>	Dopaminrezeptor D2
<i>DRD3</i>	Dopaminrezeptor D3
<i>DRD4</i>	Dopaminrezeptor D4
DSM-IV	The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
Et al.	et alii (und andere)
<i>FADS2</i>	fatty acid desaturase
G	Guavin
GABA	γ-Aminobuttersäure
H ⁺	Proton
HCl	Salzsäure
<i>HTR2A</i>	5-Hydroxytryptaminrezeptor 2°
<i>HTR1B</i>	5-Hydroxytryptaminrezeptor 1B
<i>HTR2C</i>	5-Hydroxytryptaminrezeptor 2C

HWG	Hardy-Weinberg Gleichgewicht
ICD-10	The International Statistical Classification of Diseases
L	Liter
K ⁺	Kaliumion
kb	Kilobase
LD	Linkage disequilibrium
M	Molar
MAF	minimale Allelfrequenz
MAO-A	Monoaminoxidase
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
MPH	Methylphenidat
MRT	Magnetresonanztomographie
MTA-Studie	Multimodal Treatment Study of Children With ADHD
NET	Noradrenalin-Transporter
nm	Nanometer
NT	Neurotransmitter
N-Terminus	Amino-Terminus
ODD	Oppositionelle Störung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFC	Präfrontaler Kortex
pH	Pondus Hydrogenii (Säuregrad einer Lsg.)
QTL	Quantitative Trait Loci
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
r ²	Determinationskoeffizient
S	Sekunde
<i>SCAMP</i>	secretory carrier membrane protein
<i>SERT</i>	Serotonintransporter
<i>SHR</i>	Spontaneously Hypertensive Rats
<i>SNAP-25</i>	Synaptosomal assoziiertes Protein 25
SNARES	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSRI	Selektive Serotonin- Wiederaufnahmehemmer
SV	Synaptisches Vesikel
<i>SV2A</i>	Synaptisches Vesikelprotein 2A
<i>SV2B</i>	Synaptisches Vesikelprotein 2B
<i>SV2C</i>	Synaptisches Vesikelprotein 2C

<i>SVOP</i>	SV two-related protein
<i>SYP</i>	Synaptophysin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TDT	Transmissions-Disequilibrium-Test
<i>TPH2</i>	Tryptophanhydroxylase 2
U	Unit
UV	Ultraviolett
μl	Mikroliter
μs	Mikrosekunde
V	Volt
WKY	normotensive Wistar-Kyoto-Ratten
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörung



"Ob der Philipp heute still
Wohl bei Tische sitzen will ?"
Also sprach in ernstem Ton
Der Papa zu seinem Sohn,
Und die Mutter blickte stumm
Auf dem ganzen Tisch herum.
Doch der Philipp hörte nicht,
Was zu ihm der Vater spricht.
Er gaukelt
Und schaukelt,
Er trappelt
Und zappelt
Auf dem Stuhle hin und her.
"Philipp, das mißfällt mir sehr !"

Abb.1: Der Zappel-Philipp von Heinrich Hoffmann (1) [Hoffmann, 1988]

Heinrich Hoffmann beschrieb 1846 in seinem Buch „Der Struwwelpeter“ mit der Geschichte des Zappel-Philipps als erster Psychiater typische Symptome der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS). Die Geschichte handelt vom kleinen Jungen Philipp, der trotz der Ermahnungen seiner Eltern nicht still am Tisch sitzen kann, ständig mit dem Stuhl schaukelt und am Ende mitsamt der Tischdecke und der Mahlzeit auf den Boden fällt. „Der Struwwelpeter“ gilt als die Erstbeschreibung von ADHS und repräsentiert damit ein wichtiges Dokument der Medizingeschichte. Die Erzählung des Zappel-Philipps zeigt zudem, dass die Diagnose ADHS keine „Erfindung“ der Moderne ist [Thome et al., 2003].

1902 berichtete George Still, ein Kinderarzt, von Hyperaktivität bei einer Gruppe von Kindern, die unter dem Defizit der „gewollten Hemmung“ bzw. unter fehlender moralischer Kontrolle leiden. Dazu beschrieb er schon damals Merkmale von ADHS. Er

erkannte, dass dieser Erkrankung eine familiäre Prädisposition zugrunde liegt, dass Jungen häufiger als Mädchen betroffen sind und dass bei Verwandten des Betroffenen vermehrt Kriminalität, Alkoholismus und Depressionen auftreten. Als Ursache für die Symptomatik der Hyperaktivität vermutete er eine Schädigung des Zentralen Nervensystems.

Stills Erkenntnisse wurden durch die Forschung der nächsten 50-90 Jahre bestätigt. Charles Bradley entdeckte 1937, dass das Psychopharmakum Bazedrin einen sedierenden Effekt auf die Hyperaktivität betroffener Kindern hat. Diese Erkenntnis bildete die Grundlage für nachfolgende Behandlungen mit d-Amphetamin und Methylphenidat, die heute Mittel der Wahl bei der medikamentösen Behandlung von ADHS-Patienten darstellen [Levy et al., 2001].

1.1.1 Definition und Symptomkriterien

Die klinische Diagnosestellung von ADHS wird auf der Basis der Kriterien der International Statistical Classification of Diseases (ICD-10) beziehungsweise des Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV) gestellt [American Psychiatric Association, 1994; Schmidt et al., 2001].

Nach heutiger Definition ist ADHS durch die Symptomtrias Aufmerksamkeitsstörung, motorischer Überaktivität und ausgeprägter Impulsivität gekennzeichnet, die in einem für den Entwicklungsstand des Betroffenen abnormen Ausmaß situationsübergreifend auftritt. Die Störung beginnt vor dem siebten Lebensjahr und sollte in mindestens zwei Lebensbereichen/Situationen (z.B. in der Schule, in der Familie oder in der Untersuchungssituation) konstant auftreten. Die Symptome verursachen eine weitreichende Beeinträchtigung der sozialen, schulischen oder beruflichen Funktionsfähigkeit. Zudem darf die Störung nicht die Kriterien für eine tiefgreifende Entwicklungsstörung, eine manische Episode, eine depressive Episode oder eine Angststörung erfüllen.

Die Unterschiede zwischen DSM-IV und ICD-10 sind bezüglich hyperkinetischer Störungen eher gering; für beide sind die Symptomkriterien gestörte Aufmerksamkeit, Hyperaktivität und Impulsivität entscheidend.

Im Folgenden werden nun die Symptomkriterien nach ICD-10 F.90 und DSM IV vorgestellt.

Aufmerksamkeitsstörung:

1. Beachtet häufig Einzelheiten nicht oder macht Flüchtigkeitsfehler bei den Schularbeiten, bei der Arbeit oder bei anderen Tätigkeiten.
2. Hat oft Schwierigkeiten, längere Zeit die Aufmerksamkeit bei Aufgaben oder Spielen aufrechtzuerhalten.
3. Scheint häufig nicht zuzuhören, wenn andere ihn ansprechen.
4. Führt häufig Anweisungen anderer nicht vollständig durch und kann Schularbeiten, andere Arbeiten oder Pflichten am Arbeitsplatz nicht zu Ende bringen (nicht aufgrund oppositionellem Verhalten oder Verständnisschwierigkeiten).
5. Hat häufig Schwierigkeiten, Aufgaben und Aktivitäten zu organisieren.
6. Vermeidet häufig, hat eine Abneigung gegen oder beschäftigt sich häufig nur widerwillig mit Aufgaben, die länger andauernde geistige Anstrengungen erfordern (wie Mitarbeit im Unterricht oder Hausaufgaben).
7. Verliert häufig Gegenstände, die er/sie für Aufgaben oder Aktivitäten benötigt (z.B. Spielsachen Hausaufgabenhefte, Stifte, Bücher oder Werkzeug).
8. Lässt sich oft durch äußere Reize leicht ablenken.
9. Ist bei Alltagstätigkeiten häufig vergesslich.

Hyperaktivität:

1. Zappelt häufig mit Händen oder Füßen oder rutscht auf dem Stuhl herum.
2. Steht in der Klasse oder in anderen Situationen auf, in denen Sitzen bleiben erwartet wird.
3. Lläuft häufig herum oder klettert exzessiv in Situationen, in denen dies unpassend ist (bei Jugendlichen und Erwachsenen kann dies auf ein subjektives Unruhegefühl beschränkt sein).
4. Hat häufig Schwierigkeiten, ruhig zu spielen oder sich mit Freizeitaktivitäten ruhig zu beschäftigen.
5. Ist häufig „auf Achse“ oder handelt oftmals, als wäre er „getrieben“ (nur ICD-10).
6. Zeigt ein anhaltendes Muster exzessiver motorischer Aktivität, das durch die soziale Umgebung oder durch Aufforderungen nicht durchgreifend beeinflussbar ist (nur DSM-IV).

Impulsivität:

1. Platzt häufig mit der Antwort heraus, bevor die Frage zu Ende gestellt ist.
2. Kann häufig nur schwer warten, bis er/sie an der Reihe ist (bei Spielen oder in Gruppensituationen (nur ICD-10)).
3. Unterbricht und stört andere häufig (platzt z.B. in Gespräche oder in Spiele anderer hinein).
4. Redet häufig übermäßig viel ohne angemessen auf soziale Beschränkungen zu reagieren (nur ICD-10); in DSM-IV unter Hyperaktivität subsumiert.

Tabelle 1: Symptomkriterien der hyperkinetischen Störung nach ICD-10 (Forschungskriterien) und des Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom nach DSM-IV [American Psychiatric Association, 1994; Schmidt et al., 2001]

Für die einfache Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung (F90.0) sind folgende Symptome gefordert: Mindestens sechs Monate lang bestehen mindestens sechs der Symptome der Aufmerksamkeitsstörung, drei Symptome der Hyperaktivität und ein Symptom der Impulsivität in einem mit dem Entwicklungsstand des Kindes nicht zu vereinbarenden und unangemessenen Ausmaß.

Nach DSM-IV werden drei Typen unterschieden:

- Der Mischtyp liegt vor, wenn sechs Symptome einer Aufmerksamkeitsstörung und sechs Symptome einer Hyperaktivität und Impulsivität für mehr als sechs Monate auftreten.
- Der vorwiegend unaufmerksame Typ weist mindestens sechs Symptomkriterien einer Aufmerksamkeitsstörung auf, wohingegen Hyperaktivität und Impulsivität nicht oder nicht hinreichend stark ausgebildet sind.
- Der vorwiegend hyperaktiv-impulsive Typ weist mindestens sechs Symptomkriterien für Hyperaktivität und Impulsivität auf, wohingegen eine Aufmerksamkeitsstörung nicht oder nicht hinreichend stark ausgebildet ist.

1.1.2 Epidemiologie und Komorbidität

Mit einer Prävalenz von 8-12 % [Faraone et al., 2005] bzw. 3-10% [American Psychiatric Association, 1994] weltweit ist ADHS eine der häufigsten psychiatrischen Erkrankungen des Kindesalters. Einige epidemiologische Studien besagen sogar, dass die Prävalenz drei- bis viermal so hoch ist [Paule et al., 2000].

Für die Ätiologie von ADHS werden genetische und biochemische Faktoren, die Umwelt und der soziale Hintergrund diskutiert. Dabei sehen Hill und Taylor (2001) die genetische Komponente als das wichtigste Element an.

Familienstudien haben gezeigt, dass Eltern, deren Kinder von ADHS betroffen sind, ein zwei- bis achtfach erhöhtes Risiko für ADHS aufweisen. Weitere Verwandte der betroffenen Kinder haben ein ähnlich gesteigertes Risiko [Faraone et al., 2005]. Dabei wird ein ADHS-Subtyp innerhalb einer Familie nicht überdurchschnittlich vererbt [Faraone et al., 2000].

Noch aussagekräftiger sind Zwillings- und Adoptionsstudien, da hierbei der genetische Hintergrund von Umwelteinflüssen besser getrennt werden kann.

Die Konkordanzraten belaufen sich bei monozygoten Zwillingen auf 50-80%, hingegen bei dizygoten auf 30-40% [Heiser et al., 2004].

Im Folgenden sind die Ergebnisse verschiedener Zwillingsstudien zur Heritabilität von ADHS, die in den USA, Australien, Skandinavien und in der Europäischen Union durchgeführt wurden, in Abbildung 1 dargestellt. Dabei lag im Mittel die Erbllichkeit für ADHS bei monozygoten Zwillingen bei 77%.

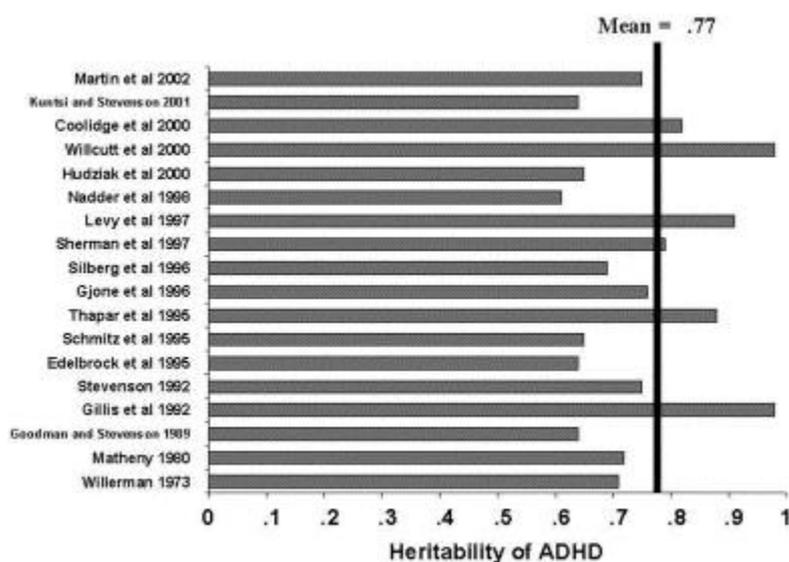


Abb. 2: Heritabilität von ADHS bei monozygoten Zwillingen [Biederman, 2005]

Bei Adoptionsstudien wurde deutlich, dass ein höherer Anteil an Hyperaktivität unter den leiblichen Eltern von betroffenen Kindern im Vergleich zu Adoptiveltern zu verzeichnen ist [Biederman, 2005].

Zudem ist ADHS häufig mit anderen psychiatrischen Erkrankungen vergesellschaftet. In einer Studie von Kadesjo und Gillberg (2001) lag in einer Stichprobe von schwedischen Kindern mit ADHS die Prävalenz für eine weitere psychiatrische Erkrankung bei 87% und für zwei oder mehr bei 67%. Die dabei am häufigsten auftretenden Komorbiditäten sind dissoziale Persönlichkeitsstörungen, Oppositionelle Störung (ODD) und Störung des Sozialverhaltens (CD), Lern- und Entwicklungsstörungen sowie affektive Störungen, Angststörungen und Tic-Störungen. In Abbildung 3 ist das Profil der Komorbidität bei ADHS- Patienten nach Biederman (2005) dargestellt.

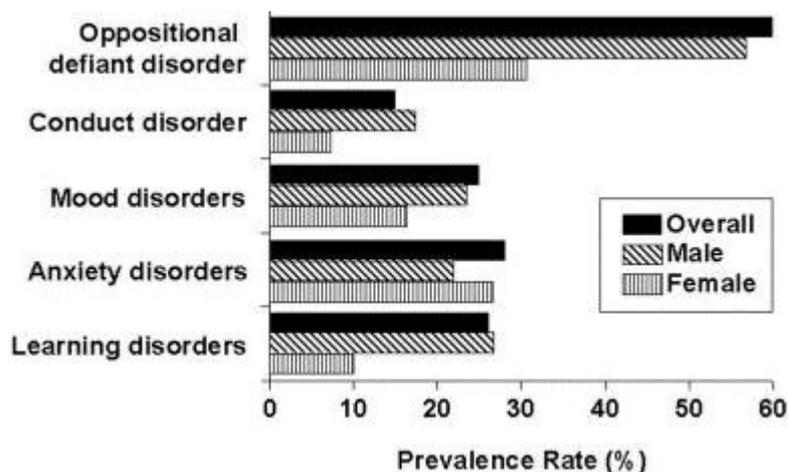


Abb.3: Das Profil der Komorbidität bei ADHS- Patienten

Die Symptomatik setzt sich häufig auch ins Jugend- und Erwachsenenalter fort. In einer Studie von Barkley et al. (1990) wurde beschrieben, dass 88% der untersuchten Patienten acht Jahre nach Diagnosestellung noch immer die Kriterien von ADHS erfüllten. In dieser Studie wurde eine Abnahme der Hyperaktivität mit dem Alter festgestellt, die Aufmerksamkeitsstörung war jedoch überdauernd. In der Adoleszenz zeigten Kinder mit ADHS schlechtere Schulleistungen und verminderte kognitive Fähigkeiten. Ein erhöhter Alkohol- und Nikotinabusus sowie Konsum illegaler Drogen wurde in Bezug auf Gleichaltrige beschrieben. Die Delinquenzrate war ebenfalls gesteigert, ein Zusammenhang mit der gehäuft auftretenden dissozialen Persönlichkeitsstörung wird diskutiert. Innerhalb der Familien ADHS-betroffener Kinder treten vermehrt Konflikte auf.

Häufig persistierten im Erwachsenenalter Symptome der Impulsivität, Unruhe und Unaufmerksamkeit, jedoch zeigte sich im Allgemeinen, dass die ADHS-Merkmale mit dem Alter abnehmen [Brassett-Harknett et al., 2007].

1.1.3 Therapie

Die Therapie von ADHS umfasst verhaltenstherapeutische Optionen, milieubezogene Maßnahmen und Pharmakotherapie [Goldman et al., 1998].

In der MTA- Studie (Multimodal Treatment Study of Children With ADHD) wurden diese unterschiedlichen Therapieansätze miteinander verglichen. Hierfür wurden 579 Kinder mit ADHS vom Mischtyp im Alter von 7.0- 9.9 Jahren in vier Gruppen

aufgeteilt, in denen sie mit einer bzw. zwei der unterschiedlichen Konzepte über 14 Monate hinweg behandelt wurden. Dabei zeigten sich die Kombinationstherapie aus Pharmako- und Verhaltenstherapie sowie die alleinige Pharmakotherapie gegenüber den milieubezogenen Maßnahmen oder der alleinigen Verhaltenstherapie überlegen [Jensen et al., 1999].

In der Pharmakotherapie werden überwiegend Methylphenidat (MPH), Dextroamphetaminsulfat und Atomoxetin eingesetzt.

Mittlerweile sind über 170 Studien zur medikamentösen Therapie bei mehr als 6000 Schulkindern durchgeführt worden. Dabei sprachen ungefähr 70% der Patienten auf die Medikation mit Stimulantien an, wobei „Ansprechen“ in diesem Zusammenhang eine statistisch oder klinisch signifikante Reduktion der Hyperaktivität bzw. eine vermehrte Aufmerksamkeit bedeuten soll [Goldman et al., 1998].

Bei Non-Respondern wurden andere Medikamente wie trizyklische Antidepressiva oder Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRIs) eingesetzt [Swanson et al., 2007].

MPH und d-Amphetamin sind Psychostimulantien, die als indirekte Dopaminagonisten wirken. Nach derzeitiger Studienlage blockieren sie die Wiederaufnahme von Dopamin und/oder Noradrenalin aus dem synaptischen Spalt, stimulieren deren Ausschüttung und verlängern damit die Einflussnahme dieser Neurotransmitter auf die postsynaptischen Rezeptoren. Das ebenfalls eingesetzte Pemolin wirkt in ähnlicher Weise wie die genannten Amine, obwohl es kein Amphetamin-Derivat ist, sondern ein Oxazolinon [Mutschler et al., 2001].

Volkow et al. (1998) berichteten, dass MPH durch Blockade von Dopamintransportern eine erhöhte Konzentration von Dopamin in der Synapse bewirkt. Dabei kann MPH dopaminerge Transporter abhängig von der Dosis, bei 20mg zu 54% und bei 40mg oder 60mg bis zu 72-74%, blockieren. MPH scheint daneben einen zusätzlichen Wirkmechanismus im noradrenergen System zu haben [Rohde et al., 2007]. Neben MPH sind auch andere Psychostimulantien (d-Amphetamin und Pemolin) in der Lage, dopaminerge Transporter zu inhibieren und damit die Symptome von ADHS zu lindern. In Tiermodellen wurden weitere Hinweise auf die Mechanismen der eingesetzten Pharmaka gewonnen. Hess et al. (1996) untersuchten Colobomamäuse, die eine Deletion aufwiesen, die mehrere Gene umfasste. Diese Deletion betraf unter anderem

das Gen, welches für das synaptisch assoziierte Protein 25 (SNAP-25) kodiert. Die Mäuse zeigten eine ausgeprägte motorische Hyperaktivität, die durch die Applikation von d-Amphetamin deutlich reduziert werden konnte. Diese Erkenntnisse unterstützen die Hypothese, dass eine Dysregulation im dopaminergen Transmittersystem eine Rolle in der Ätiologie von ADHS spielt [Amara et al., 1993; Faraone et al., 1998].

Atomoxetin ist ein neues Medikament in der Therapie von ADHS, das 2005 in Deutschland zugelassen wurde. Es ist als Inhibitor der präsynaptischen noradrenergen Transporter im zentralen Nervensystem (ZNS) beschrieben. Die verfügbare Konzentration an Noradrenalin und Dopamin wird hierdurch erhöht, besonders im präfrontalen Kortex (PFC) [Purper-Ouakil et al., 2005 und Brown et al., 2005].

Die Pharmakotherapie bildet jedoch nur eine Säule der Therapie von ADHS. Die Verhaltenstherapie, die Psychoedukation und milieubezogene Maßnahmen spielen ebenfalls für eine erfolgreiche Therapie eine wichtige Rolle. Die eingehende Beratung von Eltern und Institutionen wie beispielsweise der Schule sollten Teil des Therapiekonzeptes sein [Goldman et al., 1998].

1.1.4 Neurobiologischer Hintergrund

In den letzten drei Jahrzehnten lag der Fokus der neurobiologischen Forschung bezüglich ADHS auf den Monoamin-Transmittersystemen [Pliszka, 2005]. In Tierversuchen von Arnsten et al. (2005) wurden hierbei Veränderungen in den noradrenergen und dopaminergen Transmittersystemen des PFC beschrieben. Der PFC umfasst diejenigen neokortikalen Anteile des Frontallappens, die rostral des PFC bis zum Frontalpol gelegen sind. Er steht in enger Verbindung zu sensorischen Assoziationsgebieten des Kortex, zu den Basalganglien, zum dorsomedialen Nukleus des Thalamus und zum limbischen System.

Funktionen dieses Großhirnbereiches umfassen das Kurzzeitgedächtnis und höhere soziale, psychische und geistige Leistungen des Menschen. Bei Beeinträchtigung der Funktion des PFC haben ADHS-Patienten Einschränkungen in den Bereichen Planung, Problemlösung und der Aufmerksamkeit. Außerdem kann es zu impulsivem und situationsunangemessenem Verhalten kommen [Nolte, 2002; Trepel, 2004].

Mithilfe bildgebender Verfahren wie der Magnetresonanztomographie (MRT) wurden Patienten mit ADHS hinsichtlich Veränderungen ihrer Hirnstrukturen untersucht. Hierbei beschrieben Krain und Castellanos (2006) eine Volumenreduktion der Gehirne betroffener Patienten im Kindes- und Jugendalter im Vergleich zu Gesunden. Vor allem der PFC scheint signifikant kleiner zu sein. Darüber hinaus wurde über eine Verminderung der physiologisch auftretenden Asymmetrie des rechten in Vergleich zum linken präfrontalen Kortex berichtet. Ähnliche Veränderungen bezüglich der Größe und Symmetrie wurden bei den Basalganglien und im Kleinhirn beschrieben. Daneben scheint zusätzlich die weiße und graue Substanz des Gehirns vermindert zu sein. Diese genannten volumetrischen Veränderungen scheinen nicht progressive Defizite zu sein, welche vermutlich aus genetischer oder umweltbedingter Einflussnahme resultieren.

Man geht davon aus, dass bei Patienten mit ADHS im PFC ein Ungleichgewicht des noradrenergen zum dopaminergen System zugrunde liegt. Dabei wird von einer Dominanz der noradrenergen gegenüber der dopaminergen Neurotransmission ausgegangen [Malone et al., 1994; Bruno et al., 2007].

Satterfield und Dawson (1971) gehörten zu den Ersten, die eine frontolimbische Dysfunktion für eine Ursache von ADHS hielten. Sie nahmen an, dass die schwache inhibitorische Kontrolle über die limbischen Funktionen zu ADHS führen. Der erfolgreiche Einsatz von Stimulantien und verschiedene Tiermodelle zum dopaminergen System scheinen diese Annahme zu unterstützen [Faraone et al., 1998].

Spontaneously hypertensive rats (SHR) eignen sich im Tierversuch als genetisches Modell für ADHS. Sie wurden von Russell (2001) mit normotensiven Wistar-Kyoto (WKY) als Kontrollratten untersucht. Dabei reagierten die SHR nach elektrischer Stimulation von dopaminergen Neuronen mit einer geringeren Dopaminausschüttung als WKY. Neben dieser hypodopaminergen Funktion des PFC der SHR scheint die Inhibition der Noradrenalinausschüttung durch den Rezeptor selbst beeinträchtigt zu sein. Dies spricht für eine schwache Regulation der noradrenergen Funktion des PFC von SHR.

Die genannten Resultate deuten darauf hin, dass die bei ADHS auftretenden Verhaltensstörungen das Ergebnis des Ungleichgewichtes zwischen dem noradrenergen und dem dopaminergen System im PFC sind, wobei die inhibitorische dopaminerge Aktivität reduziert und die noradrenerge erhöht vorliegt [Russell, 2001]. Laut einer

Studie von Moll et al. (2000) steigert MPH wiederum signifikant diese intrakortikale inhibitorische Aktivität.

In einer weiteren Tiermodell-Studie konnten Gainetdinov et al. (1999) mithilfe Dopamintransporter-Knockout-Mäusen (DAT-KO) einen Phänotyp generieren, der in der Hyperaktivität dem Bild einer ADHS-Störung beim Menschen simulierte. Ihnen fehlte das für den Dopamintransporter (DAT) kodierende Gen, wodurch der Dopamintonus erhöht vorlag. Die Mäuse wiesen Hyperaktivität und eine Beeinträchtigung ihrer räumlichen Wahrnehmung auf. Nach Gabe von Psychostimulantien nahm ihr Bewegungsdrang ab. Dieser Effekt scheint in der serotonergen Neurotransmission begründet zu sein [Gainetdinov et al., 1999].

Zusammenfassend weisen die Wirksamkeit von Stimulantien in der ADHS-Therapie und verschiedene Tierversuche zur Pathophysiologie von ADHS auf eine Dysfunktion der Neurotransmittersysteme des Gehirns hin [Thapar et al., 2005].

1.1.5 Molekulare Genetik

Die hohe Heritabilität von ADHS führte zu molekulargenetischen Untersuchungen bezüglich der pathophysiologischen Grundlagen. ADHS wird als komplexe psychiatrische Erkrankung angesehen, an deren Entstehung eine Vielzahl von Genen mit kleineren Effekten beteiligt ist [Faraone et al., 2005]. Dabei wurden genomweite Untersuchungen auf Quantitative Trait Loci (QTL) durchgeführt. QTL bezeichnen Abschnitte auf einem Chromosom, die Einfluss auf den Phänotyp des betreffenden Organismus haben [Eley et al., 2005]. Diese Analysen bringen Hinweise auf relevante chromosomale Loci, die in Assoziationsstudien näher erforscht werden können und geben Anhalt zur Aufdeckung neuer Kandidatengene. In mehreren Kopplungsstudien wurde übereinstimmend der Marker 5p13 als relevanter Genlocus beschrieben [Oddie et al., 2003; Hebebrand et al., 2006]. Dieser chromosomale Genort 5p13 befindet sich nahe dem Dopamintransportergen (*DAT*). Friedel et al. (2007) untersuchten im Rahmen einer Feinkartierung 30 Polymorphismen dieses Gens bei 329 Familien mit 523 betroffenen Kindern. Dabei wurde der Single Nucleotide Polymorphism (SNP) rs463379 als signifikant assoziiert mit ADHS beschrieben und stellt *DAT* als interessantes Kandidatengen für ADHS in Aussicht. Dieses Beispiel zeigt, wie ein

potentielles Kandidatengen für ADHS in einer Kopplungsstudie [Hebebrand et al., 2006] erkannt und im Anschluss in einer Feinkartierung [Friedel et al., 2005] als assoziiert erkannt werden konnte.

In Kandidatengenuntersuchungen wurden Gene besonders der dopaminergen und serotonergen Transmittersysteme fokussiert [Swanson et al., 2001]. Diese Systeme wurden aufgrund der Erkenntnisse von Tierversuchen, der Pharmakotherapie und der Bildgebung ausgewählt [Mill et al., 2005]. Zudem gibt es Hinweise auf Interaktion zwischen dem dopaminergen und dem serotonergen System in der Pathophysiologie von ADHS [Hawi et al., 2002]. Weiterhin ist zusätzlich das noradrenerge System von Bedeutung. Die Erkenntnisse im PFC im Kontext mit ADHS weisen auf eine Beteiligung des noradrenergen Systems in der polygenetischen Ätiologie von ADHS hin [Malone et al., 1994].

Darüber hinaus stellen Gene, die Proteine kodieren, welche modulierenden Einfluss auf die Neurotransmission haben, eine weitere interessante Kandidatengruppe dar. Diese Proteine sind an der Synapse an der Ausschüttung und Wiederaufnahme von neuronalen Botenstoffen beteiligt und haben damit für die Regulation der Neurotransmission eine große Bedeutung [Brookes et al., 2005].

Auf der Basis dieser Überlegungen wurde eine Vielzahl von Assoziationsstudien zu Kandidatengen durchgeführt.

In der Tabelle 2 sind Kandidatengene für ADHS, die in verschiedenen Studien beschrieben worden sind, zusammengestellt.

Dopaminerges System	
<i>DAT</i> (Dopamintransporter)	Hawi et al., 2003; Brookes et al., 2005; Feng et al., 2005; Bobb et al., 2005; Friedel et al., 2007
<i>DRD2</i> (Dopaminrezeptor D2)	Rowe et al., 1999; Comings et al., 1991; Todd et al., 2002; Huang et al., 2003
<i>DRD3</i> (Dopaminrezeptor D3)	Muglia et al., 2002; Payton et al., 2001; Barr et al., 2000
<i>DRD4</i> (Dopaminrezeptor D4)	Lowe et al., 2004; Payton et al., 2001; Bellgrove et al., 2005; Barr et al., 2001
<i>DDC</i> (Dopa-decarboxylase)	Hawi et al., 2003

<i>DBH</i> (Dopamin- β -Hydroxylase)	Comings et al., 1999; Daly et al., 1999; Roman et al., 2002; Smith et al., 2003; Zhang et al., 2005
Noradrenerges System	
<i>ADRA2A</i> (Alpha 2A-Adrenoceptor)	Brookes et al., 2005
<i>NET</i> (Noradrenalin-Transporter)	Xu et al., 2005; Bobb et al., 2005; Barr et al., 2002; McEvoy et al., 2002; Comings et al., 2000; De Luca, 2004; Kent et al., 2001; Todd et al., 2003
Serotonerges System	
<i>SERT</i> (Serotonintransporter)	Curran et al., 2005; Kent et al., 2002
<i>TPH2</i> (Tryptophanhydroxylase)	Sheehan et al., 2005; Walitza et al., 2005
<i>HTR2A</i> (5-Hydroxy-tryptaminrezeptor 2A)	Li et al., 2002; Bobb et al., 2005
<i>HTR1B</i> (5-Hydroxy-tryptaminrezeptor 1B)	Hawi et al., 2002; Quist et al., 2003; Bobb et al., 2005; Li et al., 2005
<i>HTR2C</i> (5-Hydroxy-tryptaminrezeptor 2C)	Bobb et al., 2005; Li et al., 2004
Gene, die synaptische Proteine kodieren	
<i>SNAP-25</i>	Mill et al., 2002 und 2004; Brophy et al., 2002, Barr et al., 2000 ; Kustanovich et al., 2003; Feng et al., 2005 ; Bobb et al., 2005
<i>SYP</i> (Synaptophysin)	Brookes et al., 2006
<i>MAO-A</i> (Monoaminoxidase)	Domschke et al., 2005
<i>COMT</i> (Catechol-O-Methyltransferase)	Eisenberg et al., 1999; Qian et al., 2003; Bobb et al., 2005; Thapar et al., 2005
Weitere Gene	
<i>FADS2</i> (fatty acid desaturase)	Brookes et al., 2006
<i>CHRNA4</i> (nicotinerges Acetylcholin-Rezeptorgen α 4)	Brookes et al., 2006

Tabelle 2: Untersuchte Kandidatengene für ADHS

Aufgrund ihrer Fähigkeit, verschiedene Neurotransmittersysteme zu modulieren, sind Gene, die synaptische Proteine kodieren, von besonderem Interesse. Im Folgenden werden die Grundlagen der Neurotransmission, die Bedeutung von synaptischen Vesikeln und Proteinen näher erläutert.

1.2 Neurotransmission

Die Prozesse der Neurotransmission sind wichtig für das Verständnis der Pathophysiologie von ADHS. Daher werden die Abläufe der neuronalen Informationsverarbeitung im Folgenden dargestellt.

Das menschliche Gehirn besitzt circa 10 Milliarden Neurone, welche die Grundeinheiten der spezifischen Gehirnleistungen bilden. Die Verbindungen zwischen den einzelnen Neuronen werden durch Synapsen bewerkstelligt, wobei jedes Neuron über mehr als 100 derartige Verknüpfungen verfügt. Hier werden Informationen von einem Neuron auf ein folgendes über den synaptischen Spalt auf molekularem Weg durch Neurotransmitter weitergegeben. Die Botenstoffe werden anschließend im synaptischen Spalt abgebaut oder aus dem synaptischen Spalt wieder aufgenommen und in Vesikeln gespeichert. Dieses „Recycling“ geschieht aktiv durch vesikuläre Transporter. Die Speicherung von Neurotransmittern in synaptischen Vesikeln ist eine entscheidende Voraussetzung für die Funktion der Synapse.

Die Neurotransmitter unterteilt man in biogene Amine, Aminosäuren und Neuropeptide.

Typ	Wichtige Neurotransmitter
Biogene Amine	Acetylcholin, Dopamin, Noradrenalin und Serotonin
Aminosäuren	Glutamat, GABA, Glycin
Neuropeptide	Angiotensin II, β -Endorphin, Cholezystokinin, Enkephalin, Neuropeptid Y, Neurotensin, Somatostatin, Substanz P

Tabelle 3: Wichtige Neurotransmitter im Gehirn [Nolte, 2002]

In den genannten Transmittersystemen wurden verschiedene Gene zu ADHS untersucht (s. Kapitel 1.1.5). Das in dieser Arbeit untersuchte Kandidatengen *SV2C* kodiert für ein synaptisches Vesikelprotein. Im Folgenden wird auf den Aufbau und die Funktion der synaptischen Vesikel für die Neurotransmission und anschließend auf das Protein *SV2C* eingegangen.

1.2.1 Synaptische Vesikel

1.2.1.1 Zyklus der Synaptischen Vesikel

Synaptische Vesikel (SV) sind elementare Bestandteile der Neurotransmission. Sie sind für die Ausschüttung von Botenstoffen in den synaptischen Spalt verantwortlich und erfüllen damit die sekretorische Funktion der präsynaptischen Struktur. Sie befinden sich hierbei durchgehend im zyklischen Transportvorgang, dem Trafficking. Zunächst nehmen sie durch aktiven Transport Neurotransmitter auf der präsynaptischen Seite auf und sammeln sich in der aktiven Zone an (docking/priming). Die aktive Zone ist der Bereich der präsynaptischen Struktur, der auf die Transmitterausschüttung spezialisiert ist. Dort geben die SV im nächsten Schritt durch den Zustrom von Ca^{2+} getriggert die gespeicherten Neurotransmitter in den synaptischen Spalt ab. Dies geschieht via Exozytose. Dabei kommt es zur Fusion der SV mit der präsynaptischen Membran. Nun folgen die Endozytose und das Recycling der SV, wobei sich aus der präsynaptischen Membran wieder SV formen. Somit sind diese wieder bereit, neue Neurotransmitter aufzunehmen [Südhof et al., 1999 u. 2004].

In Abbildung 4 ist das Trafficking der SV graphisch dargestellt.

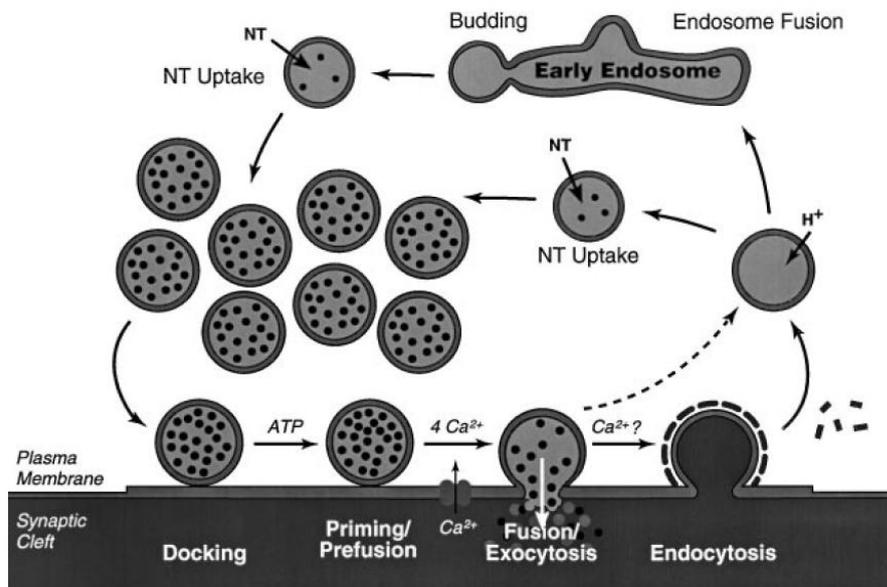


Abb. 4: Zyklus der synaptischen Vesikel [Südhof et al., 1999]

1.2.1.2 Aufbau der synaptischen Vesikel

SV haben einen Radius von 17 bis 22nm und benötigen für den oben dargestellten Zyklus weniger als 100 μ s. Sie beinhalten zwei obligatorische Komponenten. Das sind zum einen die Transportproteine und zum anderen die Trafficking-Proteine.

Die Transportproteine sind für die Aufnahme von Botenstoffen verantwortlich.

Die Neurotransmitteraufnahme in SV wird durch einen elektrochemischen Gradienten ausgelöst. Dieser wird durch eine vakuoläre H^+ -Pumpe seitens des SV generiert.

Die Trafficking-Proteine sind am zyklischen Transportvorgang der SV an der Endo- und Exozytose sowie dem Recycling von SV beteiligt. Der Mechanismus des Trafficking von SV ist weniger gut verstanden. Derzeit wird versucht, Proteine, die allen SV gemeinsam sind, zu identifizieren, denn alle SV scheinen, unabhängig vom Neurotransmitter, einem ähnlichen Trafficking-Prozess zu unterliegen. SV-Proteine sind unterschiedlich aufgebaut. Sie besitzen periphere Membranproteine, die durch hydrophobe posttranslatorische Modifikation an das SV binden. Dazu besitzen sie eine oder mehrere Transmembranregionen.

Zehn mutmaßliche Klassen von Trafficking-Proteinen sind in Abbildung 5 beschrieben. Dazu zählen Synaptotagmin (SYT), das synaptische Vesikelprotein 2A,B und C (SV2A,

B und C), SV Two-Related Protein (*SVOP*) und Synaptophysin (*SYP*) [Südhof et al., 1999 u. 2004].

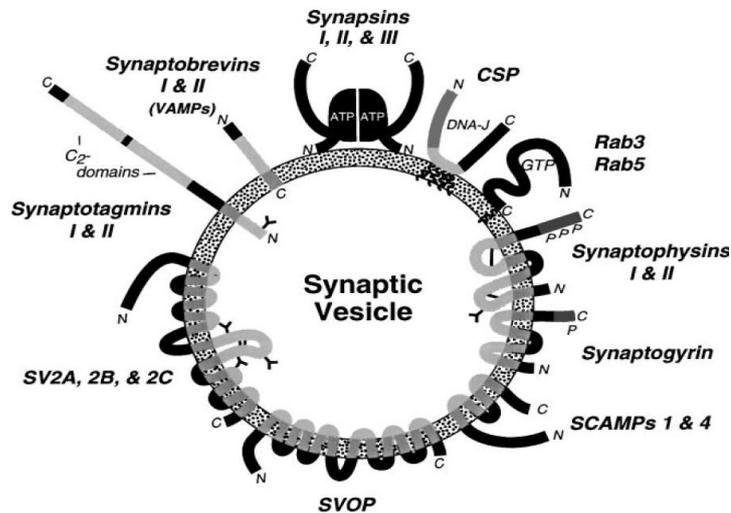


Abb. 5: Aufbau eines synaptischen Vesikels [Südhof et al., 1999]

Das Vesicle Associated Membrane Protein 2 (*VAMP2*) bildet mit Syntaxin 1a (*STX-1a*) und synaptosomal assoziiertem Protein 25 (*SNAP-25*) einen Komplex, der für die Transmitterausschüttung in den synaptischen Spalt essentiell ist. Die Proteine, welche in diese Komplexe involviert sind, bezeichnet man als SNARES (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptors). Ihnen wird für das intrazelluläre Trafficking eine wichtige Rolle zugeschrieben [Brookes et al., 2005].

Die Familie der *SYT* kodiert für Proteine, welche Kalzium binden und für die Ausschüttung von Neurotransmittern bereitstellen. Damit stellt *SYT* ein wichtiges Gen für die Ca^{2+} -regulierte Exozytose an der Synapse dar. Die Proteine *SYP* und *SYT* interagieren mit den SNARE-Proteinen [Brookes et al., 2005; Brophy et al., 2002]. In einer Assoziationsstudie von Brookes et al. (2005) konnte bezüglich *STX1*, *SYP*, *SYT1* und *VAMP2* nur hinsichtlich Genvarianten von *SYP* eine Assoziation zu ADHS gezeigt werden.

Die Proteinfamilie SV2 wird ebenfalls zu den Trafficking-Proteinen gezählt. Sie wurde von Buckley und Kelly [1985] entdeckt und scheint eine essentielle Rolle bei der Neurotransmission zu spielen [Südhof et al., 1999]. Im Folgenden wird auf die

Proteinfamilie SV2 und im Besonderen auf SV2C eingegangen, denn SV2C scheint bei der Ca^{2+} -getriggerten Exozytose bedeutsam zu sein.

1.2.2 SV2C als Kandidatengen

1.2.2.1 Die Proteinfamilie SV2

Die Proteinfamilie SV2 wurde bei Untersuchungsreihen mit monoklonalen Antikörpern gegen synaptische Vesikelproteine entdeckt [Buckley et Kelly ,1985]. SV2-Proteine sind Bestandteil synaptischer Vesikel (s. Abb. 3) und scheinen eine wichtige Funktion in der Neurotransmission zu haben [Südhof et al., 1999].

Es konnten drei Isoformen von SV2-Proteinen kloniert werden, die auf monoklonale Antikörper reagierten: SV2A, SV2B und SV2C.

Ein SV2-Protein enthält 12 Transmembranregionen mit N- und C-Terminus im Zytoplasma. Es zeigt eine signifikante Ähnlichkeit zu Kohlenhydrattransportproteinen in Eukaryonten und Bakterien. Die meisten Loops des Proteins, die mit dessen Transmembranregion verbunden sind, sind kurz. Die Ausnahmen bilden der Loop zwischen den Transmembrandomänen 6 und 7 im Zytoplasma und der intravesikuläre Loop zwischen den Transmembrandomänen 7 und 8. Der große intravesikuläre Loop ist in hohem Maße glykosyliert. Zudem steht er möglicherweise aufgrund seiner Proteinreste mit dem Inneren des synaptischen Vesikels in hydrophober Wechselwirkung.

Die drei Isoformen von SV2 haben untereinander eine hohe Ähnlichkeit bezüglich ihrer Transmembranregion und des zytoplasmatischen Loops, jedoch unterscheiden sie sich in der Sequenz des N-Terminus im Zytoplasma und des intravesikulären Loops. In Abbildung 6 ist die Struktur von SV2-Proteinen schematisch dargestellt.

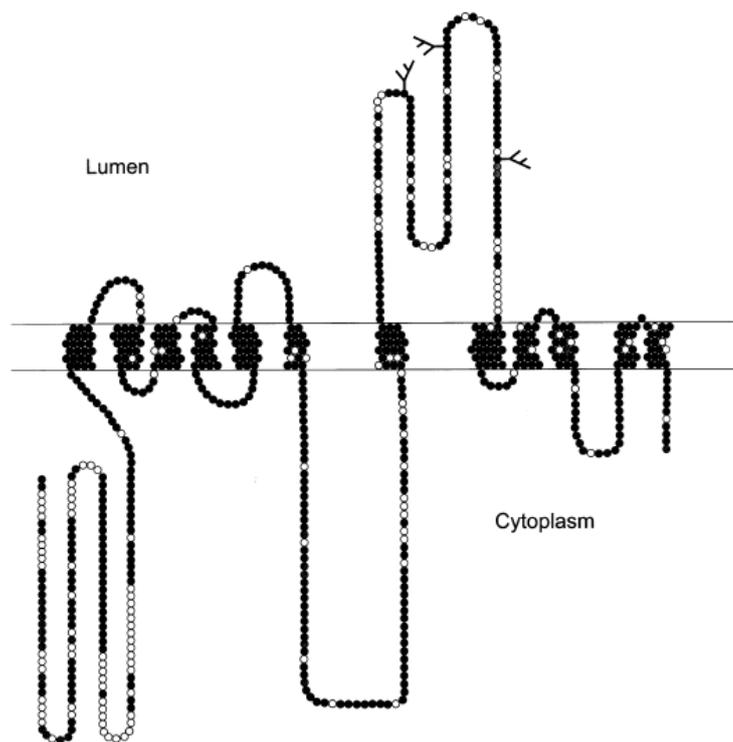


Abb. 6: Modell eines SV2-Proteins: Lokalisation der Proteinreste, die bei allen Isoformen vorhanden sind. Jeder Rest wird durch einen Kreis dargestellt. Reste, die in allen SVC-Isoformen vorkommen, repräsentieren schwarze Kreise; Reste, die in zwei Isoformen vorkommen, graue Kreise; Reste, die nicht stetig vorkommen, weiße Kreise [Südhof et al., 1999].

Die drei SV2-Proteine kommen an unterschiedlichen Orten im Gehirn und im endokrinen Gewebe vor. Die Verteilung der Proteine wurde mittels Immunzytochemie und in-situ-Hybridisierung erforscht. Dabei zeigte sich, dass SV2-Proteine in kleinen synaptischen Vesikeln vorhanden und nicht an ein bestimmtes Neurotransmittersystem gebunden sind.

SV2A-Proteine sind ubiquitär in allen Neuronen des Gehirns zu finden, SV2B-Proteine kommen hingegen nur begrenzt in Synapsen vor. SV2C-Proteine sind ebenfalls in synaptischen Vesikeln vorhanden, primär in Synapsen phylogenetisch alter Gehirnbereiche. Daraus könnte man ableiten, dass SV2C-Proteine älter als die anderen beiden Isoformen sind [Südhof et al., 1999].

Ein weiterer Bestandteil synaptischer Vesikel stellen neben den SV2-Proteinen die SVOP dar (s. Abb 3). Diese besitzen eine ähnliche Transmembranstruktur wie SV2, verfügen jedoch nicht über einen langen glykosylierten Loop. SVOP sind in wirbellosen Tieren anzutreffen, SV2-Proteine hingegen nicht. Daraus könnte man schließen, dass

SV2-Proteine entwicklungsgeschichtlich jünger sind und möglicherweise die Abkömmlinge von SVOP bei Vertebraten darstellen.

Sowohl bei SVOP als auch bei SV2A und SV2B hat sich eine signifikante Homologie zu Proteinen von Transportmolekülen verschiedenster Substrate gezeigt. Vor diesem Hintergrund diskutierten Südhof und Kollegen, dass SV2-Proteine vesikuläre Transportproteine für ein unbekanntes Substrat sein könnten, welches jedoch biochemisch noch nicht nachgewiesen werden konnte [Südhof et al., 2004].

Dazu müssten sie als treibende Kraft einen Protonengradienten nutzen. Mit den negativ geladenen Aminosäuren in der ersten Transmembranregion könnte das Protein positiv geladene Substrate transportieren. Aus diesem Grund befördern SV2-Proteine wahrscheinlich keine negativ geladene Substrate wie Chlorid oder ATP [Südhof et al., 1999].

1.2.2.2 Struktur und Funktion von SV2C

Janz und Südhof klonierten als Erste 1999 das Protein SV2C. Es reagierte hierbei auf monoklonale SV2-Antikörper. Daneben zeigte es ein hohes Maß an Homologie zu den Proteinen SV2A und SV2B. SV2C hat 62% seiner Struktur mit SV2A und 57% mit SV2B gemeinsam. Außerdem verfügt es ebenso wie SV2A und SV2B über zwölf Transmembrandomänen. Somit wurde SV2C als dritte Isoform der SV2-Familie beschrieben. Mithilfe eines SV2C-spezifischen Antikörpers fanden Janz und Südhof heraus, dass das Protein SV2C in synaptischen Vesikeln lokalisiert ist. SV2C zeigt im Vergleich zu SV2A eine sehr begrenzte Verteilung. Es kommt primär in phylogenetisch alten Hirnregionen wie dem Pallidum, der Substantia nigra, dem Mittelhirn, dem Hirnstamm und dem Bulbus olfactorius vor. Im Hippocampus und im Kortex war SV2C nicht auffindbar, im Kleinhirn nur in geringem Umfang. Zudem wurde SV2C in adrenergen chromaffinen Zellen gefunden.

Die allgemeine Grundstruktur eines SV2-Proteins wurde in Kapitel 1.2.2.1 bereits beschrieben. Die drei SV2-Isoformen zeigen eine hohe Übereinstimmung in ihrer Transmembranregion und des zytoplasmatischen Loops. In der Sequenz des Amino-Terminus und des intravesikulären Loops unterscheiden sie sich. Die N-Termini von SV2A und SV2C haben eine sehr ähnliche Struktur. Bei SV2B ist dieser Terminus

jedoch kürzer und anders aufgebaut. *SV2C* besteht aus 727 Aminosäuren [www.genecards.org] und ist wie die beiden anderen Isoformen N-glykosyliert [Südhof et al., 1999].

Das kodierende Gen *SV2C* ist auf dem langen Ende des Chromosoms 5q13.3 lokalisiert [www.genecards.org]. Die Abbildung 7 in Kapitel 3.2.1 gibt einen Überblick über die genomische Organisation des *SV2C*-Gens.

Die Funktion von *SV2C* ist noch nicht endgültig geklärt. Von Schivell et al. (2005) wurde die Interaktion der SV2-Proteine mit dem synaptischen Vesikelprotein SYT beschrieben. Alle drei Isoformen von SV2 binden SYT-Proteine, jedoch haben nur *SV2A* und *SV2C* eine SYT-bindende Domäne in ihrem Amino-Terminus [Schivell et al., 2005]. SYT bindet nach Fernández-Chacón et al. (1999) in der präsynaptischen Struktur Kalzium für die Exozytose der Synapse. Aufgrund der Interaktion mit SYT scheint *SV2C* an der Regulation der Ca^{2+} -abhängigen Exozytose in Nerven- und endokrinen Zellen beteiligt zu sein [Schivell et al., 2005; Xu et al., 2001]

Weiterhin konnte eine Wechselwirkung von Botulinumtoxin (BoNT) mit *SV2C* gezeigt werden, eine Interaktion mit *SV2A* oder *SV2B* konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. BoNT hemmt die Transmitterfreisetzung an der motorischen Endplatte, wobei die Proteine SYT I und II als Rezeptoren für die Serotypen BoNT/B und BoNT/G dienen. Mahrhold et al. (2006) beschrieben die Interaktion von BoNT/A mit der großen intravesikulären Domäne des Proteins *SV2C*. Dies führte zu einer drastischen Reduktion der Toxizität von BoNT/A am Nervus phrenicus von Mäusen.

Einzelne Domänen von SV2-Proteinen interagieren mit SYT-Proteinen (s. oben). Da SYT wichtig für die Ca^{2+} -abhängige Exozytose ist, ist es vorstellbar, dass BoNT im Allgemeinen mit Proteinrezeptoren in Wechselwirkung tritt, deren Aufgabe die Regulation der Exozytose ist [Mahrhold et al., 2006].

Weiterhin wurde die Rolle von *SV2C* in der regulierten Insulinsekretion untersucht. Das Gen ist in Insulin-sezernierenden Zellen an der Rekrutierung von Vesikeln an der Plasmamembran beteiligt, allerdings konnte für keine SV2-Isoform eine Funktion bei der K^+ -induzierten Insulinsekretion gezeigt werden. Daraus kann geschlossen werden, dass *SV2C* bei den Ca^{2+} -abhängigen Schritten der Exozytose keine regulatorische Aufgabe übernehmen [Iezzi et al., 2005].

1.2.2.3 *SV2C* und ADHS

In der Pathophysiologie von ADHS scheint eine Dysfunktion der Neurotransmittersysteme des Gehirns ursächlich an der Störung beteiligt zu sein. Daher sind die Mechanismen der neuronalen Informationsverarbeitung von besonderem Interesse. Hierbei spielen synaptische Proteine aufgrund ihrer Fähigkeit zur Modulation von Neurotransmittersystemen eine wichtige Rolle. *SV2C* kodiert ein synaptisches Vesikelprotein, das am Trafficking synaptischer Vesikel Einfluss zu nehmen scheint.

In einer molekulargenetischen Studie des Hauses mittels array comparative genomic hybridization (aCGH) haben Frau Selch und Kollegen in einer Stichprobe von 99 ADHS-Patienten *SV2C* als Kandidatengen für ADHS identifiziert.

Durch diese molekulargenetische Untersuchungsmethode kann man Mikroduplikationen und -deletionen auf einem Gen erkennen. In weiterführenden Untersuchungen können Gene identifiziert werden, die durch diese Veränderungen betroffen sind. aCGH wurde bereits auf der Suche nach genomischen Aberrationen bei psychiatrischen Störungen wie Autismus [Szatmari et al., 2007] eingesetzt. Die Detektion solcher Aberrationen sind eine interessante Möglichkeit, genomweit neue Kandidatengene für Störungsbilder mit komplexer genetischer Grundlage wie ADHS zu identifizieren.

In genannter Studie des Hauses wurden mehrere private Deletionen und Duplikationen entdeckt, die bei einzelnen Kindern de novo auftraten oder durch die Eltern vererbt wurden. So wurde auf dem Chromosom 5q13 eine Duplikation bei einem Patienten und dessen ebenfalls von ADHS betroffenen Vater gefunden. Durch diese Duplikation ist das Gen für *SV2C* betroffen, das, wie bereits geschildert, eine wichtige Rolle in der Funktion der synaptischen Vesikel einnimmt. Die Duplikation, die *SVC2* partiell einschließt, könnte eine Veränderung der Regulation von *SV2C* mit nachfolgender Beeinflussung der Funktionalität von *SV2C* in der Neurotransmission bedingen und bei den von der Duplikation betroffenen Probanden in besonderem Maße zur Ätiopathogenese der ADHS beitragen. Auf der Grundlage der bekannten Funktionen von *SV2C* und den berichteten Vorbefunden ist *SV2C* somit als ein Kandidatengen für molekulargenetische Untersuchungen der ADHS zu betrachten. Regulatorisch relevante Regionen, wie die Promoterregion, sind dabei von besonderem Interesse.

1.3 Zusammenfassung und Zielsetzung

ADHS ist ein neuropsychiatrisches Störungsbild, das durch die Symptomtrias Aufmerksamkeitsstörung, motorischer Überaktivität und Impulsivität charakterisiert ist. Verschiedene Tiermodelle zur Pathophysiologie von ADHS deuten darauf hin, dass mehrere Neurotransmittersysteme am Pathomechanismus von ADHS beteiligt sind. Die Effektivität der Pharmakotherapie und die Ergebnisse der Bildgebung unterstützen die Annahme einer besonderen Beteiligung monoaminerger Neurotransmitter. Bei der neuronalen Signalübertragung sind synaptische Vesikel bedeutsam für die Ausschüttung und Wiederaufnahme von Botenstoffen. Das in dieser Dissertation untersuchte Gen *SV2C* ist auf dem langen Ende des Chromosoms 5q13.3 lokalisiert und kodiert ein Protein, welches sich in der Membran von synaptischen Vesikeln befindet und an der Regulation der Exozytose bei der Neurotransmission beteiligt ist. In einer vorangegangenen molekulargenetischen Studie an einer Stichprobe von 99 ADHS Patienten durch aCGH wurde eine Duplikation gefunden, die *SV2C* partiell einschließt. Diese Duplikation könnte eine Dysfunktion der Regulation von *SV2C* und der Gesamtfunktionalität von *SV2C* in der Neurotransmission nach sich ziehen. *SV2C* ist damit ein interessantes Kandidatengen für ADHS. Ziel dieser Dissertation ist die molekulargenetische Untersuchung von *SV2C* anhand dreier ausgewählter Polymorphismen aus dem Promotorbereich auf eine Assoziation zu ADHS. Diese Untersuchung soll im Rahmen einer familienbasierten Assoziationsstudie geschehen. Das hierbei verwendete Patientenkollektiv umfasst 100 ADHS-Familien, die nach DSM-IV (s. Tabelle 1) diagnostiziert worden sind.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Oligonukleotide

Aus der Promotorregion von *SV2C* wurden für die drei SNP rs30198, rs1862519 und rs30196 die in Tabelle 4 dargestellten Primer verwendet. Die amplifizierte Produktlänge und die Annealingtemperatur des jeweiligen SNP sind ebenfalls angegeben.

Kennung des SNPs	Primer forward	Primer reverse	Produktlänge	Annealingtemperatur
Rs30198	5'-agtaggcaacctagctctgc-3'	5'-caactgtgactgtgcgttg-3'	195bp	60.6°C
Rs1862519	5'-gtactgctctcagaggctgagat-3'	5'-ttgaaggacatagacgatctcct-3'	472bp	61.6°C
rs30196	5'-gcctgaccatctcatagcacca-3'	5'-gtagcttgggtttccagttcga-3'	229bp	60.4°C

Tabelle 4: Verwendete PCR-Primer

2.1.2 Puffer

Als Puffer wurden für die PCR Goldstar und MgCl₂ verwendet, für die Gel-Elektrophorese TAE-Puffer und Blaupuffer.

Goldstar10x	750mM Tris-HCl (pH 9) 200mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.1% Tween 20
MgCl ₂ 25mM	
25x TAE-Puffer	Tris-Base 121g Eisessig 28.5g EDTA (0.5M/pH 8) 50ml aqua dest. ad 1l
Blaupuffer	10ml H ₂ O 1.5ml Glycerol 25mg Bromphenolblau-Xylen-cyanol

Tabelle 5: Verwendete Puffer bei PCR und Gel-Elektrophorese

2.1.3 Enzyme

Für die PCR wurde das Enzym Taq DNA-Polymerase (5U/ μ l) von Eurogentec (Seraing, Belgien) verwendet.

Der Restriktionsverdau (Digest) wurde mit den in Tabelle 6 dargestellten Enzymen durchgeführt, die jeweiligen Inkubationstemperaturen und Produktlängen sind zudem dargestellt.

SNP-Kennung des Polymorphismus	Enzym	Puffer	Inkubation	Produktlängen
rs30198	PleI	NEB4	6h bei 37°C	G/G -> 75bp + 120bp G/A -> 75bp + 120bp + 197bp A/A -> 197bp
rs1862519	BsmAI	NEB3	16h bei 55°C	C/C -> 220bp + 252bp G/C -> 220bp + 252bp + 472bp G/G -> 472bp
rs30196	Hpy188III	NEB4	16h bei 37°C	T/T-> 113bp + 116bp G/T -> 113bp + 116bp + 229bp G/G -> 229bp

Tabelle 6: Enzyme und Produktlängen für den Restriktionsverdau

2.1.4 Arbeitsgeräte

In Tabelle 7 sind die verwendeten Arbeitsgeräte aufgelistet.

Biometra Uno II Thermoblock	BIOMETRA, Göttingen
Biometra T-1 Thermoblock	BIOMETRA, Göttingen
Biometra T-Gradient Thermoblock	BIOMETRA, Göttingen
Frischhalte-Folie	Toppits Melitta, Minden
Gelkammern, Käämme, Spatel	PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen
Mikrowelle	SIEMENS
Parafilm	Menasha, WI 52920, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg Vitaris, Baar
Pipettenspitzen	STARLAB GmbH, Ahrensburg Nümbrecht, Sarstedt
Spannungsgeräte	Gene Power Supply, GPS 200/400, Pharmacia, Freiburg Power Supply Consort E835 300V-500mA, Belgien Power Supply Consort E844 400V-400mA Biometra Powerpack P24
Schüttelgerät	IKA- LABORTECHNIK, Staufen
Tubes	MultiplyR- μ StripPro Biosphere®, Nümbrecht
Thermopapier f. Mitsubishi Video-Printer	MS-L GmbH, Wiesloch, Heidelberg
UV-Transluminator	Fluo-Link (TFL-20M, 312nm), MWG Biotech, Eberstadt
Waage	PM 300 METTLER, Gießen
Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Zentrifuge	neoLAB®, Heidelberg Vortex Microspin FV-2400

Tabelle 7: Verwendete Arbeitsgeräte

2.1.5 Chemikalien

In Tabelle 8 sind die benutzten Chemikalien aufgelistet.

Agarose	Biozym, Hessen, Oldendorf
Aqua dest.	Merck, Darmstadt
100-Basenpaarleiter	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Bromphenolblau-Xylencyanol	Sigma, Steinheim
0,5 M EDTA (pH 8)	Applichem, Darmstadt
Enzyme(PleI, BsmA1, Hpy188III)	New England Biolabs® www.neb.com
1% Ethidiumbromidlösung	Sigma, Steinheim
Glycerol	Sigma, Steinheim
KCL	Sigma, Steinheim
MgCl ₂	Sigma, Steinheim
Nukleotide	dNTP (2.5mM; dATP; dGTP, dCTP; dTTP) Promega, Mannheim
Tris-Base	Applichem, Darmstadt
Tris-HCl	Applichem, Darmstadt
Tween 20	Sigma, Steinheim

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien

2.2 Methoden

2.2.1 Genstruktur von *SV2C*

Der schematische Aufbau von *SV2C* ist in Abbildung 7 dargestellt. *SV2C* ist auf dem langen Ende des Chromosoms 5q13.3 lokalisiert [www.genecards.org].

Es besteht aus 13 Exons; es gibt mindestens vier Splice-Varianten

[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&l=SV2C>].

Drei Polymorphismen wurden aus dem Promotorbereich von *SV2C* ausgewählt, die in dieser Dissertation auf eine Assoziation zu ADHS untersucht wurden. Die SNP waren rs30196, rs30198 und rs1862519.

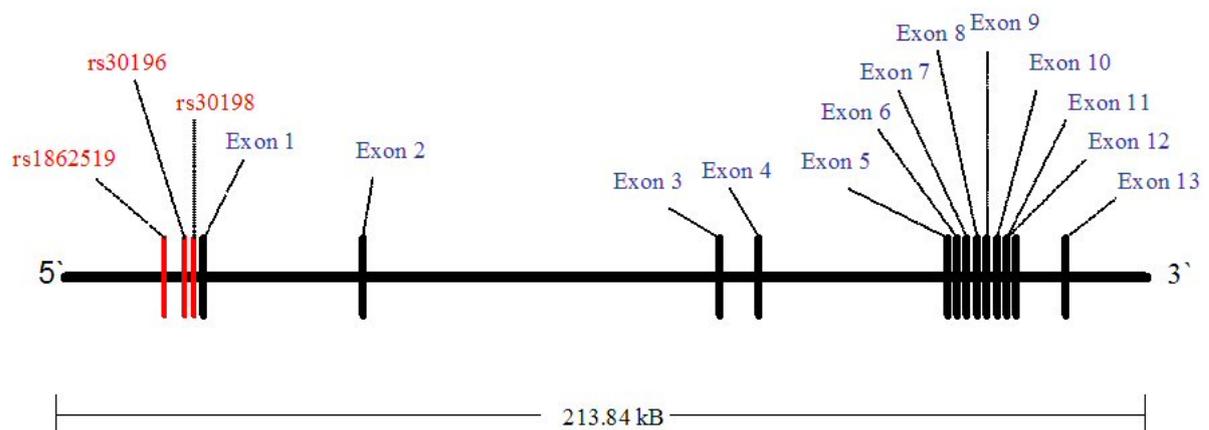


Abb. 7: Schematischer Aufbau der Genstruktur von *SV2C*. Die roten Balken markieren die drei untersuchten SNP, die schwarzen die Exons von *SV2C*.

2.2.2 SNP und Haploblocks

SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) sind Einzelnukleotid-Polymorphismen von DNA-Abschnitten, in denen sich zwei Individuen durch die Variation einer Nukleotidbase unterscheiden.

Verschiedene Studien haben bei der Untersuchung von SNP gezeigt, dass sich diese in Blöcke, sogenannte Haploblocks, zusammenfassen lassen. Innerhalb eines Haploblocks

weisen Polymorphismen eine hohe Korrelation bezüglich des Genotyps auf. Mithilfe weniger ausgewählter SNP eines Haploblocks, die als Tag-SNP bezeichnet werden, ist es möglich, eine Aussage über weitere Polymorphismen dieses Haploblocks treffen zu können [Halperin et al., 2004].

Diese Tag-SNP wurden mithilfe des Haploview-Programmes basierend auf HapMap-Daten (<http://www.hapmap.org>) ausgewählt. Diese Datenbank zeigt jene Regionen mit ausgeprägtem Linkage disequilibrium (LD) für ein bestimmtes Gen an. LD beschreibt die Situation, dass Allelkombinationen häufiger vorkommen als die Verteilung der Haplotypen von Allen bezüglich ihrer Häufigkeit es hätte vermuten lassen [Brookes et al., 2005]. Aus einem derartigen Haploblock wurden gezielt die hier untersuchten Tag-SNP ausgewählt. Abbildung 8 zeigt mit rs30198, rs1862519 und rs30196 die drei Tag-SNP für diesen Haploblock, wobei die minimale Allelfrequenz MAF bei 0.1 und der Determinationskoeffizient r^2 bei 0.9 lagen [www.broad.mit.edu/mpg/haploview].

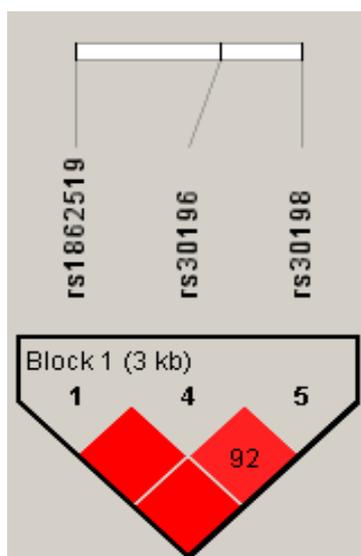


Abb. 8: Untersuchte SNP in einem Haploblock des Promotorbereichs von *SV2C*

Die SNP wurden im Promotorbereich von *SV2C* ausgewählt, da der Promotor eine entscheidende Funktion bei der Transkription von DNA darstellt.

Der Promotor enthält spezifische DNA-Sequenzen, die von Transkriptionsfaktoren erkannt werden und dort den Transkriptionsinitiationskomplex bilden. Dieser aktiviert die für die Transkription wichtige RNA-Polymerase [Löffler, 2003]. Der Core-Promotor ist das wesentliche Element des Promotors. Neben dem Promotor können

auch weitere DNA-Abschnitte, sogenannte Enhancer, Transkriptionsfaktoren binden. Diese sind häufig von ihrem Zielpromotor entfernt gelegen. Die Interaktion zwischen Enhancer und Promotor ist wichtig für den Ablauf der Transkription. Dabei bestimmt die Bindung sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren die Häufigkeit der Initiation einer Transkription [Smale et al., 2003].

2.2.3 Molekulargenetische Methoden

2.2.3.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Kary Mullis gelang 1984 mit der Entwicklung des Verfahrens der Polymerasekettenreaktion (engl. PCR, Polymerase Chain Reaction) der Durchbruch in der Gentechnik [Mullis et al., 1987]. Mit diesem Verfahren ist es möglich, Abschnitte der Desoxyribonukleinsäure (DNA) gezielt zu vervielfältigen. Für die Amplifikation wird isolierte genomische DNA aus dem Blut verwendet. Das zu amplifizierende Fragment wird von zwei bekannten, zueinander weisenden DNA-Sequenzen, sogenannten Primern (Oligonukleotiden), flankiert. Nachdem die DNA-Polymerase lediglich in 5`-3`-Richtung synthetisieren kann, sind ein auf dem Lesestrang liegender forward-Primer und ein auf dem komplementären Strang liegender reverse-Primer notwendig. Es kommt zu einer exponentiellen Zunahme der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte, wenn diese drei Einzelreaktionen in aufeinanderfolgenden Zyklen mehrfach wiederholt werden. Dadurch werden bei n Zyklen theoretisch 2^n Kopien produziert. Somit ist es bei 35 Zyklen möglich, den spezifischen DNA-Bereich auf bis zu 3×10^{10} Kopien zu vervielfältigen.

Im ersten Schritt wird der zu amplifizierende DNA-Abschnitt, der als Vorlage (Template) für die PCR dient, bei 95°C hitzedenaturiert und liegt damit in Form von Einzelsträngen vor. Dieser Vorgang findet in automatisierten Thermocyclern statt.

Bei der zweiten Einzelreaktion kommt es zur Anlagerung von flankierenden synthetisch hergestellten Primern (Annealing). Diese erfolgt adaptiert an die jeweilig eingesetzten Primer bei Temperaturen von ca. 50°C bis 65°C.

Der nächste Schritt ist die Elongation, die bei einer Temperatur von 72°C stattfindet, um unspezifische Hybridisierungen zu verhindern. Hierbei kommt es zur Synthese des zu

kopierenden DNA-Abschnitts, die an den angelagerten Primern beginnt und daraufhin komplementär zu den einzelnen vorliegenden DNA-Strängen erfolgt. Die Synthese wird durch die thermostabile, aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus* isolierte DNA-Polymerase, kurz „Taq-Polymerase“, vermittelt. Deren Aktivität bleibt auch bei hohen Temperaturen über mehrere Stunden aufrecht erhalten [Löffler et al., 2003].

Die definierte Abfolge von

- Denaturierung bei 95°C für 45s
- Annealing zwischen 58-61°C für 45s
- Elongation bei 72°C für 45s

wurde bei den in dieser Arbeit verwendeten Laborprotokollen mit einer Wiederholung von 35 Zyklen eingesetzt.

Vorangestellt war eine Denaturierung bei 95°C von 180s, und abschließend endete die PCR mit einer Elongation bei 72°C über 180s.

In Tabelle 9 ist der Reaktionsansatz der PCR dargestellt.

DNA	1 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
Nukleotide 2.5 mM	1 µl
Puffer: Goldstar	2.5 µl
Puffer: MgCl ₂	1 µl
Taq Polymerase	0.5 µl

Tabelle 9: Reaktionsansatz der PCR

Die Lokalisation, die Primerpaare und die PCR-Produktlänge sind in Tabelle 6 aufgeführt. Das Volumen des Ansatzes betrug 25.0µl.

2.2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die durch PCR gewonnenen replizierten DNA-Fragmente von *SV2C* wurden in einem homogenen, konstanten, elektrischen Feld mittels horizontaler Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Es wurden 3%ige Agarosegele mit der Größe 12 x 14cm verwendet, welche durch Zugabe von 3.00mg Agarose in 100ml TAE-Puffer gegossen wurden. Außerdem wurden den Gelen noch Ethidiumbromid in einer Menge von 3-5 μ l zugesetzt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Zunächst wurde 7 μ l PCR-Produkt mit 7 μ l Blaupuffer versetzt, gemischt und zusammen in die durch Kämmen vorgegebenen Geltaschen pipettiert. Nun wurde eine Spannung von 120 Volt angelegt und die Fragmente über 30-45 Minuten aufgetrennt. Das in den Gelen vorhandene Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA-Doppelhelix der PCR Produkte und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 365nm. Somit konnten nach elektrophoretischer Auftrennung die DNA-Fragmente in Form von Banden sichtbar gemacht werden. Zur Größenbestimmung diente eine 100 Basenpaare umfassende DNA-Leiter als Referenz. Sämtliche Ergebnisse wurden mit einem UV-Transilluminator festgehalten [Löffler et al., 2003].

2.2.3.3 Restriktionsverdau

Mithilfe des Restriktionsverdau kann man die Basenabfolge des zu untersuchenden SNP für die erhaltenen PCR-Produkte in einem neuen Ansatz herausfinden. Hierbei werden durch Zugabe des entsprechenden Enzyms Fragmente in unterschiedlicher Größe in Abhängigkeit der vorhandenen definierten Erkennungssequenz generiert, wobei jedes Enzym bestimmte Reaktionsbedingungen, die in Tabelle 6 dargestellt sind, beansprucht. In Tabelle 10 ist der jeweilige Reaktionsansatz für den Enzymverdau dargestellt.

Reagenz	Menge
PCR-Produkt	10-15 μ l
Enzym	1 μ l
Puffer	2 μ l
dH ₂ O	2-7 μ l

Tabelle 10: Reaktionsansatz des Restriktionverdau (Gesamtvolumen 20 μ l)

Nach abgeschlossenem Restriktionsverdau wurden die einzelnen Ansätze erneut gelelektrophoretisch in der oben beschriebenen Weise aufgetrennt. Für diesen Vorgang wurden ebenfalls die bereits beschriebenen Gele und Puffer verwendet sowie die Banden mit dem UV-Transilluminator visualisiert.

Die Auswertung der im Digest-Gel entstandenen Banden ist beispielhaft in Tabelle 11 dargestellt.

2.2.4 Statistische Methoden

2.2.4.1 Transmissions-Disequilibrium-Test

Die vorliegende Dissertation wurde als familienbasierte Assoziationsstudie mit Trios bestehend aus einem ADHS-Patienten und dessen leibliche Eltern durchgeführt. Es wurde untersucht, welche der beiden Allele bei heterozygoten Elternpaaren häufiger auf das von ADHS betroffene Kind übertragen wurden. Wird eines der beiden Allele auf das erkrankte Kind im Sinne eines signifikanten Transmissionsunterschiedes bevorzugt vererbt, spricht man von einem Transmissionsungleichgewicht. Um den Zusammenhang der untersuchten Polymorphismen mit dem Auftreten eines bestimmten Phänotyps zu prüfen, wurde die gefundene Allelverteilung mit Hilfe des Transmissions-Disequilibrium-Tests (TDT) ausgewertet (Spielman et al., 1993). Der TDT vergleicht hierbei transmittierte und nicht transmittierte Allele anhand einer Vier-Felder-Tafel. Das einfache Signifikanzniveau wurde im Vorfeld auf $p < 0.05$ festgelegt.

2.2.4.2 Hardy-Weinberg Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg Gleichgewicht (HWG) ist ein mathematisches Modell der Populationsgenetik. Es dient als statistisches Tool zur Berechnung von Allel- bzw. Genotypfrequenzen in einer idealen Population. Das HWG findet Anwendung in der Berechnung von heterozygoten Individuen (Aa) bei dominant-rezessiven Erbgängen, da heterozygote von homozygot dominanten Allele (AA) phänotypisch nicht zu unterscheiden sind, da sich das dominante Allel durchsetzt.

p gibt die Häufigkeit des Allels A, q die Häufigkeit von a.

Berechnungsformeln des HWG:

$p + q = 1$ (Komplementarität der Allele A und a)

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Betrachtet man die Allele, ergibt sich Folgendes:

$$AA + 2Aa + aa = 1$$

3. Ergebnisse

Ziel dieser Dissertation war, innerhalb einer Stichprobe von 100 ADHS-Patienten den Promotorbereich von *SV2C* anhand der drei SNP rs30196, rs30198 und rs1862519 auf Assoziation zu ADHS zu untersuchen.

Beispielhaft sind im Folgenden die verschiedenen Untersuchungsgänge anhand des SNP rs30196 dokumentiert.

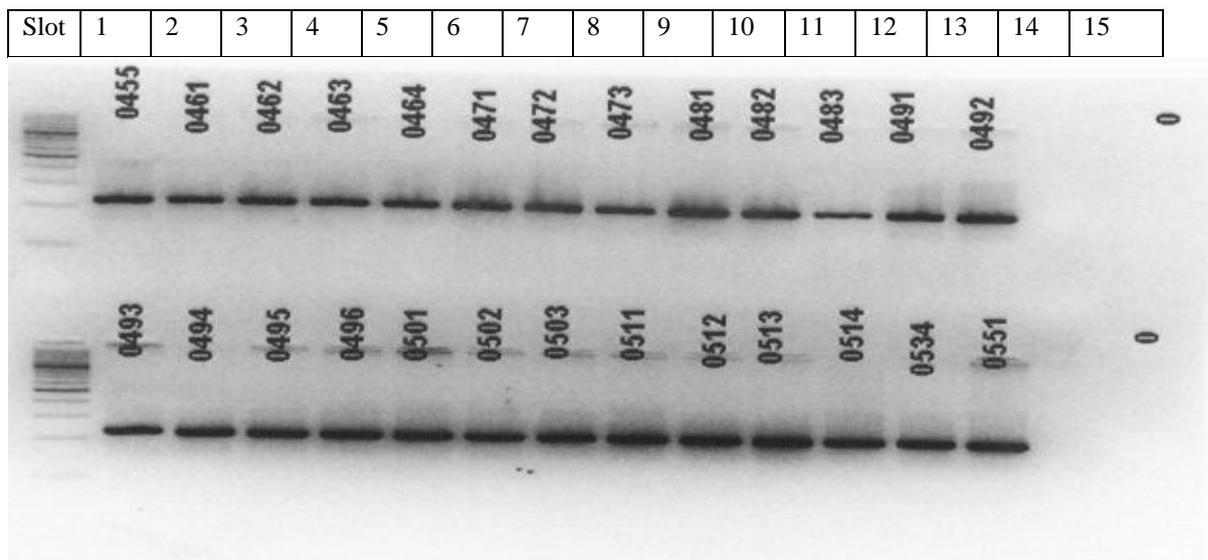


Abbildung 9: Invertierte Fotografie eines PCR-Gels des SNP rs30196; Slot 1: 100bp-ladder, Slot 2-13: Proben 0455-0492 bzw. 0493-0551, Slot 14: Leerprobe, Slot 15: Negativkontrolle

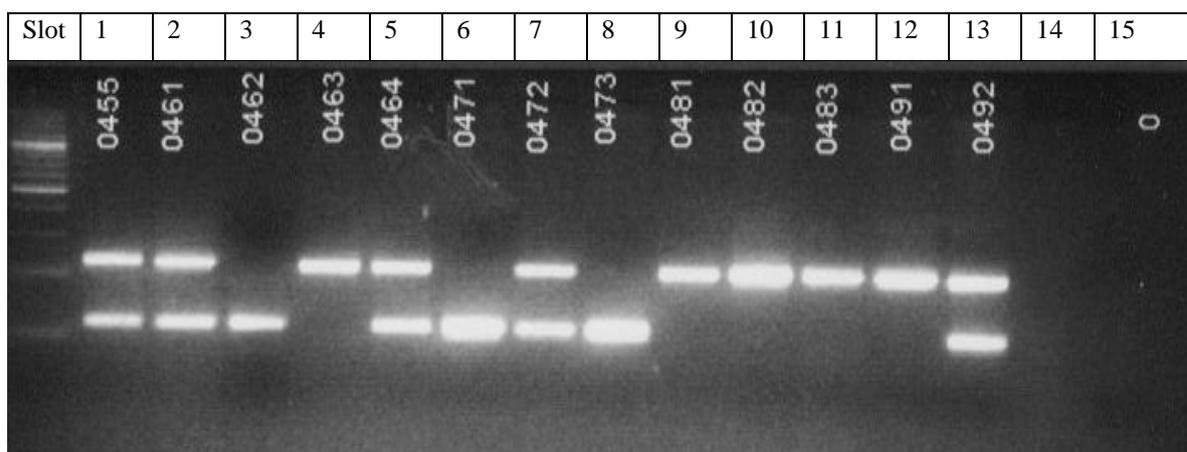


Abbildung 10: Fotografie eines Digest-Gels mit der ersten Hälfte der in Abb. 9 gezeigten PCR-Produkten: Slot 1: 100bp-ladder, Slot 2-13: Proben 0455-0492, Slot 14: Leerprobe, Slot 15: Negativkontrolle

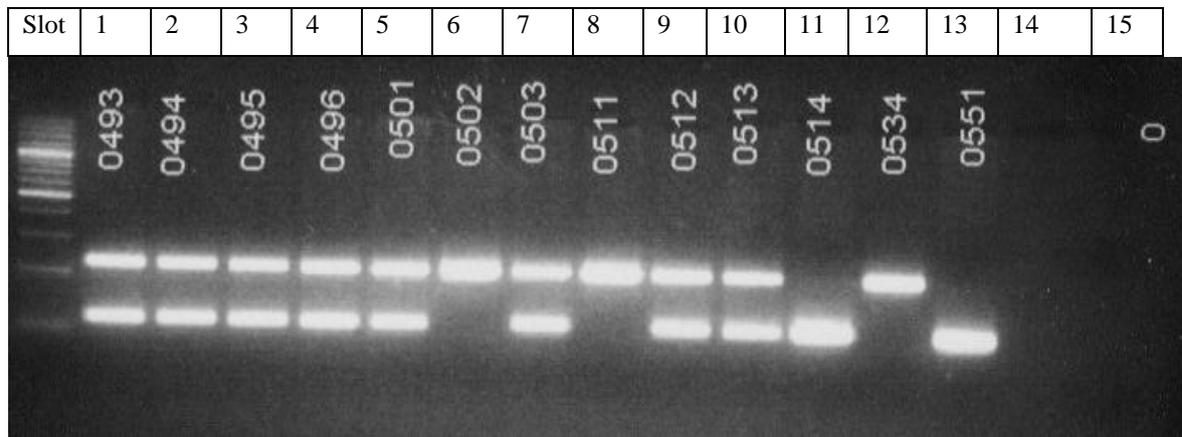


Abbildung 11: Invertierte Photographie eines Digest-Gels mit der zweiten Hälfte der in Abb. 9 gezeigten PCR-Produkten: Slot 1: 100bp-ladder, Slot 2-13: Proben 0493-0551, Slot 14: Leerprobe, Slot 15: Negativkontrolle

Die Proben 0455- 0551 des SNP rs30196 aus den Abbildungen 8, 9 und 10 wurden mithilfe Tabelle 6 ausgewertet und in Tabelle 11 dokumentiert.

0455	G/T	0472	G/T	0492	G/T	0502	G/G	0534	G/G
0461	G/T	0473	T/T	0493	G/T	0503	G/T	0551	T/T
0462	T/T	0481	G/G	0494	G/T	0511	G/G		
0463	G/G	0482	G/G	0495	G/T	0512	G/T		
0464	G/T	0483	G/G	0496	G/T	0513	G/T		
0471	T/T	0491	G/G	0501	G/T	0514	T/T		

Tabelle 11: Auswertung der Proben 0455- 0551 des SNPs rs30196 anhand des Digest-Gels

Die Allelverteilung des gesamten Patientenkollektivs für die untersuchten Polymorphismen ist in Tabelle 12 dargestellt.

SNP rs1862519	GG	GC	CC
Eltern	132	61	7
Kinder	96	46	2
SNP rs30196	GG	GT	TT
Eltern	65	111	26
Kinder	50	76	19
SNP 30198	GG	AG	AA
Eltern	67	115	19
Kinder	54	74	17

Tabelle 12: Allelverteilung des Patientenkollektivs

In dieser Studie wurde eine Genotypisierung betroffener Kinder und deren Eltern hinsichtlich dreier Polymorphismen durchgeführt. Dabei wurde analysiert, ob eines der beiden Allele heterozygoter Elternpaare häufiger auf ihr Kind transmittiert wurde.

In der folgenden Tabelle wurden die übertragenen und nicht übertragenen Allele der Trios dargestellt und das jeweilige Transmissionsungleichgewicht berechnet. Es ergab sich bei Festlegung des Signifikanzniveaus auf $p < 0.05$ nach statistischer Auswertung kein signifikanter Zusammenhang der drei untersuchten SNP mit ADHS.

SNP	Allel	Trios	Transm.	Nicht trans.	TDT
rs1862519	G	144	238	237	0.917411
rs1862519	C	144	50	51	0.917411
rs30196	G	145	176	173	0.796253
rs30196	T	145	114	117	0.796253
rs31098	G	144	181	176	0.680051
rs31098	A	144	107	112	0.680051

Tabelle 13: Transmission disequilibrium test (TDT)

Grafisch sind die p-Werte in Abbildung 12 gezeigt.

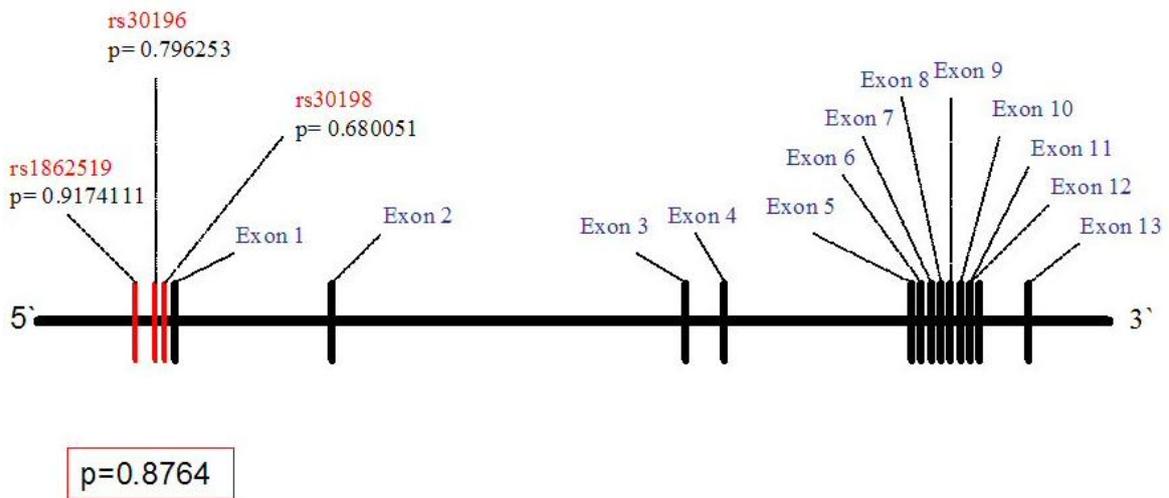


Abbildung 12: P-Werte der untersuchten Polymorphismen

Die Kriterien des Hardy-Weinberg Gleichgewichts waren für alle Polymorphismen der Kinder und für den SNP rs1862519 der Eltern erfüllt; für die SNP rs30196 und 30198 der Eltern nicht.

SNP	Eltern	Kinder
Rs1862519	0.9884	0.174
Rs30196	0.0442	0.2357
Rs30198	0.0025	0.2691

Tabelle 14: Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

4. Diskussion

ADHS ist weltweit die häufigste psychiatrische Störung des Kindesalters. Trotz einer hohen Heritabilität ist nur ein Teil der an der Pathophysiologie von ADHS beteiligten Gene bekannt. Hierbei scheint eine Dysfunktion der Neurotransmittersysteme des Gehirns die Entstehung von ADHS zu bedingen. Verschiedene Tiermodelle [Russell, 2006; Mill, 2006] deuten auf eine Beteiligung monoaminerger Signalwege in der Pathogenese von ADHS hin. Sowohl die Effektivität der Pharmakotherapie als auch die Resultate der Bildgebung scheinen diesen Zusammenhang zusätzlich zu beschreiben. Im Gehirn findet die Signalübertragung an Synapsen mittels Neurotransmitter statt, wobei Botenstoffe via synaptischer Vesikel transportiert werden. Das synaptische Vesikelprotein SV2C nimmt Einfluss auf den Prozess der Signalübertragung, indem es am Ablauf der Exozytose von Neurotransmittern beteiligt ist. Somit nehmen synaptische Proteine wie SV2C einen essentiellen Part bei der Neurotransmission ein und erlangen dadurch großes Interesse bei der Untersuchung des Pathomechanismus von ADHS.

Im Rahmen einer molekulargenetischen Studie zu chromosomalen Deletionen und Insertionen wurde im Labor für klinische Psychobiologie der Universität Würzburg von Frau Selch und Kollegen eine aCGH an einer Stichprobe von 99 ADHS-Patienten durchgeführt. Dabei zeigte sich bei einer ADHS-Familie eine Duplikation, die SV2C partiell einschloss. Diese Duplikation könnte eine Dysfunktion der Regulation von SV2C bedingen und dadurch die Funktionalität von SV2C in der Neurotransmission beeinflussen. Die Ätiologie von ADHS weist eine hohe Heritabilität auf und die genannte Duplikation könnte in der untersuchten Familie auf einen möglichen Hauptgeneffekt von SV2C in der neurobiologischen Pathogenese von ADHS dieser Familie hindeuten. SV2C stellt somit allgemein für ADHS ein interessantes Kandidatengen dar, wenn auch in der Gesamtpopulation der Betroffenen von einer geringen Effektstärke ausgegangen werden muss.

Für die Funktion des Gens ist der Promoter die wichtigste regulatorische Einheit. In früheren Untersuchungen konnte eine wichtige Rolle von Promotorvarianten in psychiatrischen Erkrankungen [Lesch et al., 1996] gezeigt werden, Polymorphismen im Promotorbereich sind daher für molekulargenetische Untersuchungen von besonderem

Interesse. In der vorliegenden Dissertation wurden aus dem putativen Promotorbereich des Kandidatengens *SV2C* drei SNP ausgewählt und molekulargenetisch mittels PCR und Restriktionsverdau bei einem Patientenkollektiv von 100 ADHS-Familien hinsichtlich einer Assoziation zu ADHS analysiert. Anhand dieser drei SNP ist es möglich, eine Aussage über eine Region von 5000 Basenpaaren upstream vom putativen Transkriptionsstartpunkt zu treffen und auf einen potenziellen pathophysiologischen Zusammenhang mit ADHS zu prüfen. Für diese drei Polymorphismen des Promotorbereichs konnte in der verwendeten Stichprobe keine Assoziation zu ADHS gezeigt werden.

Bei vielen psychiatrischen Störungen wird eine polygenetische Ätiologie diskutiert. Sie sind nicht durch die Dysfunktionalität eines einzelnen Gens (monogenetisch) verursacht, sondern es muss mit einer Vielzahl an Genen gerechnet werden, die für die Erkrankung verantwortlich ist. Nach solchen Modellen addieren sich diese Gene hierbei im Sinne eines Schwelleneffektes und nehmen Einfluss auf den Phänotyp. Es ist möglich, dass verschiedene Gene unterschiedlich starke Auswirkungen auf den Phänotyp der Erkrankung haben [Baron, 2001; Motulsky, 2006].

Bei ADHS wird ebenfalls eine multifaktorielle Pathogenese angenommen. Zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Kandidatengenen wurden bereits durchgeführt, wobei die Ergebnisse der einzelnen Studien zum Teil widersprüchlich sind. Das Gen *DAT1* wurde in verschiedenen Studien als assoziiert zu ADHS beschrieben [Hawi et al., 2003; Bobb et al., 2005 und Friedel et al., 2007]. Zudem wird mit Einsatz von MPH nach Volkow et al. (1998) dieser Transporter blockiert und die Symptome der Patienten durch Eingriff in die dopaminerge Signalübertragung signifikant gemindert. *DAT1* gilt neben *DRD4*, *DRD5*, *SNAP-25*, *5HTT*, *HTR1B* und *DBH* als wichtigstes Kandidatengen für ADHS [Elia et al., 2007]. Einige durchgeführte Studien zeigten jedoch hinsichtlich der Assoziation von *DAT1* zu ADHS negative Ergebnisse. Roman et al. (2001) konnten in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen dem Gen und ADHS nicht bestätigen. Weitere negative Resultate in Bezug auf *DAT1* sind ebenso von Holmes et al. (2000) und Swanson et al. (2000) beschrieben worden. Für andere Kandidatengene wie beispielsweise *DRD4* wurden ebenfalls Studien durchgeführt, die keine Assoziation der Gene zu ADHS ergaben [Eisenberg et al., 2000; Hawi et al., 2000; Holmes et al., 2000].

Ähnlich kontroverse Studienergebnisse ergaben sich für *SNAP-25*. Dieses Gen wird von verschiedenen Autoren als assoziiert zu ADHS beschrieben [Brophy et al. 2002; Mill et al., 2002]. In anderen Arbeiten konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden [Kustanovich et al., 2003; Faraone et al., 2005; Renner et al., 2008].

Diese genannten Beispiele zeigen, dass Assoziationsuntersuchungen heterogene Ergebnisse mit sich bringen. Die Inkonsistenz der Ergebnisse deutet darauf hin, dass eine fehlende Assoziation eines Kandidatengens innerhalb eines Patientenkollektivs nicht automatisch eine Funktion des Gens in der Entstehungsgeschichte der Erkrankung ausschließt.

Die Auswahl der Studienteilnehmer könnte als wesentliche Einflussgröße für die Diskrepanz der Untersuchungsergebnisse verantwortlich sein. ADHS-Patienten unterscheiden sich in Subtypzuordnung, Komorbidität, Medikamenten-Response und Geschlecht. Daher wird diskutiert, ob diese klinische Heterogenität für divergierende Ergebnisse bei Kandidatengenstudien verantwortlich sein könnte. Die phänotypische Variabilität könnte sich ebenso auf neurobiologischer Ebene widerspiegeln. Nach Krain und Castellanos [2006] deuten unterschiedliche neuroanatomische Ergebnisse, besonders hinsichtlich der Asymmetrie der Basalganglien, auf eine neurobiologische Heterogenität von ADHS-Patienten hin.

Das in dieser Dissertation verwendete Patientenkollektiv von 100 Familien wurde nach ICD-10 und DSM-IV diagnostiziert. Die Stichprobe wurde für diese Arbeit unabhängig vom ADHS-Subtyp, Komorbidität, Medikamenten-Response oder Geschlecht ausgewählt.

Im Folgenden wird auf Differenzen verschiedener ADHS-Subtypen eingegangen. In der Literatur wurden diese bereits von diversen Autoren beschrieben [Volk et al., 2006; Faraone et al., 2000]. Von Unterschieden im Verhalten, im Profil der Komorbidität und der Familiengeschichte der einzelnen Subtypen wurde berichtet.

McLoughlin et al. (2007) führten eine Studie an 6222 Zwillingspaaren mit ADHS durch. Anhand dieser Zwillinge wurde das Ausmaß der genetischen Übereinstimmung zwischen dem vorwiegend unaufmerksamen Typ und dem hyperaktiv-impulsiven Typ untersucht. Laut dieser Studie scheinen beide Subtypen zwar über die Hälfte des genetischen Profils gemeinsam zu haben, jedoch muss von einer gewissen genetischen Unabhängigkeit in der Expression des ADHS-Subtyps ausgegangen werden. Diese

genetische Heterogenität kann als Hinweis auf mögliche Subtyp-spezifische Gene interpretiert werden, die in der individuellen Krankheitsentstehung von ADHS von Bedeutung sein könnten.

Der vorwiegend unaufmerksame Typ scheint im Vergleich zu Kindern mit signifikanten Symptomen der Hyperaktivität und Impulsivität eine andere neuronale Ursache zu haben [Solanto et al., 2000]. Hierbei diskutierten Renner et al. (2008), dass die Dimension der Unaufmerksamkeit mit Defiziten der Exekutivfunktionen in einer Unterfunktion des präfrontalen Kortex begründet sein könnte. Unterschiedliche Transmittersysteme scheinen somit pathophysiologisch an der Entstehung von ADHS-Subtypen beteiligt zu sein.

Neben der Einteilung nach Subtypen könnte das Profil der Komorbidität ein wichtiger Indikator für die klinische Heterogenität von ADHS-Patienten sein [Taylor, 1998]. In einer Studie von Kadesjo und Gillberg (2001) lag die Prävalenz von ADHS-Patienten für eine weitere psychiatrische Erkrankung bei 87%, für zwei oder mehr Komorbiditäten bei 67%. Verschiedene Studien zeigten dabei deutliche Differenzen bezüglich der Begleiterkrankungen [Biederman et al., 2005; Jensen et al., 2001]. Zudem scheinen manche Komorbiditäten vermehrt bei bestimmten ADHS-Subtypen vorzukommen. Eiraldi et al. (1997) beschrieben beim Mischtyp ein gehäuftes Auftreten von externalisierenden Störungen wie ODD, CD und Abusus von Substanzen wie Alkohol im Vergleich zu anderen Subtypen. Dagegen scheint der vorwiegend unaufmerksame Typ eher internalisierende Störungen als zusätzliche psychiatrische Erkrankungen aufzuweisen [McGough et al., 2005; Murphy et al., 2002]. Das serotonerge System wird als neuropathologische Grundlage für Störungen wie ODD und CD angesehen. Dieses Neurotransmittersystem ist für die Regulation von Angst, Aggression und Impulsivität sowie der Stimmungslage bedeutsam [Lesch et al., 2003]. Nach Spooon (1992) prädisponieren Abweichungen der serotonergen Aktivität im Gehirn für dissoziales Verhalten. Eine Komorbidität könnte damit einen Hinweis liefern, welches Neurotransmittersystem eines ADHS-Patienten pathologisch verändert vorliegen könnte.

Nach Bauermeister et al. (2007) scheinen auch geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Komorbidität zu bestehen. Jungen scheinen dabei innerhalb der Untergruppe Mischtyp ein erhöhtes Risiko für eine depressive Störung zu haben;

Mädchen innerhalb der Untergruppe vorwiegend unaufmerksamer Typ eher für eine Angststörung. Daraus folgt, dass das Geschlecht der Patienten zusammen mit der Komorbidität zur Heterogenität einer Stichprobe beiträgt.

Zusätzlich ist ein Einfluss von ethnischen Hintergründen auf die Diagnose und die Zuteilung zu einzelnen ADHS-Subtypen möglich [Hillemeier et al., 2007]. In diesem Patientenkollektiv ist eine Beeinträchtigung durch die Ethnizität jedoch eher als gering einzuschätzen, da sich die Stichprobe ausnahmslos aus deutschen Familien zusammensetzte.

Als weiterer klinischer Parameter, der bei der Auswahl der Studienteilnehmer berücksichtigt werden sollte, ist das Ansprechen der Patienten auf medikamentöse Therapie zu nennen. In der MTA-Studie wurde von der Effektivität der Pharmakotherapie berichtet [Jensen et al., 1999]. Elia et al. (1991) beschrieben hingegen, dass manche Patienten nicht auf Pharmakotherapie ansprechen. Psychostimulantien wie MPH reduzieren laut Volkow et al. (1998) die Symptome von ADHS, indem sie Dopamintransporter blockieren. Möglicherweise liegt bei Non-Respondern eine andere neurobiologische Ursache zugrunde, welche den genannten Medikamenten nicht zugänglich ist [Feng et al., 2005]. Rohde et al. (2007) beschrieben in einer Studie mithilfe des Ansprechens auf MPH einen Zusammenhang von Kandidatengen und ADHS-Subtyp. Sie untersuchten das Kandidatengen *ADRA2A* aus dem noradrenergen Transmittersystem bei Patienten vom vorwiegend unaufmerksamen Typ. Sie berichteten, dass sich die Wirksamkeit von MPH vor allem bezüglich der Dimension der Unaufmerksamkeit abhängig von *ADRA2A*-Polymorphismen in ihrem Patientenkollektiv unterschied. Damit scheint ein pathophysiologischer Zusammenhang zwischen *ADRA2A* und dem vorwiegend unaufmerksamen Typ zu bestehen. Diese Studie beschreibt demnach, dass manche ADHS-Kandidatengene für bestimmte ADHS-Subtypen spezifisch bedeutsam zu sein scheinen. In ähnlicher Weise könnte auch *SV2C* an der Pathogenese von ADHS beteiligt sein. Weiterhin zeigt diese Studie, dass die Pharmokogenetik ein wichtiger Gesichtspunkt bei der Erforschung der neurobiologischen Ursache von ADHS darstellen könnte.

In vorangegangenen Kapiteln wurde bereits von der Interaktion des Gens *SV2C* mit BoNT/A berichtet. BoNT verhindert an der präsynaptischen Struktur die Ausschüttung von Neurotransmittern und damit die Signalübertragung an der Synapse. Diesen Effekt

erzielt das Toxin durch Proteolyse neuronaler SNARE-Proteine, welche für die Funktionsfähigkeit synaptischer Vesikel und damit für die Neurotransmission wichtig sind [Keller et al., 2004]. Das Protein SV2C scheint nach Mahrhold et al. (2006) die Untereinheit BoNT/A mit seiner großen intravesikulären Domäne zu binden. Im Tierversuch konnte durch diese Bindung eine deutliche Reduktion der Neurotoxizität von BoNT/A am Nervus phrenicus von Mäusen herbeigeführt werden.

Denkbar wären pharmakogenetisch relevante Überlegungen, wenn man den Zusammenhang von *SV2C* und BoNT/A vor dem Hintergrund der Ergebnisse von Muencke und Kollegen [2007] betrachtet. Diese berichteten von Untersuchungen zu Latrophilin 3 (*LPHN3*) bei ADHS. *LPHN3* besitzt die Eigenschaft, das Nervengift Latrotoxin von Spinnen der Gattung *Latrodectus* zu binden [Ushkaryov et al., 2004] und zu einem Risikohaplotyp konnte eine Assoziation mit ADHS in mehreren unabhängigen Stichproben bestätigt werden.

Sowohl bei *LPHN3* als auch bei *SV2C* handelt es sich um ein Gen, welches ein synaptisches Protein kodiert. Zusätzlich verfügen beide Proteine über die Eigenschaft, natürlich vorkommende Neurotoxine als Liganden zu binden. Bestünde für *SV2C* ein Zusammenhang mit ADHS, wie es für *LPHN3* beschrieben wurde, könnte die Fähigkeit des Proteins, als Bindungspartner zu dienen, pharmakologisch genutzt werden. *SV2C* könnte als Target für ein Pharmakon dienen, das eine Konformationsänderung dieses Proteins bewirkt und durch dessen Dysfunktion zu einer Minderung der ADHS-Symptomatik von Patienten beiträgt.

Abschließend wird noch auf Limitationen dieser Dissertation eingegangen. Dabei ist zunächst die Stichprobengröße zu nennen; es wurden 100 ADHS-Familien in diese Studie eingeschlossen. Möglicherweise war die Stichprobe zu klein, um eine signifikante Assoziation dieser drei SNP des Promotorbereiches hinsichtlich ADHS zu erhalten. Um diese Einflussgröße zu minimieren, müsste man eine größere Probandengruppe in die Studie aufnehmen.

Das Patientenkollektiv wurde nach ICD-10 und DSM-IV diagnostiziert, allerdings wurden verschiedene klinische Parameter, wie bereits erläutert, bei der Auswahl nicht berücksichtigt. Eine zusätzliche Untergliederung der Stichprobe hinsichtlich des klinischen Phänotyps wäre in zukünftigen Studien denkbar.

Mithilfe der Software *Haploview* wurde auf der Grundlage der *HapMap*-Daten drei SNP aus der Promotorregion ausgewählt. Neben dem Promotorbereich gibt es jedoch noch weitere Gen-Abschnitte, die für die Genregulation bedeutsam sind, und damit interessante Regionen für zukünftige molekulargenetische Untersuchungen von *SV2C* darstellen.

5. Zusammenfassung

In der Pathophysiologie von ADHS ist der Prozess der Neurotransmission bedeutsam für das Verständnis der Erkrankung. Gene wie *SV2C*, die synaptische Proteine kodieren, spielen eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung und könnten daher für den Pathomechanismus von ADHS interessant sein. *SV2C* qualifiziert sich als Kandidatengen, da ihm eine regulatorische Aufgabe bei der Ausschüttung von Neurotransmittern zugeschrieben wird.

Einen weiteren Hinweis auf die potentielle Beteiligung von *SV2C* an der Entstehung von ADHS ergab eine Studie des Labors für klinische Psychobiologie der Universität Würzburg. Dabei wurde mittels aCGH im Bereich von *SV2C* eine Duplikation entdeckt, welche auf eine Dysfunktion von *SV2C* bedingen könnte.

In dieser Dissertation wurde *SV2C* in einer Stichprobe von 100 ADHS-Familien anhand von drei Tag-SNP des putativen Promotorbereichs analysiert. Mittels molekulargenetischer Methoden (PCR, Restriktionsverdau) wurden die Genotypen des Patientenkollektivs bezüglich dieser SNP bestimmt. Für keinen der drei untersuchten SNP konnte in dieser Arbeit eine signifikante Assoziation zu ADHS beschrieben werden.

Das Studienergebnis schließt allerdings eine Bedeutung von *SV2C* in der Pathogenese der Störung nicht aus. Zu bedenken ist, dass die statistische Leistungsfähigkeit von Einzelstudien gering ist, sodass anhand größerer Fallzahlen eine Assoziation von *SV2C* zu ADHS zu prüfen ist. Weitere DNA-Sequenzen, die neben dem Promotor an der Genregulation beteiligt sind, wären zusätzliche interessante Ansatzpunkte folgender Kandidatengenstudien. Hierfür wäre auch das Verfahren des Hochdurchsatzes sinnvoll, bei dem maschinell in kürzerer Zeit mehrere SNP untersucht werden können.

Das verwendete Patientenkollektiv dieser Dissertation wurde unabhängig vom ADHS-Subtyp, Komorbidität, Medikamenten-Response oder Geschlecht ausgewählt. Eine unausgewogene Verteilung dieser klinischen Parameter innerhalb der Stichprobe könnte eine Beeinflussung der Studienergebnisse darstellen, wenn sich die klinische Heterogenität auch auf neurobiologischer Ebene zeigt. Von einer differenzierteren Phänotypisierung könnten zukünftige molekulargenetische Untersuchungen profitieren.

Als Studiendesign dieser Doktorarbeit wurde die familienbasierte Assoziationsstudie gewählt. Dieser Studientypus wird dem multifaktoriellen Charakter der Erkrankung am ehesten gerecht und eignet sich für weitere Assoziationsstudien an *SV2C*.

Das langfristige Ziel bei der Suche nach Kandidatengenomen wie *SV2C* ist das Verstehen der genetischen Komponente in der Ätiologie von ADHS. Mit diesen Erkenntnissen wäre die Entwicklung neuer Medikamente denkbar, die beispielsweise synaptische Proteine beeinflussen und dabei die Transmitterabgabe in den synaptischen Spalt regulieren könnten. Ein individuelles Therapiekonzept für ADHS-Patienten wäre vor dem neuropathologischen Hintergrund denkbar, welches sich sowohl am Genotyp als auch am Phänotyp des Einzelnen orientiert.

6. Literaturverzeichnis

1. Amara S, Kuhar M.: Neurotransmitter transporters: recent progress. *Ann. Rev. Neurosci.*; 16: 73-93, 1993
2. American Psychiatric Association: Diagnostic and statistical manual of mental diseases, 4th Edition, 1994
3. Arnsten A.F.T., Li B.M.: Neurobiology of Executive Functions: Catecholamine Influences on Prefrontal Cortical Functions; *Biological Psychiatry*, 2005, Pages 1377-1384
4. Barkley R.A.: Attention deficit hyperactivity disorder: A handbook for diagnosis and treatment, Guilford Press(1990)
5. Baron M.: The search for complex disease genes: fault by linkage or fault by association; *Mol. Psychiatry*, 6(2): 143-9, 2001
6. Barr C.L., Wigg K.G., Bloom S., Schachar R., Tannock R., Roberts W. et al.: Further evidence from haplotype analysis for linkage of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder; *Am. J. Med. Genet.* 2000; 96: 262-267
7. Barr C.L., Feng Y., Wigg K., Bloom S., Roberts W., Malone M., Schachar R., Tannock R., Kennedy J.L.: Identification of DNA variants in the SNAP-25 gene and linkage study of these polymorphisms and attention-deficit hyperactivity disorder; *Mol. Psychiatry* 2000; 5: 405-409
8. Barr C.L., Feng Y., Wigg K.G., Schachar R., Tannock R., Roberts W. et al.: 5'-untranslated region of the dopamine D4 receptor gene and attention-deficit hyperactivity disorder; *Am. J. Med. Genet.*, 2001; 105:84-90
9. Barr C.L., Kroft J., Feng Y., Wigg K., Roberts W., Malone M., Ickowicz A., Schachar, Tannock R., Kennedy J.L.: The norepinephrine transporter gene attention-deficit hyperactivity disorder; *Am. J. Med. Genet.* 2002; 114:255-259
10. Bauermeister J.J., Shrout P.E., Chavez L., Rubio-Stipec M., Ramirez R., Padilla L., Anderson A., Garcia P., Canino G.: ADHD and gender: are risks and sequela of ADHD the same for boys and girls?; *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 48:8, pp 831-839; 2007
11. Bellgrove M.A., Hawi Z., Lowe N., Kirley A., Robertson I.H., Gill M.: DRD4 gene variants and sustained attention in attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): effects of associated alleles at the VNTR and - 521 SNP; *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2005; 136: 81-86
12. Biederman J.: Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Selective Overview; *Biological Psychiatry*; Volume 57, Issue 11, 2005, Pages 1215-1220
13. Bobb A.J., Addington M., Sidransky E., Gornick M.C., Lerch J.P., Greenstein D.K., Clasen L.S., Sharp W.S., Inoff-Germain G., Wavrant-De Vrièze F., Arcos-Burgos M. Straub R.E., Hardy J.A., Castellanos X., Rapoport J.L.: Support for Association Between ADHD and Two Candidate Genes: NET and DRD1; *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 134B: 67-72 (2005)

14. Brassett-Harknett A., Butler N.: Attention-deficit/hyperactivity disorder: An overview of the etiology and a review of the literature relating to the correlates and lifecourse outcomes for men and women; *Clinical Psychology Review*; Volume 27, Issue 2, 2007, Pages 188-210
15. Brookes K.J., Knight J., Xu X., Asherson P.: DNA Pooling Analysis of ADHD and Genes Regulating Vesicle Release of Neurotransmitters; *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 139B:33-37 (2005)
16. Brookes K., Xu X., Chen W., Zhou K., Neale B., Lowe N., Aneey R., Franke B., Gill M., Ebstein R., Buitelaar J., Sham P., Campbell D., Knight J., Andreou P., Altink M., Arnold R., Boer F., Buschgens C., Butler L., Christiansen H., Feldman L., Fleischman K., Fliers E., Howe-Forbes R., Goldfarb A., Heise A., Gabriëls I., Korn-Lubetzki I., Marco R., Medad S., Minderaa R., Mulas F., Müller U., Mulligan A., Craig I., Banachewski T., Sonuga-Barke E., Eisenberg J., Kuntsi J., Manor I., McGuffin P., Miranda A., Oades R.D., Plomin R., Roeyers H., Rothenberger A., Sergeant J., Steinhausen H.C., Taylor E., Thompson M., Faraone S.V., Asherson P., Johansson L.: The Analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes; *Molecular Psychiatry* (2006) 11, 834-953
17. Brophy K., Hawi Z., Kirley A., Fitzgerald M., Gill M.: Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): evidence of linkage and association in the Irish population; *Mol. Psych.* 2002; 7:913-917
18. Brown R.T., PhD, Amler R.W., MD, Freeman W.S., PhD, Perrin J.M., MD, Stein M.T., MD, Feldman H.M., MD, PhD, Pierce K., MD, Wolraich M.L, MD and the Committee on Quality Improvement, Subcommittee on Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Overview of the Evidence; *PEDIATRICS* Vol. 115 No. 6 June 2005, pp. e749-e757 (doi:10.1542/peds.2004-2560)
19. Bruno K.J., Freet C.S., Twining R.C., Egami K., Grigson P.S., Hess E.J.: Abnormal latent inhibition and impulsivity in coloboma mice, a model for ADHS; *Neurobiol. Dis.* 25:206-16; 2007
20. Buckley K., Kelly R.B.: Identification of a glycoprotein specific for secretory vesicles of neural and endocrine cells, *J.Cell. Bio.* 100, 1284-1294; 1985
21. Comings D.E., Comings B.G., Muhlemann D., Dietz G., Shahbahrani B., Tost D. et al.: Dopamine D2 receptor locus as a modifying gene in neuropsychiatric disorders; *JAMA* 1991; 266: 1793-1800
22. Comings D.E., Gade-Andavolu R., Gonzalez N., Blake H., Wu S., MacMurray J.P.: Additive effect of three noradrenergic genes (ADRA2a, ADR2c, DBH) on attention-deficit hyperactivity disorder and learning disabilities in Tourette syndrome subjects; *Clin. Genet.* 1999; 55: 160-172
23. Comings D.E., Gade-Andavolu R., Gonzalez N., Wu S., Muhleman D., Blake H. et al.: Comparison of the role of dopamine, serotonin and noradrenaline genes in ADHD, ODD and conduct disorder: multivariate regression analysis of 20 genes; *Clin. Genet.* 2000; 57: 178-196
24. Curran S., Purcell S., Craig I., Asherson P., Sham P.: The serotonin transporter gene as a QTL for ADHD; *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2005; 134: 42-47

25. Daly G., Hawi Z., Fitzgerald M., Gill M.: Mapping susceptibility loci in attention deficit disorder: preferential transmission of parental alleles in DAT1, DBH and DRD5 to affected children; *Mol. Psychiatry* 1999; 4: 192-196
26. De Luca V., Muglia P., Jain U., Kennedy J.L.: No evidence of linkage or association between the norepinephrine transporter (NET) gene MnlI polymorphism and adult ADHD; *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2004; 124: 38-40
27. Domschke K., Sheehan K., Lowe N., Kirley A., Mullins C., O'Sullivan R., Freitag C., Becker T., Conroy J., Fitzgerald M., Gill M., Hawi Z.: Association analysis of the monoamine oxidase A and B genes with attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) in an Irish sample: preferential transmission of the MAO-A 941G allele to affected children; *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 2005; 134: 110-114
28. Eiraldi R.B., Power T.J., Nezu C.M.: Pattern of Comorbidity Associated With Subtypes of Attention- Deficit/Hyperactivity Disorder Among 6- to 12-Year-Old Children; *J.Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, 36:4; 1997
29. Eisenberg J., Mei-Tal G., Steinberg A., Tartakovsky E., Zohar A., Gritsenko I., Nemanov L., Ebstein R.P.: Haplotype relative risk study of catechol-O-methyltransferase (comT) and attention deficit disorder: association of the high-enzyme activity Val allele with ADHD impulsive-hyperactive phenotype; *Am. J. Med. Genet.* 1999; 88: 497-502
30. Eisenberg J., Zohar A., Mei-Tal G., Steinberg A., Tartakovsky E., Gritsenko I., Nemanov L., Ebstein R.P.: A haplotype relative risk study of the dopamine D4 receptor (DRD4) exon III repeat polymorphism and attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD); *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatr. Genet.)* 96:258-261; 2000
31. Eley T.C., Craig I.W.: Introductory guide to the language of molecular genetics; *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 46:10 (2005), pp 1039-1041
32. Elia J., Borcharding B.G., Rapoport J.L., Keysor C.S.: Methylphenidate and dextroamphetamine treatments of hyperactivity: are there true nonresponders? *Psychiatry Res.* 36(2):141-55, 1991
33. Elia J., Devoto M.: ADHD genetics: 2007 update; *Curr Psychiatry Rep.*, 2007; 9 (5): 434-9
34. Faraone S.V., Biederman J.: Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder; *Biological Psychiatry*, Volume 44, Issue 10, 15 November 1998, Pages 951-958
35. Faraone, Biederman J., Weber W., Russell R.L.: Psychiatric, neuropsychological and psychosocial features of DSM-IV subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder; results form a clinically referred sample; *J.Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry*; 37:185-193; 1998
36. Faraone S.V., Biederman J., Friedman D.: Validity of DSM-IV subtypes of attention-deficit/hyperactivity disorder: a family study perspective; *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry*; 39: 300-307; 2000
37. Faraone S.V., Perlis R.H., Doyle A.E., Smoller J.W., Goralnick J.J., Holmgren M.A., Sklar P.: Molecular Genetics of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder; *Biol Psychiatry* 2005; 57:1313-1323

38. Feng Y., Crosbie J., Wigg K., Pathare T., Ickowicz A., Schachar R., Tannock, Roberts W., Malone M., Swanson J., Kennedy J.L., Barr C.L.: The SNAP25 gene as a susceptibility gene contribution to attention-deficit hyperactivity disorder; *Mol. Psychiatry* 2005; 10: 998-1005
39. Feng Y., Wigg K.G., Makkar R., Ickowicz A., Pathare T., Tannock R. et al.: Sequence variation in the 3'- untranslated region of the dopamine transporter gene and attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD); *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2005; 139: 1-6
40. Fernández-Chacón R., Südhof T.C.: Genetics of Synaptic Vesicle Function: Toward the Complete Functional Anatomy of an Organelle; *Ann. Rev. Physiol.* 1999. 61:753-76
41. Friedel S., Saar K., Sauer S., Dempfle A., Walitza S., Renner T.J., Romanos M., Freitag C., Seitz C., Palmason H., Scherag A., Windemuth-Kieselbach C., Schimmelmann B.G., Wewetzer C., Meyer J., Warnke A., Lesch K.P., Reinhardt R., Herpertz-Dahlmann B., Linder M., Hinney A., Remschmidt H., Schäfer H., Konrad K., Hübner N., Hebebrand J.: Association and linkage of allelic variants of the dopamine transporter gene in ADHD; *Mol. Psychiatry* 12, 923-933; 2007
42. Gainetdinov R.R., Wetsel W.C., Jones S.R., Levin E.D., Jaber M., Caron M.G.: Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity; *Science*; 283: 397-401, 1999
43. Goldman L. S., MD; Genel M., MD; Bezman R. J., MD; Slanetz P. J., MD, MPH; for the Council on Scientific Affairs, American Medical Association: Diagnosis and Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Children and Adolescents *JAMA*. 1998; 279:1100-1107.
J Neural Transm; DOI 10.1007/s00702-007-0815-4; 2007
44. Halperin E. And Eskin E.: Haplotype reconstruction from genotype data using Imperfect Phylogeny; *Vol.20*, pages 1842-1849, 2004
45. Hawi Z., McCarron M., Kirley A., Fitzgerald M., Daly G., Gill M.: No association of the dopamine DRD4 receptor (DRD4) gene polymorphism with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) in the Irish population; *Am. J. Med. Genet. (Neuropsychiatr. Genet.)* 96: 268-272; 2000
46. Hawi Z., Dring M., Kirley A., Foley D., Kent L., Craddock N., Asherson P., Curran S., Gould A., Richards S., Lawson D., Pay H., Turic D., Langley K., Owen M., O'Donovan, Thapar A., Fitzgerald M., Gill M.: Serotonergic system and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): a potential susceptibility locus at the 5-HT1B receptor gene in 273 nuclear families from a multi-centre sample; *Nature*, Vol. 7, Nr. 7, pages 718-725, 2002
47. Hawi Z., Lowe N., Kirley A., Gruenhage F., Nothen M., Greenwood T. et al.: Linkage equilibrium mapping DAT1, DRD5 und DBH narrows the search for ADHD susceptibility alleles at these loci; *Mol. Psychiatry* 2003; 8: 299-308
48. Hebebrand J., Dempfle A., Saar K., Thiele H., Herpertz-Dahlmann B., Linder M., Kiefl H., Remschmidt H., Hemminger U., Warnke A., Knölker U., Friedel S., Hinney A., Schäfer H., Nürnberg P., Konrad K.: A genome-wide scan for attention-deficit/hyperactivity disorder in 155 German sib-pairs; *Mol. Psychiatry* 11, 196-205 (2006)
49. Heiser P., Friedel S., Dempfle A., Konrad K., Smidt J., Grabarkiewicz J., Herpertz-Dahlmann B., Remschmidt H., Hebebrand J.: Molecular genetic aspects of attention-deficit/hyperactivity disorder; *Neuroscience and Behavioral Reviews* 28 (2004) 625-641

-
50. Hess E.J., Collins K.A., Wilson M.C.: Mouse Model of Hyperkinesis Implicates SNAP-25 in Behavioral Regulation; Vol 16, Nr 9, pp. 3104-3111; 1996
 51. Hill P., Taylor E.: An auditable protocol for treating attention deficit/hyperactivity disorder; Arch Dis Child 2001;84:404-409
 52. Hillemeier M.M., Foster M.E., Heinrichs B.M.S., Heier B.B.S, the Conduct Problems Prevention Research Group: Racial Differences in Parental Reports of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Behaviors; Lippincott Williams & Wilkins, Inc. Volume 28(5), pp 353-361, 2007
 53. Hoffmann H.: Der Struwwelpeter: Frankfurt: Insel Verlag; 1988
 54. Holmes J., Payton A., Burret J.H., Hever T., Fitzpatrick H., Trumper A.L., Harrington R., McGuffin, Owen M., Oliver W., Worthington, Thapar A.: A family-based and case-control association study of the dopamine D4 receptor gene and dopamine transporter gene in attention-deficit/hyperactivity disorder; Mol. Psychiatry 5: 523-530; 2000
 55. Huang Y.S., Lin S.K., Wu Y.Y., Chao C.C., Chen C.K.: A family-based association study of attention-deficit hyperactivity and dopamine D2 TaqI A alleles; Chang Gung Med. J.; 2003; 26: 897-903
 56. Iezzi M., Thenander S., Janz R., Loze C. Wollheim C.B.: SV2A and SV2C are not vesicular Ca²⁺ transporters but control glucose-evoked granule recruitment; Journal of Cell Science 118, 5647-5660 (2005)
 57. Janz R., Südhof T.C.: SV2C is a Synaptic Vesicle Protein with an Unusually Restricted Localization: Anatomy of a Synaptical Vesicle Protein Family; Neuroscience Vol 94, No.4, 1279-1290, 1999
 58. Jensen P.S., Arnold L.E., Richters J.E., Sever J.B., Vereen D., Vitiello B., Schiller E., Hinshaw S.P., Elliott G.R., Conners C.K., Wells K.C., March J., Swanson J., Wigal T., Cantwell Dennis P., Abikoff H.B., Hechtman L., Greenhill L.L., Pelham W.E., Hoza B., Kraemer H.C.: A 14-Month Randomized Clinical Trial of Treatment Strategies for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder; Arch Gen Psychiatry 1999; 56: 1073-1086
 59. Jensen P.S., Hinshaw S., Kraemer H., Lenora N.B.S., Newcorn J.H., Abikoff H.B., March J.S., Arnold L.E., Cantwell D.P., Conners C.K., Elliot G.R., Greenhill L.L., Hechtman L., Hoza B., Pelham W., Severe J.B., Swanson J.M., Wells K.C., Wigal T., Vitiello B.: ADHS Comorbidity Findings From the MTA Study: Comparing Comorbid Subgroups; American Academy of Child and Adolescent Psychiatry Vol. 40(2), pp 147-158; 2001
 60. Kadesjö B., Gillberg C.: The comorbidity of ADHD in the general population of Swedish school-age children; Journal of Child Psychology and Psychiatric and Allied Disciplines Vol. 42, Issue 4, 2001, Pages 487-492
 61. Kadesjö C., Kadesjö B., Hägglöf B., Gillberg C.: ADHD in Swedish 3- to 7-Year-Old Children; American Academy of Child and Adolescent Psychiatry Vol. 40(9), 2001, Pages 1021-102
 62. Keller J.E., Cai F., Neale E.A.: Uptake of Botulinum Neurotoxin into Cultured Neurons; Biochemistry 2004; 43, 526-532

63. Kent L., Middle F., Hawi Z., Fitzgerald M., Gill M., Feehan C., Craddock N.: Nicotinic acetylcholine receptor alpha4 subunit gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder; *Psychiatr. Genet.* 2001; 11: 37-40
64. Kent L., Doerry U., Hardy E., Parmar R., Gingell K., Hawi Z. et al.: Evidence that variation at the serotonin transporter gene influences susceptibility to attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): analysis and pooled analysis; *Mol. Psychiatry* 2002; 7: 908-912
65. Krain A.L., Castellanos F.X.: Brain development and ADHD; *Clinical Psychology Review*; Vol. 26, Issue 4, pp. 433-444; 2006
66. Kustanovich V., Merriman B., McGough J., McCracken J.T., Smalley S.L., Nelson S.F.: Biased paternal transmission of SNAP-25 risk alleles in attention-deficit hyperactivity disorder; *Mol Psychiatry* 2003; 8: 309-315
67. Lesch K.P., Bengel D., Heils A., Sabol S.Z., Greenberg B.D., Petri S., Benjamin J., Müller C.R., Hamer D.H., Murphy D.L.: Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region; *Science*: 274 (5292): 1527-31; 1996
68. Lesch K.P., Reif A.: Toward a molecular architecture of personality; *Behavioral Brain Research* 139: 1-20; 2003
69. Levy F.: *Attention, Genes and Adhd*; Brunner-Routledge-Verlag, 1. Auflage, 2001
70. Li J., Wang Y., Qian Q., Wang B., Zhou R.: Association of 5-HAT (2A) receptor polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder in children; *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; 82: 1173-1176
71. Li J., Wang Y., Zhou R.L., Zhang H.B., Wang B., Yang L.: Association between serotonin 2C gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder comorbid or not comorbid with learning disorder; *Beijing Da Xue Xue Bao* 2004; 36: 366-369
72. Li J., Wang Y., Zhou R., Zhang H., Yang L., Wang B. et al.: Serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit disorder in Chinese Han subjects; *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2005; 132: 59-63
73. Löffler G.: *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*; 5.Auflage, Springer-Verlag; 2003
74. Lowe N., Kirley A., Mullins C., Fitzgerald M., Gill M., Hawi Z.: Multiple marker analysis at the promotor region of the DRD4 gene and ADHD: evidence of linkage and association with the SNP-616; *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2004; 131: 33-37
75. Mahrhold S., Rummel A., Bigalke H., Davletov B., Binz T.: The synaptic vesicle protein 2C mediates the uptake of botulinum neurotoxin A into phrenic nerves; *FEBS Vol. 580, Issue 8, 2006, Pages 2011-2014*
76. Malone M.A., Kershner J.R., Swanson J.M.: Hemispheric processing and methylphenidate effects in attention-deficit hyperactivity disorder; *Journal of Child Neurol.*, 1994, 181-9
77. McEvoy B., Hawi Z., Fitzgerald M., Gill H.: No evidence of linkage or association between the norepinephrine transporter (NET) gene polymorphisms and ADHD in the Irish population; *Am. J. Med. Genet.* 2002; 114: 665-666

78. McGough J.J., Smalley S.L., McCracken J.T., Yang M., Del'Homme M., Lynn D.E. et al.: Psychiatric comorbidity in adult attention deficit hyperactivity disorder: findings from multiplex families. *Am J Psychiatry* 2005; 62: (9): 1621-7
79. McLoughlin G., Ronald A., Kuntsi J., Asherson P., Plomin R.: Genetic Support for the Dual Nature of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Substantial Genetic Overlap Between the Inattentive and Hyperactive-impulsive Components; *J. Abnorm. Child Psychol.* (2007) 35; 999-1008
80. Mill J., Curran S., Kent L., Gould A., Hockett L., Richards S., Taylor E., Asherson P.: Association study of a SNAP-25 microsatellite and attention deficit hyperactivity disorder; *Am. J. Genet.*, 114(3): 269-71, 2002
81. Mill J., Richards S., Knight J., Curran S., Taylor E., Asherson P.: Haplotype analysis of SNAP-25 suggests a role in the aetiology of ADHD; 2004, Vol. 9, No. 8, Pages 801-810
82. Mill J., Xu X., Ronald A., Curran S., Price T., Knight J., Craig I., Sham P., Plomin R., Asherson P.: Quantitative Trait Locus Analysis of Candidate Gene Alleles Associated With Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) in Five Genes: DRD4, DAT1, DRD5, SNAP-25 and 5HT1B; *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 133:B 68-73; 2005
83. Mill J.: Rodent models: Utility for candidate gene studies in human attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD); *Journal of Neuroscience Methods*; 166 (2) 294-305; 2006
84. Moll G.H., Heinrich H., Trott G., Wirth S., Rothenberger A.: Deficient intracortical inhibition in drug-naïve children with attention-deficit hyperactivity disorder is enhanced by methylphenidate; *Neurosci Lett.*, 285(1-2): 1121-5, 2000
85. Motulsky A.G.: Genetics of complex diseases; *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006 February; 7(2): 167–168.
86. Muenke M.: A common and ancestral variant of latrophilin (LPHN3) confers susceptibility to attention-deficit/hyperactivity disorder; *Journal of Neural Transmission*; p.46; 2007
87. Muglia P., Jain U., Kennedy J.L.: A transmission disequilibrium test of the Ser9/Gly dopamine D3 receptor gene polymorphism in adult attention-deficit hyperactivity disorder; *Behav. Brain Res.* 2002; 130: 91-95
88. Mullis K.B., Faloona F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods. Enzymol.* 155: 335-350; 1987
89. Murphy K., Barkley R.A., Bush T.: Young adults with attention deficit hyperactivity disorder: Subtype differences in comorbidity, educational and clinical history; *Vol 190 (3), 2002, pp 147-157*
90. Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K., Schäfer-Korting M.: *Arzneimittelwirkungen-Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*; 9.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2001
91. Nolte J.: *The Human Brain- An Introduction to its Functional Anatomy*; 5th edition, Mosby, 2002
92. Odgie M.N., Macphie L., Minassian S.L., Yang M., Fisher S.E., Francks C., Cantor R.M., McCracken J.T. et al.: A Genomwide Scan for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in an Extended Sample: Suggestive Linkage on 17p11; *Am. J. Hum. Genet.* 72:1268-1279; 2003

93. Paule M.G., Rowland A.S., Ferguson S.A., Chelonis J.J., Tannock R., Swanson J.M., F.X. Castellanos: Attention deficit/hyperactivity disorder: characteristics, interventions and models; *Neurotoxicology and Teratology* Vol. 22, Issue 5, 2000, Pages 631-651
94. Payton A., Holmes J., Barrett J.H., Hever T., Fitzpatrick H., Trumper A.L. et al.: Examining for association between candidate gene polymorphisms in the dopamine pathway and attention-deficit hyperactivity disorder: a family-based study; *Am. J. Med. Genet.* 2001; 105: 464-470
95. Pliszka S.R.: the Neuropsychopharmacology of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder; *Biological Psychiatry*, Vol. 57, Issue 11, 2005, Pages 1385-1390
96. Purper-Ouakil D., Fournere P., Wohl M., Rénéric J.P.: Atomoxetine : a new treatment for Attention Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD) in children and adolescents; *Encephale*, 31(3): 337-48, 2005
97. Qian Q., Wang Y., Zhou R., Li J., Wang B., Glatt S., Faraone S.V.: Family-based and case-control association studies of catechol-O-methyl-transferase in attention deficit disorder suggest genetic sexual dimorphism; *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2003; 118: 103-109
98. Quist J.F., Barr C.L., Schachar R., Roberts W., Malone M., Tannock R. et al.: The serotonin 5-HT1B receptor gene and attention deficit disorder; *Mol. Psychiatry* 2003; 8: 98-102
99. Renner T.J., Gerlach M., Romanos M., Herrmann M., Reif A., Fallgatter A.J., K.P.Lesch: Neurobiologie des Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom; *Nervenarzt* 2008; 79:771-781
100. Rohde L.A., Polanczyk G., Zeni C., Genro J.P., Guimaraes B.Sc., Roman T., Hutz M.H.: Association of the Adrenergic alpha2A Receptor Gene With Methylphenidate Improvement of Inattentive Symptoms in Children and Adolescents With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder; *Arch Gen Psychiatry*; 2007; 64(2):218-224
101. Roman T., Schmitz M., Polynczyk G.V., Eizirik M., Rohde L.A., Hutz M.H.: Attention-deficit hyperactivity disorder: a study of association with both the dopamine transporter gene and the dopamine D4 receptor gene; *Am. J. Med. Genet.*; 8; 105(5): 471-8; 2001
102. Roman T., Schmitz M., Polynczyk G.V., Eizirik M., Rohde L.A., Hutz M.H.: Further evidence for the association between attention deficit disorder and the dopamine-beta-hydroxylase gene; *Am. J. Genet.* 2002; 114: 154-158
103. Rowe D.C., Van der Oord E.J., Stever C., Giedinghagen L.N., Gard J.M., Cleveland H.H. et al.: The DRD2 TaqI polymorphsim and symptoms of attention deficit hyperactivity disorder; *Mol. Psychiatry* 1999; 4: 580-586
104. Russell V.A.: Hypodopaminergic and hypernoradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder-the spontaneously hypertensive rat; *Behavioural Brain Research* 130 (2001) 191-196
105. Russell V.A.: Reprint of "Neurobiology of animal models of attention-deficit hyperactivity disorder"; *Journal of Neuroscience Methods* 166 (2006) 1-14
106. Schivell A.E., Mochida S., Kensel-Hammes P., Custer K.L., Bajjalieh S.M.: SV2A and SV2C contain a unique synaptotagmin-binding site; *Molecular and Cellular Neuroscience*, Vol. 29, Issue 1, 2005, Pages 56-64

107. Schmidt, M., Remschmidt, H., Poustka, F.: Multiaxiales Klassifikationsschema für psychische Störungen des Kindes- und Jugendalters nach ICD-10 der WHO; Mit einem synoptischen Vergleich von ICD-10 mit DSM-IV (4.Auflage), Hans Huber Verlag, Bern (2001)
108. Sheehan K., Lowe N., Kirley A., Mullins C., Fitzgerald M., Gill M. et al.: Tryptophan hydroxylase 2 (TPG2) gene variants associated with ADHD; *Mol. Psychiatry* 2005; 10 944-949
109. Smale S.T. and Kadonaga J.T.: The RNA Polymerase II Core Promotor; *Annu. Rev. Biochem.*, 2003, 72: 449-79
110. Smith K.M., Daly M., Fischer M., Yiannoutsos C.T., Bauer L., Barkley R. et al.: Association of the dopamine beta hydroxylase gene with attention deficit disorder: genetic analysis of the Milwaukee longitudinal study; *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2003; 119: 77-85
111. Spielman R.S., McGinnis R.E., Ewens W.J.: Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet.* 52(3):506-16; 1993
112. Spooont M.R.: Modulatory role of serotonin in neural information processing: implication for human psychopathology; *Psychol Bull*, 1992; 112 (2): 330-50
113. Solanto M.V.: The predominantly inattentive subtype of attention-deficit hyperactivity disorder; *CNS Spectr.* 2000; 5(6):45-51
114. Südhof T.C.: The Synaptic Vesicle Cycle; *Annu. Rev. Neurosci.* 2004. 27:509-47
115. Swanson J., Flodman P., Kennedy J., Spence M.A., Moyzis R., Schuck S., Murias M., Moriarity J., Barr C., Smith M., Posner M.: Dopamine genes and ADHD; *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24: 21-25; 2000
116. Swanson J., Posner M., Fusellaa J., Wasdell M., Sommer T., Fan J. : Genes and attention deficit hyperactivity disorder ; *Curr Psychiatry Rep* 3 :92-100 ; 2001
117. Swanson J. M., Kinsbourne M., Nigg J., Lanphear B., Stefanatos G.A., Volkow. N., Taylor E., Casey B.J., Castellanos F.X., Wadhwa P.D. 2007: Etiologic Subtypes of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Brain Imaging, Molecular Genetics and Environmental Factors and the Dopamine Hypothesis; *Neuropsycholol Rev*(2007) 17:39-59
118. Szatmari P., Paterson A.D., Zwaigenbaum L., Roberts W., Brian J., Liu X.Q., Vincent J.B., Skaug J.L. et al.: Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements; *Nat. Genet.* 2007; 39 (10): 1285
119. Taylor E.: Clinical foundations of hyperactivity research; *Behavioral Brain Research Vol 94, Issue 1, Pages 11-24, 1998*
120. Thapar A., Langley K., Fowler T., Rice F., Turic D., Whittinger N. et al.: Catechol-O-methyltransferase gene variant and birth weight predict early-onset antisocial behavior in children with attention deficit disorder; *Arch. Gen. Psychiatry* 2005; 62: 1275-1278
121. Thapar A., O'Donovan M., Owen M.J.: The genetics of attention deficit hyperactivity disorder; *Human Molecular Genetics*, 2005, Vol.14, Review Issue 2, 275-282
122. Thome J., Jacobs K.A.: Attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) in a 19th century children's book; *European Psychiatry Vol. 19 (5), pp 303-303; 2004*

123. Todd R.D., Lobos E.A.: Mutation screenin of the dopamine D2 receptor gene in attention- deficit hyperactivity disorder subtypes: preliminary report of a research stragety; *Am. J. Med. Genet.* 2002; 114: 34-41
124. Todd R.D., Lobos E.A., Sun L.W., Neuman R.J.: Mutational analysis of the nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene in attention deficit hyperactivity disorder: evidence for association of an intronic polymorphism with attention problems; *Mol. Psychiatry* 2003; 8: 103-108
125. Trepel M.: *Neuroanatomie-Struktur und Funktion*; 3.Auflage, Urban&Fischer, 2004
126. Ushkaryov Y.A., Volynski K.E., Ashton A.C.: The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies; *Toxicon.* 2004; 43 (5): 527-42
127. Volk H.E., Henderson C., Neumann R.J., Todd R.D.: Validation of population-based ADHD subtypes and identification of three clinically impaired subtypes; *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.*; 141: 312-318; 2006
128. Volkow. N.D., Wang G.-J., Fowler J.S., Gatley S.J., Logan J., Ding Y.-S., Hitzemann R., Pappas N.: Dopamine Transporter Occupancies in the Human Brain Induced by Therapeutic Doses of Oral Methylphenidate; *Am. J. Psychiatry* 155; 1325-1331, 1998
129. Walitza S., Renner T.J., Dempfle A., Konrad K., Wewetzer Ch., Halbach A. et al.: Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in attention-deficit/hyperactivity disorder; *Mol. Psychiatry* 2005; 10; 1126-1132
130. Xu T., Bajjalieh S.M.: SV2 modulates the size fo the readily releasable pool of secretory vesicles; *Nat. Cell. Biol.*, 2001
131. Xu X., Knight J., Brookes K., Mill J., Sham P., Craig I., Taylor E., Asherscon P.: DNA Pooling Analysis of 21 Norepinephrine Transporter Gene SNPs With Attention Deficit Hyperactivity Disorder; *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)* 134B:115-118 (2005)
132. Zhang H.B., Wang Y.F., Li J., Wang B., Yang L.: Association of dopamine beta-hydroxylase with attention deficit disorder complicated with disruptive behavior disorder; *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 2005; 43: 26.30

Weitere verwendete Literatur

- Biederman J., Spencer T.J., Newcorn J.H., Gao H., Milton D.R., Feldman P.D. Witte M.M.: Effect of comorbid symptoms of oppositional defiant disorder on responses to atomoxetine in children with ADHD: a meta-analysis of controlled clinical trial data; *Psychopharmacology (Berl.)*; 190 (1): 31-41; 2007
- Brookes K., Mill J., Guindalini C., Curran S., Xu X., Knight J. et al.: A common haplotype of the dopamine disorder and interacting with maternal use of alcohol; *Arch Gen. Psychiatry* 2006; 63: 74-81

-
- Brown C.D., Johnson D.S., Sidow A.: Functional Architecture and Evolution of Transcriptional Elements That Drive Gene Coexpression; *Science* Vol. 317.no. 5844, pp.1557-1560, 2007
 - Byun H., Yang J., Lee M., Jang W., Yang J.W., Kim J.H., Hong S.D., Joung Y.S.: Psychiatric Comorbidity in Korean Children and Adolescents with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: Psychopathology According to Subtype; *Yonsei Med. J.*; 47:113-121; 2006
 - Comings D.E., Gade-Andavolu R., Gonzalez N., Wu S., Muhleman D., Blake H. et al.: Multivariate analysis of associations of 42 genes in ADHD, ODD and conduct disorder; *Clin. Genet.* 58: 31-40, 2000;
 - Eley T.C., Rijdsdijk: Introductory guide to the statistics of molecular genetics; *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 46:10(2005), pp 1042-1044
 - Faraone S.V., Khan S.A.: Candidate gene studies of attention-deficit/hyperactivity disorder; *Journal of Clinical Psychiatry* 2006; 67 Suppl 8:13-20
 - Fischman A.J., Madras B.K.: The Neurobiology of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder; *Biological Psychiatry*; Volume 57, Issue 11, 1 June 2005, Pages 1374-1376
 - Fisher S.E., Francks C., McCracken J.T., McGough J.J., Marlow A.J., MacPhie L., Newbury D.F., Crawford L.R., Palmer C.G.S., Woodward J.A. et al.: A Genomewide Scan for Loci Involved in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder; *Am. J. Hum. Genet.* 70: 1183-1196, 2002
 - Ghuman J.K., Riddle M.A., Vitiello B., Greenhill L.L., Chuang S.Z., Wigal S.B., Kollins S.H., Abikoff H.B., McCracken J.T., Kastelic E., Scharko A.M., McGough J.J., Murray D.W., Evans L., Swanson J.M., Wigal T., Posner K., Cunningham C., Davies M., Skrobala A.M.: Comorbidity Moderates Response to Methylphenidate in the Preschoolers with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Treatment Study; *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*; 17(5): 563-80; 2007
 - Goozen, van S.H.M; Fairchild G.: Neuroendocrine and neurotransmitter correlates in children with antisocial behavior; *Horm. Beh.*, 2006; 50 (4): 647-54
 - Greimel E., Herpertz-Dahlmann B., Günther T., Vitt C., Konrad K.: Attentional functions in children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder with and without comorbid tic disorder;
 - Hawi Z., Foley D., Kirley A., McCarron M., Fitzgerald M., Gill M.: Dopa decarboxylase gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): no evidence for association in the Irish population; *Mol. Psychiatry* 2001; 6: 420-424
 - Inkster B., Muglia P., Jain U., Kennedy J.L.: Linkage disequilibrium analysis of the dopamine beta-hydroxylase in persistent attention deficit disorder; *Psychiatr. Genet* 2004; 14: 117-120
 - Jensen P., Epstein J.N., Conners C.K., Hervey A.S., Tonev S.T., Arnold E.L., Abikoff H.B., Elliott G.R., Greenhill L.L., Hoagwood K., Hinshaw S.P., Hoza B., Swanson J.M., March J.S., Newcorn J.H., Pelham W., Severe J.M.S., Vitiello B., Wigal T., MTA Cooperative Study Group: Assessing medication effects in the MTA study using neuropsychological outcomes; *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, Vol 47 Issue 5 Page 446-456; 2006
 - Jensen P.S., Arnold L.E., Swanson J., Vitiello B., Abikoff H.B., Greenhill L.L., Hechtman L., Hinshaw S., Pelham W.E., Wells Karen, Conners K.C., Elliot G.R., Epstein J.N., Hoza B., March J.S., Molina B.S.G., Newcorn J.H., Severe J.B., Wigal T., Gibbons R., Hur K.: 3-Year Follow-up of

- the NIMH MTA Study; American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, Vol 46(8), 2007, pp 989-1002
- Keller J.E., Neale E.A., Oyler G., Adler M.: Persistence of botulinum neurotoxin action in cultered spinal cord cells; FEBS letters 456 (1999) 137-142
 - King S., Griffin S., Hodges Z., Weatherly H., Asseburg C., Richardson G., Golder S., Taylor E., Drummond M., Riemsma R.: A systematic review and economic model of the effectiveness and cost-effectiveness of methylphenidate, dexamfetamine and atomoxetine for the treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children and adolescents, Health Technol Assess 10(23), 2006
 - Kustanovich V., Ishii J., Crawford L., Yang M., McGough J.J., McCracken J.T., Smalley S.L., Nelson S.F.: Transmission disequilibrium testing of dopamine-related candidate gene polymorphisms in ADHD: confirmation of association of ADHD with DRD4 and DRD5; Mol Psychiatry (2004) 9, 711-717
 - Levine M., Tjian R.: Transcription regulation and animal diversity; Nature 424, 147-151; 2003
 - Michele di F., Prichep L., John E.R., Chabot R.J. 2005: The neurophysiology of attention-deficit/hyperactivity disorder; International Journal of Psychophysiology Volume 58, Issue 1, October 2005, Pages 81-93
 - Müller Smith K., Daly M., Fischer M., Yiannoutsos C.T., Bauer L., Barkley R., Navia B.A.: Association of the Dopamine Beta Hydroxylase Gene With Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Genetic Analysis of the Milwaukee Longitudinal Study; American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics) 119B:77-85 (2003)
 - Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Moore P.K.: Pharmacology, 5th edition, Churchill Livingstone, 2003
 - Russell V.A., Allie S., Wiggins T.: Increased noradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder-the spontaneously hypertensive rat; Behavioural Brain Research 117 (2000) 69-74
 - Russell V.A., Sagvolden T., Johansen E.B.: Animal models of attention-deficit hyperactivity disorder; Behav. Brain Function; 15: 1:9, 2005
 - Russell V.A.: Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder; Journal of Neuroscience Methods; Volume 161(2), Pages 185-198; 2007
 - Sobanski E., Brüggemann D., Alm B., Kern S., Philipsen A., Schmalzried H., Heßlinger B., Waschowski H., Rietschel M.: Subtype differences in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) with regard to ADHD-symptoms, psychiatric comorbidity and psychosocial adjustment; Eur.Psychiatry, 2008; 23 (2): 142-9
 - Song C.M., Yeo B.H., Tantoso E., Yang Y., Lim Y.P., Li K.B., Rajagopal G.: iHAP – integrated haplotype analysis pipeline for characterizing the haplotype structure of genes; BMC Bioinformatics. 2006; 7: 525; published online 2006; 10.1186/1471-2105-7-525
 - State M.W., Lombroso P.J., Pauls D.L., Leckman J.F.: The genetics of childhood psychiatric disorders: a decade of progress; J.Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry; 39: 946-962; 2000

- Stockl K.M., Hughes T.E., Jarrar M.A., Secnik K., Perwien A.R.: Physician Perceptions of the Use of Medications for Attention Deficit Hyperactivity Disorder; *Journal of Managed Care Pharmacy* Sept/Oct 2003 Vol. 9, No.5 www.amcp.org
- Wigg K., Zai G., Schachar R., Tannock R., Roberts W., Malone M.: Attention deficit disorder and the gene for dopamin Beta-hydroxylase; *Am. J. Psychiatry* 2002; 159: 1046-1048
- Wilson M.C.: Coloboma mouse mutant as an animal model of hyperkinesia and attention deficit hyperactivity disorder; *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24 (2000) 51-57
- Yang L., Wang Y.F., Qian Q.J., Biederman J., Faraone S.V.: DSM-IV subtypes of ADHD in a Chinese outpatient sample; *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*; 43:248-250; 2004
- Yang Y., Zhang J., Hoh J., Matsuda F., Xu P., Lathrop M., Ott J.: Efficiency of single-nucleotide polymorphism haplotype estimation from pooled DNA; 2003; www.pnas.org/cgi/doi/10.173/pnas.1237858100
- Zhao H., Zhang S., Merikangas K.R., Trixler M., Wildenauer D.B., Sun F., Kidd K.K.: Transmission/Disequilibrium Tests Using Multiple Tightly Linked Markers; *Am. J. Hum. Genet.* 67: 936-946; 2000
- Zito, J.M. PhD; Safer D. J., MD; dosReis S., PhD; Magder L. S., PhD; Gardner J.F., ScM; Zarin D.A., MD 1999: Psychotherapeutic Medication Patterns for Youths With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder; *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1999;153:1257-1263

Danksagungen

Zum Abschluss meiner Doktorarbeit möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. K.P. Lesch für die Überlassung des interessanten Themas und das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Zudem danke ich für die abschließende Durchsicht meiner Dissertation.

Herrn Dr. T.J. Renner sei für die hervorragende Betreuung mit besonderem Lob bedacht. Sowohl während des experimentellen Teils als auch bei der Erarbeitung theoretischer Hintergründe stand er mir mit großem Engagement und seiner fachlichen Kompetenz stets verlässlich zur Seite.

Das gesamte Laborteam, insbesondere Frau C. Jambor, verdient große Anerkennung für die Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Unterstützung bei der experimentellen Durchführung dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich meinen Eltern auf diesem offiziellen Weg danken, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben und mir jederzeit sowie in jeder Hinsicht zur Seite gestanden sind. Ihnen ist diese Dissertation gewidmet.

Meiner Freundin Frau C. Pohl sei gedankt, dass sie mich uneingeschränkt mit aller erdenklicher Kraft unterstützt hat und stets mein persönlicher Rückhalt war.

Lebenslauf

Name: Jan Kellner

Geburtstag, -ort: 07.09.1982, Werneck

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schulbildung: 89-93 Grundschule Reichenberg
93-02 Röntgen-Gymnasium Würzburg
06/02 Abitur

Studium
WS 02/03 Chemiestudium, Universität Würzburg
ab SS 03 Medizinstudium, Universität Würzburg
03/05 Physikum
WS 05/06 Auslandsaufenthalt an der Universität Turku (SF)
06/09 Erlangen der Approbation als Arzt