

Aus der Klinik und Poliklinik für
Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Marcel Romanos

Expressionsanalysen monoaminerger Kandidatengene bei der
Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung und Autismusspektrumsstörung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Lennart Gunnar Reefschläger
aus Köln

Würzburg, Januar 2017



Referent: Prof. Dr. Marcel Romanos

Korreferent/-in: PD Dr. Angelika G. Schmitt-Boehrer

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

02.05.2018

Der Promovend ist Arzt.

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung	3
1.2.1	Symptomatik	3
1.2.2	Klassifikation der ADHS	4
1.2.3	Neurobiologie	6
1.3	Autismusspektrumstörung (ASS)	8
1.3.1	Symptomatik	8
1.3.2	Klassifikation	10
1.3.3	Neurobiologie	12
1.4	Definition eines Krankheitsmarkers	14
1.5	Kandidatengene	17
1.5.1	Dopaminrezeptoren D4 (<i>DRD4</i>)	17
1.5.2	Dopaminrezeptoren D5 (<i>DRD5</i>)	18
1.5.3	Tryptophanhydroxylasegen 1 (<i>TPH1</i>)	18
2	Forschungsstand	20
2.1	Zum Inhalt der Studie	20
2.2	Zum methodischen Forschungsstand	21
2.3	Zusammenfassung	22

2.4	Fragestellung.....	22
3	Methode	24
3.1	Erhebung der Stichproben.....	24
3.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien	24
3.1.1.1	Patienten	24
3.1.1.2	Gesunde Kontrollgruppe.....	24
3.1.2	Diagnosestellung	25
3.1.2.1	Diagnostik einer ADHS.....	25
3.1.2.2	Diagnostik einer ASS.....	25
3.1.2.3	Charakterisierung der gesunden Kontrollgruppe	26
3.1.3	Testpsychologische Verfahren	26
3.1.3.1	Fremdbeurteilungsbogen-ADHS (FBB-ADHS) für Eltern und Erziehungsberechtigte	26
3.1.3.2	Child Behavior Checklist (CBCL/4-18).....	26
3.1.3.3	Depressionsinventar für Kinder und Jugendliche (DIKJ)	27
3.1.3.4	Diagnostisches Interview für Autismus - Revidiert (ADI-R).....	27
3.1.3.5	Diagnostische Beobachtungsskala für Autistische Störungen (ADOS)	27
3.1.3.6	Intelligenz- und Leistungsdiagnostik.....	28
3.2	Verfahren zur Datenerhebung	28
3.2.1	Kontaktaufnahme und Aufklärung	28
3.2.2	Expressionsanalysen.....	29
3.2.2.1	mRNA-Gewinnung und -Isolierung.....	29

3.2.2.2	Reverse Transkription.....	30
3.2.2.3	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	30
3.2.3	Relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode.....	35
3.3	Geräte und Materialien	36
3.4	Statistische Auswertung	37
4	Ergebnisse.....	39
4.1	Merkmale der Stichproben.....	39
4.1.1	Merkmale der Patienten mit ADHS	40
4.1.2	Merkmale der Patienten mit ASS.....	42
4.2	mRNA-Expressions-Ergebnisse	45
5	Diskussion.....	49
6	Ausblick.....	62
7	Zusammenfassung	63
8	Literaturverzeichnis.....	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Erwartungen an einen Krankheitsmarker	16
Abbildung 2: Ermittlung des Ct-Wertes (<i>threshold cycle</i> , Schwellenwertzyklus)	31
Abbildung 3: Darstellung einer Schmelzkurve	33
Abbildung 4: Verteilung der ADHS-Subtypen nach ICD-10- Diagnoseschlüsseln	40
Abbildung 5: T-Wert-Mittelwerte und -Standardabweichungen der CBCL/4-18 (internalisierend, externalisierend, gesamt) für die Gruppe der Patienten mit ADHS, mit ASS und die gesunde Kontrollgruppe.....	42
Abbildung 6: Verteilung der Diagnosen aus dem Autismusspektrum nach ICD-10-Schlüsseln.....	43
Abbildung 7: Verteilung der ADHS-Subtypen nach ICD-10- Diagnoseschlüsseln bei Patienten mit ASS und komorbider Aufmerksamkeitsstörung.....	45
Abbildung 8: mRNA-Expression der Kandidatengene <i>TPH1</i> , <i>DRD5</i> und <i>DRD4</i> im Vollblut von Patienten mit ADHS, ASS und gesunden Kontrollpersonen in Relation zu einer internen Referenz	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Cut-off-Werte für ADOS-Module	28
Tabelle 2: Reaktionsansatz für qRT-PCR	34
Tabelle 3: Reaktionsprotokoll für qRT-PCR	34
Tabelle 4: Untersuchte Kandidaten- und Haushaltsgene und ihre Bestellnummern	35
Tabelle 5: Verwendete Geräte und Materialien	36
Tabelle 6: Demographische Angaben zu den Stichproben	39
Tabelle 7: Art und Häufigkeit von Komorbiditäten in der ADHS-Gruppe	41
Tabelle 8: Auswertung des ADI-R	43

Daten der vorliegenden Promotion wurden im Februar 2011 *im World Journal of Biological Psychiatry* publiziert, wobei der Doktorand als Co-Autor fungierte (Taurines, Grünblatt, Schecklmann, Schwenck, Albantakis, Reefschläger, Walitza, Renner, Gerlach, Thome, Romanos: „*Altered mRNA expression of monoaminergic candidate genes in the blood of children with attention deficit hyperactivity disorder and autism spectrum disorder.*“, s. Anhang). Aus diesem Grund ergeben sich in der Diskussion der vorliegenden Arbeit inhaltliche Überschneidungen mit der Diskussion der o.g. Publikation.

Die wissenschaftliche Eigenleistung des Doktoranden besteht zusammenfassend in der Rekrutierung und klinischen Charakterisierung der Patienten, der Rekrutierung der Kontrollprobanden, Gewinnung der Probenmaterialien, sowie der Aufbereitung und Diskussion der Ergebnisse.

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung (auch Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung, ADHS) äußert sich durch eine Störung der Aufmerksamkeit, eine erhöhte Impulsivität und durch Hyperaktivität. Die genaue Ätiologie ist bis dato noch unbekannt, allerdings weisen Zwillings- und Adoptionsstudien auf eine neuropsychiatrische Entwicklungsstörung mit starkem genetischen Einfluss hin (Faraone et al. 2005). Aufgrund molekulargenetischer Befunde, Beobachtungen an Tiermodellen sowie aufgrund der Effizienz von Stimulanzien bei der Therapie der ADHS erscheinen katecholaminerge bzw. monoaminerge Gene pathophysiologisch relevant (Faraone & Biederman 1998). In molekulargenetischen Studien und Metaanalysen konnte besonders für dopaminerge Kandidaten signifikante Assoziationen mit dem Phänotyp ADHS berichtet werden. Die Gene, von denen am häufigsten und konstantesten Varianten in Assoziation mit ADHS auftreten, kodieren für den Dopaminrezeptor D4 (*DRD4*) und D5 (*DRD5*) sowie für das Enzym Tryptophanhydroxylase (*TPH*) (Li et al. 2006b; Gizer et al. 2009; Banaschewski et al. 2010; Wu et al. 2012). Ätiologisch und klinisch wäre es nun bedeutsam zu untersuchen, ob die Expression dieser Gene in den betroffenen Hirnregionen bei Patienten mit ADHS im Vergleich zu gesunden Kontrollen verändert ist. Eine Annäherung an diese Fragestellung ist über indirekte Vorgehensweisen, beispielsweise über postmortem-Untersuchungen, SPECT-Messung etc. möglich. Ein weiterer Ansatz ist es, peripheres Gewebe als Surrogat für Gehirngewebe zu untersuchen. Hinweise für ähnliche Expressionsmuster relevanter Genklassen in Gehirn- und peripherem Gewebe ergaben sich bereits aus einigen Studien (Mckenna et al. 2002; Sullivan et al. 2006). Bisher liegen lediglich wenige Untersuchungen vor, die sich mit der peripheren Expression monoaminergener Kandidatengene bei psychiatrischen Erkrankungen befassen. In diesen Studien wurde meist die mRNA-Expression bei psychiatrischen Erkrankungen wie Schizophrenien, Depression oder dem Tourette-Syndrom bestimmt, häufig mit uneinheitlichen Ergebnissen (Ilani et al. 2001; Kwak et al. 2001; Vogel et al. 2004; Mehler-Wex et al. 2006; Ferrari et al. 2008; Urhan-Kucuk et al. 2011)

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nun, mögliche Unterschiede in der mRNA-Expression der Gene *DRD4*, *DRD5* und *TPH1* in peripherem Gewebe bei Kindern und Jugendlichen mit neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen im Vergleich zu gesunden Kontrollkindern zu untersuchen; bei jungen Patienten mit ADHS und - als klinische Kontrollgruppe - mit einer weiteren neuropsychiatrischen Entwicklungsstörung, einer Autismusspektrumsstörung (ASS), welche eine sehr hohe Komorbidität mit ADHS aufweist (Goldstein & Schwebach 2004; Leyfer et al. 2006; Simonoff et al. 2008). Zusätzlich soll ein möglicher Einfluss von Psychostimulanzien auf die mRNA-Expression untersucht werden. Spezifische Befunde zur Genexpression in peripherem Gewebe bei ADHS könnten zukünftig als objektive Testergebnisse, als „periphere Marker“ des Störungsbildes eventuell diagnostische Hilfe bei bestehender Verdachtsdiagnose ADHS geben. Ergebnisse zu einem möglichen Einfluss von Stimulanzien auf die mRNA-Expression ergänzen bisherige Kenntnisse zu molekularen Wirkprinzipien dieser Substanzen und erlauben möglicherweise eine Vorhersage über das Ansprechen auf Stimulanzien als Medikamente der Wahl bei ADHS sowie die Durchführung eines Therapie-Monitorings.

Die Studie, auf die sich diese Arbeit bezieht, wurde als Fall-Kontroll-Studie konzipiert. In die Untersuchung wurden 51 Kinder und Jugendliche mit ADHS eingeschlossen, denen peripheres venöses Blut abgenommen wurde. Bei 30 dieser Patienten wurden zu zwei Zeitpunkten Blutentnahmen durchgeführt: eine Entnahme unter Stimulanzien einfluss und eine nach Absetzen der Stimulanzien für mindestens 24 Stunden, was einer Auswaschperiode von mindestens zehn Halbwertszeiten entspricht. Zusätzlich wurden 26 Patienten mit einer ASS als klinische Kontrollgruppe rekrutiert. Demgegenüber steht eine Kontrollgruppe bestehend aus 39 gesunden Kindern und Jugendlichen.

Als wichtigstes Ergebnis konnte eine signifikante Verringerung der *DRD4*-mRNA-Expression im Blut der Patienten mit ADHS und der Kinder und Jugendlichen mit ASS im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich eine signifikant verminderte *DRD5*-mRNA-Expression im Blut der Patienten mit ASS im Vergleich zu den Kindern mit ADHS sowie zur gesunden Kontrollgruppe.

1.2 Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung

1.2.1 Symptomatik

Wie eingangs erwähnt ist die ADHS eine psychische Störung mit Beeinträchtigung der Aufmerksamkeit, einer erhöhten Impulsivität und Hyperaktivität. Im Folgenden werden diese Hauptsymptome genauer erläutert.

Aufmerksamkeitsstörung

Die Aufmerksamkeitsstörung ist gekennzeichnet durch eine kurze Aufmerksamkeitsspanne. Die Patienten haben große Schwierigkeiten bei Tätigkeiten, die eine kontinuierliche Aufmerksamkeit und Konzentration erfordern. Betroffene sind ablenkbar und unkonzentriert, was durch eine übermäßige Reizoffenheit bedingt ist. Viele Aktivitäten werden begonnen, ohne zu Ende geführt zu werden. Die Kinder gehen vor allem solchen Tätigkeiten aus dem Weg, die von anderen vorgegeben werden und nicht selbst initiiert sind (Hausaufgaben, Teilnahme an Schulstunden usw.). Im Vorschulalter zeigen die Betroffenen diese Konzentrationsschwäche teilweise auch bei selbst bestimmten Tätigkeiten, während dieses Verhalten bei Jugendlichen kaum mehr zu finden ist. Die Fähigkeit, Ereignisse und Aufgaben nach ihrer Wichtigkeit zu hierarchisieren, d.h. sich zu organisieren, ist oft eingeschränkt (Lehmkuhl et al. 2007).

Impulsivität

Unter Impulsivität versteht man im Allgemeinen ein Verhalten, bei dem als Reaktion auf verschiedene Impulse oder motivationale Zustände Handlungen schnell ausgeführt werden, ohne dass vorher die Reaktion geplant und durchdacht wurde. Bei der funktionalen Impulsivität erfolgt dieser Verhaltensstil der Situation angepasst (Lehmkuhl et al. 2007). Bei Kindern mit ADHS ist dieses Verhalten jedoch dysfunktional. Von ihnen werden kurzfristige und unüberlegte Handlungen auch ausgeführt, wenn es der Situation nicht angemessen ist. Diese Störung äußert sich häufig in der Missachtung sozialer Normen (z.B. Unterbrechung von Gesprächspartnern, starke Gefühlsausbrüche) und in Verhaltensexzessen, bei denen ein an sich normales Verhalten in seiner Stärke oder seiner Häufigkeit zu einem unerwünschten

Ausmaß übersteigert wird (Daruna & Barnes 1993). Dadurch geraten die Kinder häufig in Streit, wobei es ihnen nicht möglich ist, die Folgen ihrer impulsiven Handlungen abzuschätzen. Das Risiko für Unfälle, körperliche Verletzungen (v.a. schwere Verletzungen (Merrill et al. 2009)) und akzidentielle Vergiftungen ist zudem deutlich erhöht.

Hyperaktivität

Extreme Ruhelosigkeit und eine deutlich erhöhte motorische Aktivität sind vor allem bei Vorschul- und Grundschulkindern typische Kennzeichen einer ADHS. In Situationen, in denen vermehrt Ruhe und Konzentration gefordert sind, treten diese Auffälligkeiten besonders stark hervor. Die Kinder haben große Schwierigkeiten still zu sitzen oder ruhig zu spielen. Permanentes Herumlaufen und -klettern sind Ausdruck dieses übermäßigen Bewegungsdranges, der auch durch Aufforderungen nicht dauerhaft unterbunden werden kann (Döpfner et al. 1999; Lehmkuhl et al. 2007).

1.2.2 Klassifikation der ADHS

Die Kriterien für die Diagnose hyperkinetischer Störungen oder Aufmerksamkeitsdefizits-/Hyperaktivitätsstörungen werden in den international anerkannten Klassifikationssystemen der Weltgesundheitsorganisation (*International Classification of Diseases*; ICD-10) und der *American Psychiatric Association* (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*; DSM-IV und zuletzt DSM-5) definiert und decken sich weitgehend. Da sie sich dennoch in einzelnen Unterpunkten voneinander unterscheiden, werden ihre Klassifikationskriterien im Folgenden aufgeführt.

Kriterien nach ICD-10

In der ICD-10 sind in der Gruppe F90 alle hyperkinetischen Störungen mit Beginn in der Kindheit und Jugend zusammengefasst; F90 umfasst die einfache Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung (F90.0), die hyperkinetische Störung des Sozialverhaltens (F90.1) und sonstige sowie nicht näher bezeichnete hyperkinetische Störungen (F90.8/F90.9).

Für die Diagnose einer einfachen Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung (F90.0) müssen als Hauptsymptome ausgeprägte Aufmerksamkeitsstörungen

sowie Hyperaktivität und Impulsivität vorhanden sein. Diese Symptome müssen schon vor dem sechsten Lebensjahr vorliegen, länger als ein halbes Jahr andauern, deutlich stärker ausgeprägt sein als bei gleichaltrigen Kindern und zu einer Beeinträchtigung in mehreren Lebensbereichen führen, z.B. zu Hause, in der Schulklasse oder im Freizeitbereich.

Als mögliche Begleitsymptome, die nicht notwendig für die Diagnosestellung sind, diese jedoch stützen, werden weiterhin Distanzlosigkeit in sozialen Beziehungen, Unbekümmertheit in gefährlichen Situationen und impulsive Missachtung sozialer Regeln angeführt.

Falls zusätzlich noch Kriterien für eine Störung des Sozialverhaltens in Form von aggressiven und deutlich oppositionellen Verhaltensweisen vorliegen, kann die Diagnose hyperkinetische Störung des Sozialverhaltens (F90.1) gestellt werden (Lehmkuhl et al. 2007).

Hyperkinetische Störungen ohne klare Zuordnung zu den vorigen Diagnosen können sonstigen hyperkinetischen Störungen (F90.8) oder nicht näher bezeichneten hyperkinetischen Störungen (F90.9) zugeteilt werden.

Kriterien nach DSM

Zum Zeitpunkt der Patientenrekrutierung für die vorliegende Arbeit war das DSM-IV gültig, welches im Mai 2013 durch das DSM-5 abgelöst wurde. Im DSM-IV findet man als Kardinalsymptome Aufmerksamkeitsstörung, Hyperaktivität und Impulsivität, wobei auch hier - wie bei der ICD-10 - weitere diagnostische Kriterien zutreffen müssen, um die Diagnose stellen zu können. So sollten die Symptome schon vor dem siebten Lebensjahr und länger als sechs Monate vorliegen. Die Beeinträchtigungen, die sich aus den ADHS-Symptomen und ihrer psychosozialen Komponente ergeben, sollten mehrere Lebensbereiche betreffen und zu einem klinisch relevanten Leidensdruck führen.

Je nach Ausprägung der Kardinalsymptome werden drei Subtypen spezifiziert:

- Beim Mischtyp einer Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörung (ADHS, 314.02) finden sich Aufmerksamkeitsstörung, Hyperaktivität und Impulsivität in gleicher Intensität.
- Beim vorwiegend unaufmerksamen Typ (Aufmerksamkeitsdefizitstörung, ADS, 314.00) steht die Aufmerksamkeitsstörung im Mittelpunkt, während die Hyperaktivität und Impulsivität nicht oder nicht hinreichend stark ausgeprägt sind.

- Der vorwiegend hyperaktiv-impulsive Typ (HI, 314.01) ist vor allem durch die im Vordergrund stehende Hyperaktivität und Impulsivität gekennzeichnet. Bei dieser Form ist die Aufmerksamkeitsstörung nicht oder nicht hinreichend vorhanden.

Im DSM-5 wurden als Neuerung Diagnosekriterien für Erwachsene ergänzt. Auch wurde das Alter, vor dem erste ADHS-Symptome beobachtet werden müssen, von sieben auf zwölf Jahre hoch gesetzt. ADHS und ASS werden nicht mehr als sich ausschließende Störungsbilder genannt, somit deren häufig komorbides Auftreten aufgegriffen.

Zusammenfassend sind beide Klassifikationssysteme bezüglich der Kriterien der hyperkinetischen Störung und der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung weitgehend identisch. So entspricht die einfache Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung aus der ICD-10 dem Mischtypus einer Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung aus dem DSM-IV. Allerdings benennt die ICD-10 einen koexistenten Subtypus mit Störung des Sozialverhaltens, welcher im DSM-IV mit zwei eigenen Diagnosen definiert ist. Dagegen werden im DSM-IV drei Subtypen beschrieben, die die unterschiedliche Ausprägung der Kardinalsymptome widerspiegeln. Die ICD-10 erfasst somit eine Kerngruppe hyperkinetisch auffälliger Kinder, während im DSM-IV eine größere Gruppe unter diesem Störungsbild miteinbezogen wird. Da sich in der Literatur der Begriff Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) durchgesetzt, wird er auch in dieser Arbeit synonym zur einfachen Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung nach ICD-10 F90.0 verwendet werden.

1.2.3 Neurobiologie

Die Entstehung der ADHS ist multifaktoriell. Neben einer starken genetischen Prädisposition scheinen auch Umwelteinflüsse mit der abnormen Ausbildung neuroplastischer Strukturen und mit ADHS-Symptomen assoziiert zu sein (Biederman & Faraone 2005; Renner et al. 2008). Es existieren mittlerweile zahlreiche Befunde aus der Molekulargenetik, aus der strukturellen und funktionellen Bildgebung sowie aus neurophysiologischen, neurochemischen und neuropsychologischen Untersuchungen, aus denen eine Dysregulation

verschiedener Neurotransmittersysteme und neuronaler Regelkreise hervorgeht.

Mittels Zwillings- und Familienstudien zeigte sich für die ADHS sowie für ASS eine Erbllichkeit von bis zu 80%, wobei ein multifaktorielles Vererbungsmuster unter Zusammenwirken mehrerer Genvarianten vermutet wird.

Ebenso werden Umweltbedingungen als möglich Entstehungsfaktoren genannt. Neben einem pränatalen Nikotinkonsum der Mutter sowie einer mütterlichen Adipositas vor der Schwangerschaft scheint ein niedriges Geburtsgewicht das Risiko für eine ADHS zu erhöhen (Walitza et al. 2005; Rodriguez et al. 2008; Thapar et al. 2013). Eine erhöhte Exposition mit Blei oder bestimmten Lebensmittelzusätzen sowie ein gesteigerter Konsum von Medien ließen sich dagegen nicht als ätiologische Risikofaktoren identifizieren (Banerjee et al. 2007; Mccann et al. 2007; Efsa 2008).

In strukturellen Bildgebungsstudien und in Metaanalysen bestätigte sich ein leicht reduziertes Hirnvolumen bei Kindern mit ADHS, insbesondere im Bereich des Kleinhirns, im Frontalkortex und der Basalganglien (Krain & Castellanos 2006). Passend zur Hypothese einer neuropsychiatrischen Entwicklungsstörung scheint die Reifung des Kortex besonders in frontalen Arealen verspätet abzulaufen (Dickstein et al. 2006).

Der Einfluss neurochemischer Substrate auf den Phänotyp ADHS lässt sich aus pharmakologischen Studien, Tiermodellen und Befunden der funktionellen Bildgebung nachweisen. Durch den Eingriff in monoaminerge Stoffwechselprozesse beeinflussen Psychostimulanzien und Atomoxetin die Konzentration von Dopamin und Noradrenalin im synaptischen Spalt und wirken mit einer Verbesserung der ADHS-Kernsymptomatik (Prince 2008; Walitza et al. 2009). Durch Beeinträchtigung der dopaminergen Genexpression fallen Mausmodelle durch Kernsymptome der ADHS auf. Dabei scheint eine verringerte Funktion des Dopamintransporter (DAT) eine wesentliche Rolle zu spielen (Mill et al. 2005; Gainetdinov 2008). Dazu passend wurde wiederholt eine erhöhte DAT-Dichte im Striatum bei Patienten mit ADHS ohne Medikation und eine Normalisierung der Dichte unter Stimulanziengabe nachgewiesen (Krause et al. 2000; Krause 2008; Prince 2008).

Es wird - wie bereits erläutert - davon ausgegangen, dass bei der ADHS Veränderungen innerhalb der Regelkreisläufe im Bereich des frontalen Kortex, der Basalganglien und des Cerebellums auftreten. Fehlfunktionen im Bereich fronto-striataler neuronaler Bahnen, die die Kontrolle kognitiver Funktionen beeinflussen, führen zu zahlreichen Einschränkungen der sog. exekutiven

Funktionen wie Handlungsplanung und -umsetzung sowie der Anpassung an veränderte Umstände. Weiterhin finden sich Beeinträchtigungen im Bereich der Aufmerksamkeit sowie Steuerung motorischer Reaktionen (Durston et al. 2011). Ventrale und mediale Teile des präfrontalen Kortex steuern Emotionen über neuronale Verbindungen mit den Amygdala, Nucleus accumbens, Hirnstamm und dem Hypothalamus (Arnsten 2009). Bezüglich Belohnungsverhalten und Motivation spielen orbito-fronto-striatale Bahnen eine wichtige Rolle. Veränderungen in diesen Strukturen führen bei Patienten mit ADHS zu Ungeduld und einer verringerten Toleranz, eine Belohnung aufzuschieben (Durston et al. 2011).

1.3 Autismusspektrumstörung (ASS)

In die Studie wurden als klinische Kontrollprobanden Kinder und Jugendliche mit einer autistischen Störung eingeschlossen. Im Folgenden werden die Verhaltens- und Wahrnehmungsbesonderheiten bei Menschen mit einer Autismusspektrumstörung (ASS) erläutert, die Klassifikationen autistischer Störungen im ICD-10 und DSM-IV/5 vorgestellt und neurobiologische Grundlagen dieser neuropsychiatrischen Entwicklungsstörung zusammengefasst.

1.3.1 Symptomatik

Autistische Störungen kennzeichnen sich durch tiefgreifende, überdauernde Verhaltensmuster, die in die Kernbereiche Vorhandensein von qualitativen Beeinträchtigungen im Bereich der sozialen Interaktion und der sozialen Kommunikation sowie eingeschränkte, repetitive und stereotype Verhaltensmuster, Interessen und Aktivitäten gegliedert werden. Im Folgenden werden diese Verhaltensbesonderheiten näher erläutert.

Qualitative Beeinträchtigung in der sozialen Interaktion

Diese ist gekennzeichnet durch die Unfähigkeit, Blickkontakt, Mimik, Körperhaltung und Gestik zur Regulation sozialer Interaktionen zu verwenden. Weiterhin fehlt die Fähigkeit, Beziehungen zu Gleichaltrigen mit gemeinsamen

Interessen, Aktivitäten und Gefühlen aufzunehmen. Bei autistischen Kindern zeigt sich dies oft darin, dass kaum Kontakt zu anderen Kindern gesucht wird und kein gemeinsames Spiel stattfindet. Freundschaften können nur schwer oder gar nicht aufgebaut und aufrecht erhalten werden. Neben dem Mangel an Fähigkeit zur Verhaltensanpassung entsprechend dem sozialen Kontext besteht auch ein Mangel an sozioemotionaler Wechselseitigkeit, die sich in unpassenden Reaktionen auf die Emotionen anderer äußert. Oftmals ist es den Betroffenen nicht möglich, Freude, Interessen oder Tätigkeiten mit anderen zu teilen (Mangel an sog. „Joint Attention“). Einem Kind mit ASS fällt es beispielsweise schwer, den Eltern Spielsachen zu zeigen, die ihm wichtig sind, diese zu erklären und sich gemeinsam daran zu freuen.

Qualitative Beeinträchtigung der Sprache und der Kommunikation

Diese ist charakterisiert durch eine verspätete oder auch völlig fehlende Entwicklung der gesprochenen Sprache. Dabei fehlt der Versuch, die sprachlichen Defizite durch den Einsatz von Gestik oder Mimik als alternative Kommunikationswege auszugleichen. Es mangelt den Betroffenen an der Fähigkeit der verbalen Kontaktaufnahme und der Aufrechterhaltung des Kontakts, bei dem es einen gegenseitigen Kommunikationsaustausch mit dem Gegenüber gibt.

Ebenso fallen die Betroffenen durch eine stereotype und repetitive Verwendung der Sprache sowie durch den eigentümlichen Gebrauch von Worten oder Phrasen sowie durch Neologismen auf. Personen mit ASS und einem hohen Funktionsniveau (es liegt keine Intelligenzminderung vor), können auch eine elaborierte Sprache entwickeln, die phrasenhaft, monoton und wenig moduliert erscheinen kann. Oft wird Doppeldeutigkeit und Ironie nicht wahrgenommen, sondern Gesagtes konkretistisch verstanden.

Eingeschränkte und stereotype Verhaltensmuster, Interessen und Aktivitäten

Die Betroffenen zeigen umfassendes Interesse an stereotypen und an Flexibilität begrenzten Handlungen, die in Inhalt und Schwerpunkt abnorm sind. Teilweise werden diese Interessen auch mit ungewöhnlicher Intensität verfolgt. Zudem fallen neben einer zwanghaften Anhänglichkeit an spezifische, nicht funktionale Handlungen oder Rituale auch stereotype und repetitive motorische Manierismen mit Hand- und Fingerschlagen oder Verbiegen sowie komplexe

Bewegungen des ganzen Körpers (z.B. Jaktationen) auf. Die Betroffenen beschäftigen sich überwiegend mit Teilobjekten oder nicht funktionalen Elementen des Spielmaterials (z. B. ihrem Geruch, der Oberflächenbeschaffenheit oder dem von ihm hervorgebrachten Geräusch oder der Vibration). Beispielsweise ist ein Kind nur am Drehen des Rades eines Spielzeugautos oder am Beleckten der metallischen Oberfläche interessiert und nicht daran, das Auto im Kontext einer komplexeren Spielsituation einzusetzen. (Blanz et al. 2005; Remschmidt & Kamp-Becker 2008; Boelte 2009; Noterdaeme 2011)

1.3.2 Klassifikation

Autistische Störungen werden in der ICD-10 und DSM-IV/ DSM-5 unter den tiefgreifenden Entwicklungsstörungen klassifiziert. Die Unterschiede der beiden Klassifikationssysteme werden im Folgenden erläutert.

Kriterien nach ICD-10

In der im europäischen Sprachraum meist angewendeten ICD-10 werden aktuell unter F84 die Diagnosen eines frühkindlichen Autismus (F84.0, Synonym Kanner-Syndrom), das Asperger Syndrom (F84.5), der atypische Autismus (F84.1), die nicht näher bezeichnete (F84.9) und sonstige tiefgreifende Entwicklungsstörungen (F84.8) klassifiziert (World Health Organization 1993). Nach aktuellem Forschungsstand werden diese unter dem oben bereits genannten, und in das DSM-5 aufgenommenen (s.u.) Begriff „Autismusspektrumstörung“ (ASS) zusammengefasst. Somit grenzen sie sich von den anderen tiefgreifenden Entwicklungsstörungen wie dem Rett-Syndrom (F84.2), der desintegrativen Störung (F84.3) oder der überaktiven Störung mit Intelligenzminderung und Bewegungsstereotypien (F84.4) ab.

Die verschiedenen Diagnosen/Subtypen innerhalb des autistischen Spektrums werden durch das Vorliegen bestimmter Entwicklungsaspekte sowie unterschiedlicher Schweregrade und Zusammensetzungen von Symptomen aus dem Kernbereich bestimmt. Der frühkindliche Autismus gilt als Vorbild der ASS. Die restlichen ASS sind gekennzeichnet durch das Vorhandensein wesentlicher phänotypischer Merkmale des frühkindlichen Autismus.

Die Diagnose frühkindlichen Autismus fordert eine auffällige und beeinträchtigte Entwicklung (Verzögerung der Sprachentwicklung) und das Auftreten

autistischer Merkmale aus allen Kernbereichen vor Vollendung des dritten Lebensjahres. Diese Form von ASS geht häufig mit einer Intelligenzminderung einher.

Menschen mit Asperger Syndrom zeigen nach den Diagnosekriterien der ICD-10 in den ersten drei Lebensjahren eine normale Entwicklung der Anpassungsfähigkeit und Neugierde an der Umgebung. Sie sind nicht durch eine kognitive oder Sprachentwicklungsverzögerung eingeschränkt. Auffällig beim Asperger Syndrom sind jedoch eingeschränkte und sehr umschriebene Interessen sowie ein motorisches Ungeschick.

Die Diagnose atypischer Autismus wird bei Vorhandensein der Kriterien des frühkindlichen Autismus mit Auftreten nach dem dritten Lebensjahr oder bei Fehlen von Symptomen aus einem der drei Kernbereiche vergeben.

Die Kriterien nicht näher bezeichneter tiefgreifender Entwicklungsstörungen sind denen der restlichen ASS ähnlich, aber noch vager definiert. (Boelte 2009; Dilling et al. 2011; Noterdaeme 2011).

Kriterien nach DSM

Im DSM-IV gehörten autistische Erkrankungen zu den unter dem Schlüssel 299 aufgelisteten tiefgreifenden Entwicklungsstörungen. Darunter fielen u.a. die Diagnosen „autistische Störung“ (299.00) und „Asperger-Syndrom“ (299.80). Die Definition der autistischen Störung war weitestgehend identisch mit der des frühkindlichen Autismus (s. Definition nach ICD-10 im vorangegangenen Abschnitt). Die Diagnosekriterien für das Asperger-Syndrom deckten sich in beiden Klassifikationssystemen größtenteils. Die Diagnose des atypischen Autismus aus der ICD-10 hatte jedoch kein Pendant im DSM-IV und wird dort als Sonderfall einer nicht näher bezeichneten tiefgreifenden Entwicklungsstörung diagnostiziert.

Das DSM-IV wurde 2013 vom DSM-5 abgelöst. Der Begriff „ASS“, der ein dimensionales Konzept eines fließenden Überganges zwischen sehr unterschiedlichen Ausprägungsformen autistischer Störungen widerspiegelt, wurde erstmals in das DSM-5 aufgenommen (www.dsm5.org) (AMERICAN PSYCHIATRIC Association 1994; Boelte 2009; Noterdaeme 2011).

1.3.3 Neurobiologie

Im Allgemeinen sind ASS erblich bedingte, genetisch sehr heterogene Störungsbilder mit Heritabilitätsraten von 80-90% (Freitag et al. 2010; Betancur 2011). In Zwillingsstudien fielen Konkordanzraten von 60-90% bei eineiigen Zwillingen gegenüber 0-10% bei zweieiigen Zwillingen auf (Veenstra-Vanderweele et al. 2003; Veenstra-Vanderweele & Cook 2004). Durch Untersuchungen in der Vergangenheit zeigte sich, dass heterogene Vererbungsmuster sehr unterschiedliche autistic Phänotypen hervorbringen können. Im Gegensatz zu sog. „syndromalen“ Formen von Autismus mit monogenen Erbgängen (z.B. fragile X- oder Rett-Syndrom) wird bei „idiopathischen“ Formen von einer Vielzahl von überwiegend unbekanntem Genvarianten in Interaktion mit Umweltfaktoren ausgegangen (Freitag et al. 2010; Noterdaeme & Enders 2010).

Biologische und Umweltfaktoren, welche mit ASS in Verbindung gebracht werden, sind neben Infektionskrankheiten der Mutter in der Schwangerschaft, wie z.B. Rötelninfektionen, eine länger anhaltende extreme Deprivation in der frühen Kindheit, künstliche Befruchtung mit Einsatz von follikelstimulierendem Hormon, erhöhtes Alter der Eltern bei Befruchtung, Frühgeburtlichkeit mit niedrigem Geburtsgewicht und Hirnblutung sowie Schwangerschaftsdiabetes, eine Präeklampsie und die mütterliche Einnahmen von Antiepileptika, insbesondere Valproat (Chess et al. 1978; Yamashita et al. 2003; Sweeten et al. 2004; Rasalam et al. 2005a; Rutter et al. 2007; Buchmayer et al. 2009; Atladottir et al. 2010; Pinto-Martin et al. 2011; Freitag 2012; Lyall et al. 2012a).

Zahlreiche Befunde auf neuroanatomischer, neurochemischer, neurophysiologischer und neuropsychologischer Ebene weisen auf eine neuropsychiatrische Entwicklungsstörung bei ASS hin. Neben einer mehrfach nachgewiesenen nach der Geburt einsetzen Volumenvergrößerung der weißen und grauen Substanz insbesondere in frontalen und temporalen Gebieten wurde in einigen Untersuchungen bei Patienten mit ASS ein verringertes Volumen des Corpus callosum festgestellt, was eine reduzierte neuronale Vernetzung über längere Distanzen im Gehirn bewirken könnte (Courchesne 2004; Hardan et al. 2009; Keary et al. 2009; Nickl-Jockschat & Michel 2011). In postmortem-Untersuchungen zeigten sich histologische Veränderungen im limbischen System sowie innerhalb der kleinsten funktionellen kortikalen Einheiten, den sog. Mikrokolumnen, und zudem eine verminderte Anzahl von Purkinje-Zellen im Kleinhirn (Kemper & Bauman 2002; Bauman & Kemper

2005; Casanova et al. 2006). In Strukturen des Hirnstamms wurden ebenso neuroplastische Veränderungen entdeckt (Hashimoto et al. 1995; Rodier et al. 1996).

Bei Menschen mit ASS ließ sich im Blut wiederholt ein erhöhter Serotoningehalt in Thrombozyten nachweisen (Marazziti et al. 2000; Anderson et al. 2002; Mulder et al. 2004; Whitaker-Azmitia 2005). Die Hypothese von Whitaker-Azmitia (Whitaker-Azmitia 2005), dass eine frühe Hyperserotoninämie bei noch unvollständiger Blut-Hirn-Schranke eine Schädigung serotonerger Neurone verursachen und konsekutiv zu den o.g. hirnanatomischen und mit ASS assoziierten Verhaltensauffälligkeiten führen könnte, wird durch Befunde am Rattenmodell gestützt (Mcnamara et al. 2008).

Aus neurophysiologischer Sicht auffällig ist eine um 10-60% erhöhte Auftretenswahrscheinlichkeit für epileptische Potenziale bzw. Epilepsien bei betroffenen Personen (Kawasaki et al. 1997; Tuchman 2000; Tuchman & Rapin 2002; Bölte 2009). Untersuchungen zu evozierten Potentialen ergaben eine veränderte Verarbeitung sprachlich akustischer wie auch visueller Informationen (Reaktion auf Gesichter) bei Kindern mit ASS (Dawson et al. 2002; Kuhl et al. 2005; Lepisto et al. 2005; Lepisto et al. 2008). Dazu passend zeigte sich in Studien der funktionellen Bildgebung bei Menschen mit ASS eine Minderaktivierung des fusiformen Gyrus bei Präsentation von Gesichtern mit kompensatorisch erhöhter Aktivierung benachbarter Areale wie der inferiore temporale oder mediale occipitale Gyrus, die bei Gesunden der Registrierung von Objekten dienen (Schultz et al. 2000; Hubl et al. 2003; Kleinhans et al. 2011).

Auf neuropsychologischer Ebene fallen Menschen mit ASS durch zahlreiche komplexe Defizite auf. In Untersuchungen zum Modell der „*Theory of Mind (ToM)*“, welches die Fähigkeit beschreibt, eigene und fremde gedankliche Vorgänge, Gefühle und Verhaltensweisen zu verstehen, zeigte sich, dass es Kindern mit ASS, im Vergleich zu gesunden Gleichaltrigen, nur eingeschränkt möglich erscheint von ihrem eigenen Kenntnisstand ausgehend Fragen zu beantworten und in die Perspektive eines anderen Menschen zu wechseln (Baron-Cohen et al. 1985; Senju 2012). Personen mit ASS haben zudem eine natürliche Präferenz für die Wahrnehmung von Details. Sie sind weniger anfällig für optische Täuschungen, allerdings fällt es Betroffenen schwer, einzelne Elemente in einen Gesamtzusammenhang zu integrieren und als ein Einheitsbild zu erfassen (BÖLTE 2009). Kinder mit ASS haben im Alltag Schwierigkeiten, sich selbst zu strukturieren, alltägliche Handlungen zu planen

und schrittweise umzusetzen. Diese Defizite sind Ausdruck exekutiver Dysfunktionen, welche bei autistischen Menschen durch die Anwendung verschiedener Planungsaufgaben nachgewiesen wurde (Hughes et al. 1994; Bennetto et al. 1996)

Die genannten zytologisch-hirnanatomischen, neurochemischen und hirnfunktionellen Befunde einer abnormen neuronalen Plastizität und die daraus resultierenden komplexen neuropsychologischen Defizite deuten darauf hin, dass es sich bei ASS um eine neuropsychiatrische Entwicklungsstörung handelt.

1.4 Definition eines Krankheitsmarkers

Ein Krankheitsmarker (auch biologischer Marker oder „Biomarker“) ist ein charakteristisches biologisches Merkmal, das objektiv gemessen wird und als Hinweis auf physiologische oder pathologische Prozesse im Körper dient. Gleichzeitig werden Marker auch zur pharmakologischen Überwachung bei therapeutischen Interventionen eingesetzt (Group 2001; Thome et al. 2012). Als Beispiel sei das Blutbild genannt, das anhand seiner Blutwerte eine Aussage über den Gesundheitszustand des Menschen liefern kann.

Marker für Störungen des zentralen Nervensystems (ZNS) können beispielsweise in klinische, bildgebende, biochemische, genetische und proteomische Marker eingeteilt werden, abhängig davon, auf welcher pathophysiologischen Ebene sie Informationen vermitteln (THOME et al. 2012). Das Ziel der Entwicklung von Krankheitsmarkern ist unter anderem eine verbesserte und frühzeitigere Diagnose neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen (s. Abb. 1). Für die ADHS wären Marker von großer Bedeutung, da die Erstdiagnose und Weiterbehandlung des Störungsbildes bislang lediglich auf der klinischen Ermittlung spezifischer Symptome beispielsweise unter Einbezug spezieller Fragebögen beruht. Mit diesen Verfahren ist es nur begrenzt möglich, ein individuelles Erkrankungsrisiko zu ermitteln, zügig eine exakte Diagnose zu treffen, einzelne Unterformen einer ADHS für eine optimale Therapieplanung zu unterscheiden und den Schweregrad von krankheitsspezifischen Symptomen einzuordnen. Ebenso könnte durch Marker ein valides Therapiemonitoring gewährleistet werden und damit der Einsatz von Stimulanzien individueller angepasst werden. Durch die Identifikation von Markern im Bereich der psychiatrischen Störungen ist vielleicht auch eine

größere Akzeptanz in der Allgemeinbevölkerung gegenüber diesen Erkrankungsbildern zu erwarten.

Derzeit gibt es diverse Forschungsgruppen, die sich mit der Erforschung von Biomarkern bei psychiatrischen Erkrankungen beschäftigt. Die Studiengruppe des Cambridge Center for Neuropsychiatric Research publizierte in den letzten Jahren verschiedene Arbeiten, in denen potentielle Biomarker u.a. für Schizophrenie und Depression untersucht wurden (Chan et al. 2015a; Chan et al. 2015b). Eine Arbeit von Chan et al. (2015b) beschäftigt sich mit der Entwicklung eines Markersets, welches das individuelle Risiko zur Ausbildung einer Schizophrenie identifizieren soll. Zunächst erfolgte eine Blutuntersuchung von 127 medikamentennaiven Patienten mit der Erstdiagnose einer Schizophrenie und 204 gesunden Kontrollprobanden unter Verwendung einer Multiplex-Immunoassay-Analyse. Dabei wurde ein Set aus 26 modulierten Markern identifiziert, das die Patienten am besten von den gesunden Probanden unterschied. Anschließend wurde das Marker-Set in einer anderen Kohorte bestehend aus 93 Patienten mit Erstdiagnose einer Schizophrenie sowie 88 Kontrollpersonen untersucht. Dabei bestätigte sich das Ergebnis aus der ersten Untersuchung. Schließlich erfolgte eine Überprüfung bzgl. der Vorhersagbarkeit der Entwicklung einer Schizophrenie. Dazu wurde das Serum von 445 Personen untersucht, die entweder ein hohes Risiko für eine Psychose oder Frühsymptome einer Schizophrenie aufwiesen. Als Ergebnis zeigte sich eine hohe Vorhersagbarkeit unter Verwendung des Marker-Sets für die Identifikation von Patienten, die bis zwei Jahren nach Probenentnahme eine Schizophrenie entwickelten.

Das Ziel einer weiteren Arbeit war die Entwicklung und Validierung eines Krankheitsmarkertests zur Früherkennung einer Depression, ebenfalls unter Verwendung einer Multiplex-Immunoassay-Analyse von insgesamt 1007 Blutproben. Zunächst wurde im Serum von 78 medikamentennaiven Patienten mit Erstdiagnose einer Depression und 156 Kontrollen nach modulierten Markern gesucht, deren Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen gesund und krank in einer zweiten Kohorte von 468 Patienten mit einer Depression und 305 Kontrollprobanden überprüft wurde. Dabei ergab sich ein Set von 33 immunoendokrinen Markern, das eine moderate bis gute Unterscheidungsfähigkeit zwischen Patienten und Gesunden aufwies.

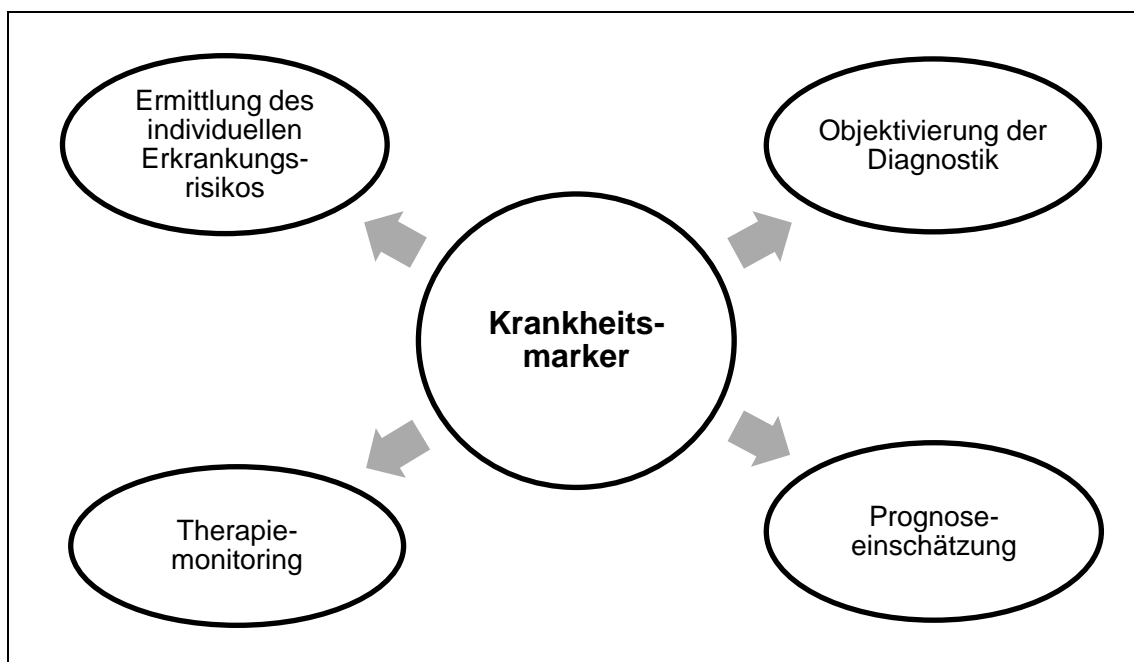
Für einen idealen Marker für ADHS definierte die *Task Force für biologische Marker der World Federation of Societies of Biological Psychiatry* und die *World Federation of ADHD* Kriterien (Thome et al. 2012). Diese Kriterien sind

angelehnt an die Anforderungen für Biomarker bei der Alzheimer Erkrankung, deren Erforschung maßgebend für die Entwicklung von biologischen Markern bei Erkrankungen des ZNS ist.

Folgenden Kriterien wurden vorgeschlagen:

- eine diagnostische Sensitivität größer als 80% für das Aufdecken einer ADHS,
- eine Spezifität größer als 80% für die Abgrenzung von anderen Störungen mit ADHS-ähnlichen Symptomen,
- eine ausreichende Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit,
- eine einfache, nicht invasive Durchführung und niedrige Kosten sowie
- eine Bestätigung durch mindestens zwei unabhängige Studien, die von qualifizierten Untersuchern durchgeführt werden und deren Ergebnisse in Fachzeitschriften mit Gutachtersystem veröffentlicht werden.

Abbildung 1: Erwartungen an einen Krankheitsmarker



1.5 Kandidatengene

Aufgrund der in 1.2.3. und 1.3.3. dargestellten neurobiologischen Untersuchungen ergibt sich ein Fokus im Bereich des monoaminergen Kandidatensystems. Aus einer Vielzahl potentieller Kandidatengene erwiesen sich folgende monoaminerge Gene für die vorliegende Arbeit als interessant, da bestimmte Varianten wiederholt mit ADHS assoziiert waren (Li et al. 2006b; Gizer et al. 2009; Banaschewski et al. 2010; Wu et al. 2012).

1.5.1 Dopaminrezeptorgen D4 (*DRD4*)

DRD4 kodiert für den Dopaminrezeptor D4, einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, durch dessen Aktivierung die Adenylatcyclase inhibiert wird. In Folge dessen nimmt die Konzentration des intrazellulären sekundären Botenstoffs zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ab (Oldenhof et al. 1998). *DRD4* wird überwiegend im mesocortico-limbischen System exprimiert, welches sich aus dem frontalen Kortex, dem Hippocampus, der Amygdala und dem Mesencephalon zusammensetzt und von dem angenommen wird, dass es eine wichtige Rolle in der Ätiologie der ADHS einnimmt (Noain et al. 2006; Floresco & Tse 2007).

DRD4 befindet sich auf Chromosom 11 auf dem Genlocus 11p15.5, und enthält vier Exons. In Exon drei befindet sich ein *Variable Number Tandem Repeat* (VNTR)-Polymorphismus über eine 48 Basenpaar (bp) lange Sequenz (Van Tol et al. 1991; Van Tol et al. 1992). Zehn Allele mit 2-11 Wiederholungen dieser 48 bp wurden bisher weltweit nachgewiesen. In mehreren Metaanalysen von molekulargenetischen Studien zur ADHS wurde festgestellt, dass das Allel mit 7 Wiederholungen (7-Repeat-Allel) besonders häufig mit dem Auftreten der Störung assoziiert ist (gepoolte Odds-Ratio, OR 1,34) und zwar sowohl bei kaukasischen als auch nicht kaukasischen Populationen (Faraone et al. 2001; Bhaduri et al. 2006; Cheuk & Wong 2006; Li et al. 2006a; Ballon et al. 2007; Guan et al. 2007; Yang et al. 2008; Gizer et al. 2009). Zudem konnte für *DRD4*-Varianten in Assoziationsstudien ein Zusammenhang mit stärkeren Ausprägungen an „Novelty Seeking“ („die Suche nach etwas Neuem“) nachgewiesen werden (Benjamin et al. 1996; Ebstein et al. 1996), ein Persönlichkeitsmerkmal, das eng mit einer hohen Bereitschaft zu Impulsivität und Erregbarkeit bei Patienten mit ADHS verknüpft ist (Faraone et al. 1999). Auch gibt es unter den Trägern des *DRD4* 7R-Allels Hinweise für eine erhöhte

Empfänglichkeit für Suchterkrankungen (Chen et al. 2011; Park et al. 2011; Van Der Zwaluw et al. 2012).

1.5.2 Dopaminrezeptorgen D5 (*DRD5*)

Das Dopaminrezeptorgen D5 (*DRD5*) kodiert für den Dopaminrezeptor D5, welcher wie der DRD4 ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor ist, im Gegensatz zu diesem jedoch die Adenylatcyclase stimuliert und damit cAMP erhöht (Polymeropoulos et al. 1991). Northern-Blot-Untersuchungen und In-situ-Hybridisierungen ergaben, dass der DRD5-Rezeptor eine neuronenspezifische Verteilung zeigt und insbesondere innerhalb der limbischen Regionen, den kortikalen Schichten II, IV und VI, dem Gyrus dentatus und in weiteren hippocampalen Strukturen des Gehirns exprimiert wird (Sunahara et al. 1991). Es wird vermutet, dass *DRD5* Lernprozesse bei der Erfahrung neuer Ereignisse moduliert (Li et al. 2003). Desweiteren ergaben verschiedene molekulargenetische Studien Hinweise für einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) von *DRD5* und suizidalem Verhalten (Fernandez-Navarro et al. 2012), Nikotinabhängigkeit (Wei et al. 2012) sowie Alkoholismus (Hack et al. 2011). Bei SNPs kommt es zum Austausch einzelner Basenpaare in einem DNA-Strang. Abhängig von deren Lage im Genom können sie Einfluss auf das Ablesen eines Gens bzw. die Funktion eines Proteins nehmen.

DRD5 befindet sich auf Chromosom 4 auf dem Genlocus 4p16.1 - 4p15.3 und besteht aus zwei Exons. Eine hoch polymorphe Mikrosatelliten-Sequenz [D5(CT/GT/GA)_n] mit 12 Allelen unterschiedlicher Länge konnte für das Gen identifiziert werden. (Grandy et al. 1992; Sherrington et al. 1993; Beischlag et al. 1995). Für das Allel mit einer Länge von 148 bp wurde mittels mehrerer Metaanalysen eine signifikante Assoziation (gepoolte OR 1,3) mit ADHS nachgewiesen (Daly et al. 1999; Lowe et al. 2004; Li et al. 2006a; Gizer et al. 2009).

1.5.3 Tryptophanhydroxylasegen 1 (*TPH1*)

Das Tryptophanhydroxylasegen (*TPH*) kodiert für das Enzym Tryptophanhydroxylase (TPH), welches das geschwindigkeitsbestimmende Enzym bei der Biosynthese von Serotonin darstellt und in zwei Isoformen, als TPH1 und TPH2, vorliegt (Cooper & Melcer 1961).

Das *TPH1*-Gen liegt auf Chromosom 11 auf dem Genlocus 11p15.3 - p14, erstreckt sich über 29 kb und enthält 11 Exons (Craig et al. 1991). *TPH1*-mRNA-Expression wurde überwiegend in peripherem Gewebe sowie in Pinealozyten nachgewiesen (Walther et al. 2003). *TPH2* ist auf Chromosom 12 auf dem Genlocus 12q21.1 lokalisiert (Walther et al. 2003). Es wird ausschließlich im Gehirn, nicht in peripherem Gewebe exprimiert (Walther & Bader 2003). *TPH2* stimmt zu 72% mit der Aminosäuresequenz von *TPH1* überein (Walther & Bader 2003).

In mehreren molekulargenetischen Studien konnten Einzelnukleotid-Polymorphismen (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) von *TPH1* und *TPH2* mit dem Auftreten einer ADHS in Zusammenhang gebracht werden (Walitza et al. 2005; Brookes et al. 2006; Li et al. 2006a; Park et al. 2013).

2 Forschungsstand

2.1 Zum Inhalt der Studie

In der Literatur findet man zum Zeitpunkt der Umsetzung des vorliegenden Projektes nur wenige Studien, die sich mit der peripheren Expression monoaminergener Kandidatengene bei psychiatrischen Erkrankungen befassen. Seitdem wurden einige ergänzende Untersuchungen publiziert. Gegenstand der Untersuchung waren psychiatrische Störungsbilder, die ätiologisch mit einer zentralen monoaminergen Dysfunktion in Verbindung gebracht werden, wie v.a. Ticstörungen, Schizophrenien und affektive Störungen.

So konnten Ferrari et al. (2008) bei einer Gruppe von 15 Patienten mit Tourette-Syndrom eine höhere Konzentration von *DRD5*-mRNA in peripheren Lymphozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachweisen. Zusätzlich korrelierte die Konzentration der untersuchten mRNA mit der Schwere der komorbiden zwanghaften Symptome. Weiterhin konnten Liao et al. (2010) eine positive Korrelation zwischen der Expression von *DRD2*-mRNA in peripherem Blut und dem Schweregrad einer Ticstörung bei medizierten Patienten aufzeigen.

Widersprüchliche Ergebnisse lieferten Studien zur mRNA-Expression bei Schizophrenien (Zvara et al. 2005; Liu et al. 2013). So wiesen Vogel et al. (2004) geringere Konzentrationen an *DRD3*-mRNA im Vollblut bei Patienten mit Schizophrenien oder bipolaren Störungen im Vergleich zu gesunden Kontrollen nach. In einer anderen Studie zeigten sich dagegen erhöhte Spiegel von *DRD3*-mRNA bei schizophrenen Patienten, jedoch fand diese Analyse an peripheren Blut-Lymphozyten statt (Ilani et al. 2001).

In einer Studie von Rocc et al. (2002) fand sich bei Patienten mit schwerer Depression ein verringerter *DRD4*-mRNA-Spiegel in peripheren mononukleären Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden, welcher nach achtwöchiger Behandlung mit Paroxetin jedoch auf die Werte der Kontrollgruppe anstieg.

In einer Studie von Frieling et al (2010) zeigte sich bei Patienten mit einer Essstörung eine verringerte *DRD2*-mRNA-Konzentration in peripherem Blut im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Die ebenfalls untersuchte *DRD4*-mRNA-Expression war nicht signifikant verändert.

Eine Untersuchung zur Expression von *DRD3*- und *DRD4*-mRNA in peripheren Blut-Lymphozyten bei Patienten mit Autismus ergab eine erhöhte Konzentration an *DRD4*-mRNA im Vergleich zu gesunden Probanden (Emanuele et al. 2010). Zum Zeitpunkt der Umsetzung des Projektes lagen noch keine Studien zur mRNA-Expression monoaminergener Kandidatengene in peripherem Gewebe bei ADHS vor. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich daher unter anderem mit der Frage, ob die mRNA-Expression von monoaminergen Kandidatengenen bei Patienten mit ADHS im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen im Vollblut verändert ist und ob die Expression durch Stimulanziengabe moduliert wird.

2.2 Zum methodischen Forschungsstand

Für mRNA-Expressionsanalysen hat sich die quantitative Real-time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität, ihrer schnellen, einfachen Handhabung sowie aufgrund des geringen Kontaminationsrisikos als Standard durchsetzen können (Vanguilder et al. 2008). Im Gegensatz zur konventionellen PCR erfolgt hier die Detektion des PCR-Produkts schon während der Amplifikation und nicht erst nach Abschluss der gesamten PCR. Für die Detektion der Amplifikate existieren zwei Ansätze: zum einen die Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen, die sich während der Amplifikation unspezifisch an doppelsträngige DNA anlagern, zum anderen der Einsatz von sequenzspezifischen fluorophormarkierten DNA-Strängen. Bei Letzteren handelt es sich um Oligonukleotide, welche spezifisch an eine Region innerhalb des Zielgens binden. Unabhängig vom verwendeten System emittiert die Probe innerhalb des PCR-Zyklus ein Fluoreszenz-Signal nur bei Anwesenheit der Zielsequenz. Die Intensität ist dabei proportional zur Menge des gebildeten amplifizierten Produktes (Heid et al. 1996; Mackay 2004; Espy et al. 2006). Mithilfe der Fluoreszenz-Signale wird die Quantifizierung durchgeführt. Für diese werden verschiedene Rechenmodelle herangezogen, wobei Referenz-Gene mit einer als relativ stabil geltenden Expression (sog. Haushalts-, englisch *Housekeeping*-Gene; z.B. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase [GAPDH], β -Actin, Tubulin) mitgemessen werden, um einen relativen Mengenvergleich durchzuführen (relative Quantifizierung).

Als fluoreszierender Farbstoff, der sich an DNA anlagert, wird in der Mehrheit der Fälle SYBR® Green, ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, verwendet, wohingegen sich bei den sequenzspezifischen fluorophormarkierten DNA-

Strängen die sogenannte TaqMan-Sonde durchgesetzt hat. Beide Verfahren werden in etwa in gleicher Häufigkeit in Laboren eingesetzt (Knutson et al. 2007). Die Verfahren liefern vergleichbare Ergebnisse, allerdings ist eine qRT-PCR mit SYBR® Green wesentlich kostengünstiger (Arikawa et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit kam ebenfalls SYBR® Green zum Einsatz.

2.3 Zusammenfassung

Die Datenlage bezüglich Expressionsanalysen monoaminerger Kandidatengene in peripherem Gewebe bei psychiatrischen Erkrankungen ist bisher noch spärlich. Auch wenn die vorliegenden Studien teilweise unterschiedliche Ergebnisse liefern, geben sie aufgrund der Dysregulationen in Surrogatgewebe Hinweise auf eine möglicherweise veränderte Expression monoaminerger Gene auf zentraler Ebene und können somit hilfreich bei der Aufklärung pathophysiologischer Zusammenhänge bei Störungsbildern wie der ADHS sein. Die genannten Studien sind sich in ihrem Ansatz ähnlich, sie unterscheiden sich jedoch teilweise bzgl. Phänotypisierungsverfahren, analysiertem Gewebe und mRNA-Quantifizierungsmethoden.

Für die ADHS lässt sich zum Zeitpunkt der Datenerhebung in der Literatur keine Studie zu Expressionsanalysen monoaminerger Kandidatengene finden.

2.4 Fragestellung

Aus dem bisherigen Forschungsstand lassen sich folgende Fragestellungen und Hypothesen ableiten:

Fragestellung 1: Lässt sich bei Kindern und Jugendlichen mit ADHS oder ASS eine modulierte mRNA-Expression monoaminerger Kandidatengene im Vollblut im Vergleich zu gesunden Kindern feststellen?

- Hypothese 1.1: Die mRNA-Expression von *TPH1* ist bei Kindern und Jugendlichen mit ADHS oder ASS im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verändert.
- Hypothese 1.2: Die mRNA-Expression von *DRD5* ist bei Kindern und Jugendlichen mit ADHS oder ASS im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verändert.

- -Hypothese 1.3: Die mRNA-Expression von *DRD4* ist bei Kindern und Jugendlichen mit ADHS oder ASS im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verändert.

Fragestellung 2: Wird die mRNA-Expression von *DRD4*, *DRD5* und *TPH1* im Vollblut von Kindern und Jugendlichen mit ADHS durch Stimulanziengabe moduliert?

- Hypothese 2: Die Einnahme von Stimulanzien bei Patienten mit ADHS bewirkt eine Modulation der mRNA-Expression der o.g. Kandidatengene in Vollblut.

3 Methode

3.1 Erhebung der Stichproben

3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

3.1.1.1 Patienten

Für die Studie wurden Patienten mit ADHS oder/und ASS eingeschlossen, die an der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Würzburg rekrutiert wurden.

Einschlusskriterien:

- Alter 6 bis 18 Jahre
- Diagnose einer ADHS bzw. einer autistischen Störung nach ICD-10-Kriterien

Ausschlusskriterien:

- schwere neurologische oder körperliche Erkrankung
- IQ-Wert unter 70
- Konsum illegaler Drogen

3.1.1.2 Gesunde Kontrollgruppe

Für die Kontrollgruppe wurden gesunde Kinder und Jugendliche rekrutiert. Durch ein kurzes telefonisches Interview mit einem Elternteil wurde im Vorfeld das Vorliegen bekannter psychischer sowie körperlicher Vorerkrankungen und Medikamenteneinnahme ausgeschlossen.

Einschlusskriterien:

- Alter 6 bis 18 Jahre
- unauffällige Werte bei spezifischen Fragebögen zur Diagnose einer ADHS und weiterer psychischer Erkrankungen (s. Punkt 3.1.2.3)

Ausschlusskriterien:

- (V.a.) psychische oder schwere körperliche Erkrankung
- IQ-Wert unter 70
- Konsum illegaler Drogen
- Psychopharmakaeinnahme

3.1.2 Diagnosestellung

3.1.2.1 Diagnostik einer ADHS

Die Diagnosevergabe für ADHS erfolgte durch erfahrene Kinder- und Jugendpsychiater der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universitätsklinik Würzburg gemäß der Kriterien der ICD-10. Die Diagnose wurde durch den Fremdbeurteilungsbogen für ADHS (FBB-ADHS, s. Punkt 3.1.3.1) bestätigt, der von den Eltern ausgefüllt wurde. Dieser Bogen stammt aus dem Diagnostik-System für psychische Störungen im Kindes- und Jugendalter (Döpfner et al. 2008). Zur Erfassung weiterer psychischer Auffälligkeiten bzw. somatischer Beschwerden kamen die „*Child Behavior Checklist*“ (Achenbach & Rescorla 2001, CBCL/4-18, s. Punkt 3.1.3.2) sowie das „*Depressionsinventar für Kinder und Jugendliche*“ (Stiensmeier-Pelster et al. 2000, DIKJ) zum Einsatz, das unter Punkt 3.1.3.3 erläutert wird. Außerdem kam zur Intelligenzdiagnostik der „*Kulturell faire Intelligenztest/ Cultural Faire Intelligence Test*“ (CFT-1 oder CFT-20) von Cattell und Weiß (Cattell et al. 1997; Weiß 1998, s. Punkt 3.1.3.6) zum Einsatz.

3.1.2.2 Diagnostik einer ASS

Die Diagnosevergabe einer autistischen Störung erfolgte ebenfalls durch o.g. erfahrene Kinder- und Jugendpsychiater. Im Rahmen der Diagnostik bzw. zusätzlich kamen Autismus-spezifische Verfahren (ADI-R, ADOS) zur Erfassung und Differenzialdiagnostik von Störungen des autistischen Spektrums zum Einsatz, die die Diagnose bestätigten (Ruehl et al. 2004; Boelte et al. 2006), s. Punkte 3.1.3.4 und 3.1.3.5. In dieser Gruppe kam ebenfalls die CBCL/4-18 (Achenbach & Rescorla 2001, s. Punkt 3.1.3.2) zum Einsatz. Zur Intelligenztestung wurde, je nach klinischer Notwendigkeit, einer der unter Punkt 3.1.3.6 genannten Intelligenztests verwendet.

3.1.2.3 Charakterisierung der gesunden Kontrollgruppe

In dieser Gruppe kamen zur Erfassung psychischer Auffälligkeiten beziehungsweise somatischer Beschwerden ebenfalls die CBCL/4-18 (Achenbach & Rescorla 2001, s. Punkt 3.1.3.2) sowie das DIKJ (Stiensmeier-Pelster et al. 2000, s. Punkt 3.1.3.3) zum Einsatz. Zum Aufdecken einer vielleicht bisher nicht diagnostizierten ADHS-Symptomatik wurde der FBB-ADHS eingesetzt (Döpfner et al. 2008, s. Punkt 3.1.3.1). Zusätzlich wurde der CFT-1 oder CFT-20 (Cattell et al. 1997; Weiß 1998, s. Punkt 3.1.3.6) zur Intelligenzmessung verwendet.

3.1.3 Testpsychologische Verfahren

3.1.3.1 Fremdbeurteilungsbogen-ADHS (FBB-ADHS) für Eltern und Erziehungsberechtigte

Der FBB-ADHS dient der Beurteilung der Diagnosekriterien für Hyperkinetische Störungen nach ICD-10 und für Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörungen nach DSM-IV. Es werden Fragen (= Items) bezüglich der drei Hauptmerkmale Aufmerksamkeit, Hyperaktivität und Impulsivität gestellt. Die Items werden in einer Skala von 0 bis 3 beantwortet, wobei für 0 (= gar nicht) und 1 (= ein wenig) ein Symptomkriterium als nicht erfüllt gilt, bei 2 (= weitgehend) und 3 (= besonders) hingegen schon. Die Auswertung der Tests erfolgt durch Summierung der Ausprägungen auf den entsprechenden Items dividiert durch die Anzahl der Beurteilungen (Döpfner et al. 2008). Kinder mit ADHS wurden in die Studie eingeschlossen, wenn im FBB-ADHS-Gesamtwert ein Prozentrang von ≥ 90 erreicht wurde.

3.1.3.2 Child Behavior Checklist (CBCL/4-18)

Dieser Test beurteilt psychosoziale Kompetenzen, Verhaltensauffälligkeiten, emotionale Auffälligkeiten sowie somatische Beschwerden bei Kindern und wird in internalisierende, externalisierende und gemischte Auffälligkeiten unterteilt. Als klinisch auffällig werden Ausprägungen mit einem T-Wert über 60 eingeschätzt (Achenbach & Rescorla 2001).

3.1.3.3 Depressionsinventar für Kinder und Jugendliche (DIKJ)

Das DIKJ ist ein Selbsteinschätzungsfragebogen zur Ermittlung der Disposition für eine depressive Störung. Jedes der 26 Items des DIKJ verlangt vom Probanden eine Entscheidung zwischen drei vorgegebenen Antwortalternativen, die unterschiedliche Ausprägungen eines Symptomzustands kennzeichnen. Ein T-Wert von größer als 60 wird als Hinweis für eine depressive Symptomatik gewertet (Stiensmeier-Pelster et al. 2000).

3.1.3.4 Diagnostisches Interview für Autismus - Revidiert (ADI-R)

Das ADI-R ist ein standardisiertes Befragungsinstrument zur Erfassung und Differenzialdiagnostik von Störungen des autistischen Spektrums. Es beinhaltet 93 Items zur frühkindlichen Entwicklung, zu Spracherwerb und möglichem Verlust von sprachlichen Fertigkeiten, verbalen und non-verbalen kommunikativen Fähigkeiten, Spiel- und sozialem Interaktionsverhalten, stereotypen Interessen und Aktivitäten sowie komorbiden Symptomen (Aggression, Selbstverletzung, Epilepsie). Die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse erfolgt in einem empirisch generierten diagnostischen Algorithmus über die Verrechnung von 42 Items zu den vier Bereichssummenwerten: Soziale Interaktion (Cut-off > 10), Verbale/ nonverbale Kommunikation (Cut-off > 8 (verbale)/ 7 (nonverbale Kinder), Stereotype Verhaltensweisen (Cut-off > 3), Abnorme Entwicklung (Cut-off > 1) (Boelte et al. 2006).

3.1.3.5 Diagnostische Beobachtungsskala für Autistische Störungen (ADOS)

Die Diagnostische Beobachtungsskala für Autistische Störungen (ADOS) ist eine strukturierte Ratingskala zur Abklärung und Klassifikation von qualitativen Auffälligkeiten der sozialen Interaktion und reziproken Kommunikation im Sinne des Autismus. In Abhängigkeit von Alter und Sprachniveau des jeweiligen Patienten wird eine von vier Untersuchungsstrategien (Modulen) gewählt, um anhand von gezielt inszenierten spielerischen Elementen, Aktivitäten und Gesprächen für die Diagnose des Autismus relevante Sachverhalte und Symptome prüfen zu können (Ruehl et al. 2004). Die Cut-Off-Werte variieren dabei für die Bereiche Kommunikation und soziale Interaktion, s. Tabelle 1.

Tabelle 1: Cut-off-Werte für ADOS-Module

	Modul 1	Modul 2	Modul 3	Modul 4
Kommunikation	4; 2	5; 3	3; 2	3; 2
Soziale Interaktion	7; 4	6; 4	6; 4	7; 4
Summe aus Kommunikation und sozialer Interaktion	12; 7	12; 8	10; 7	12; 7

ADOS: Diagnostische Beobachtungsskala für Autistische Störungen
X; Y: Autismus-Cut-off-Werte; ASS-Cut-off-Werte

3.1.3.6 Intelligenz- und Leistungsdiagnostik

Zur Erfassung der Allgemeinbegabung wurden je nach individueller klinischer Notwendigkeit der „Kulturell faire Intelligenztest/ *Cultural Faire Intelligence Test*“ (CFT-1 oder CFT-20) von Cattell und Weiß (Cattell et al. 1997; Weiß 1998), der „Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Kinder IV“ (HAWIK-IV) (Petermann & Petermann 2008) oder die deutsche Version der „*Kaufman Assessment Battery for Children*“ (K-ABC) (Melchers & Preuß 2009) angewendet.

3.2 Verfahren zur Datenerhebung

3.2.1 Kontaktaufnahme und Aufklärung

Vor Durchführung der Studie wurde sie durch die lokale Ethikkommission geprüft und für zulässig befunden (Ethikantragsnummern 8/06 und 227/09).

Für die Untersuchung wurden Patienten der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Würzburg rekrutiert.

Für die gesunde Kontrollgruppe wurden Kinder und deren Erziehungsberechtigte mittels Flyer, durch persönliches Vorsprechen an Schulen, in Vereinen sowie mittels Annoncen in der Zeitung und auf der Website der Universität Würzburg rekrutiert. Die Kinder und Sorgeberechtigten wurden über die Existenz und den Hintergrund der Studie informiert.

In der Patientengruppe erfolgte die Kontaktaufnahme über oben genannte Einrichtung in dieser selbst oder telefonisch. In einem ersten Gespräch wurden ebenfalls Informationen über das Vorhaben der Studie vermittelt.

Bei Interesse an einer Studienteilnahme wurden die Patienten bzw. die Kontrollkinder und deren Erziehungsberechtigte im Vorfeld über den Inhalt, die Fragestellung sowie den Ablauf der Untersuchung detailliert mündlich und schriftlich aufgeklärt. Es wurde nachhaltig über die Freiwilligkeit der Studienteilnahme und über die Möglichkeit des Studienabbruchs zu jedwedem Zeitpunkt der Studie hingewiesen. Das Einverständnis zur Studienteilnahme wurde in schriftlicher Form eingeholt.

3.2.2 Expressionsanalysen

Es wurde mRNA aus zuvor gewonnenem Vollblut aufgereinigt und isoliert. Anschließend wurde die isolierte mRNA in komplementäre cDNA umgeschrieben, um schließlich die Expression der Zielgene in Relation zu den Referenzgenen mittels qRT-PCR zu ermitteln. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte erläutert.

3.2.2.1 mRNA-Gewinnung und -Isolierung

Für die Expressionsanalysen wurde bei den Patienten sowie bei den Kontrollkindern je zwei Proben von jeweils 2,5 ml Nüchternblut gewonnen. Das Blut wurde in PAXgene® Blood RNA Tubes (PreAnalytiX, Hombrechtikon, CH) gemäß den Angaben des Herstellers gesammelt. Zur Isolierung und Aufreinigung der mRNA aus den Zellen durch Entfernung von genomischer DNA und kleinen RNA-Molekülen (rRNA, tRNA) sowie von Proteinen und Lösungsmittelresten aus der Probe wurde das PAXgene™ Blood RNA Kit 50 (PreAnalytiX, Hombrechtikon, CH) benutzt. Die Arbeitsschritte wurden exakt durchgeführt wie in der Anleitung des PAXgene™ Blood RNA Kit Handbuchs 04/2008 beschrieben (Preanalytix 2008). Nach der Isolierung wurde die RNA photometrisch in TRIS Puffer vermessen und die Gesamt-RNA in der Probe bestimmt (Experion, Bio-Rad Labs, Hercules, CA, USA). Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Reinheit der Probe gewährleistet war. Anschließend wurden die Proben bei -20°C bis zu ihrer Weiterverarbeitung gelagert.

3.2.2.2 Reverse Transkription

cDNA wird mittels reverser Transkription (RT) aus mRNA gewonnen. Dabei wird die Sequenzabfolge der mRNA als Vorlage genutzt. Das Enzym Reverse Transkriptase schreibt diese in die komplementäre DNA um. Durch die Tatsache, dass mRNA-Moleküle am 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz besitzen, kann ein Oligo-dT-Primer als Startpunkt für die cDNA-Synthese verwendet werden. Für die Synthese können aber auch so genannte „Random Hexamer Primer“ eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich um eine Mischung einzelsträngiger Nukleotidsequenzen aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden. Sie lagern sich den RNA-Strängen komplementär an und bilden die doppelsträngigen Startpunkte der reversen Transkriptase. Das Enzym reverse Transkriptase, auch als RNA-abhängige DNA-Polymerase bezeichnet, bildet nun einen zur mRNA komplementären DNA-Strang. Danach wird der mRNA-Strang mit dem Enzym RNase H abgebaut. In der weiteren Prozessierung wird nun mittels einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase (über einen Primer) der komplementäre DNA-Strang zum schon bestehenden cDNA-Einzelstrang synthetisiert.

Die cDNA wurde mit Hilfe von iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Labs, Hercules, CA, USA) aus der isolierten mRNA hergestellt (Bio-Rad Laboratories 2006).

3.2.2.3 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

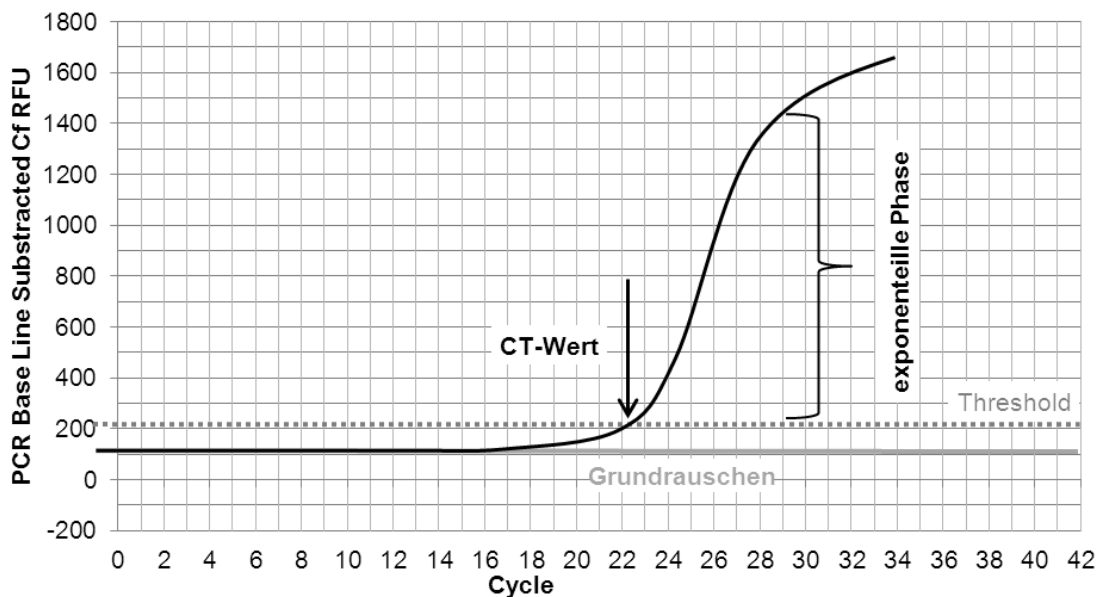
Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine von Dr. Kary Banks Mullis und Michael Smith schon 1983 entwickelte Methode zur Vervielfältigung von Nucleinsäuren. Die PCR verläuft in Zyklen. Jeder Zyklus ist wiederum in drei Schritte unterteilt. Im ersten Schritt findet die Denaturierung statt. Bei 95°C ist die DNA aufgeschmolzen und liegt als Einzelstrang vor. Im zweiten Schritt, der Primer-Hybridisierung, binden bei etwa 55°C die spezifischen Primer an die DNA-Einzelstränge. Die Elongation, der dritte Schritt, erfolgt bei etwa 72°C. Hierbei bildet die DNA-Polymerase, beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers, aus freien Nucleotiden einen komplementären DNA-Strang.

Russell G. Higuchi verfeinerte dieses Verfahren und veröffentlichte 1993 „Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions“ (Higuchi et al. 1993), wodurch er als Erfinder der Real-time-PCR angesehen

wird. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem amplifizierte DNA-Sequenzen während des Prozesses der PCR gemessen werden.

Durch den Einsatz von unspezifischen, DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die qRT-PCR eine relative DNA-Quantifizierung. In der vorliegenden Arbeit wurde dafür der Farbstoff SYBR® Green verwendet, der sich mit hoher Spezifität an doppelsträngige DNA anlagert. Dabei erhöht sich die Fluoreszenz nach Anregung mittels ultravioletten Lichts um das 1000-fache im Vergleich zu nicht an DNA angelagertem Farbstoff. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, daher zeigt die Fluoreszenzkurve einen exponentiellen Verlauf. Der Zyklus, bei dem sich die Fluoreszenz signifikant von der Hintergrundfluoreszenz („Grundrauschen“) abhebt, wird Schwellenwertzyklus genannt („*threshold cycle*“, C_T ; s. Abbildung 2).

Abbildung 2: Ermittlung des Ct-Wertes (*threshold cycle*, Schwellenwertzyklus)



Als Ct-Wert wird der Zyklus bezeichnet, bei dem die Zunahme der Fluoreszenz das Hintergrundrauschen übersteigt, bei dem der sog. Schwellenwert („*Threshold*“) überschritten wird.

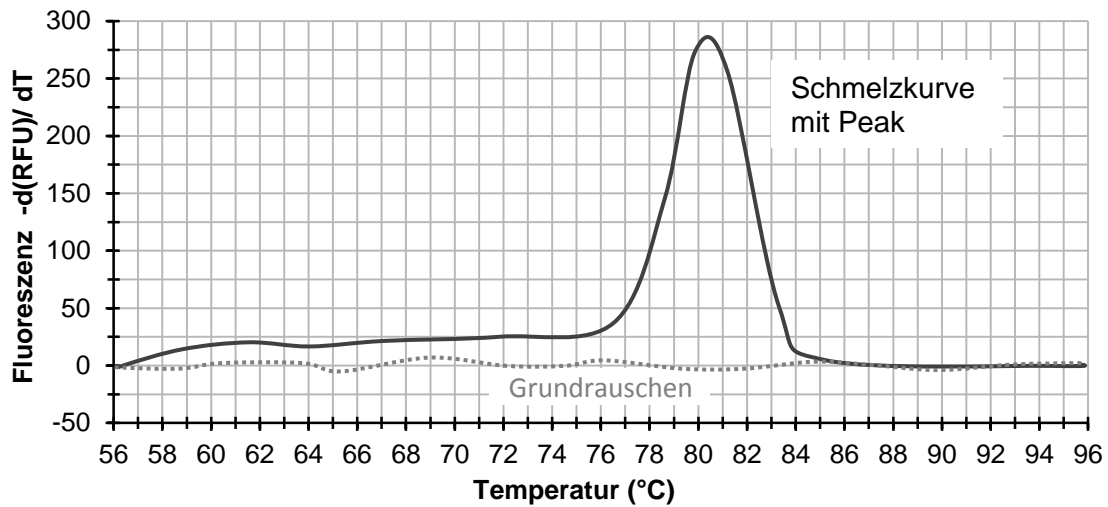
Da es sich um eine relative und keine absolute Quantifizierung handelt, wird das Erreichen dieses Schwellenwertes mit dem Schwellenwert einer Standardreihe verglichen. Die Standardreihe ergibt sich aus der Fluoreszenzkurve eines Referenzgens oder eines Referenzindex aus mehreren Referenzgenen. Ein solches Referenzgen, auch Haushaltsgen (engl.:

housekeeping gene) genannt, ist ein konstitutiv exprimiertes, nicht reguliertes Gen, welches möglichst unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und von äußeren Einflüssen exprimiert wird (Vandesompele et al. 2002).

Die relative Quantifizierung ist deswegen sinnvoll, da die Proben aufgrund verschiedener Leukozytenzahlen in den entnommenen Vollblutproben unterschiedliche Konzentrationen von mRNA enthalten. Dieser Einflussfaktor kann eliminiert werden, indem durch Differenzbildung der Ct-Werte nur die relative Menge von mRNA in Bezug auf die mRNA des Referenzgens/-index betrachtet wird.

Am Ende eines jeden PCR-Laufs wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, indem die Temperatur stufenweise erhöht wird. Sie dient der Schmelzpunktgewinnung, das heißt der Gewinnung des Temperaturpunktes, bei dem die Doppelstrang-DNA denaturiert und damit in Einzelsträngen vorliegt. Wie oben erwähnt interkaliert SYBR® Green nur mit Doppelstrang-DNA. Die Emission an Fluoreszenz steigt somit exponentiell bei jedem PCR-Zyklus, da sich stets neue Doppelstrang-DNA bildet, an die sich der Farbstoff anlagert. Spaltet sich also die Doppelstrang-DNA bei einer für das amplifizierte Fragment spezifischen Schmelztemperatur auf, fällt augenblicklich die Fluoreszenzemission ab (siehe Abbildung 3). Passiert dies aber bei verschiedenen Temperaturpunkten, liegen mehrere Amplifikationsprodukte und damit auch mehrere Schmelztemperaturen vor, was einer Kontamination bzw. Nebenprodukten und Primer-Dimeren entsprechen kann. Diese Schmelzkurvenanalyse ist eine weitere Kontrolle dafür, dass die gewählten Primer spezifisch sind und die Probe nicht kontaminiert ist.

Abbildung 3: Darstellung einer Schmelzkurve



Die Temperatur ist auf der x-Achse gegenüber der relativen Fluoreszenzabnahme auf der y-Achse aufgetragen. Bei der Temperatur, bei der die Fluoreszenz den stärksten Abfall hat, entsteht ein deutlicher "Peak".

Die qRT-PCR wurde mit dem BIORAD CFX 384 RT-System (C1000 Thermal-Cycler; BioRad Co.) für die Kandidatengene (*DRD4*, *DRD5* und *TPH1*) sowie für die sechs Referenzgene (*β -Actin*, *ACTB*; *Ribosomales Protein L13a*, *RPL13a*; *δ -Aminolävulinsäuresynthase 1*, *ALAS*; *18S Ribosomale RNA*, *R18S*; *Peptidylprolylisomerase A*, *PPIA*; *Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase*, *GAPDH*) jeweils als Duplikat durchgeführt. Es wurden der in Tabelle 2 dargestellte Reaktionsansatz und das in Tabelle 3 dargestellte Reaktionsprotokoll für die qRT-PCR benutzt. Die relative Quantifizierung wurde mithilfe der BioRad CFX Manager 2.0 Software durchgeführt, die die komparative CT-Methode verwendet.

Tabelle 2: Reaktionsansatz für qRT-PCR

Reagenz	Volumen
Fast SYBR® Green Master Mix	5,00 µl
Primer	1,00 µl
cDNA	1,00 µl
Destilliertes Wasser	3,00 µl
Endvolumen	10,00 µl

Tabelle 3: Reaktionsprotokoll für qRT-PCR

	Vorgang	Temperatur	Dauer des Zyklus	Anzahl der Zyklen
1.	Enzymaktivierung	95 °C	5 min	1x
2.	Denaturierung	95 °C	10 s	39x
	Primerhybridisierung	60°C	30 s	
	Elongation	72 °C	30 s	
3.	Schmelzkurvenanalyse	70 – 95 °C Temperaturerhöhung in 0,5°C Schritten	15 s	50x
4.	Abkühlung	15 °C	∞	1x

Alle Primer wurden von Quiagen N.V. (QuantiTec Primer Assays, Niederlande) designed und hergestellt. Die Identifikation der Primer anhand ihrer Bestellnummern ist Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: Untersuchte Kandidaten- und Haushaltsgene und ihre Bestellnummern

Kandidatengene	Bestellnummer (Quiagen)
<i>DRD4</i>	QT 00204316
<i>DRD5</i>	QT 00217651
<i>TPH1</i>	QT 00045346
Haushaltsgene	
<i>ACTB</i>	QT 01680476
<i>RPL13a</i>	QT 00089915
<i>ALAS</i>	QT 00073122
<i>R18s</i>	QT 00199367
<i>PPIA</i>	QT 01866137
<i>GAPDH</i>	QT 01192646

3.2.3 Relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens zu der Expression einer endogenen Kontrolle in Relation gesetzt. Man nennt diesen Vorgang auch Normalisierung der Expressionsergebnisse. Dadurch, dass Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der qRT-PCR innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Haushaltsgen betreffen, kann die Varianz der Expressionsergebnisse vermindert werden. In den Berechnungen des Expressionsunterschiedes heben sich diese individuellen Probeneffekte dann wieder auf (Pfaffl 2004). Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den Patientenproben wird auf Probenmaterial der Kontrollgruppe bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) erfolgt über die sogenannte „delta-delta CT Methode“ ($\Delta\Delta\text{CT}$). Dabei wird zuerst für jede untersuchte Probe der C_T -Wert des Referenzgens vom C_T -Wert des Zielgens abgezogen, wobei als Ergebnis der ΔC_T -Wert erscheint. Nach dieser Normalisierung wird vom ΔC_T -Wert der Patientengruppe der ΔC_T -Wert der Kontrollgruppe subtrahiert. Dadurch entsteht das „delta-delta CT“-Berechnungsmodell. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Patientengruppe und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen

und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der **arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$** (Livak & Schmittgen 2001; Pfaffl 2006).

C_t	=	threshold-cycle (Schwellenwertzyklus)
ΔC_t	=	C_t -Zielgen – C_t -Referenzgen
$\Delta\Delta C_t$	=	ΔC_t -Patienten – ΔC_t -Kontrolle
Ratio	=	$2^{-\Delta\Delta C_t}$

3.3 Geräte und Materialien

Folgende Geräte und Materialien wurden verwendet:

Tabelle 5: Verwendete Geräte und Materialien

Blutabnahme	Hersteller
<ul style="list-style-type: none"> • Kanüle: 	
<ul style="list-style-type: none"> <ul style="list-style-type: none"> ○ Safety-Multifly®-Set 	SARSTEDT, Nümbrecht
<ul style="list-style-type: none"> • Adapter: 	
<ul style="list-style-type: none"> <ul style="list-style-type: none"> ○ BD Vacutainer™ multiple sample luer adapter 	BECTON, DICKINSON COMPANY, Franklin Lakes, USA
<ul style="list-style-type: none"> <ul style="list-style-type: none"> ○ BD Vacutainer® One Use Holder 	BECTON, DICKINSON COMPANY, Franklin Lakes, USA
<ul style="list-style-type: none"> <ul style="list-style-type: none"> ○ Membran-Adapter 	SARSTEDT, Nümbrecht
<ul style="list-style-type: none"> • Reaktionsgefäße zur Isolation und Aufreinigung von mRNA 	
<ul style="list-style-type: none"> <ul style="list-style-type: none"> ○ PAXgene Blood RNA Tubes 	PREANALYTIX, Hombrechtikon, CH
Kühlschrank:	
Model 983 -86 ULT Double Door Freezer	FORMA SCIENTIFIC INC., Marietta, USA
Nofrost -20	SIEMENS, München
Zentrifugen:	
ROTANTA 460R	HETTICH, Tuttlingen
MIKRO 200 R	HETTICH, Tuttlingen
Zentrifuge 5430	EPPENDORF, Hamburg

Pipettenzubehör:	
Pipetten	EPPENDORF, Hamburg
Pipettenspitzen	EPPENDORF, Hamburg
Biosphere® Filterspitzen 10-100µl	SARSTEDT, Nümbrecht
Schüttelgerät:	
Vortex Genius 2	VWR INTERNATIONAL, Darmstadt
Schüttelinkubator:	
Thermomixer comfort	EPPENDORF, Hamburg
Spektrophotometer:	
NanoDrop ND-1000	PEQLAB, Erlangen
REAL-TIME PCR:	
BIORAD CFX384 Real-Time PCR Detection System, C1000 Thermal-Cycler	BIO-RAD Labs, Hercules, CA, USA
BioRad CFX Manager 2.0 software	BIO-RAD Labs, Hercules, CA, USA
PCR:	
Thermocycler	BIOMETRA, Göttingen
Hard-Shell® 384-Well PCR Plates	BIO-RAD Labs, Hercules, CA, USA
Microseal B Adhesive Sealer MSB-1001 (PCR-Foil)	BIO-RAD Labs, Hercules, CA, USA
Kommerzielle Kits und Reagenzien:	
Fast SYBR® Green Master Mix	Applied Biosystems, Germany GMBH
iScript cDNA Synthesis Kit	BIO-RAD Labs, Hercules, CA, USA
TRIS-Puffer	AppliChem, Darmstadt
Destilliertes Wasser	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol absolute	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.4 Statistische Auswertung

Das Programm SPSS 18.0.0 (SPSS Inc., USA) kam zur statistischen Analyse der Daten zur Anwendung. Gruppenunterschiede der einzelnen

Kandidatengene wurden mittels Varianzanalysen (ANOVA) mit den Zwischensubjektfaktoren „Gruppe“ (ADHS, ASS, Kontrollkinder) und mithilfe Bonferroni-korrigierter Post-hoc-Tests ausgewertet. Die Kovarianzanalyse (ANCOVA) wurde eingesetzt, um bezüglich möglicher konfundierender Effekte der Kovariablen Alter, Geschlecht, IQ und Medikationszustand (Blutprobe unter Medikation oder nicht) zu kontrollieren. Ein zweiseitiger t-Test für gebundene Stichproben diente dazu, Unterschiede in der mRNA-Expression in der Subgruppe der Patienten mit ADHS mit zwei Messzeitpunkten (mit und ohne Medikation) zu untersuchen.

4 Ergebnisse

4.1 Merkmale der Stichproben

An der Studie waren insgesamt 51 Kinder mit einer ADHS, 26 Kinder mit einer ASS und 39 gesunde Kontrollkinder beteiligt. Zur Alters- und Geschlechterverteilung, dem kognitiven Leistungsstand sowie Medikationsstatus siehe Tabelle 6. Dieser Tabelle ist auch zu entnehmen, wie die Gruppen charakterisiert bzw. phänotypisiert wurden. Von den autistischen Kindern und Jugendlichen wiesen 19 (73%) eine komorbide ADHS auf. Bezüglich des Alters unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant voneinander, jedoch hinsichtlich des Geschlechterverhältnisses. Zudem fiel bei den Patientengruppen ein signifikant niedrigerer Durchschnitts-IQ-Wert im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe auf (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Demographische Angaben zu den Stichproben

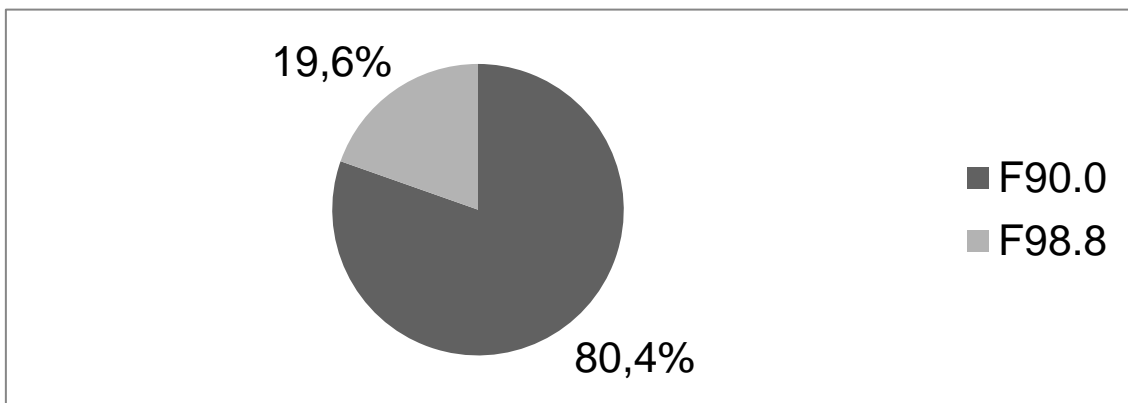
	ADHS	ASS	Kontrollen	Gruppenvergleich
Stichprobengröße (n)	51	26	39	-
männlich (n; %)	37 (73%)	23 (89%)	20 (51%)	$\chi^2=13$; $df=2$; $p=0,002$
komorbide ADHS (n; %)	-	19 (73%)	-	-
Alter (Jahre)	11,9 ± 2,1	11,0 ± 3,4	12,8 ± 2,7	$F=2$; $df=2,113$; $p=0,145$
IQ	104 ± 13	96 ± 15	113 ± 12	$F=13$; $df=2,110$; $p<0,001$
mit Medikation (n; %)	30 (+/-) (59%)	19 (73%)	-	-
Diagnostik	FBB-ADHS, CBCL, DIKJ	ADI-R, ADOS	CBCL, FBB-ADHS, DIKJ	-

ADHS: Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung; **ADI-R:** Diagnostisches Interview für Autismus - Revidiert; **ADOS:** Diagnostische Beobachtungsskala für Autistische Störungen; **ASS:** Autismusspektrumstörung; **CBCL/4-18:** *Child Behavior Check List*; **FBB-ADHS:** Fremdbeurteilungsfragebogen ADHS für Eltern/ Erziehungsberechtigte; **DIKJ:** Depressionsinventar für Kinder und Jugendliche

4.1.1 Merkmale der Patienten mit ADHS

Bei dem Großteil der Patienten mit Aufmerksamkeitsstörung lag die Diagnose einer Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung nach ICD-10 F 90.0, also eine ADHS vom Mischtypus vor (s. Abbildung 4). Bei 19,6% wurde die Diagnose einer isolierten Aufmerksamkeitsstörung bzw. Aufmerksamkeitsstörung ohne Hyperaktivität nach ICD-10 F 98.8 vergeben.

Abbildung 4: Verteilung der ADHS-Subtypen nach ICD-10-Diagnoseschlüsseln



F90.0: einfache Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung; F98.8: Aufmerksamkeitsstörung ohne Hyperaktivität

Bei 22 (43,1%) Kindern lag eine oder mehrere Komorbiditäten vor, am häufigsten wurde dabei eine komorbide Störung des Sozialverhaltens oder eine Ausscheidungsstörung beobachtet. In Tabelle 7 sind Komorbiditäten im Detail nach ICD-10-Schlüssel aufgeführt. Bei 27 (52,1%) Kindern und Jugendlichen wurde neben der ADHS keine komorbide Störung diagnostiziert. Zu den Komorbiditäten von zwei (3,9%) Patienten lagen keine detaillierteren Angaben vor.

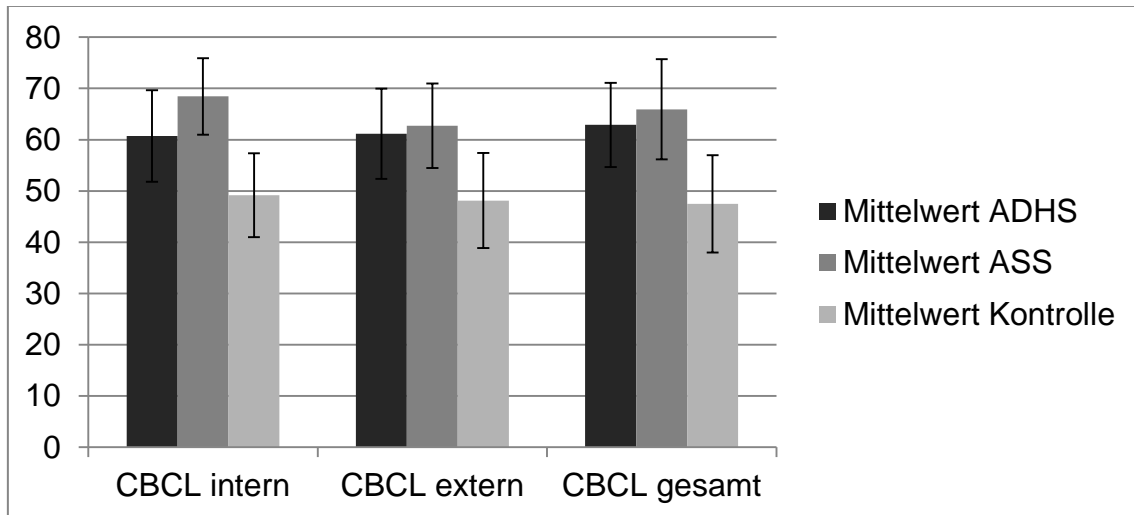
Tabelle 7: Art und Häufigkeit von Komorbiditäten in der ADHS-Gruppe

ICD-10	Komorbidität	Häufigkeit (n)
F32	Depressive Episode	1
F40.2	Spezifische Phobie	1
F 43.2	Anpassungsstörung	7
F91	Störung des Sozialverhaltens	16
F93.0	Emotionale Störung mit Trennungsangst des Kindesalters	2
F95	Ticstörung	3
F98.0/F98.1	Ausscheidungsstörung (Enuresis, Enkopresis)	13

ADHS: Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung

Die Auswertung der CBCL ergibt in den beiden Patientengruppen (ADHS und ASS) im Mittel auffällige T-Werte im CBCL-gesamt und bzgl. externalisierender und internalisierender Symptomatik (s. Abbildung 5). Die Patienten mit ADHS sind im Mittel weniger stark betroffen im Vergleich zu den autistischen Kindern und Jugendlichen, besonders bzgl. internalisierender Auffälligkeiten.

Abbildung 5: T-Wert-Mittelwerte und -Standardabweichungen der CBCL/4-18 (internalisierend, externalisierend, gesamt) für die Gruppe der Patienten mit ADHS, mit ASS und die gesunde Kontrollgruppe



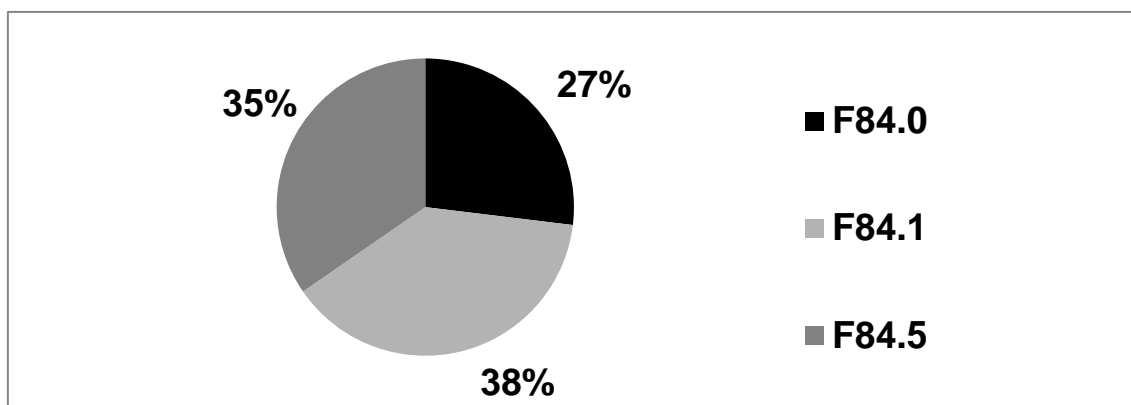
ADHS: Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung; **ASS:** Autismusspektrumstörung; **CBCL:** Child Behavior Checklist

Die Erfassung einer möglichen depressiven Symptomatik anhand des DIKJ ergab in der Stichprobe der Patienten mit ADHS einen mittleren T-Wert von 49,1 (SD: 8,0) im Gegensatz zu 43,4 (SD: 7,4) in der gesunden Kontrollgruppe. In diesen beiden Stichproben, in denen das DIKJ durchgeführt wurde, zeigte sich demnach im Mittel keine relevante depressive Symptomatik.

4.1.2 Merkmale der Patienten mit ASS

In der Gruppe von Kindern und Jugendlichen mit ASS waren die ICD-10 Diagnosen „frühkindlicher Autismus“, „Asperger-Syndrom“ und „atypischer Autismus“ in etwa gleich häufig vertreten (s. Abbildung 6).

Abbildung 6: Verteilung der Diagnosen aus dem Autismusspektrum nach ICD-10-Schlüsseln



F84.0: Frühkindlicher Autismus; **F84.1:** Atypischer Autismus; **F84.5:** Asperger-Syndrom

Die autistische Symptomatik im Alter von ca. fünf Jahren, ermittelt im Interview mit den Eltern anhand des ADI-R, ist in Tabelle 8 aufgeführt. Für die jeweilige Subskala sind der Mittelwert, die Standardabweichung und der Cut-off angegeben.

Tabelle 8: Auswertung des ADI-R

Interviewbereiche	Mittelwert \pm SD	Cut-off
ADI_A: Soziale Interaktion	15,76 \pm 4,989	10
ADI_B: Kommunikation	11,48 \pm 3,790	8/7
ADI_C: Stereotype Verhaltensweisen	4,62 \pm 3,041	3
ADI_D: Abnorme Entwicklung	2,57 \pm 0,978	1

ADI-R: Diagnostisches Interview für Autismus - Revidiert; **SD:** Standardabweichung

In Tabelle 9 ist die autistische Symptomatik in der standardisierten Verhaltensbeobachtung, erhoben anhand der ADOS, aufgeführt. Da unterschiedliche ADOS-Module Verwendung fanden, werden relative Werte für die Kategorie „Summe Kommunikation und soziale Interaktion“ (individueller Wert/ maximaler Wert von „Summe Kommunikation und soziale Interaktion“ des jeweils verwendeten Moduls) zusammen mit der Standardabweichung aufgeführt.

Tabelle 9: Auswertung der ADOS

	Mittelwert	SD
Relative Summe „Kommunikation und soziale Interaktion“	0,55	0,21

ADOS: Diagnostische Beobachtungsskala für Autistische Störungen; **SD:** Standardabweichung

Bei 22 von 26 (85%) Kindern und Jugendlichen mit ASS lagen eine oder mehrere Komorbidität(en) vor, wovon die ADHS mit Abstand die häufigste Begleitstörung darstellte (73%). In Tabelle 10 sind Komorbiditäten im Detail nach ICD-10-Schlüssel aufgeführt.

Tabelle 10: Art und Häufigkeit von Komorbiditäten in der ASS-Gruppe

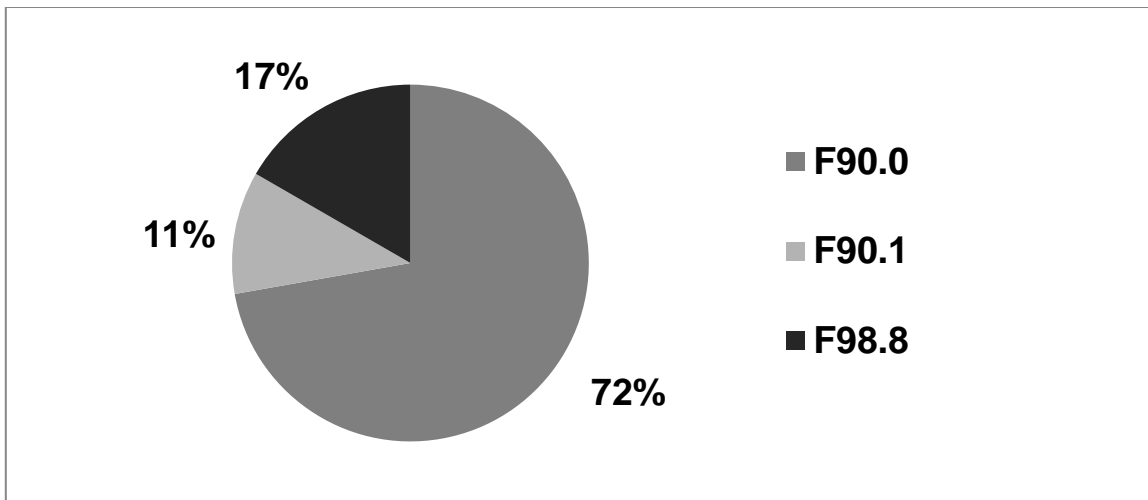
ICD-10	Komorbidität	Häufigkeit (n)
F40.2	Spezifische Phobie	1
F 42	Zwangsstörung	2
F43.2	Anpassungsstörung	1
F45.2	Dysmorphophobie	1
F81/82/83	Umschriebene Entwicklungsstörungen	7
F90.0/ F90.1/ F98.8	Hyperkinetische Störungen/ Aufmerksamkeitsstörung	19
F93.3	Emotionale Störung mit Geschwisterrivalität	1
F95	Ticstörung	1
F98.0/F98.1	Ausscheidungsstörung (Enuresis, Enkopresis)	2
F98.5	Stottern	1

ASS: Autismusspektrumstörung

In Abbildung 7 sind die komorbiden ADHS-Diagnosen nach ICD-10-Schlüssel aufgeführt: Fast Dreiviertel der autistischen Patienten zeigen als Begleitstörung

eine Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung nach ICD-10 F 90.0, eine ADHS vom „Mischtypus“.

Abbildung 7: Verteilung der ADHS-Subtypen nach ICD-10-Diagnoseschlüsseln bei Patienten mit ASS und komorbider Aufmerksamkeitsstörung



F90.0: einfache Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung; **F90.1:** Hyperkinetische Störung des Sozialverhaltens; **F98.8:** Aufmerksamkeitsstörung ohne Hyperaktivität

Die Auswertung der **CBCL** ergibt in den beiden Patientengruppen (ADHS und ASS) im Mittel auffällige T-Werte im CBCL-gesamt und bzgl. externalisierender und internalisierender Symptomatik (s. Abbildung 5). Die autistischen Patienten sind im Mittel stärker betroffen, besonders bzgl. internalisierender Auffälligkeiten.

4.2 mRNA-Expressions-Ergebnisse

Hypothese 1: Die mRNA-Expression von *TPH1*, *DRD5* und/oder *DRD4* im Blut ist bei Kindern und Jugendlichen mit ADHS oder ASS im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verändert.

Hypothese 1.1: Die mRNA-Expression von *TPH1* ist bei Kindern und Jugendlichen mit ADHS oder ASS im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verändert.

Der relative Wert der mRNA-Expression von *TPH1* im Vergleich zur internen Referenz liegt in der Gruppe der Patienten mit ADHS bei $1,40 \times 10^{-2}$, in der Gruppe autistischer Kinder und Jugendlicher bei $1,36 \times 10^{-2}$ und in der Kontrollgruppe bei $1,20 \times 10^{-2}$.

Mittels ANOVA konnten keine Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachgewiesen werden ($F=1,376$; $df=2,112$; $p=0,257$) (siehe Abbildung 8).

Somit muss die Hypothese nach den Resultaten der untersuchten Stichproben als falsifiziert angesehen werden.

Hypothese 1.2: Die mRNA-Expression von *DRD5* ist bei Kindern und Jugendlichen mit ADHS oder ASS im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verändert.

Der relative Wert der mRNA-Expression von *DRD5* im Vergleich zu den Referenzgenen liegt in der Gruppe der Patienten mit ADHS bei $1,40 \times 10^{-2}$, in der Gruppe autistischer Kinder und Jugendlicher bei $0,99 \times 10^{-2}$ und in der Kontrollgruppe bei $1,91 \times 10^{-2}$.

Es wurde ein signifikanter Gruppenunterschied festgestellt mit einem erniedrigten *DRD5*-mRNA-Wert bei den Patienten mit ASS verglichen mit den Kontrollpersonen ($p < 0,001$) und Patienten mit ADHS ($p = 0,001$) (siehe Abbildung 8).

Ein signifikanter Einfluss der Kovariablen Geschlecht, Alter, IQ und Medikationszustand konnte durch eine Kovarianzanalyse ausgeschlossen werden ($F=4,558$; $df=2,103$; $p=0,013$).

Somit kann diese Hypothese zu den Untersuchungen der eingeschlossenen Stichproben als verifiziert gelten.

Hypothese 1.3: Die mRNA-Expression von *DRD4* ist bei Kindern und Jugendlichen mit ADHS oder ASS im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden verändert.

Der relative Wert der mRNA-Expression von *DRD4* im Vergleich zur internen Referenz liegt in der Gruppe der Patienten mit ADHS bei $2,18 \times 10^{-2}$, in der Gruppe autistischer Kinder und Jugendlicher bei $2,21 \times 10^{-2}$ und in der Kontrollgruppe bei $2,68 \times 10^{-2}$.

Es wurde durch ANOVA ein signifikanter Gruppenunterschied nachgewiesen ($F=5,475$; $df=2,110$; $p=0,005$). Post-hoc-Analysen zeigten eine verminderte *DRD4*-mRNA-Konzentration sowohl für die Gruppe der Patienten mit ADHS ($p=0,007$) sowie für die der Patienten mit ASS ($p=0,017$) im Vergleich zu der gesunden Kontrollgruppe. Die beiden Patientengruppen unterschieden sich jedoch nicht signifikant von einander in der *DRD4*-mRNA-Expression. Die *DRD4*-Expression unterschied Patienten und Kontrollen mit einer Sensitivität von 75% und Spezifität von 56%.

Auf die Ergebnisse hatten die Kovariablen Alter, Geschlecht, IQ und Medikationszustand keinerlei Auswirkung ($T=0,017$; $df=28$; $p=0,987$) (siehe Abbildung 8).

Somit kann diese Hypothese für die untersuchten Stichproben als verifiziert angesehen werden.

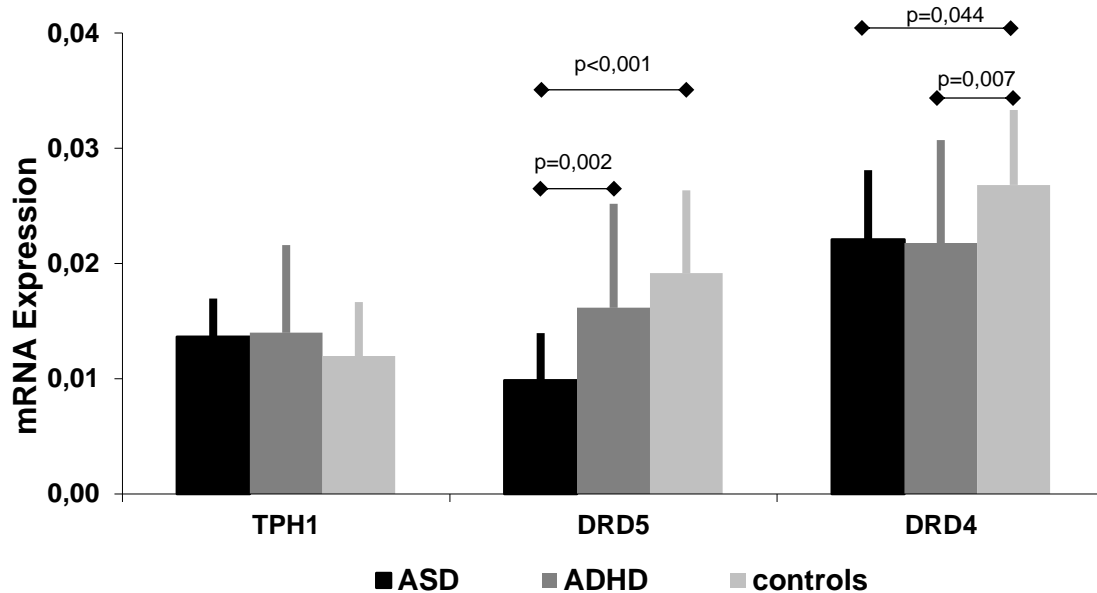
Hypothese 2: Die Einnahme von Stimulanzien bei Patienten mit ADHS bewirkt eine Modulation der mRNA-Expression der o.g. Kandidatengene in Vollblut.

Es wurde für eine Subgruppe, bestehend aus 30 Patienten mit einer ADHS, zwei Blutentnahmen durchgeführt und zwar eine unter Stimulanzienfluss und eine nach mindestens eintägigem Absetzen der Medikation, was einer Auswaschperiode von mindestens zehn Halbwertszeiten entspricht.

Ein zweiseitiger t-Test für gebundene Stichproben konnte in dieser Subgruppe keinen signifikanten mRNA-Expressionsunterschied zu den zwei Messzeitpunkten nachweisen und zwar weder für die *TPH1*- ($T=0,606$; $df=29$; $p=0,549$), noch für die *DRD5*- ($T=0,574$; $df=27$; $p=0,571$) oder für die *DRD4*-Expression ($T=0,017$; $df=28$; $p=0,987$).

Somit ist diese Hypothese in der untersuchten Stichprobe unter den beschriebenen Untersuchungsbedingungen als falsifiziert anzusehen.

Abbildung 8: mRNA-Expression der Kandidatengene *TPH1*, *DRD5* und *DRD4* im Vollblut von Patienten mit ADHS, ASS und gesunden Kontrollpersonen in Relation zu einer internen Referenz



ADHD/ADHS = attention deficit hyperactivity disorder, Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung, **ASD/ASS** = autism spectrum disorder/ Autismusspektrumstörung; **DRD4, 5** = Dopaminrezeptoren D4, 5, **TPH1** = Tryptophanhydroxylase-Gen 1

5 Diskussion

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage nach einer veränderten mRNA-Expression der Gene *DRD4*, *DRD5* und *TPH1* im Blut von Kindern und Jugendlichen mit ADHS im Vergleich zu autistischen Patienten als klinischer Kontrollgruppe und gesunden Kontrollprobanden und einer möglichen Beeinflussung der Expression durch Psychostimulanzien. Es war ein Ziel zu prüfen, ob die erhobenen mRNA-Expressionsbefunde die untersuchten monoaminergen Gene als mögliche Kandidaten für „periphere Krankheitsmarker“ der ADHS stützen.

Für *TPH1* wurden keine unterschiedlichen mRNA-Konzentrationen im Blut in den drei untersuchten Gruppen nachgewiesen. Die *DRD4*-mRNA-Expression hingegen war sowohl in der Gruppe der Patienten mit ADHS als auch in der Gruppe der Kinder und Jugendlichen mit ASS signifikant niedriger als in der gesunden Kontrollgruppe. Weiterhin zeigte sich ein erniedrigter Gehalt an *DRD5*-mRNA im Vollblut der autistischen Patienten im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen.

Bisher gibt es vergleichsweise wenige Studien, in denen der Einfluss von psychiatrischen Erkrankungen auf die periphere mRNA-Expression von Genen aus dem monoaminergen System untersucht wurde. Es ließ sich zum Zeitpunkt der Datenerhebung keine derartige Untersuchung im Zusammenhang mit einer ADHS finden. Für Patienten mit ASS findet sich eine Studie, in der Emanuele et al. (2010) die *DRD3*- und *DRD4*-mRNA-Expression bei 20 Patienten mit ASS, 19 professionellen Musikern und 19 gesunden Kontrollpersonen verglichen. Die Autoren waren an Musikern als Vergleichsgruppe interessiert, da autistische Menschen mitunter besondere Interessen im musischen Bereich zeigen. Im peripheren Blut der autistischen Patienten und auch der professionellen Musiker fiel eine erhöhte *DRD4*-mRNA-Expression im Vergleich zu gesunden Probanden auf, die die Autoren als möglichen „molekularen Link“ zwischen ASS und Interesse sowie Begabung für Musik interpretierten. Die Expression von *DRD3*-mRNA war nicht signifikant verändert. Emanuele und Kollegen kommen somit in Bezug auf die *DRD4*-mRNA-Expression zu einem anderen Ergebnis als die vorliegende Arbeit. Als Ursache hierfür könnten Unterschiede im Studiendesign bzw. der eingeschlossenen Populationen diskutiert werden, wie

zum Beispiel ein unterschiedliches Alter der Probanden (Erwachsene versus Kinder und Jugendliche). Des Weiteren sind mögliche Einflüsse von komorbiden Störungen nicht auszuschließen, da sich in unserer Studie eine gleichgerichtete Modulation der *DRD4*-Expression bei Patienten mit ASS sowie mit ADHS beobachten ließ und unsere Gruppe autistischer Kinder hoch komorbide mit ADHS war. In der Arbeit von Emanuele und Kollegen wurde dagegen keine Aussagen über die Komorbidität der Probanden getroffen. Die abweichenden Ergebnisse der beiden Studien könnte auch durch den Medikationsstatus bedingt sein, zu dem in der Arbeit von Emanuele et al. ebenfalls keine näheren Angaben gemacht wurden. Auch wurde zur Normalisierung der Kandidatengen-Expression bei Emanuele et al. lediglich ein Haushaltsgen verwendet, nicht wie in der vorliegenden Arbeit die fünf stabilsten von insgesamt sechs Referenzgenen.

Der Befund zu einer reduzierten *DRD4*-mRNA-Expression sowohl bei Kindern mit ADHS als auch bei Kindern mit ASS (in unserer Stichprobe in knapp 70% der Fälle ebenfalls mit komorbider ADHS) bekräftigen bisherige Befunde in der Literatur zu möglicherweise überlappenden ätiologischen Faktoren bei diesen beiden neuropsychiatrischen Störungsbildern (Taurines et al. 2012). So wurde bei Vorliegen einer ASS eine Prävalenz von 30% für eine komorbide ADHS beschrieben (Simonoff et al. 2008). Damit liegt die Prävalenz etwa sechsmal höher als in der weltweiten Bevölkerung (Polanczyk et al. 2007). Zudem finden sich autistische Symptome häufiger bei Kindern mit ADHS als in gesunden Kontrollen (Mulligan et al. 2009). Ebenfalls lassen sich für beide Störungen gemeinsame Risikofaktoren ableiten. Beide Erkrankungen gehen mit einer hohen Erblichkeit einher, sodass mögliche gemeinsame genetische Faktoren untersucht wurden. Es zeigten sich sowohl in Familien- als auch in Zwillingsstudien vermehrt Symptome einer ASS bei Geschwistern eines Kindes mit einer ADHS (Mulligan et al. 2009). In genspezifischen Assoziationsstudien wurden mehrere Kandidatengene der ADHS auf eine mögliche Verbindung mit einer ASS untersucht. Es fanden sich jedoch nur zwei Kandidatengene (*DRD3* und *MAOA* [Monoaminoxidase A]) bei ADHS, welche mit Symptomen einer ASS assoziiert waren (Rommelse et al. 2010).

In sogenannten genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) wurde das gesamte Genom auf bereits erwähnte Einzelnukleotid-Polymorphismen, SNPs (s. 1.5.2), bei Patienten mit ASS oder mit ADHS untersucht, jedoch ließen sich den Erkrankungen keine typischen Genvarianten zuordnen (Devlin et al. 2011;

Stergiakouli et al. 2012). Den Ergebnissen dieser Untersuchungen nach ist anzunehmen, dass über pleiotrope Effekte häufig auftretende SNPs das Risiko sowohl für ADHS als auch für ASS erhöhen (Taurines et al. 2012). Ebenso wurden in genomweiten Untersuchungen sogenannter Kopienzahlvariationen (copy number variants, CNVs) solch kleine zytogenetische Abweichungen im Genom von Menschen mit ASS oder mit ADHS analysiert. Die Ergebnisse dieser CNV-Studien weisen ebenso wie die Untersuchungen zu SNPs auf überlappende genetische Faktoren als Grundlage beider Erkrankungsbilder hin (Elia et al. 2011; Williams et al. 2012).

In weitaus geringerem Umfang erfolgten in den letzten Jahren Studien zu nicht-biologischen Risikofaktoren einer ASS oder ADHS. Sowohl für ADHS als auch für ASS liegt eine Geschlechterwendigkeit mit einem erhöhten Risiko für männliche Individuen vor. Zusätzlich scheinen Komplikationen während der Schwangerschaft wie Frühgeburtlichkeit vor der 26. Schwangerschaftswoche, die Einnahme von Valproat, mütterlicher Diabetes, Präeklampsie sowie virale und bakterielle Infektionen mit einem erhöhten Risiko für ASS, aber auch für ADHS assoziiert zu sein (Rasalam et al. 2005b; Johnson et al. 2010; Mann et al. 2010; Cohen et al. 2011; Halmoy et al. 2012; Lyall et al. 2012b). Zur Bestätigung dieser Studienergebnisse sind jedoch noch größere populationsbasierte Studien notwendig.

In den weiteren in der Literatur vorhandenen Studien zur Expression monoaminergener Kandidaten in peripherem Gewebe standen psychiatrische Störungsbilder im Fokus, die pathophysiologisch mit monoaminergener Dysregulation in Verbindung gebracht werden, wie Schizophrenien, affektive oder Ticstörungen. Die meisten Studien befassten sich mit der mRNA-Expression dopaminergener Kandidatengene (von *DRD2*, *DRD3*, *DRD4* und *DRD5*) bei schizophrenen Psychosen, deren Ergebnisse sich jedoch evtl. aufgrund methodischer Unterschiede uneinheitlich präsentieren.

Zur Expression von *DRD2*-mRNA im Blut bei Schizophrenien berichteten Zvara et al. (2005) eine signifikant erhöhte Konzentration in peripheren Blut-Lymphozyten bei 13 medikamentennaiven Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu 10 gesunden Probanden.

Im Gegensatz dazu konnten in Folgestudien meist keine Expressionsunterschiede bei Patienten mit schizophrenen Psychosen im Vergleich zu Kontrollprobanden beobachtet werden, jedoch mitunter eine

Korrelation der *DRD2*-Expression mit der psychotischen Symptomatik. Yao et al. (2008) fanden keinen Unterschied in der *DRD2*-mRNA Expression in mononukleären Blutzellen bei 30 Patienten mit Schizophrenie, die erstmals stationär behandelt wurden, verglichen mit 26 gesunden Kontrollpersonen. Liu et al. (2013) untersuchten die Expression von *DRD2*-mRNA in peripheren Blut-Lymphozyten bei 25 Patienten mit akuter Schizophrenie und bei 27 Patienten mit chronischer Schizophrenie im Vergleich zu 30 gesunden Kontrollpersonen. Es wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gemessen, jedoch zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der *DRD2*-mRNA-Konzentration und der Ausprägung der Positivsymptomatik bei akut psychotischen Patienten. Diese Ergebnisse wurden bestätigt von Cui et al. (2015), die keine veränderte *DRD2*-mRNA in peripheren Blut messen konnten im Vergleich einer Patientengruppe bestehend aus 18 Patienten mit einer nicht näher bezeichneten psychotischen Störung und 14 Schizophrenie-Patienten mit einer gesunden Kontrollgruppe bestehend aus 30 Probanden. Auch in dieser Untersuchung korrelierte die *DRD2* mRNA-Expression mit Werten der *Positive and Negative Syndrome Skala* bei Schizophrenie (PANSS).

Zur Expression von *DRD3* bei schizophrenen Psychosen ergaben sich ebenfalls teils gegensätzliche Befunde. Ilani et al. (2001) maßen in einer Gruppe von 14 Patienten mit Schizophrenie im Vergleich zu 11 gesunden Kontrollpersonen eine Steigerung der Expression von *DRD3* in isolierten Blut-Lymphozyten. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen berichteten Cui et al. (2015) eine signifikant erhöhte *DRD3*-mRNA-Expression in peripherem Blut der o.g. Patientengruppe (s. Abschnitt zur *DRD2*-Expression), bestehend aus 18 Patienten mit einer nicht näher bezeichneten psychotischen Störung und 14 Schizophrenie-Patienten, im Vergleich mit 30 gesunden Kontrollprobanden. Kwak et al. (2001) verglichen die Expression von *DRD3* in peripheren Lymphozyten bei insgesamt 87 schizophrenen Patienten, von denen sich zum Zeitpunkt der Datenerhebung 44 Patienten in andauernder medikamentöser Behandlung (> drei Jahre) befanden, 28 Patienten seit mehr als drei Monate nicht mehr medikamentös behandelt wurden („medikamentenpausierende“) und 15 Patienten medikamentennaiv waren. Zudem wurden 31 gesunde Kontrollpersonen eingeschlossen. Initial zeigte sich – wie in der Studie von Ilani et al. 2001 - eine erhöhte *DRD3*-mRNA-Expression in der Gruppe der medikamentenpausierenden Patienten im Vergleich zu durchgängig medizierten und medikamentennaiven Patienten sowie zu gesunden Kontrollen.

Die Expression zwischen Schizophrenie-Patienten unter antipsychotischer Dauermedikation und gesunden Kontrollen unterschied sich dabei nicht. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine signifikant erhöhte *DRD3*-mRNA-Expression sowohl bei medikamentennaiven als auch bei medikamentenpausierenden schizophrenen Patientin mit einem höheren Wert auf der Beurteilungsskala für psychotische Symptome (*Brief Psychiatric Rating Scale*, BPRS) einherging.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen einer erhöhten *DRD3*-Expression bei Schizophrenien fanden sich in anderen Untersuchungen keine derartigen Expressionsunterschiede zwischen Patienten und Kontrollgruppen (z.B. Van Der Weide et al. 2003; Kawano et al. 2011; Urhan-Kucuk et al. 2011) jedoch mitunter eine Korrelation der *DRD3*-Expression mit der schizophrenen Symptomatik (Rodrigues et al. 2005; Kawano et al. 2011).

In der Studie von Vogel et al. (2004) wurde sogar eine verringerte Konzentration von *DRD3*-mRNA im Vollblut berichtet, jedoch in relativ kleinen Stichproben, bei insgesamt 13 Patienten mit einer Schizophrenie und 11 Patienten mit einer bipolaren Störung im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Letzteres Ergebnis war unabhängig von der Vormedikation. Interessanterweise normalisierten sich die Konzentrationen von *DRD3*-mRNA bei schizophrenen Patienten nach Gabe von Antipsychotika auf dem Niveau der gesunden Kontrollen.

Die meisten Studien zur Expression von *DRD4* im Blut von Patienten mit schizophrenen Psychosen fanden übereinstimmend keine Unterschiede im Expressionsniveau im Vergleich zwischen Patienten mit schizophrenen Psychosen und gesunden Kontrollprobanden (Ilani et al. 2001; Rodrigues et al. 2005). Rodrigues und Kollegen berichteten jedoch innerhalb der Patientengruppe eine signifikante Korrelation zwischen der Ausprägung psychotischer Symptome - gemessen anhand der BPRS - und der Dopaminrezeptorexpression. Höhere Werte auf der BPRS gingen mit höheren Rezeptorexpressionen von D4 (und D3) einher. In der Studie wird jedoch der Medikationsstatus der Patienten nicht aufgeführt.

In o.g. Untersuchung von Kwak et al. (2001) an verschiedenen Gruppen schizophrener Patienten (1. in antipsychotischer Dauertherapie, 2. in einer medikamentenpausierenden Phase, 3. medikamentennaive Patienten) war die Expression von *DRD5*-mRNA in der medikamentenpausierenden Gruppe nur im Vergleich zu der medizierten Patientengruppe erhöht. Zwei Wochen nach

Beginn der Gabe von Antipsychotika wurde eine deutlich erhöhte *DRD5*-Expression gemessen, die in der Verlaufsuntersuchung nach acht Wochen wieder niedriger, jedoch noch signifikant oberhalb des Ausgangsniveaus lag. Einzelne medikamentennaive Schizophrenie-Patienten zeigten erhöhte Expressionen von *DRD5* (auch von o.g. *DRD3*); das Ergebnis war jedoch auf Gruppenniveau im Vergleich zu den gesunden Kontrollen nicht signifikant. Die Autoren fassten ihre Ergebnisse zu *DRD3* und *DRD5* so zusammen, dass die Befunde evtl. dafür hilfreich sein könnten, eine Subgruppenbildung von Patienten mit schizophrenen Psychosen zu ermöglichen. Zudem verweisen die Studienergebnisse darauf, dass die Expression dieser Kandidatengene unter antipsychotischer Medikation moduliert wird.

Zusammenfassend zu den Ergebnissen bei Schizophrenien könnte ein modulierender Faktor für die divergierenden Ergebnisse der unterschiedliche Medikationszustand in den Patientengruppen angesehen werden. In den Studien von Ilani et al. (2001), van der Weide et al. (2003), Kawano et al. (2011) und Urhan-Kucuk et al. (2011) werden Blutzellen von medizierten Patienten untersucht, während in den anderen Studien zwischen medikamentenfreien/-pausierenden, medikamentennaiven sowie medizierten Patienten unterschieden wird. Weiterhin könnte der Krankheitsverlauf eine Rolle spielen. So findet in einigen Studien keine Unterteilung in eine chronische oder akute/erste Episode einer Schizophrenie statt (Ilani et al. 2001; Vogel et al. 2004; Zvara et al. 2005; Kawano et al. 2011; Urhan-Kucuk et al. 2011; Cui et al. 2015). Auch könnte angenommen werden, dass sich unterschiedliche Subtypen der Schizophrenien in ihren peripheren Expressionsmustern unterscheiden.

Neben der ausführlichen Literatur zur Expression dopaminergener Gene bei Schizophrenien liegen auch Untersuchungen zu diesen Kandidaten bei weiteren psychiatrischen Störungsbildern vor, die mit einer monoaminergen Dysregulation in Verbindung gebracht werden.

In einer Studie zur Depression konnte bei 12 nicht medizierten Patienten mit einer schweren Symptomatik eine initial reduzierte *DRD4*-Expression durch eine achtwöchige Paroxetin-Behandlung auf das Niveau der *DRD4*-Expression von gesunden Kontrollen angehoben werden (Rocc et al. 2002). Die Autoren vermuteten, dass eine veränderte *DRD4*-Expression in der Peripherie ein zentrales dopaminerges Ungleichgewicht im akuten Krankheitszustand widerspiegeln könnte. Diese Ergebnisse einer erniedrigten *DRD4*-Expression

bei depressiver Symptomatik sind auch im Kontext der vorliegenden Studie interessant, da die untersuchten Patienten mit ADHS und ASS ebenfalls erniedrigte *DRD4*-Werte zeigten und ADHS sowie ASS eine hohe Komorbidität mit Depression aufweisen (Matson & Nebel-Schwalm 2007; Taurines et al. 2010). Möglicherweise sind diese übereinstimmenden Befunde auf gemeinsame (ätiologische) Faktoren zurück zu führen. Die Patienten mit ADHS - sowie die Kinder und Jugendlichen mit ASS - der vorliegenden Studie zeigten in der CBCL auffällige Werte, was internalisierendes Verhalten angeht. Das depressionsspezifische DIKJ, das zusätzlich bei den Patienten mit ADHS durchgeführt worden war, war in der Gruppenauswertung jedoch nicht auffällig. Es ist jedoch anzunehmen, dass einige der noch nicht von depressiven Symptomen betroffenen jungen Patienten mit autistischer oder ADHS-Symptomatik im Entwicklungsverlauf eine komorbide Depression ausbilden werden und die peripheren Expressionsbefunde damit assoziiert sein könnten.

In einer Studie zu Essstörungen wurde die *DRD4*- und *DRD2*-Expression, zusätzlich auch die Expression des Dopamin-Transportergens (*DAT*) im Blut von 46 Patienten (22 mit Anorexia nervosa, 24 mit Bulimia nervosa) im Vergleich zu 30 gesunden Kontrollprobanden untersucht. Neben einer Hochregulierung der *DAT*-Expression und Hypermethylierung des *DAT*-Promotors in der gesamten Patientengruppe im Vergleich mit den gesunden Kontrollen fiel eine verminderte periphere Expression von *DRD2*-mRNA in der Patientengruppe und zusätzlich eine Hypermethylierung des *DRD2*-Promotors in der Gruppe der Anorexiepatienten auf. Bezüglich der peripheren *DRD4*-Expression zeigte sich jedoch kein signifikanter Gruppenunterschied (Frieling et al. 2010).

Für Ticstörungen liegen einige wenige periphere Expressionsanalysen vor. Erhöhte *DRD5*-mRNA Konzentrationen wurden in einer Studie bei 15 Patienten mit Tourette-Syndrom im Vergleich zu 15 Kontrollpersonen nachgewiesen (Ferrari et al. 2008). Die Ausprägung der *DRD5*-mRNA Expression war sowohl unabhängig von einer Medikamentengabe als auch von einer gleichzeitig bestehenden Zwangsstörung oder einer ADHS. Jedoch korrelierte die Intensität der Zwangssymptome bei Patienten mit einer komorbiden Zwangsstörung mit der Höhe des *DRD5*-mRNA-Gehalts (Ferrari et al. 2008). Eine andere Studie verglich die mRNA-Konzentrationen von *DRD2* bei 20 medizierten und 23 nicht medizierten Tourette-Patienten (21 medikamentennaiv und zwei

medikamentenfrei für mindestens 40 Stunden) in Relation zu der Ausprägung der Tic-Symptomatik (Liao et al. 2010). Dabei zeigte sich eine positive Beziehung zwischen der Schwere der Tic-Symptome und den *DRD2*-mRNA-Konzentrationen bei den medizierten Patienten, allerdings nicht bei medikamentennaiven bzw. -freien Patienten. Die Autoren vermuteten eine kompensatorische Überexpression von Dopaminrezeptorgenen, ausgelöst durch die dopaminerge Rezeptorblockade der antipsychotischen Medikamente. Die Überexpression von *DRD2*-mRNA schien bei einigen eingeschlossenen Individuen stärker ausgeprägt zu sein als bei anderen, und höhere *DRD2*-mRNA-Spiegel bei diesen waren mit einer ausgeprägteren Tic-Symptomatik assoziiert. Diese Befunde werden ergänzt durch das Ergebnis einer Studie von Gunther et al. (2012), in der ebenfalls eine positive Korrelation zwischen der *DRD2*-mRNA-Expression und der Schwere der Tic-Symptomatik bei Tourette-Patienten nachgewiesen wurde, allerdings bei 26 nicht medizierten Patienten. Auch in der Studie von Ji und Wu (2016), in der 60 Kinder mit einer Ticstörung eingeschlossen wurden, korrelierte die mRNA-Expression von *DRD2* mit der Schwere der Tic-Symptomatik. Zusätzlich wurde in dieser Studie eine signifikante Reduktion der Expression von *DRD2*-mRNA nach einer dreimonatigen Behandlung mit dem atypischen Antipsychotikum Aripiprazol nachgewiesen.

Zusammenfassend liegen einzelne Studien mit teils divergierenden Ergebnissen zu der peripheren Expression von dopaminergen Rezeptorgenen und *TPH* bei psychiatrischen Störungsbildern vor, die pathophysiologisch mit monoaminergem Dysregulation in Verbindung gebracht werden. Die vorliegende Arbeit liefert erstmalig periphere Expressionsbefunde bei jungen Patienten mit ADHS.

Als ein Ziel dieser Arbeit sollte ein möglicher Einfluss von Alter, IQ und Geschlecht auf die Expression der Kandidatengene untersucht werden. Nach Auswertung der Daten in den vorliegenden Kollektiven konnte kein Einfluss der genannten Faktoren auf die mRNA-Expression festgestellt werden. Auch in den meisten oben erwähnten Arbeiten wurden die Kovariaten Alter und Geschlecht als mögliche Einflussfaktoren auf die Expression analysiert. In den Studien zu Schizophrenien von Ilani et al. (2001), Kwak et al. (2001), Zvara et al. (2005), Kawano et al. (2011) Liu et al. (2013) und Cui et al. (2015) konnte kein Zusammenhang dieser Faktoren mit der Expression der Kandidatengene

nachgewiesen werden. Auch in den Arbeiten über Ticstörungen war kein Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Expression feststellbar. In den restlichen oben erwähnten Studien wurden Kovariaten als mögliche Einflussfaktoren auf die mRNA-Expression nicht untersucht (Ferrari et al. 2008; Yao et al. 2008; Emanuele et al. 2010).

Weiterhin wurde in dieser Arbeit noch ein möglicher Effekt von Psychostimulanzien auf die mRNA-Expression der monoaminergen Kandidatengene untersucht. In einer Subgruppe der Patienten mit ADHS erfolgten Expressionsanalysen der Kandidatengene einmal unter Stimulanzieneinfluss und einmal ohne diesen. Hierbei ließ sich kein Unterschied in der mRNA-Konzentration der Kandidatengene im Vollblut nachweisen. Dieses Ergebnis mag durch die relativ kurze Absetzphase von Methylphenidat von mindestens 24 Stunden mitbedingt sein, was jedoch einer Auswaschperiode von mindestens zehn Halbwertszeiten entspricht.

In der Literatur finden sich - abweichend von diesen Befunden - mehrere Studien, in denen ein Effekt von Psychopharmaka auf die mRNA-Expression bei psychiatrischen Erkrankungen beschrieben wurde. Untersuchte Substanzklassen waren v.a. Antidepressiva und Antipsychotika, nicht die aktuell im Fokus gestandenen Psychostimulanzien. So stieg bei 12 medikamentenfreien Patienten mit schwerer Depression nach achtwöchiger Gabe des selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmers (SSRI) Paroxetin (20-50mg/Tag) die *DRD4*-mRNA-Expression auf das Niveau von gesunden Probanden an (Rocc et al. 2002). Vor der Behandlung war die mRNA-Expression signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. In der oben erwähnten Arbeit von Kwak et al. (2001) wurde bei den 28 medikamentenfreien und 15 medikamentennaiven schizophrenen Patienten ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von *DRD3* und *DRD5* nach insgesamt achtwöchiger Behandlung mit einer Chlorpromazin-Äquivalenzdosis von ca. 700mg/Tag im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe dokumentiert. Kawano et al. (2011) untersuchten in einer kleinen Gruppe von 12 medizierten schizophrenen Patienten einen möglichen Effekt unterschiedlicher Dosierungen von verschiedenen Antipsychotika, genormt auf die Chlorpromazin-Äquivalenzdosis, auf die mRNA-Expression von *DRD3* und *DRD4*. Dabei konnte keine Korrelation nachgewiesen werden. In der Studie von Cui et al. (2015) wurden bei 19 medikamentenfreien und 13 medizierten Patienten mit Schizophrenie die mRNA-Expression von *DRD2* und *DRD3* im Vergleich zu einer gesunden

Kontrollgruppe bestehend aus 31 Personen bestimmt, wobei sich kein signifikanter Unterschied darstellte. Auf die Medikamentendosis wird in der Studie nicht näher eingegangen. In der Arbeit von Liao et al. (2010) wurde die unterschiedliche Expression dopaminerger Kandidatengene bei 20 medizierten Tourette-Patienten im Vergleich zu 23 unmedizierten Patienten gemessen. Die verwendeten Medikamente zur Behandlung der Tic-Störung und eventueller komorbider Erkrankung wie ADHS oder einer Zwangsstörung stammten aus der Gruppe der Antipsychotika, Stimulanzien und alpha-2-adrenergen Agonisten. Weiterhin wurden SSRIs und nicht näher beschriebene Medikamente zur Behandlung der ADHS angegeben. Dabei zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration von *DRD2*-mRNA in der Gruppe unter Medikation. Jedoch wurden weder die einzelnen Medikamentenklassen getrennt analysiert, noch Dosierungen in der Arbeit angegeben, so dass der genaue Einfluss der verschiedenen Wirkstoffgruppen weiter zu klären bleibt. In der oben genannten Studie von Ferrari et al. (2008), in der bei 15 medizierten Tourette-Patienten die mRNA-Expression von allen fünf Dopaminrezeptoren bestimmt wurden, ließ sich kein Zusammenhang zwischen einer bestehenden psychiatrischen Medikation mit Antipsychotika, SSRIs oder der Kombination aus beiden und der mRNA-Expression von Dopaminrezeptorgenen nachweisen. Jedoch wird auch in dieser Arbeit keine genaue Dosisangabe der verabreichten Medikamente aufgeführt.

Zuletzt war es Ziel dieser Arbeit zu prüfen, ob die erhobenen mRNA-Expressionsbefunde bekräftigen, dass die untersuchten monoaminergen Gene in pathophysiologischem Zusammenhang mit den untersuchten Störungsbildern stehen und diese Gene so mögliche Kandidaten für „periphere Marker“ der ADHS sein könnten. Wie oben ausführlicher beschrieben wurde in einem Konsensus-Report der *World Federation of Societies of Biological Psychiatry* und *World Federation of ADHD* (Thome et al. 2012) für einen Krankheitsmarker eine Sensitivität und Spezifität größer als 80% gefordert; eine ausreichende Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Daten sowie eine einfache, nicht invasive methodische Durchführung. Zudem müssen die Befunde durch mindestens zwei unabhängige Studien, die von qualifizierten Untersuchern durchgeführt werden, reproduziert und deren Ergebnisse in Fachzeitschriften mit Gutachtersystem veröffentlicht werden.

Zusammengefasst erfüllen die vorliegenden Befunde nicht die genannten Kriterien an einen Marker. Die mRNA-Expressionen von *TPH1* und *DRD5*

zeigten in der vorliegenden Arbeit in der ADHS-Gruppe keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe, sodass diese Befunde *TPH1* und *DRD5* als mögliche Marker-Kandidaten der ADHS nicht stützen. Für die *DRD4*-Expression zeigten sich signifikante Gruppenunterschieden zwischen Patienten und gesunden Kontrollen, doch waren die Anforderungen an Sensitivität und Spezifität letztlich nicht erfüllt (*DRD4*: Sensitivität 75%, Spezifität 56%). Die fehlende Unterscheidbarkeit von Kindern und Jugendlichen mit ADHS und Patienten mit ASS (häufig mit komorbider ADHS) durch die *DRD4*-Expressionsbefunde verweist in Übereinstimmung mit oben diskutierten Befunden aus der Literatur auf mögliche gemeinsame molekulare Grundlagen der sich in bestimmten Aspekten ähnelnden und überlappenden Phänotypen ADHS und ASS (Taurines et al. 2012). Inwiefern die Befunde zu einer erniedrigten *DRD5*-Expression bei jungen Menschen mit ASS Kriterien eines peripheren Markers erfüllen, ist in ergänzenden Untersuchungen zu klären.

Zu den weiteren geforderten Kriterien an einen Krankheitsmarker ist zu ergänzen, dass die zur Probengewinnung eingesetzte Methode einer Blutentnahme grundsätzlich nicht als non-invasives, jedoch als wenig invasives Verfahren gilt. Die Analysemethodik der qRT-PCR ist zum aktuellen Zeitpunkt in vielen Labors etabliert und Ergebnisse können rasch und unter begrenztem Kostenaufwand erhoben werden. Eine Reproduktion und Validierung der vorliegenden Ergebnisse an größeren Stichproben sowie unter Einschluss weiterer phänotypisch ähnlicher Störungsbilder auch durch unabhängige Untersucher ist ausstehend.

Es ist zu erwarten, dass kein einzelner Expressionsbefund zukünftig Biomarkerkriterien erfüllen wird, sondern höchstens ein Set aus unterschiedlichsten Markern bzw. charakteristischen Befunden (einschließlich genetischer, epigenetischer Befunde, Expressionsmuster sowie Marker erhoben mit Methoden z.B. der funktionellen Bildgebung) die klinische Diagnostik sinnvoll ergänzen kann. Die Hoffnung wäre es, frühzeitig diagnostische Sicherheit bei sich ähnelnden Phänotypen zu erhalten, Therapiemaßnahmen inkl. der Pharmakotherapie gezielt und individualisiert zu wählen und objektivierbare Maße zum Monitoring des Behandlungsverlaufs zu erhalten.

Zusammenfassend ergeben sich für die Ätiologie der ADHS aus mittlerweile zahlreichen Studien Belege für einen zentral dysregulierten Monoaminstoffwechsel. Neuropharmakologische Studien geben Anhalt für eine

Regulationsstörung komplexer Interaktionen zwischen einzelnen monoaminergen Neurotransmittersystemen (Pliszka 2005; Heal et al. 2009). Auch in bildgebenden Studien zeigte sich, dass bei betroffenen Individuen besonders fronto-subkortikale Signalwege, in denen überwiegend Katecholamine dominieren, verändert sind (Faraone & Biederman 1998). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden mittels molekulargenetischer Studien zahlreiche monoaminerge Gene identifiziert, die mit dem Auftreten der ADHS in Verbindung gebracht werden (Faraone & Mick 2010). Eines der in diesem Zusammenhang am häufigsten genannten Kandidatengene ist *DRD4*, für das es in der vorliegenden Arbeit erstmals gelang, eine dysregulierte Expression auch in peripherem Gewebe junger Patienten mit ADHS nachzuweisen.

Aussagekraft und Gültigkeit der Ergebnisse

Eine der Stärken der vorliegenden Studie ist, dass es sich um eine etablierte und verlässliche Methodik und ein standardisiertes Protokoll der Probengewinnung und -verarbeitung handelt (Knudtson et al. 2007; Arikawa et al. 2008). Außerdem wurden für die relative Quantifizierung mittels qRT-PCR aus sechs Haushaltsgenen die fünf stabilsten bestimmt. Dadurch wird die interne Referenz stabilisiert und das Risiko für fehlerhafte Ergebnisse verringert (Vandesompele et al. 2002). Bei vielen anderen Expressionsstudien dagegen wurde lediglich ein Haushaltsgen verwendet (Suzuki et al. 2000). Im Vergleich zu anderen Untersuchungen zur peripheren mRNA-Expression bei psychischen Erkrankungen weist diese Arbeit auch eine höhere Probandenzahl auf sowie eine Phänotypisierung der Patienten nach internationalem Goldstandard.

Als mögliche Limitation der Studie kann die Tatsache angesehen werden, dass keine medikamentennaiven Patienten mit ADHS, sondern solche mit zuvor abgesetzter Medikation, untersucht wurden. Zudem erhielten die Kinder und Jugendlichen mit ASS unterschiedliche Medikamente aus der Klasse der Stimulanzien, Antidepressiva und Antipsychotika. Ein möglicher Einfluss der Medikation auf die Expressionsniveaus ist daher nicht sicher auszuschließen (Kwak et al. 2001; Rocc et al. 2002; Liao et al. 2010).

6 Ausblick

Wie eingangs erwähnt, ist diese Arbeit - soweit aus der Literatur ersichtlich - die erste, die sich mit der mRNA-Expression monoaminerger Kandidatengene im Vollblut von Patienten mit ADHS befasst. Sie ergänzt dabei die bisher in der Literatur vorhandenen, einzelnen Studien zur peripheren Genexpression bei psychiatrischen Erkrankungen mit Veränderungen des Monoaminstoffwechsels. Ihre Ergebnisse sollten in weiteren Studien an größeren Patientenkollektiven, unter Einschluss weiterer, phänotypisch ähnlicher psychiatrischer Störungsbilder und medikamentennaiver Patienten validiert werden, um herauszustellen, ob Expressionsbefunde monoaminerger Kandidaten als potenzielle neurobiologische Marker die Diagnostik und Therapie psychiatrischer Störungen sinnvoll ergänzen können. Die Diagnostik der ADHS wird bisher über eine sorgfältige Anamneseerhebung, auch mittels standardisierter Verfahren, und die Verhaltensbeobachtung gestellt. Neurobiologische Marker könnten den Diagnoseprozess beschleunigen bzw. ergänzen. Zudem könnte der Symptom- und Therapieverlauf mittels regelmäßiger Kontrollen der Marker dokumentiert und insbesondere die medikamentöse Therapie gezielt gewählt und ggf. angepasst werden.

7 Zusammenfassung

Die Genese der neuropsychiatrischen Entwicklungsstörung ADHS ist multifaktoriell, die Pathophysiologie jedoch noch nicht vollständig geklärt. Eine zentrale Rolle scheint eine Dysregulation des Monoaminmetabolismus zu spielen. Dies geht aus zahlreichen tierexperimentellen, bildgebenden und molekulargenetischen Studien hervor. In diesem Kontext werden verschiedene Kandidatengene genannt, die für eine Dysregulation des zentralen Monoaminstoffwechsels mitverantwortlich gemacht werden. In molekulargenetischen Studien wurden dabei mehrfach Polymorphismen von *DRD4* und *DRD5* sowie *TPH1* in Assoziation mit ADHS-Symptomatik identifiziert.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, die mRNA-Expression dieser Kandidatengene in Vollblut bei Patienten mit ADHS sowie Patienten mit ASS als weiterer, häufig komorbider neuropsychiatrischer Entwicklungsstörung im Vergleich zu gesunden Probanden zu analysieren. Zudem sollte ein möglicher Einfluss durch bestehende Medikation respektive durch die Kovariaten Alter, Geschlecht und Intelligenz ermittelt werden. Weiterhin war es Ziel dieser Arbeit zu prüfen, ob die erhobenen mRNA-Expressionsbefunde die untersuchten monoaminergen Gene als mögliche Kandidaten für „periphere Marker“ der ADHS stützen.

Es zeigte sich eine signifikant geringere mRNA-Expression von *DRD4* in der Gruppe der Kinder und Jugendlichen mit ADHS und ASS im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Die *DRD5*-mRNA-Expression war bei der Gruppe autistischer Patienten im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant verringert. Bezüglich der Expression von *TPH1* ließen sich keine Expressionsunterschiede feststellen. Ebenso ließen sich keine modulierenden Effekte durch Medikation, Alter, Geschlecht und Intelligenzniveau nachweisen. Die Kriterien für den Einsatz allein der genannten Expressionsbefunde als mögliche Krankheitsmarker der ADHS wurden nicht erfüllt.

In dieser Arbeit wurde jedoch erstmalig eine veränderte mRNA-Expression dopaminerger Kandidatengene bei Patienten mit ADHS sowie autistischen Patienten in peripherem Gewebe nachgewiesen. Dieses Ergebnis untermauert die bisher vermutete Hypothese einer zentralen Dysregulation des Monoaminstoffwechsels bei den neuropsychiatrischen Entwicklungsstörungen

ADHS und ASS. Weitere Studien mit einer größeren Probandenanzahl unter Einbezug phänotypisch ähnlicher psychiatrischer Störungsbilder sind für eine Ergänzung und Verifizierung der Ergebnisse notwendig.

8 Literaturverzeichnis

Achenbach T & Rescorla L (2001). Manual for the Child Behavior Checklist 4-18. In University of Vermont (ed). Achenbach, Vermont.

Anderson GM, Gutknecht L, Cohen DJ, Brailly-Tabard S, Cohen JH, Ferrari P, Roubertoux PL & Tordjman S (2002). Serotonin transporter promoter variants in autism: functional effects and relationship to platelet hyperserotonemia. *Molecular psychiatry*, 7, 831-6.

Arikawa E, Sun Y, Wang J, Zhou Q, Ning B, Dial SL, Guo L & Yang J (2008). Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genomics*, 9, 328.

Arnsten AF (2009). Toward a new understanding of attention-deficit hyperactivity disorder pathophysiology: an important role for prefrontal cortex dysfunction. *CNS Drugs*, 23 Suppl 1, 33-41.

Association AP (1994). DSM IV, Diagnostic and statistical Manual of Mental Disorders. American Psychiatric Press Washington DC.

Atladottir HO, Thorsen P, Ostergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M & Parner ET (2010). Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *Journal of autism and developmental disorders*, 40, 1423-30.

Ballon N, Leroy S, Roy C, Bourdel MC, Olie JP, Charles-Nicolas A, Krebs MO & Poirier MF (2007). Polymorphisms TaqI A of the DRD2, Ball of the DRD3, exon III repeat of the DRD4, and 3' UTR VNTR of the DAT: association with childhood ADHD in male African-Caribbean cocaine dependents? *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 144B, 1034-41.

Banaschewski T, Becker K, Scherag S, Franke B & Coghill D (2010). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder: an overview. *Eur Child Adolesc Psychiatry*, 19, 237-57.

Banerjee TD, Middleton F & Faraone SV (2007). Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. *Acta paediatrica*, 96, 1269-74.

Baron-Cohen S, Leslie AM & Frith U (1985). Does the autistic child have a "theory of mind"? *Cognition*, 21, 37-46.

Bauman ML & Kemper TL (2005). Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. *Int J Dev Neurosci*, 23, 183-7.

Beischlag TV, Marchese A, Meador-Woodruff JH, Damask SP, O'dowd BF, Tyndale RF, Van Tol HH, Seeman P & Niznik HB (1995). The human dopamine D5 receptor gene: cloning and characterization of the 5'-flanking and promoter region. *Biochemistry*, 34, 5960-70.

Benjamin J, Li L, Patterson C, Greenberg BD, Murphy DL & Hamer DH (1996). Population and familial association between the D4 dopamine receptor gene and measures of Novelty Seeking. *Nat Genet*, 12, 81-4.

Bennetto L, Pennington BF & Rogers SJ (1996). Intact and impaired memory functions in autism. *Child Dev*, 67, 1816-35.

Betancur C (2011). Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain research*, 1380, 42-77.

Bhaduri N, Das M, Sinha S, Chattopadhyay A, Gangopadhyay PK, Chaudhuri K, Singh M & Mukhopadhyay K (2006). Association of dopamine D4 receptor (DRD4) polymorphisms with attention deficit hyperactivity disorder in Indian population. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 141B, 61-6.

Biederman J & Faraone SV (2005). Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet*, 366, 237-48.

Bio-Rad Laboratories I (2006). *iScript™ cDNA Synthesis Kit Handbook*, Hercules, CA.

Blanz B, Remschmidt H, Schmidt M & Warnke A (eds) (2005) *Psychische Störungen im Kindes- und Jugendalter: Ein entwicklungs-psychopathologisches Lehrbuch*. Schattauer Stuttgart, New York.

Boelte S (ed) (2009) *Autismus. Spektrum, Ursachen, Diagnostik, Intervention, Perspektiven*. Hans Huber, Bern.

Boelte S, Rühl D, Schmoetzer G & Poustka F (2006). *ADI-R – Diagnostisches Interview fuer Autismus – Revidiert*. Huber, Bern.

Bölte S (2009). *Autismus. Spektrum, Ursachen, Diagnostik, Intervention, Perspektiven*. Hans Huber, Bern.

Brookes K, Xu X, Chen W, Zhou K, Neale B, Lowe N, Anney 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, Gabriels I, Korn-Lubetzki I, Johansson L, Marco R, Medad S, Minderaa R, Mulas F, Muller U, Mulligan A, Rabin K, Rommelse N, Sethna V, Sorohan J, Uebel H, Psychogiou L, Weeks A, Barrett R, Craig I, Banaschewski T, Sonuga-Barke E, Eisenberg J, Kuntsi J, Manor I, McGuffin P, Miranda A, Oades RD, Plomin R, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant J, Steinhausen HC, Taylor E, Thompson M, Faraone SV & Asherson P (2006). The analysis of 51 genes in DSM-IV combined type attention deficit hyperactivity disorder: association signals in DRD4, DAT1 and 16 other genes. *Mol Psychiatry*, 11, 934-53.

Buchmayer S, Johansson S, Johansson A, Hultman CM, Sparen P & Cnattingius S (2009). Can association between preterm birth and autism be explained by maternal or neonatal morbidity? *Pediatrics*, 124, e817-25.

Casanova MF, Van Kooten IA, Switala AE, Van Engeland H, Heinsen H, Steinbusch HW, Hof PR, Trippe J, Stone J & Schmitz C (2006). Minicolumnar abnormalities in autism. *Acta Neuropathol*, 112, 287-303.

Cattell RB, Weiß RH & Osterland J (eds) (1997) *CFT-1, Grundintelligenztest Skala 1*. Hogrefe, Göttingen.

Chan MK, Cooper JD, Bot M, Steiner J, Penninx BW & Bahn S (2015a). Identification of an Immune-Neuroendocrine Biomarker Panel for Detection of Depression: A Joint Effects Statistical Approach. *Neuroendocrinology*.

Chan MK, Krebs MO, Cox D, Guest PC, Yolken RH, Rahmoune H, Rothermundt M, Steiner J, Leweke FM, Van Beveren NJ, Niebuhr DW, Weber NS, Cowan DN, Suarez-Pinilla P, Crespo-Facorro B, Mam-Lam-Fook C, Bourgin J, Wenstrup RJ, Kaldate RR, Cooper JD & Bahn S (2015b). Development of a blood-based molecular biomarker test for identification of schizophrenia before disease onset. *Transl Psychiatry*, 5, e601.

Chen D, Liu F, Shang Q, Song X, Miao X & Wang Z (2011). Association between polymorphisms of DRD2 and DRD4 and opioid dependence: evidence from the current studies. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 156B, 661-70.

Chess S, Fernandez P & Korn S (1978). Behavioral consequences of congenital rubella. *The Journal of pediatrics*, 93, 699-703.

Cheuk DK & Wong V (2006). Meta-analysis of association between a catechol-O-methyltransferase gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder. *Behavior genetics*, 36, 651-9.

Cohen MJ, Meador KJ, Browning N, Baker GA, Clayton-Smith J, Kalayjian LA, Kanner A, Liporace JD, Pennell PB, Privitera M & Loring DW (2011). Fetal antiepileptic drug exposure: motor, adaptive, and emotional/behavioral functioning at age 3 years. *Epilepsy Behav*, 22, 240-6.

Cooper JR & Melcer I (1961). The enzymic oxidation of tryptophan to 5-hydroxytryptophan in the biosynthesis of serotonin. *J Pharmacol Exp Ther*, 132, 265-8.

Courchesne E (2004). Brain development in autism: early overgrowth followed by premature arrest of growth. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, 10, 106-11.

Craig SP, Boularand S, Darmon MC, Mallet J & Craig IW (1991). Localization of human tryptophan hydroxylase (TPH) to chromosome 11p15.3----p14 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 56, 157-9.

Cui Y, Prabhu V, Nguyen TB, Yadav BK & Chung YC (2015). The mRNA Expression Status of Dopamine Receptor D2, Dopamine Receptor D3 and DARPP-32 in T Lymphocytes of Patients with Early Psychosis. *Int J Mol Sci*, 16, 26677-86.

Daly G, Hawi Z, Fitzgerald M & Gill M (1999). Mapping susceptibility loci in attention deficit hyperactivity disorder: preferential transmission of parental alleles at DAT1, DBH and DRD5 to affected children. *Mol Psychiatry*, 4, 192-6.

Daruna JH & Barnes PA (1993). A neurodevelopmental view of impulsivity. In McCown, Johnson, Shure (eds) *The Impulsive client : theory, research, and treatment*. American Psychological Association, Washington, D.C., pp. 23-37p.

Dawson G, Carver L, Meltzoff AN, Panagiotides H, Mcpartland J & Webb SJ (2002). Neural correlates of face and object recognition in young children with autism spectrum disorder, developmental delay, and typical development. *Child Dev*, 73, 700-17.

Devlin B, Melhem N & Roeder K (2011). Do common variants play a role in risk for autism? Evidence and theoretical musings. *Brain Res*, 1380, 78-84.

Dickstein SG, Bannon K, Castellanos FX & Milham MP (2006). The neural correlates of attention deficit hyperactivity disorder: an ALE meta-analysis. *J Child Psychol Psychiatry*, 47, 1051-62.

Dilling H, Mombour W & Schmidt MH (eds) (2011) *Internationale Klassifikation psychischer Störungen: ICD-10 Kapitel V (F). Klinisch-diagnostische Leitlinien*. Verlag Hans Huber, Bern Göttingen Toronto.

Döpfner M, Görtz-Dorten A & Lehmkuhl G (2008). *Diagnostik-System für Psychische Störungen nach ICD-10 und DSM-IV im Kinder und Jugendliche-II*. Hans Huber, Bern.

Döpfner M, Schürmann S & Lehmkuhl G (1999). Wackelpeter & Trotzkopf. Hilfen bei hyperkinetischem und oppositionellem Verhalten. Psychologie Verlags Union, Weinheim.

Durston S, Davidson MC, Mulder MJ, Spicer JA, Galvan A, Tottenham N, Scheres A, Castellanos FX, Van Engeland H & Casey BJ (2007). Neural and behavioral correlates of expectancy violations in attention-deficit hyperactivity disorder. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, 48, 881-9.

Durston S, Van Belle J & De Zeeuw P (2011). Differentiating frontostriatal and fronto-cerebellar circuits in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological psychiatry*, 69, 1178-84.

Ebstein RP, Novick O, Umansky R, Priel B, Osher Y, Blaine D, Bennett ER, Nemanov L, Katz M & Belmaker RH (1996). Dopamine D4 receptor (D4DR) exon III polymorphism associated with the human personality trait of Novelty Seeking. *Nat Genet*, 12, 78-80.

Efsa (2008). Assessment of the results of the study by McCann et al. (2007) on the effect of some colours and sodium benzoate on children's behaviour - Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Food Contact Materials (AFC). *EFSA Journal*, 6.

Elia J, Glessner JT, Wang K, Takahashi N, Shtir CJ, Hadley D, Sleiman PM, Zhang H, Kim CE, Robison R, Lyon GJ, Flory JH, Bradfield JP, Imielinski M, Hou C, Frackelton EC, Chiavacci RM, Sakurai T, Rabin C, Middleton FA, Thomas KA, Garris M, Mentch F, Freitag CM, Steinhausen HC, Todorov AA, Reif A, Rothenberger A, Franke B, Mick EO, Roeyers H, Buitelaar J, Lesch KP, Banaschewski T, Ebstein RP, Mulas F, Oades RD, Sergeant J, Sonuga-Barke E, Renner TJ, Romanos M, Romanos J, Warnke A, Walitza S, Meyer J, Palmason H, Seitz C, Loo SK, Smalley SL, Biederman J, Kent L, Asherson P, Anney RJ, Gaynor JW, Shaw P, Devoto M, White PS, Grant SF, Buxbaum JD, Rapoport JL, Williams NM, Nelson SF, Faraone SV & Hakonarson H (2011). Genome-wide copy number variation study associates metabotropic glutamate receptor gene networks with attention deficit hyperactivity disorder. *Nat Genet*, 44, 78-84.

Emanuele E, Boso M, Cassola F, Brogna D, Bonoldi I, Mancini L, Marini M & Politi P (2010). Increased dopamine DRD4 receptor mRNA expression in lymphocytes of musicians and autistic individuals: bridging the music-autism connection. *Neuro Endocrinol Lett*, 31, 122-5.

Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, 3rd & Smith TF (2006). Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*, 19, 165-256.

Faraone SV & Biederman J (1998). Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 44, 951-8.

Faraone SV, Biederman J, Weiffenbach B, Keith T, Chu MP, Weaver A, Spencer TJ, Wilens TE, Frazier J, Cleves M & Sakai J (1999). Dopamine D4 gene 7-repeat allele and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry*, 156, 768-70.

Faraone SV, Doyle AE, Mick E & Biederman J (2001). Meta-analysis of the association between the 7-repeat allele of the dopamine D(4) receptor gene and attention deficit hyperactivity disorder. *Am J Psychiatry*, 158, 1052-7.

Faraone SV & Mick E (2010). Molecular genetics of attention deficit hyperactivity disorder. *Psychiatr Clin North Am*, 33, 159-80.

Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA & Sklar P (2005). Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 57, 1313-23.

Fernandez-Navarro P, Vaquero-Lorenzo C, Blasco-Fontecilla H, Diaz-Hernandez M, Gratacos M, Estivill X, Costas J, Carracedo A, Fernandez-Piqueras J, Saiz-Ruiz J & Baca-Garcia E (2012). Genetic epistasis in female suicide attempters. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 38, 294-301.

Ferrari M, Termine C, Franciotta D, Castiglioni E, Pagani A, Lanzi G, Marino F, Lecchini S, Cosentino M & Balottin U (2008). Dopaminergic receptor D5 mRNA expression is increased in circulating lymphocytes of Tourette syndrome patients. *J Psychiatr Res*, 43, 24-9.

Floresco SB & Tse MT (2007). Dopaminergic regulation of inhibitory and excitatory transmission in the basolateral amygdala-prefrontal cortical pathway. *J Neurosci*, 27, 2045-57.

Freitag CM (2012). [Autistic disorders - the state of the art and recent findings: epidemiology, aetiology, diagnostic criteria, and therapeutic interventions]. *Zeitschrift fur Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie*, 40, 139-48; quiz 48-9.

Freitag CM, Staal W, Klauck SM, Duketis E & Waltes R (2010). Genetics of autistic disorders: review and clinical implications. *European child & adolescent psychiatry*, 19, 169-78.

Frieling H, Romer KD, Scholz S, Mittelbach F, Wilhelm J, De Zwaan M, Jacoby GE, Kornhuber J, Hillemecher T & Bleich S (2010). Epigenetic dysregulation of dopaminergic genes in eating disorders. *Int J Eat Disord*, 43, 577-83.

Gainetdinov RR (2008). Dopamine transporter mutant mice in experimental neuropharmacology. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 377, 301-13.

Gizer IR, Ficks C & Waldman ID (2009). Candidate gene studies of ADHD: a meta-analytic review. *Hum Genet*, 126, 51-90.

Goldstein S & Schwabach AJ (2004). The comorbidity of Pervasive Developmental Disorder and Attention Deficit Hyperactivity Disorder: results of a retrospective chart review. *J Autism Dev Disord*, 34, 329-39.

Grandy DK, Allen LJ, Zhang Y, Magenis RE & Civelli O (1992). Chromosomal localization of three human D5 dopamine receptor genes. *Genomics*, 13, 968-73.

Group BDW (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*, 69, 89-95.

Guan LL, Wang YF, Li J, Wang B, Yang L & Qian QJ (2007). [Association analysis of dopamine D4 receptor gene polymorphism and attention deficit hyperactivity disorder with/without disruptive behavior disorder]. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 39, 233-6.

Gunther J, Tian Y, Stamova B, Lit L, Corbett B, Ander B, Zhan X, Jickling G, Bos-Veneman N, Liu D, Hoekstra P & Sharp F (2012). Catecholamine-related gene expression in blood correlates with tic severity in tourette syndrome. *Psychiatry Res*, 200, 593-601.

Hack LM, Kalsi G, Aliev F, Kuo PH, Prescott CA, Patterson DG, Walsh D, Dick DM, Riley BP & Kendler KS (2011). Limited associations of dopamine system genes with alcohol dependence and related traits in the Irish Affected Sib Pair Study of Alcohol Dependence (IASPSAD). *Alcohol Clin Exp Res*, 35, 376-85.

Halmoy A, Klungsoyr K, Skjaerven R & Haavik J (2012). Pre- and perinatal risk factors in adults with attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 71, 474-81.

Hardan AY, Pabalan M, Gupta N, Bansal R, Melhem NM, Fedorov S, Keshavan MS & Minshew NJ (2009). Corpus callosum volume in children with autism. *Psychiatry research*, 174, 57-61.

- Hashimoto T, Tayama M, Murakawa K, Yoshimoto T, Miyazaki M, Harada M & Kuroda Y (1995). Development of the brainstem and cerebellum in autistic patients. *J Autism Dev Disord*, 25, 1-18.
- Heal DJ, Cheetham SC & Smith SL (2009). The neuropharmacology of ADHD drugs in vivo: insights on efficacy and safety. *Neuropharmacology*, 57, 608-18.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ & Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6, 986-94.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G & Watson R (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11, 1026-30.
- Hubl D, Bolte S, Feineis-Matthews S, Lanfermann H, Federspiel A, Strik W, Poustka F & Dierks T (2003). Functional imbalance of visual pathways indicates alternative face processing strategies in autism. *Neurology*, 61, 1232-7.
- Hughes C, Russell J & Robbins TW (1994). Evidence for executive dysfunction in autism. *Neuropsychologia*, 32, 477-92.
- Ilani T, Ben-Shachar D, Strous RD, Mazor M, Sheinkman A, Kotler M & Fuchs S (2001). A peripheral marker for schizophrenia: Increased levels of D3 dopamine receptor mRNA in blood lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 625-8.
- Ji XY & Wu M (2016). [mRNA expression of dopamine receptor D2 and dopamine transporter in peripheral blood lymphocytes before and after treatment in children with tic disorder]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 18, 297-300.
- Johnson S, Hollis C, Kochhar P, Hennessy E, Wolke D & Marlow N (2010). Psychiatric disorders in extremely preterm children: longitudinal finding at age 11 years in the EPICure study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 49, 453-63 e1.
- Kawano M, Sawada K, Tsuru E, Nishihara M, Kato K, Honer WG & Shimodera S (2011). Dopamine receptor D3R and D4R mRNA levels in peripheral lymphocytes in patients with schizophrenia correlate with severity of illness. *Open Journal of Psychiatry*, 1, 33-39.
- Kawasaki Y, Yokota K, Shinomiya M, Shimizu Y & Niwa S (1997). Brief report: electroencephalographic paroxysmal activities in the frontal area emerged in middle childhood and during adolescence in a follow-up study of autism. *Journal of autism and developmental disorders*, 27, 605-20.
- Keary CJ, Minshew NJ, Bansal R, Goradia D, Fedorov S, Keshavan MS & Hardan AY (2009). Corpus callosum volume and neurocognition in autism. *Journal of autism and developmental disorders*, 39, 834-41.
- Kemper TL & Bauman ML (2002). Neuropathology of infantile autism. *Molecular psychiatry*, 7 Suppl 2, S12-3.
- Kleinhans NM, Richards T, Johnson LC, Weaver KE, Greenson J, Dawson G & Aylward E (2011). fMRI evidence of neural abnormalities in the subcortical face processing system in ASD. *NeuroImage*, 54, 697-704.
- Knudtson KL, Adams PS, Grove DS, Hollingshead DJ, Hunter TC & Shipley GL (2007). The ABRF NARG Real-time PCR Survey 2007: Taking the pulse of the quantitative PCR field.

- Krain AL & Castellanos FX (2006). Brain development and ADHD. *Clin Psychol Rev*, 26, 433-44.
- Krause J (2008). SPECT and PET of the dopamine transporter in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Expert Rev Neurother*, 8, 611-25.
- Krause KH, Dresel SH, Krause J, Kung HF & Tatsch K (2000). Increased striatal dopamine transporter in adult patients with attention deficit hyperactivity disorder: effects of methylphenidate as measured by single photon emission computed tomography. *Neuroscience letters*, 285, 107-10.
- Kuhl PK, Coffey-Corina S, Padden D & Dawson G (2005). Links between social and linguistic processing of speech in preschool children with autism: behavioral and electrophysiological measures. *Developmental science*, 8, F1-F12.
- Kwak YT, Koo MS, Choi CH & Sunwoo I (2001). Change of dopamine receptor mRNA expression in lymphocyte of schizophrenic patients. *BMC medical genetics*, 2, 3.
- Lehmkuhl G, Konrad K & Döpfner M (2007). Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS). In Herpertz-Dahlmann, Resch, Schulte-Markwort, Warnke (eds) *Entwicklungspsychiatrie - Biopsychologische Grundlagen und die Entwicklung psychischer Störungen*. Schattauer, Stuttgart, pp. S. 674 - 93.
- Lepisto T, Kajander M, Vanhala R, Alku P, Huotilainen M, Naatanen R & Kujala T (2008). The perception of invariant speech features in children with autism. *Biol Psychol*, 77, 25-31.
- Lepisto T, Kujala T, Vanhala R, Alku P, Huotilainen M & Naatanen R (2005). The discrimination of and orienting to speech and non-speech sounds in children with autism. *Brain research*, 1066, 147-57.
- Leyfer OT, Folstein SE, Bacalman S, Davis NO, Dinh E, Morgan J, Tager-Flusberg H & Lainhart JE (2006). Comorbid psychiatric disorders in children with autism: interview development and rates of disorders. *J Autism Dev Disord*, 36, 849-61.
- Li D, Sham PC, Owen MJ & He L (2006a). Meta-analysis shows significant association between dopamine system genes and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Hum Mol Genet*, 15, 2276-84.
- Li J, Wang Y, Zhou R, Zhang H, Yang L, Wang B & Faraone SV (2006b). Association between tryptophan hydroxylase gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder in Chinese Han population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 141B, 126-9.
- Li S, Cullen WK, Anwyl R & Rowan MJ (2003). Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nat Neurosci*, 6, 526-31.
- Liao IH, Corbett BA, Gilbert DL, Bunge SA & Sharp FR (2010). Blood gene expression correlated with tic severity in medicated and unmedicated patients with Tourette Syndrome. *Pharmacogenomics*, 11, 1733-41.
- Liu L, Yuan G, Cheng Z, Zhang G, Liu X & Zhang H (2013). Identification of the mRNA Expression Status of the Dopamine D2 Receptor and Dopamine Transporter in Peripheral Blood Lymphocytes of Schizophrenia Patients. *PLoS One*, 8, e75259.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.

Lowe N, Kirley A, Hawi Z, Sham P, Wickham H, Kratochvil CJ, Smith SD, Lee SY, Levy F, Kent L, Middle F, Rohde LA, Roman T, Tahir E, Yazgan Y, Asherson P, Mill J, Thapar A, Payton A, Todd RD, Stephens T, Ebstein RP, Manor I, Barr CL, Wigg KG, Sinke RJ, Buitelaar JK, Smalley SL, Nelson SF, Biederman J, Faraone SV & Gill M (2004). Joint analysis of the DRD5 marker concludes association with attention-deficit/hyperactivity disorder confined to the predominantly inattentive and combined subtypes. *Am J Hum Genet*, 74, 348-56.

Lyall K, Pauls DL, Spiegelman D, Ascherio A & Santangelo SL (2012a). Pregnancy complications and obstetric suboptimality in association with autism spectrum disorders in children of the Nurses' Health Study II. *Autism Res*, 5, 21-30.

Lyall K, Pauls DL, Spiegelman D, Ascherio A & Santangelo SL (2012b). Pregnancy complications and obstetric suboptimality in association with autism spectrum disorders in children of the Nurses' Health Study II. *Autism Res*, 5, 21-30.

Mackay IM (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*, 10, 190-212.

Mann JR, Mcdermott S, Bao H, Hardin J & Gregg A (2010). Pre-eclampsia, birth weight, and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord*, 40, 548-54.

Marazziti D, Muratori F, Cesari A, Masala I, Baroni S, Giannaccini G, Dell'osso L, Cosenza A, Pfanner P & Cassano GB (2000). Increased density of the platelet serotonin transporter in autism. *Pharmacopsychiatry*, 33, 165-8.

Matson JL & Nebel-Schwalm MS (2007). Comorbid psychopathology with autism spectrum disorder in children: an overview. *Res Dev Disabil*, 28, 341-52.

Mccann D, Barrett A, Cooper A, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K, Kitchin E, Lok K, Porteous L, Prince E, Sonuga-Barke E, Warner JO & Stevenson J (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 370, 1560-7.

Mckenna F, Mclaughlin PJ, Lewis BJ, Sibbring GC, Cummerson JA, Bowen-Jones D & Moots RJ (2002). Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *J Neuroimmunol*, 132, 34-40.

Mcnamara IM, Borella AW, Bialowas LA & Whitaker-Azmitia PM (2008). Further studies in the developmental hyperserotonemia model (DHS) of autism: social, behavioral and peptide changes. *Brain research*, 1189, 203-14.

Mehler-Wex C, Duvigneau JC, Hartl RT, Ben-Shachar D, Warnke A & Gerlach M (2006). Increased mRNA levels of the mitochondrial complex I 75-kDa subunit. A potential peripheral marker of early onset schizophrenia? *European child & adolescent psychiatry*, 15, 504-7.

Melchers P & Preuß U (2009). Kaufman Assessment Battery for Children, dt. Version (K-ABC). Pearson Assessment, Frankfurt /Main.

Merrill RM, Lyon JL, Baker RK & Gren LH (2009). Attention deficit hyperactivity disorder and increased risk of injury. *Adv Med Sci*, 54, 20-6.

Mill J, Sagvolden T & Asherson P (2005). Sequence analysis of Drd2, Drd4, and Dat1 in SHR and WKY rat strains. *Behavioral and brain functions* : BBF, 1, 24.

Mulder EJ, Anderson GM, Kema IP, De Bildt A, Van Lang ND, Den Boer JA & Minderaa RB (2004). Platelet serotonin levels in pervasive developmental disorders and mental retardation:

diagnostic group differences, within-group distribution, and behavioral correlates. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 43, 491-9.

Mulligan A, Anney RJ, O'regan M, Chen W, Butler L, Fitzgerald M, Buitelaar J, Steinhausen HC, Rothenberger A, Minderaa R, Nijmeijer J, Hoekstra PJ, Oades RD, Roeyers H, Buschgens C, Christiansen H, Franke B, Gabriels I, Hartman C, Kuntsi J, Marco R, Meidad S, Mueller U, Psychogiou L, Rommelse N, Thompson M, Uebel H, Banaschewski T, Ebstein R, Eisenberg J, Manor I, Miranda A, Mulas F, Sergeant J, Sonuga-Barke E, Asherson P, Faraone SV & Gill M (2009). Autism symptoms in Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: a familial trait which correlates with conduct, oppositional defiant, language and motor disorders. *J Autism Dev Disord*, 39, 197-209.

Nickl-Jockschat T & Michel TM (2011). [Genetic and brain structure anomalies in autism spectrum disorders. Towards an understanding of the aetiopathogenesis?]. *Nervenarzt*, 82, 618-27.

Noain D, Avale ME, Wedemeyer C, Calvo D, Peper M & Rubinstein M (2006). Identification of brain neurons expressing the dopamine D4 receptor gene using BAC transgenic mice. *Eur J Neurosci*, 24, 2429-38.

Noterdaeme M (2011). [Autism spectrum disorders - an overview of the current research status]. *Klin Padiatr*, 223 Suppl 1, E1-15.

Noterdaeme M & Enders A (2010). *Autismus-Spektrum-Störungen (ASS). Ein integratives Lehrbuch für die Praxis.* Kohlhammer, Stuttgart.

Oldenhof J, Vickery R, Anafi M, Oak J, Ray A, Schoots O, Pawson T, Von Zastrow M & Van Tol HH (1998). SH3 binding domains in the dopamine D4 receptor. *Biochemistry*, 37, 15726-36.

Park A, Sher KJ, Todorov AA & Heath AC (2011). Interaction between the DRD4 VNTR polymorphism and proximal and distal environments in alcohol dependence during emerging and young adulthood. *J Abnorm Psychol*, 120, 585-95.

Park TW, Park YH, Kwon HJ & Lim MH (2013). Association between TPH2 gene polymorphisms and attention deficit hyperactivity disorder in Korean children. *Genet Test Mol Biomarkers*, 17, 301-6.

Petermann F & Petermann U (eds) (2008) *Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Kinder - IV (HAWIK-IV).* Huber, Bern.

Pfaffl MW (2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, 92-95.

Pfaffl MW (2006). Relative quantification. In Dorak (ed) *Real-Time PCR (BIOS Advanced Methods).* International University Line, pp. 63-82.

Pinto-Martin JA, Levy SE, Feldman JF, Lorenz JM, Paneth N & Whitaker AH (2011). Prevalence of autism spectrum disorder in adolescents born weighing <2000 grams. *Pediatrics*, 128, 883-91.

Pliszka SR (2005). The neuropsychopharmacology of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*, 57, 1385-90.

Polanczyk G, De Lima MS, Horta BL, Biederman J & Rohde LA (2007). The worldwide prevalence of ADHD: a systematic review and metaregression analysis. *Am J Psychiatry*, 164, 942-8.

Polymeropoulos MH, Xiao H & Merrill CR (1991). The human D5 dopamine receptor (DRD5) maps on chromosome 4. *Genomics*, 11, 777-8.

Preanalytix (2008). PAXgene™ Blood RNA Kit 50 Handbook. PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon.

Prince J (2008). Catecholamine dysfunction in attention-deficit/hyperactivity disorder: an update. *J Clin Psychopharmacol*, 28, S39-45.

Rasalam AD, Hailey H, Williams JH, Moore SJ, Turnpenny PD, Lloyd DJ & Dean JC (2005a). Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Developmental medicine and child neurology*, 47, 551-5.

Rasalam AD, Hailey H, Williams JH, Moore SJ, Turnpenny PD, Lloyd DJ & Dean JC (2005b). Characteristics of fetal anticonvulsant syndrome associated autistic disorder. *Dev Med Child Neurol*, 47, 551-5.

Remschmidt H & Kamp-Becker I (2008). Tiefgreifende Entwicklungsstörungen: Autismus-Spektrum-Störungen Therapie psychischer Störungen bei Kindern und Jugendlichen. Ein integratives Lehrbuch für die Praxis. Thieme, Stuttgart, New York, pp. 134-47.

Renner TJ, Gerlach M, Romanos M, Herrmann M, Reif A, Fallgatter AJ & Lesch KP (2008). [Neurobiology of attention-deficit hyperactivity disorder]. *Nervenarzt*, 79, 771-81.

Rocc P, De Leo C, Eva C, Marchiaro L, Milani AM, Musso R, Ravizza L, Zanalda E & Bogetto F (2002). Decrease of the D4 dopamine receptor messenger RNA expression in lymphocytes from patients with major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 26, 1155-60.

Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S & Romano J (1996). Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J Comp Neurol*, 370, 247-61.

Rodrigues KP, Souza PA, Lima PM, Dutra WO, Correa H & Romano-Silva MA (2005). Expression of D3 and D4 dopamine receptors in leukocytes is related to schizophrenic symptoms. *Schizophr Res*, 80, 363-5.

Rodriguez A, Miettunen J, Henriksen TB, Olsen J, Obel C, Taanila A, Ebeling H, Linnert KM, Moilanen I & Jarvelin MR (2008). Maternal adiposity prior to pregnancy is associated with ADHD symptoms in offspring: evidence from three prospective pregnancy cohorts. *Int J Obes (Lond)*, 32, 550-7.

Rommelse NN, Franke B, Geurts HM, Hartman CA, Buitelaar JK (2010) Shared heritability of attention-deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 19:281–295

Ruehl D, Boelte S, Feineis-Matthews S & Poustka F (2004). ADOS – Diagnostische Beobachtungsskala fuer Autistische Stoerungen. Huber, Bern.

Rutter M, Kreppner J, Croft C, Murin M, Colvert E, Beckett C, Castle J & Sonuga-Barke E (2007). Early adolescent outcomes of institutionally deprived and non-deprived adoptees. III. Quasi-autism. *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, 48, 1200-7.

Schultz RT, Gauthier I, Klin A, Fulbright RK, Anderson AW, Volkmar F, Skudlarski P, Lacadie C, Cohen DJ & Gore JC (2000). Abnormal ventral temporal cortical activity during face discrimination among individuals with autism and Asperger syndrome. *Archives of general psychiatry*, 57, 331-40.

Senju A (2012). Spontaneous theory of mind and its absence in autism spectrum disorders. *Neuroscientist*, 18, 108-13.

Sherrington R, Mankoo B, Attwood J, Kalsi G, Curtis D, Buetow K, Povey S & Gurling H (1993). Cloning of the human dopamine D5 receptor gene and identification of a highly polymorphic microsatellite for the DRD5 locus that shows tight linkage to the chromosome 4p reference marker RAF1P1. *Genomics*, 18, 423-5.

Simonoff E, Pickles A, Charman T, Chandler S, Loucas T & Baird G (2008). Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 47, 921-9.

Stergiakouli E, Hamshere M, Holmans P, Langley K, Zaharieva I, De CG, Psychiatric GC, Hawi Z, Kent L, Gill M, Williams N, Owen MJ, O'donovan M & Thapar A (2012). Investigating the contribution of common genetic variants to the risk and pathogenesis of ADHD. *Am J Psychiatry*, 169, 186-94.

Stiensmeier-Pelster J, Schürmann M & Duda K (2000). *Depressions-Inventar für Kinder und Jugendliche (DIKJ)*. Handanweisung (2., überarb. und neunormierte Auflage). Hogrefe, Göttingen.

Sullivan PF, Fan C & Perou CM (2006). Evaluating the comparability of gene expression in blood and brain. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 141B, 261-8.

Sunahara RK, Guan HC, O'dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HH & Niznik HB (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature*, 350, 614-9.

Suzuki T, Higgins PJ & Crawford DR (2000). Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*, 29, 332-7.

Sweeten TL, Posey DJ & Mcdougale CJ (2004). Brief report: autistic disorder in three children with cytomegalovirus infection. *Journal of autism and developmental disorders*, 34, 583-6.

Taurines R, Schmitt J, Renner T, Conner AC, Warnke A & Romanos M (2010). Developmental comorbidity in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Atten Defic Hyperact Disord*, 2, 267-89.

Taurines R, Schwenck C, Westerwald E, Sachse M, Siniatchkin M & Freitag C (2012). ADHD and autism: differential diagnosis or overlapping traits? A selective review. *Atten Defic Hyperact Disord*, 4, 115-39.

Thapar A, Cooper M, Eyre O & Langley K (2013). What have we learnt about the causes of ADHD? *Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines*, 54, 3-16.

Thome J, Ehlis AC, Fallgatter AJ, Krauel K, Lange KW, Riederer P, Romanos M, Taurines R, Tucha O, Uzbekov M & Gerlach M (2012). Biomarkers for attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD). A consensus report of the WFSBP task force on biological markers and the World Federation of ADHD. *World J Biol Psychiatry*, 13, 379-400.

Tuchman R (2000). Treatment of seizure disorders and EEG abnormalities in children with autism spectrum disorders. *Journal of autism and developmental disorders*, 30, 485-9.

Tuchman R & Rapin I (2002). Epilepsy in autism. *Lancet Neurol*, 1, 352-8.

- Urhan-Kucuk M, Erdal ME, Ozen ME, Kul S & Herken H (2011). Is the dopamine D3 receptor mRNA on blood lymphocytes help to for identification and subtyping of schizophrenia? *Mol Biol Rep*, 38, 2569-72.
- Van Der Weide J, Ls WS, Van Der Geld MA & De Groot PA (2003). D3 dopamine receptor mRNA expression in lymphocytes: a peripheral marker for schizophrenia? *Acta Neuropsychiatr*, 15, 91-3.
- Van Der Zwaluw CS, Larsen H & Engels RC (2012). Best friends and alcohol use in adolescence: the role of the dopamine D4 receptor gene. *Addict Biol*, 17, 1036-45.
- Van Tol HH, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB & Civelli O (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature*, 350, 610-4.
- Van Tol HH, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB & Jovanovic V (1992). Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature*, 358, 149-52.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A & Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3, RESEARCH0034.
- Vanguilder HD, Vrana KE & Freeman WM (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, 44, 619-26.
- Veenstra-Vanderweele J, Cook E, Jr. & Lombroso PJ (2003). Genetics of childhood disorders: XLVI. Autism, part 5: genetics of autism. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 42, 116-8.
- Veenstra-Vanderweele J & Cook EH, Jr. (2004). Molecular genetics of autism spectrum disorder. *Molecular psychiatry*, 9, 819-32.
- Vogel M, Pfeifer S, Schaub RT, Grabe HJ, Barnow S, Freyberger HJ & Cascorbi I (2004). Decreased levels of dopamine D3 receptor mRNA in schizophrenic and bipolar patients. *Neuropsychobiology*, 50, 305-10.
- Walitza S, Renner TJ, Dempfle A, Konrad K, Wewetzer C, Halbach A, Herpertz-Dahlmann B, Remschmidt H, Smidt J, Linder M, Flierl L, Knolker U, Friedel S, Schafer H, Gross C, Hebebrand J, Warnke A & Lesch KP (2005). Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol Psychiatry*, 10, 1126-32.
- Walitza S, Romanos M, Seifert J, Warnke A & Gerlach M (2009). Psychostimulanzien. . In Springer (ed) *Neuro-Psychopharmaka im Kindes- und Jugendalter. Grundlagen und Therapie.*, Wien, pp. pp 289–318.
- Walther DJ & Bader M (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol*, 66, 1673-80.
- Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hortnagl H, Voits M, Fink H & Bader M (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299, 76.
- Wei J, Chu C, Wang Y, Yang Y, Wang Q, Li T, Zhang L & Ma X (2012). Association study of 45 candidate genes in nicotine dependence in Han Chinese. *Addict Behav*, 37, 622-6.

Weiß RH (1998). CFT 20, Grundintelligenztest Skala 2 mit Wortschatztest und Zahlenfolgentest. Hogrefe Göttingen.

Whitaker-Azmitia PM (2005). Behavioral and cellular consequences of increasing serotonergic activity during brain development: a role in autism? *Int J Dev Neurosci*, 23, 75-83.

Williams NM, Franke B, Mick E, Anney RJ, Freitag CM, Gill M, Thapar A, O'donovan MC, Owen MJ, Holmans P, Kent L, Middleton F, Zhang-James Y, Liu L, Meyer J, Nguyen TT, Romanos J, Romanos M, Seitz C, Renner TJ, Walitza S, Warnke A, Palmason H, Buitelaar J, Rommelse N, Vasquez AA, Hawi Z, Langley K, Sergeant J, Steinhausen HC, Roeyers H, Biederman J, Zaharieva I, Hakonarson H, Elia J, Lionel AC, Crosbie J, Marshall CR, Schachar R, Scherer SW, Todorov A, Smalley SL, Loo S, Nelson S, Shtir C, Asherson P, Reif A, Lesch KP & Faraone SV (2012). Genome-wide analysis of copy number variants in attention deficit hyperactivity disorder: the role of rare variants and duplications at 15q13.3. *Am J Psychiatry*, 169, 195-204.

Wu J, Xiao H, Sun H, Zou L & Zhu LQ (2012). Role of Dopamine Receptors in ADHD: A Systematic Meta-analysis. *Mol Neurobiol*.

Yamashita Y, Fujimoto C, Nakajima E, Isagai T & Matsuishi T (2003). Possible association between congenital cytomegalovirus infection and autistic disorder. *Journal of autism and developmental disorders*, 33, 455-9.

Yang JW, Jang WS, Hong SD, Ji Yi, Kim DH, Park J, Kim SW & Joung YS (2008). A case-control association study of the polymorphism at the promoter region of the DRD4 gene in Korean boys with attention deficit-hyperactivity disorder: evidence of association with the -521 C/T SNP. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32, 243-8.

Yao Y, Schroder J & Karlsson H (2008). Verification of proposed peripheral biomarkers in mononuclear cells of individuals with schizophrenia. *J Psychiatr Res*, 42, 639-43.

Zvara A, Szekeres G, Janka Z, Kelemen JZ, Cimmer C, Santha M & Puskas LG (2005). Over-expression of dopamine D2 receptor and inwardly rectifying potassium channel genes in drug-naïve schizophrenic peripheral blood lymphocytes as potential diagnostic markers. *Dis Markers*, 21, 61-9.

Danksagung

Ich möchte allen Personen, die mich während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben, an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Als erstes gebührt der Dank meinem Doktorvater Prof. em. Dr. Andreas Warnke für die freundliche Überlassung des Doktorarbeitsthemas.

Weiterhin danke ich sehr herzlich Herrn Thomas Elpel und seinem Team für die tatkräftige Unterstützung im Labor, Frau Annette Nowak für die Hilfe bei der Rekrutierung der jungen Patientinnen und Patienten und allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universitätsklinik Würzburg sowie der Tagesklinik Würzburg für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie für die überaus freundliche Unterstützung und organisatorischen Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für die intensive Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Dr. Martin Schecklmann von der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Universität Regensburg.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Marcel Romanos und in besonderem Maße Frau PD Dr. Regina Taurines bin ich zu äußerstem Dank verpflichtet. Ihre fortwährende, kompetente und überaus freundliche Hilfestellung bei Problemen jeglicher Art rund um diese Arbeit ermöglichte überhaupt erst deren Umsetzung in die Realität.

Meiner Familie, besonders aber meinen Eltern und meiner Oma, sowie meiner Frau Juliane bin ich für den stets wohlwollenden und uneingeschränkten Rückhalt, der mir nicht nur während meines Studiums und der Promotion zuteilwurde, von ganzem Herzen dankbar.

