

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

Direktor: Professor Dr. med. J. Deckert

Assoziationsstudien zur Untersuchung der Bedeutung
verschiedener Polymorphismen der serotonergen Gene
FEV und *TPH2* für affektive Störungen und adultes ADHS

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lena Bartke

aus Bochum

Würzburg, Juli 2016

Referent: PD Dr. rer. nat. Angelika Schmitt-Böhrer

Koreferent: Prof. Dr. med. Marcel Romanos

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:
23.2.2018

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	3
2.1	Das serotonerge System	3
2.1.1	Vorkommen, Wirkung und Bedeutung von Serotonin.....	3
2.1.2	Anatomie des zentralen serotonergen Systems	4
2.1.3	Biochemie – Synthese und Abbau von Serotonin	5
2.1.4	Serotonerge Neurotransmission	7
2.1.5	Die Rolle des serotonergen Systems in der Hirnentwicklung.....	9
2.1.6	Der ETS-Transkriptionsfaktor FEV	12
2.1.7	Das Kandidatengen <i>TPH2</i>	16
2.2	Psychische Erkrankungen.....	17
2.2.1	Affektive Störungen	17
2.2.2	ADHS im Erwachsenenalter	23
2.3	Formen des Studiendesigns und Begriffe der genetischen Epidemiologie	28
3	Fragestellung	30
3.1	Einzelmarker- und Haplotyp-Assoziationsstudie des Kandidatengens <i>FEV</i> ...	30
3.2	Einzelmarker- und Haplotyp-Assoziationsstudie des Kandidatengens <i>TPH2</i> .	31
4	Material und Methoden	32
4.1	Material	32
4.1.1	Stichproben zur Untersuchung von <i>FEV</i> -Polymorphismen	32
4.1.2	Stichproben zur Untersuchung von <i>TPH2</i> -Polymorphismen.....	33
4.1.3	Oligodesoxynukleotide.....	35
4.1.4	Desoxynukleotide.....	36
4.1.5	Enzyme.....	36
4.1.6	Puffer.....	36
4.1.7	Weitere Substanzen	37
4.1.8	Geräte inklusive ggf. dazugehöriger Programme.....	39
4.2	Methoden.....	40
4.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
4.2.2	Restriktionsenzym-Verdau	43
4.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	44

4.2.4	Detaillierte Reaktionsansätze der PCR- und Restriktionsenzym-Verdau- Untersuchungen.....	45
4.2.5	Minisequenzierung	48
4.2.6	Genotypisierung mittels MALDI-ToF MS (MassARRAY®)-Methode.....	51
4.2.7	Sequenzierung	53
4.2.8	Statistische Methoden.....	56
5	Ergebnisse	58
5.1	<i>FEV</i>	58
5.1.1	Genotypanalyse des SNP <i>rs452985</i>	58
5.1.2	Genotypanalyse des SNP <i>rs16859448</i>	60
5.1.3	Genotypanalyse des SNP <i>rs860573</i>	60
5.1.4	Einzelmarker-Assoziationsanalyse.....	62
5.1.5	Haplotyp-Assoziationsanalyse	62
5.1.6	Sequenzierung	64
5.2	<i>TPH2</i>	64
5.2.1	Genotypanalyse des SNP <i>rs4570625</i>	64
5.2.2	Genotypanalyse des SNP <i>rs11178997</i>	65
5.2.3	Einzelmarker-Assoziationstest	66
5.2.4	Haplotyp-Assoziationstest.....	67
6	Diskussion	68
6.1	Das Kandidatengen <i>FEV</i>	68
6.1.1	Bestimmte <i>FEV</i> -Genvarianten zeigen keine Assoziation mit der unipolaren Depression und der bipolaren Störung	68
6.1.2	Die Rolle von <i>FEV</i> als Kandidatengen.....	68
6.1.3	Depression ist eine komplexe Störung	70
6.1.4	Bewertung der Assoziationsstudien	71
6.1.5	Die Herausforderungen durch phänotypische und genetische Heterogenität ..	72
6.1.6	<i>FEV</i> ist ein stark konserviertes Gen	74
6.2	Das Kandidatengen <i>TPH2</i>	76
7	Zusammenfassung	81
8	Literaturverzeichnis.....	83

Abkürzungsverzeichnis

5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HT	5-Hydroxytryptophan (Serotonin)
5-HTR	5-HT- (Serotonin) Rezeptor
5-HTT	5-HT- (Serotonin) Transporter
<i>5-HTTLPR</i>	<i>5-HTT linked polymorphic region</i>
AADC	aromatische L-Aminosäure Decarboxylase
aADHS	adultes Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom
ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom
AMDP	Arbeitsgemeinschaft für Methodik und Dokumentation in der Psychiatrie
BDI	Beck Depression Inventory
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
bp	Basenpaare
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
ddNTPs	Didesoxynukleotidtriphosphate
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DSM IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (American Psychiatric Association, APA)</i>
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETS	Erythroblastosisvirus E 26 (<i>twenty six</i>)
F	<i>forward</i>
FEV	<i>fifth ewing variant</i>
FTQ	Fagerström Tolerance Questionnaire
GABA	γ-Aminobuttersäure
GWA /GWAS	<i>genome wide association / genome wide association study</i>

HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium (Gleichgewicht)
ICD-10	<i>International Classification of Diseases</i> (WHO)
IQ	Intelligenz Quotient
KO	Knockout
LD	Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
M	Molar
MALDI-ToF MS	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight</i> Massenspektrometrie
MAO	Monoaminoxidase
mbar	millibar
MD	<i>Major Depression</i>
MDE	Manisch depressive Erkrankung
min	Minute
Ncl.	Nucleus
NEO-PI-R	NEO Personality Inventory
PCR	Polymerase-Ketten-(<i>chain</i>)-Reaktion
Pet-1	<i>plasmacytoma expressed trascription factor 1</i>
pPNET	peripher Primitiver Neuroektodermaler Tumor
QTL	<i>quantitative trait loci</i>
R	<i>reverse</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunde(n)
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SBE	<i>single base extension</i> (Einzelbasen-Extension)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SIDS	<i>sudden infant death syndrome</i> (Plötzlicher Kindstod)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (Einzelbasen-Polymorphismus)
SPECT	<i>Single-photon emission computed tomography</i> (Einzelphotonen-emissionscomputertomographie)
SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahme (<i>Reuptake</i>)-Inhibitoren
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i> (Bakterium)

TPH	Tryptophanhydroxylase
TPQ	Tridimensional Personality Questionnaire
U	<i>units</i> (Einheit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
WURS-k	Wender-Utah-Rating Scale (Kurzfassung)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Die Erbllichkeit psychischer Erkrankungen, beispielsweise der affektiven Störungen und des Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätssyndroms (ADHS), ist seit langem bekannt (Lesch, 2004; Levinson, 2006; Renner et al., 2008). Die modernen, auf objektivierten Kriterien basierenden Forschungsergebnisse zeigen übereinstimmend die ätiologische Bedeutung genetischer Faktoren. Doch den wenigsten Krankheiten mit deutlicher genetischer Komponente liegen monogenetische Störungen zugrunde, sodass die Vererbung nur in seltensten Fällen den klassischen Mendelschen Regeln folgt. Vielmehr handelt es sich nach heutiger Ansicht bei der Mehrzahl der Störungen, wie auch gerade bei den hier behandelten psychiatrischen Erkrankungen, um komplexe genetische Erbgänge, deren Aufklärung sich aufgrund einer Fülle potenziell ursächlicher Gene ungleich schwieriger gestaltet (Lesch, 2004). Dennoch haben es die Fortschritte der Molekulargenetik ermöglicht, auch für komplexe genetische Störungen einzelne beteiligte Gene zu identifizieren, und es konnte darüber hinaus auch ihre Beeinflussung durch Umweltfaktoren nachgewiesen werden. Von der Identifikation solcher für die Ätiopathogenese einzelner psychischer Erkrankungen bedeutsamer Gene erhofft man sich nicht nur ein besseres Verständnis dieser Störungen und ihrer neurobiologischen Korrelate. Ziel ist es auch, Subtypen und unterschiedliche Erscheinungsformen der einzelnen Krankheitsbilder zu identifizieren, um diese dann letztendlich besser voneinander abgrenzen zu können. So könnte die Validität psychiatrischer Diagnosen erhöht und eine genauere Klassifizierung ermöglicht werden. Zudem bietet sich mit einem solchen Wissen unter Umständen die Möglichkeit, Medikamente zu entwickeln, welche im Vergleich zu der heute verfügbaren Pharmakotherapie noch spezifischer wirken, um damit dem Ziel einer individuelleren und nebenwirkungsärmeren Pharmakotherapie näher zu kommen.

Die vorliegende Arbeit reiht sich in eine große Anzahl von Arbeiten ein, die nach möglichen krankheitsrelevanten und ätiologisch bedeutsamen Genvarianten (hier: Einzelnukleotid-Polymorphismen, *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) im menschlichen Genom im Zusammenhang mit psychischen Erkrankungen suchen. Untersucht werden einerseits Störungen aus dem affektiven Formenkreis (unipolare Depression, manisch depressive Erkrankung, MDE) sowie andererseits das

Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom (ADHS). Hierfür wurde der Ansatz einer Assoziationsstudie mit zwei Kandidatengenen, dem *fifth ewing variant*-Gen (*FEV*-Gen) und dem Tryptophanhydroxylase 2-Gen (*TPH2*-Gen), gewählt. Beide Gene sind Komponenten des serotonergen Systems, dem – wie auch Erkenntnisse aus diversen Tiermodellen mit Veränderungen des serotonergen Systems zeigen - eine pathophysiologische Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der oben genannten psychischen Erkrankungen zugeschrieben wird.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Das serotonerge System

2.1.1 Vorkommen, Wirkung und Bedeutung von Serotonin

Vor etwas mehr als einem halben Jahrhundert wurde Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) unabhängig voneinander von zwei Forschern in relativ kurzem zeitlichem Abstand entdeckt, einerseits als eine die Motilität des Dünndarms anregende Substanz, genannt Enteramin (Erspamer, 1940), andererseits als ein aus dem Serum isolierbarer vasokonstriktiver Stoff, genannt Serotonin (Rapport et al., 1948). Die Entschlüsselung der chemischen Struktur zeigte im weiteren Verlauf, dass es sich bei beiden Substanzen um den gleichen Stoff handelte, der Name Serotonin setzte sich in der Wissenschaft durch (Whitaker-Azmitia, 1999). Der weitaus größte Teil des menschlichen Serotonins wird von den enterochromaffinen Zellen des Dünndarms produziert und kann sowohl in das Darmlumen als auch in das Portalblut abgegeben werden. Im Blut wird das zirkulierende freie Serotonin über einen aktiven Transportmechanismus in die Thrombozyten aufgenommen und gespeichert. Wird es aus diesen freigesetzt, entwickelt es seine vasokonstriktive Wirkung. Die wahrscheinlich folgenreichste Entdeckung war das Vorkommen von Serotonin im zentralen Nervensystem (ZNS). Serotonin wird hier einerseits von den Pinealozysten der phylogenetisch nicht zum Gehirn zählenden Epiphyse als Zwischenstufe der Melatonin-Biosynthese gebildet und andererseits von den zentralen serotonergen Neuronen exprimiert. Die Zellkörper der serotonergen Neurone gruppieren sich zu den die Nuclei raphes im Bereich des Hirnstamms. Ihre Leitungsbahnen bilden Projektionen in zahlreiche Hirnregionen und damit das weit reichende Netzwerk des serotonergen Systems. Dieses System ist mit seinen global-modulatorischen Eigenschaften für die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen den unterschiedlichen Hirnregionen unersetzlich (Hüther und Rüther, 2000).

Serotonerge Signaltransduktion ist der Hauptmodulator emotionalen Verhaltens, das Angst und Ängstlichkeit ebenso umfasst wie Aggression und Impulsivität. Der präfrontale Kortex, der bei emotional instabilen und eine erhöhte Stressreaktivität

aufweisenden Individuen dysfunktional erscheint, ist eines der Hauptprojektionsgebiete des serotonergen Systems (Lesch et al., 2003).

2.1.2 Anatomie des zentralen serotonergen Systems

Die Somata der serotonergen Neuronen sind in den Raphe-Nuclei lokalisiert, die sich um die Mittellinie (*griech.* raphe = Naht) des Hirnstamms gruppieren. Ihre Projektionen erreichen nahezu alle Bereiche des ZNS. Die Neurone des rostralen Raphekomplexes (dorsale und mediane Raphe) innervieren die Region des lateralen Vorderhirns (Basalganglien, Amygdala, Ncl. accumbens), des medialen Vorderhirns (cingulärer Cortex, Septum, Hippocampus), des periventrikulären Systems (Colliculi inferior und superior, Thalamus, Hypothalamus), des Cortex, sowie die Substantia nigra, den Ncl. supraopticus, das Corpus mammillare und den Ncl. interpedunculus. Durch sie werden also vor allem das limbische System und sensorische Areale des Cortex reguliert. Das serotonerge System nimmt damit unter anderem Einfluss auf emotionales und soziales Verhalten, Ess- und Sexualverhalten, den Schlaf-Wach-Rhythmus und die Thermoregulation, sowie auf die Regulation von Gedächtnisbildung, Stimmung, Kognition und die Kontrolle des Angstverhaltens (Kriegebaum et al., 2010b). Im Gegensatz dazu projizieren die Neurone des caudalen Raphekomplexes (Ncl. raphe magnus, Ncl. raphe obscurus, Ncl. raphe pallidus und Teile der angrenzenden lateralen Formatio reticularis) in das Rückenmark und das Kleinhirn. Im Rückenmark innervieren sie zum einen die Motoneurone des Vorderhorns, zum anderen synaptische Verbindungen zu afferenten Schmerzfasern des Hinterhorns sowie die spinalen trigeminalen Kerne. Damit beteiligen sie sich an der Schmerzwahrnehmung und der Tonusregulation des motorischen Systems (Hüther und Rüter, 2000; Hornung, 2003). Ihre wichtigsten Afferenzen erhalten die dorsalen und medialen Raphe-Kerne aus Regionen des limbischen Systems, die unterschiedlichen Transmittersystemen angehören (z.B. glutamaterge, GABAerge Innervation) und wiederum zu ihren eigenen Zielgebieten zählen (Hornung, 2003). Die caudale Gruppe erhält Afferenzen aus Teilen des Hypothalamus, der Amygdala, dem zentralen Höhlengrau, der Stria terminalis und der Formatio reticularis. Außerdem enden hier auch katecholaminerge spinale Projektionen und viszeral-sensorische Afferenzen (Hüther und Rüter, 2000; Hornung,

2003). Die anatomische Lage der Nuclei raphe und ihrer Projektionsbahnen in verschiedene Zielgebiete wird in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

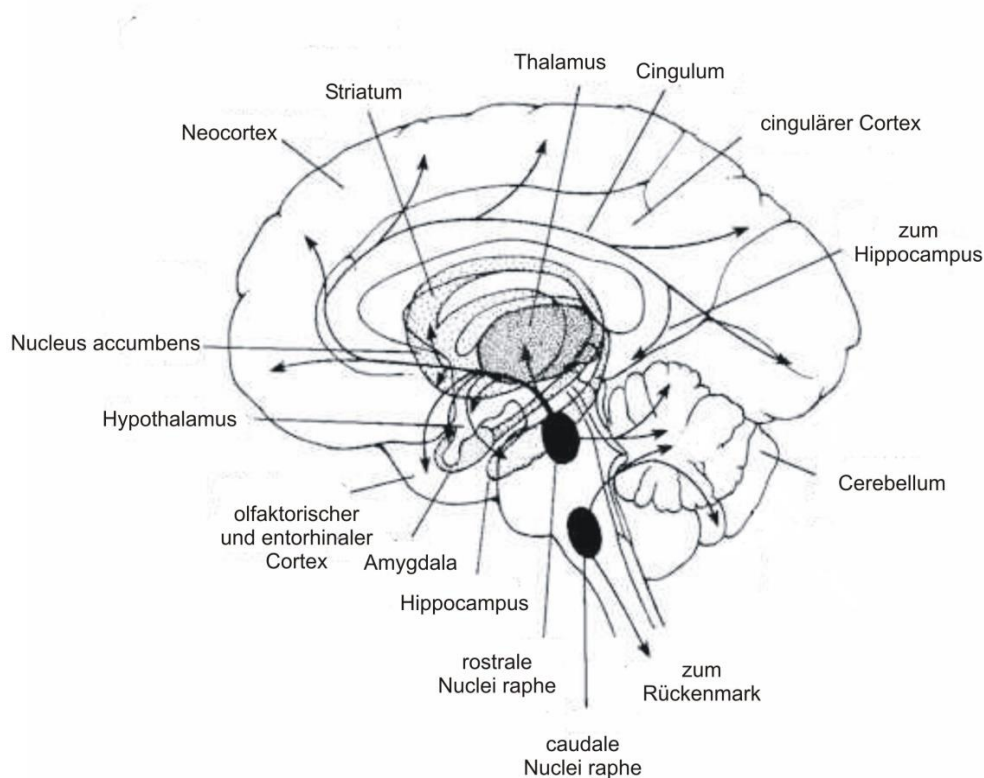


Abbildung 1: Das serotonerge System: Schematische Darstellung der humanen Raphe-Kerne und ihrer Projektionsbahnen (nach Birbaumer und Schmidt, 1999)

2.1.3 Biochemie – Synthese und Abbau von Serotonin

Ausgangsstoff für die Serotonin-Biosynthese bildet die essentielle Aminosäure L-Tryptophan. Sie wird mit der Nahrung aufgenommen und zu 80-90% an Albumin gebunden im Blut transportiert. Nur ein geringer Teil liegt frei im Plasma vor, kann also die Blut-Hirn-Schranke überwinden und somit von den Serotonin-produzierenden Zellen aufgenommen werden. Peripher gebildetes Serotonin kann die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden, sodass es von den serotonergen Neuronen selbst synthetisiert werden muss. In Abbildung 2 wird der Synthese- und Abbauweg des Serotonins zusammenfassend mit allen Zwischenprodukten sowie den beteiligten Enzymen dargestellt. Das erste und geschwindigkeitsbegrenzende Enzym der Serotonin-Biosynthese ist die Tryptophanhydroxylase (TPH). Von ihr sind seit 2003

zwei Isoformen bekannt, TPH1 und TPH2, deren letztere hauptsächlich in den serotonergen Neuronen der Raphe-Kerne exprimiert wird (Walther und Bader, 2003; Zill et al., 2007b; Gutknecht et al., 2009). Gutknecht und Mitarbeiter konnten im Mausmodell nachweisen, dass in den serotonergen Neuronen ohne funktionelles TPH2-Enzym auch kein 5-HT mehr gebildet wird, woraus sich schließen lässt, dass die TPH1 im serotonergen System des ZNS keine physiologische Relevanz besitzt (Gutknecht et al., 2008; Gutknecht et al., 2009). Durch die von der TPH katalysierte Hydroxylierung entsteht 5-Hydroxytryptophan, das dann durch Decarboxylierung in 5-Hydroxytryptamin (5-HT) umgewandelt wird. Dieser zweite Schritt wird durch die aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) katalysiert.

Das synthetisierte Serotonin wird in Vesikeln gespeichert, ins synaptische Endknöpfchen transportiert und steht so für seine Ausschüttung in den synaptischen Spalt nach Eingang eines Aktionspotentials zur Verfügung. Befindet sich nicht gespeichertes Serotonin in der Zelle, wird durch die an die äußere mitochondriale Membran gebundene Monoaminoxidase (MAO) rasch sein Abbau eingeleitet. Dieses Enzym existiert in zwei Isoformen, MAO-A und MAO-B, und katalysiert den Abbau vieler Amine. Im ZNS sind vor allem die Katecholamine (Noradrenalin), aber auch das Indolamin Serotonin Substrate der MAO-A. Durch die von der MAO katalysierte oxidative Desaminierung entsteht aus 5-Hydroxytryptamin (5-HT) 5-Hydroxyindolacetaldehyd, das dann in einem zweiten Schritt entweder zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) oxidiert, oder, wenn auch seltener, zu 5-Hydroxytryptophol reduziert wird. Beide Produkte werden mit dem Urin ausgeschieden (Hüther und Rüter, 2000).

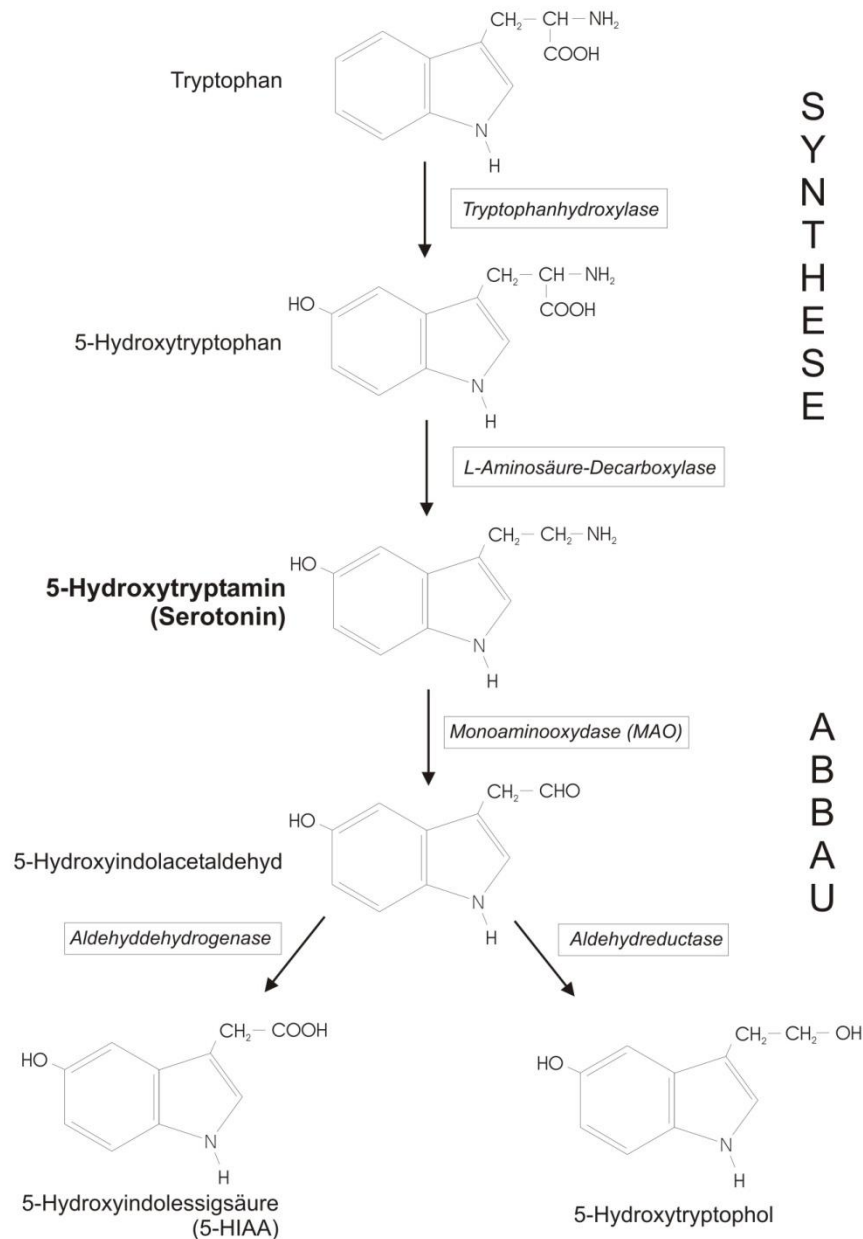


Abbildung 2: Darstellung der Serotoninsynthese und des Abbauweges sowie der daran beteiligten Enzyme nach (Hüther und Rüter, 2000; Lüllmann et al., 2003)

2.1.4 Serotonerge Neurotransmission

Synthetisiertes Serotonin wird mithilfe eines unspezifischen Monoamintransporters (Vesikulärer Monoamintransporter, VMAT) in präsynaptische Vesikel gespeichert. Kommt es zu einer Depolarisation des Neurons, werden diese Vesikel durch Kalzium-

vermittelte Kontraktionen des Zytoskeletts an die präsynaptische Membran verlagert, verschmelzen mit derselben und geben das in ihnen enthaltene Serotonin durch Exozytose in den synaptischen Spalt frei. Dort kann der Transmitterstoff über spezifische postsynaptische Rezeptoren das nachgeschaltete Effektorneuron modulieren. Aber auch das präsynaptische Neuron wird über dort lokalisierte Rezeptoren, die sog. Autorezeptoren, meist inhibitorisch reguliert. In den letzten Jahren wurden sieben verschiedene Rezeptorklassen (5-HT₁₋₇) beschrieben, von denen einzelne Klassen wiederum zahlreiche Subtypen (z.B. 5-HT_{1A}, _{1B}, _{1D}, _{1E}, _{1F}) besitzen. Die meisten dieser Rezeptoren weisen einen G-Protein-gekoppelten Transduktionsmechanismus auf, der wiederum entweder einen aktivierenden oder inhibierenden Effekt hat. Nur beim 5-HT₃-Rezeptor handelt es sich um einen ligandgesteuerten Ionenkanal. Auch die Lokalisation der einzelnen Rezeptoren entscheidet über die vermittelte Wirkung. So ist z.B. der 5-HT_{1A}-Rezeptor in den Raphekernen als Autorezeptor am terminalen Axon bzw. an der Präsynapse an der Regulation der Serotoninausschüttung beteiligt. Ein Fehlen dieser Autorezeptoren führte bei Mäusen zu einem vermehrt ängstlichen Verhalten, das auf einen erhöhten serotonergen Tonus aufgrund des fehlenden negativen Feedbacks zurückgeführt wird. Postsynaptisch initiiert der 5-HT_{1A}-Rezeptor als Heterorezeptor jedoch in Hippocampus, Septum und Amygdala eine neuronale Inhibition, die pharmakologischen Studien zufolge aggressives Verhalten sowohl beim Menschen als auch bei Nagetieren minimiert (Hüther und Rüter, 2000; Reif und Lesch, 2003).

Ebenfalls in der präsynaptischen Membran lokalisiert ist der Serotonintransporter (5-HTT), der für die Wiederaufnahme des in den synaptischen Spalt ausgeschütteten Serotonins und somit für die Beendigung des Signals zuständig ist. Durch einen aktiven Transportmechanismus wird das Serotonin über den 5-HTT mit hoher Affinität wieder in die Zelle aufgenommen und kann dort erneut in den Vesikeln gespeichert werden. Pharmakologisch stellt die Hemmung der Wiederaufnahme durch den 5-HTT mithilfe von selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (*selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRIs) oder auch durch trizyklische Antidepressiva eine effektive Therapie zahlreicher psychischer Erkrankungen dar, wie beispielsweise der Depression oder Angst- und Zwangsstörungen (Hüther und Rüter, 2000).

2.1.5 Die Rolle des serotonergen Systems in der Hirnentwicklung

Das serotonerge System wird sehr früh während der Hirnentwicklung angelegt und hat schon hier maßgeblich Einfluss auf die Reifungsprozesse anderer neuronaler Netzwerke (Hüther und Rüter, 2000). Auch nach Abschluss dieser ersten organisierenden Funktion ist das serotonerge System weiter an einer bis ins Erwachsenenalter erhaltenen synaptischen Neuroplastizität beteiligt und übernimmt vor allem stabilisierende und globalisierende Funktionen (Hüther und Rüter, 2000; Lesch, 2001). Somit kommt Serotonin neben seiner Bedeutung als Neurotransmitter auch eine wichtige Rolle als Regulator morphogenetischer Prozesse nicht nur während der frühen Gehirnentwicklung zu, sondern auch in der adulten Neurogenese (Lesch, 2001; Kriegebaum et al., 2010b). In der menschlichen Hirnentwicklung treten erste serotonerge Neuronen bereits in der fünften Gestationswoche in Erscheinung, bis zur zehnten Woche vermehren sie sich schnell und um die 15. Gestationswoche herum kann die typische Organisation der Somata serotonerger Neurone in den Raphe-Kernen nachgewiesen werden. In den ersten zwei Lebensjahren steigt der Serotoninlevel langsam und nimmt dann bis zum Erreichen adulter Werte ab dem 5. Lebensjahr wieder ab (Whitaker-Azmitia, 2001). Ergebnisse aus der Tierforschung lassen zudem vermuten, dass ein normaler Gehalt des mütterlichen peripheren 5-HT während der Schwangerschaft eine entscheidende Voraussetzung für eine gesunde embryonale Hirnentwicklung darstellt (Kriegebaum et al., 2010b).

Das Wirkungsspektrum von Serotonin reicht von Zellproliferation und -maturation über die Beeinflussung nicht neuronaler Zellen wie beispielsweise Astroglia, die eine integrale Rolle für die neuronale Plastizität einnehmen, bis hin zur Einleitung des programmierten Zelltodes, der Apoptose (Azmitia, 2001). Da Serotonin in sich entwickelnden serotonergen Neuronen noch vor Beginn der Neurotransmission oder Synaptogenese exprimiert wird, scheint es als Entwicklungssignal für embryonale rezepptive Zellen zu wirken (Lauder, 1990). Als morphogenetischer Faktor spielt Serotonin damit eine wesentliche organisierende Rolle in der Hirnentwicklung, da es Zellproliferation und -migration, morphologische und biochemische Differenzierung, axonales Wachstum und Synaptogenese sowohl der serotonergen Neurone der

Raphkerne als auch rezeptiver Zielzellen in den Projektionsgebieten beeinflusst (Lauder, 1990). Da Serotonin somit die Reifung der Neuronen in den Zielgebieten des serotonergen Systems reguliert, scheint die Menge an serotonergen Fasern, die in ein Gebiet einsprossen, ein Schlüssel für die weitere Entwicklung zu sein (Whitaker-Azmitia, 2001). Die das Wachstum regulierenden Effekte des Serotonins werden über die spezifischen 5-HT Rezeptor-Subtypen vermittelt. Hier wurden sowohl die Zellproliferation fördernde als auch hemmende Signaltransduktionswege gefunden. Ebenso scheint die Aktivierung des für Serotonin hochaffinen Serotonintransporters (5-HTT) eine Rolle in der Wachstumsregulation durch das serotonerge System zu spielen (Buznikov et al., 2001). Durch die Wiederaufnahme von Serotonin über den Serotonintransporter aus dem synaptischen Spalt wird dessen Wirkung beendet. Interessanterweise wird der Serotonintransporter während der fetalen Entwicklung in Gehirnregionen exprimiert, die für das emotionale Verhalten eine zentrale Rolle spielen, ist jedoch später dort nicht mehr nachweisbar, sodass auch hier vermutet wird, dass Genvarianten durch Veränderung der prä- und perinatale 5-HTT-Expression nachhaltig Einfluss auf für emotionale Prozesse relevante Strukturen besitzen (Reif und Lesch, 2003). 5-HT-Rezeptoren, 5-HTT und TPH spielen also nicht nur eine Rolle in der Entwicklung des eigenen Neurotransmittersystems, sondern modifizieren auch direkt oder indirekt die Entwicklung und Plastizität anderer Neurotransmittersysteme und gesamter neuronaler Netzwerke.

Darüber hinaus ist eine Vielzahl regulatorischer Gene an der Spezifizierung, Differenzierung und Ausprägung des Phänotyps des serotonergen Systems beteiligt. Diese umfassen Gene für verschiedene Transkriptionsfaktoren, neurotrophe Substanzen und Wachstumsfaktoren und die für die Serotonin-Synthese selbst kodierenden Gene (Lesch et al., 2003). In den letzten Jahren wurden mindestens sechs Transkriptionsfaktoren identifiziert, die in der Entwicklung der 5-HT-Neuronen und ihrer Vorläuferzellen eine Rolle spielen (Chen und Ding, 2006). Sie lassen sich entsprechend ihrer Expressionsprofile einteilen. Nkx2.2, Nkx6.1 und Mash1 werden beispielsweise benötigt, um 5-HT-Progenitorzellen zu erzeugen. Sie werden nur in diesen exprimiert und sind nach Abschluss des Zellzyklus in postmitotischen Zellen nicht mehr nachweisbar. Andere Transkriptionsfaktoren wie Gata2, Gata3, Lmx1b und Pet-1 sind hauptsächlich in postmitotischen 5-HT-Neuronen nachweisbar. Sie sind

nachfolgend notwendig, um durch Aktivierung serotonerger Markergene – hierzu zählen beispielsweise die TPH, der 5-HTT, die aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC), der vesikuläre Monoamintransporter (VMAT) und einige 5-HT-Rezeptoren - die 5-HT-Subtypenselektion und die terminale neuronale Differenzierung auszuführen und somit den serotonergen Zelltyp zu bestimmen (Chen und Ding, 2006; Kriegebaum et al., 2010b). Unter diesen Transkriptionsfaktoren ist *Pet-1* (*plasmacytoma expressed trascription factor 1*) der einzige, der bemerkenswerterweise ausschließlich in Zellen des serotonergen Systems exprimiert wird (Hendricks et al., 1999; Chen und Ding, 2006; Kiyasova und Gaspar, 2011). In Tierversuchen mit sog. Knockout (KO)-Mäusen, bei denen einzelne kodierende Gene ausgeschaltet werden, versucht man z.B. die Wirkung und Bedeutung einzelner Transkriptionsfaktoren auf die Hirnentwicklung zu ergründen. Hier zeigten beispielsweise *Lmx1b*-KO-Mäuse einen kompletten Serotoninverlust in den Zellen der Rapheregion. Je nach angewandter Methode verstarben die *Lmx1b*-KO-Mäuse postnatal oder wiesen Defekte bei der Atmung und der Thermoregulation auf (Kriegebaum et al., 2010a). *Gata2*-KO-Mäuse zeigten multiple Defekte der Neurogenese, u.a. fehlten 5-HT-Neuronen vollständig und sie verstarben schon früh während der embryonalen Entwicklung ebenso wie auch *Gata3*-KO-Mäuse (Chen und Ding, 2006). Interessanterweise zeigten die durchaus lebensfähigen *Pet-1*-KO-Mäuse vermutlich aufgrund ihres dennoch beeinträchtigten serotonergen Systems (ca. 70% der serotonergen Neurone blieben undifferenziert) in speziellen Verhaltensversuchen z.B. vermehrte Aggressivität und Ängstlichkeit, was die Verwicklung dieses Transkriptionsfaktors in die Ätiologie psychischer Auffälligkeiten nahe legt (Hendricks et al., 2003; Chen und Ding, 2006; Kiyasova und Gaspar, 2011). Da diese Transkriptionsfaktoren in hochkomplexer Weise während der embryonalen Entwicklung des serotonergen Systems interagieren und damit den zellulären Phänotyp bestimmen, bieten sie sich also als Kandidatengene für die Suche nach genetischen Faktoren psychischer Erkrankungen geradezu an. Durch die im Gegensatz zu anderen Transkriptionsfaktoren strikt auf das serotonerge System begrenzte Expression von *Pet-1*, respektive die *fifth ewing variant* (FEV), das menschliche Ortholog zu *Pet-1*, erscheint *FEV* als besonders viel versprechendes Kandidatengen.

2.1.6 Der ETS-Transkriptionsfaktor FEV

Überblick. Die genomische Sequenz des *Fifth ewing variant (FEV)*-Gens ist relativ kurz und befindet sich auf dem Komplementärstrang (*reverse strand*) des Chromosom 2 (p35). Sie besteht aus 3 Exons, dessen längstes, das Exon 3, aus 1180 Basenpaaren inklusive einer langen 3'-UTR (*untranslated region*, untranslatierter Bereich) besteht und für 195 der insgesamt 238 Proteine kodiert.

FEV wurde erstmals von Peter und Kollegen als neues Mitglied der ETS-Domänen-Transkriptionsfaktoren-Familie in einer Untergruppe von Ewing-Tumoren als Fusionsgen einer Translokation (t2;22) entdeckt und erhielt aufgrund dieses Ursprungs seine Bezeichnung (Peter et al., 1997). Der Name der Proteinfamilie und ihres ersten Mitglieds ETS-1 wurde von dem Onkogen *v-ets* („E twenty-six“) des bei Vögeln bekannten Erythroblastosis Virus E26 abgeleitet. ETS-Transkriptionsfaktoren sind in eine Vielzahl von Entwicklungsprozessen und zellulären Antworten auf externe Stimuli involviert, sowohl in adulten Organismen als auch während der embryonalen Entwicklung derselben (Wasyluk et al., 1993; Peter et al., 1997; Sharrocks, 2001). Die ETS-Domäne ist eine hoch konservierte, 85 Aminosäuren umfassende Helix-Loop-Helix-Domäne. Diese ermöglicht eine spezifische Bindung an purinreiche DNA-Sequenzen, die durch das 5'-GGAA/T-3'-Kernelement charakterisiert sind. Ein Großteil der ETS-Transkriptionsfaktoren wirkt als Transkriptionsaktivator, andere als -repressor und einige der Mitglieder dieser Familie scheinen beide Fähigkeiten zu besitzen. Insgesamt spielen diese Transkriptionsfaktoren eine Rolle in sehr unterschiedlichen biologischen Prozessen, beschrieben wurden beispielsweise eine Regulation der Zellproliferation, die Inhibition der Apoptose und die Unterstützung der Zelldifferenzierung (Sharrocks, 2001).

Untersuchungen zur Assoziation genetischer Varianten des *FEV*-Gens mit der Erkrankung an einer affektiven Störung fehlten bislang. So wurden hier drei SNPs, *rs452985*, *rs860573* und *rs16859448*, mittels verschiedener Methoden (Kapitel 4.2.4, 4.2.5, 4.2.6) in einer relativ großen klinischen Stichprobe untersucht (siehe Kapitel 4.1.1), sieben weitere, im Exon 3 gelegene SNPs (*rs2310126*, *rs435910*, *rs443017*, *rs13025223*, *rs13025054*, *rs6740120*, *rs451253*) wurden in einem explorativen Ansatz in einer Stichprobe von 20 Patienten mittels Sequenzierung genotypisiert (siehe Kapitel

4.2.7). Abbildung 4 verdeutlicht schematisch Aufbau und Lage des Gens *FEV* sowie der untersuchten SNPs.

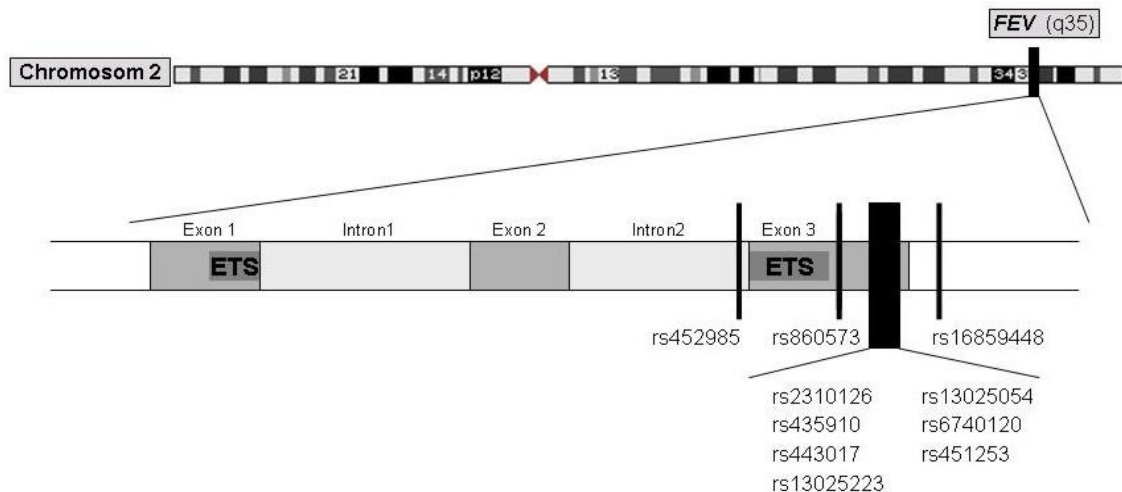


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Position und des Aufbaus des *FEV*-Gens auf Chromosom 2 sowie der Position der in dieser Arbeit untersuchten SNPs

Anmerkung: ETS = ETS-Transkriptionsfaktor-Domäne im Bereich des Exon 1 und Exon 3
 Quellen: UCSC Genome Browser (March 2006, www.genome.ucsc.edu),
www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index

FEV – Wirkung und Vorkommen. Bei der Erstbeschreibung von *FEV* wurde aufgrund einer alaninreichen Domäne am C-terminalen Ende vermutet, dass es sich hierbei um einen als Repressor wirkenden Transkriptionsfaktor handelt (Peter et al., 1997). Dies konnte durch Maurer et al (2003) bestätigt werden, wenngleich Studien am *Pet-1*-Gen (siehe unten) nahe legen, dass dieser Transkriptionsfaktor auch als Aktivator auf serotoninspezifische Gene wirkt, wie z.B. auf das *TPH2*- und *5-HTT*- Gen (Hendricks et al., 1999; Hendricks et al., 2003). Zunächst fand man *FEV* in sehr begrenztem Maße in Prostata- und Dünndarmgewebe exprimiert (Peter et al., 1997), konnte jedoch bald die spezifische Expression in den Zellen des menschlichen serotonergen Systems nachweisen. Zuerst ließ sich zeigen, dass *FEV* fast ausschließlich zusammen mit den für das serotonerge System spezifischen Markergenen *5-HTT* und *TPH* exprimiert wird (Maurer et al., 2004). Kurz darauf konnte mithilfe von In situ-Hybridisierungen nachgewiesen werden, dass *FEV*-mRNA maßgeblich in den Serotonin enthaltenden

Zellen des Mittelhirns und der Pons vorkommt, genauer gesagt im dorsalen und im medianen Nucleus raphe. Andere Gewebeproben des Gehirns stellten sich hingegen in dieser Untersuchung eindeutig negativ dar (Iyo et al., 2005).

Das *Pet-1*-Gen als Modell für das humane Ortholog *FEV*. *FEV* wird als humanes Ortholog des bei Mäusen untersuchten *Pet-1*-Gens angesehen. Das humane *FEV* Protein weist ca. 96 % Übereinstimmung mit dem murinen *Pet-1*-Protein auf (Pfaar et al., 2002). Im Gegensatz zu anderen bekannten Transkriptionsfaktoren, die an der Entwicklung und Differenzierung der serotonergen Neurone beteiligt sind und deren Funktion auch für die Entwicklung anderer neuronaler und nicht-neuronaler Zelltypen von großer Bedeutung ist, beschränkt sich das Wirken von *Pet-1* ausschließlich auf die Serotonin-spezifische Funktion im Gehirn und bestimmt somit den Phänotyp der 5-HT-Neurone mit (Hendricks et al., 1999). Schon früh in der embryonalen Entwicklung von Ratten (*Pet-1* RNA an Embryonaltag (E) 12.5) und Mäusen (*mPet-1* an E11) lässt sich die Expression von *Pet-1* in begrenzten Zellpopulationen des embryonalen Gehirns nachweisen. Die Expression von *Pet-1* geht dem Erscheinen von Serotonin sowie der Expression des Markergens für serotonerge Neurone, dem *5-HTT*, um ca. einen halben Tag voraus, woraus sich ableiten lässt, dass *Pet-1* maßgeblich an der Differenzierung und Entwicklung von Vorläuferzellen zu adulten serotonergen Neuronen beteiligt ist und diese als essentielle Komponente der transkriptionalen Kontrolle triggert (Hendricks et al., 1999; Pfaar et al., 2002). Die Differenzierung erfolgt in unterschiedlicher Weise in den einzelnen Gruppen der serotonergen Neurone als komplexes Zusammenspiel einzelner Transkriptionsfaktoren, wobei die Transkriptionsfaktoren *Mash1* und *Nkx2.2* die GATA-bindenden Transkriptionsfaktoren *Gata2* und *Gata3* sowie den LIM-Homeobox-Transkriptionsfaktor *Lmx1b* und *Pet-1* aktivieren. Durch Letztere werden dann wiederum Markergene wie *TPH*, *5-HTT*, *aromatische Aminosäure-Decarboxylase* (*AADC*, Gensymbol *DDC*), *vesikulärer Monoamintransporter* (*VMAT*) und Gene einiger 5-HT-Rezeptoren aktiviert, wodurch schließlich der serotonerge Phänotyp der Zelle determiniert wird (Kriegebaum et al., 2010b). Somit werden *TPH2* und *5-HTT* als spezifische *Targeting*-Gene für *Pet-1* bzw. *FEV* angenommen. Sowohl im *TPH2*- als auch im *5-HTT*-Gen konnten zudem in bzw. nahe dem Promotor ETS-Domänen-

Bindungsstellen nachgewiesen werden, die zu einer Aktivierung der Transkription führen (Hendricks et al., 1999).

Hendricks und Mitarbeiter konnten durch Experimente mit *Pet-1*-KO Mäusen weitere Erkenntnisse zur Funktion von *Pet-1* liefern: sie fanden, dass die normale Entwicklung des serotonergen Systems bei *Pet-1* negativen Mäusen unterbrochen war. Die Neuronen zeigten eine massive Reduktion der Fähigkeit, die für adulte und differenzierte serotonerge Zellen notwendigen Merkmale wie die Tryptophanhydroxylase (TPH2), den Serotonintransporter (5-HTT) und letztendlich 5-HT selbst zu bilden. Vielmehr behielten sie größtenteils die Merkmale von Vorläuferzellen. So wiesen die *Pet-1*-KO Mäuse nur ca. 10-15 % des bei den Wildtypen nachweisbaren 5-HT auf und auch die Expression von *TPH2* und *5-HTT* war erheblich reduziert (Hendricks et al., 2003). Daraus lässt sich schließen, dass durch den Verlust von *Pet-1* die Differenzierung der ansonsten in Zahl und Verteilung normal angelegten Vorläuferzellen ausbleibt. Dies macht die Rolle von *Pet-1* als Aktivator der Transkription wichtiger serotoninspezifischer Gene wahrscheinlich. Interessanterweise ließ sich in Verhaltensexperimenten mit den trotz ihres beeinträchtigten serotonergen Systems durchaus lebensfähigen und in ihrer sonstigen Entwicklung weitgehend unauffälligen *Pet-1*-KO Mäusen einerseits ein verstärkt aggressives bzw. vermindert angeständliches Explorations- und Sozialverhalten zeigen. Andererseits konnte auch ein pathologisch ängstliches Verhalten beobachtet werden und in Furcht-Konditionierungsversuchen zeigten die *Pet-1*-KO Mäuse eine verstärkte Furchtantwort, wodurch eine Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Ätiologie von Erkrankungen mit emotionaler Dysregulation nahe liegend erscheint (Hendricks et al., 2003; Kiyasova et al., 2011).

Diese Erkenntnisse aus tierexperimentellen Untersuchungen über Orthologe des humanen *FEV*-Gens legen die Vermutung nahe, dass dieses eine ähnlich entscheidende Rolle in der embryonalen Differenzierung der serotonergen Neuronen und der Ausbildung des serotonergen Phänotyps des Menschen besitzt.

2.1.7 Das Kandidatengen *TPH2*

Das für die Tryptophan-Hydroxylase 2 (TPH2) kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 12 (12q21.1), umspannt ungefähr 100 kb und besteht aus 11 Exons (Walther und Bader, 2003; Walitza et al., 2005). Die TPH2 ist das im zentralen Nervensystem dominante, geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Serotoninsynthese und somit in der Lage, die Serotoninverfügbarkeit für die zentrale Neurotransmission zu regulieren (Walther und Bader, 2003; Gutknecht et al., 2009). In zahlreichen Studien wurden bereits Assoziationen von genetischen Varianten der kodierenden Gene beider Isoformen (*TPH1* und *TPH2*) sowohl mit Persönlichkeits- und Verhaltensmerkmalen als auch mit neuropsychiatrischen Störungen gefunden (Gutknecht et al., 2009). Durch die Dominanz der *TPH2*-Expression in den Regionen des zentralen serotonergen Systems, fokussierte sich die Suche auf Assoziationen genetischer Variationen (z.B. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs) des *TPH2*-Gens mit psychischen Erkrankungen, bei denen das serotonerge System in die Ätiopathogenese involviert ist. So fanden sich Assoziationen genetischer Varianten des *TPH2*-Gens mit Depression (Zill et al., 2004b), Suizid (Zill et al., 2004a) und Bipolar I- und Bipolar II- Störungen (Harvey et al., 2004). Da auch beim Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) eine Beteiligung des serotonergen Systems vor allem bezüglich der Symptome Impulsivität und Aggression vermutet wird, folgten auch in diese Richtung neue Studien. So konnten Walitza und Kollegen ein Transmissionsdisequilibrium für einen Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) in der Region der transkriptionalen Kontrolle des *TPH2*-Gens in Familien von Kindern und Jugendlichen mit gesichertem ADHS nachweisen (Walitza et al., 2005).



Abbildung 4: Schematische Darstellung der Lokalisation des *TPH2*-Gens auf Chromosom 12 (q 21.1)

(nach: UCSC Genome Browser (March 2006, www.genome.ucsc.edu), www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index)

2.2 Psychische Erkrankungen

2.2.1 Affektive Störungen

Überblick und Symptomatik. Affektive Störungen sind häufig auftretende Erkrankungen. Die Punktprävalenz für unipolare Depressionen schwankt zwischen 15-30 % (leichtere Formen der Depression) und 2-7 % (schwerere Formen) (Berger, 1999). Das Lebenszeitrisiko wird für die Major Depression (MD) mit 5-10 % angegeben, der Häufigkeitsgipfel liegt um das 35. Lebensjahr (Craddock und Jones, 2001). Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer. Bipolare affektive Erkrankungen stellen etwa ein Fünftel aller affektiven Störungen dar und weisen wesentliche Unterschiede zu den unipolaren Depressionen auf. Das Lebenszeitrisiko liegt mit 0,5-1 % in der Gesamtpopulation deutlich niedriger (Craddock und Jones, 2001), der Erkrankungsgipfel liegt oft schon in der Adoleszenz oder im frühen Erwachsenenalter. Geschlechtsunterschiede treten nicht auf. Die bipolare Störung verläuft meist schwerer als die unipolaren Erkrankungen (Berger, 1999).

Die affektiven Störungen zeigen typischerweise einen phasischen Verlauf. Die Episoden gelten als selbst limitierend, ihre Dauer kann aber meist durch intensive Therapie deutlich verkürzt werden (Berger, 1999). Nach ICD-10 kann die Diagnose einer depressiven Episode (unipolare Depression) gestellt werden, wenn ein Patient über einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen an zwei der drei Hauptsymptome depressive Stimmung, Verlust von Interesse oder Freude (Anhedonie) sowie Verminderung des Antriebs und erhöhter Ermüdbarkeit leidet. Die Einteilung in drei Schweregrade (leichte, mittelschwere und schwere depressive Episode) erfolgt unter Hinzunahme weiterer Symptome wie beispielsweise verminderte Konzentration und Aufmerksamkeit, vermindertes Selbstwertgefühl und Selbstvertrauen, Suizidgedanken sowie somatische Beschwerden wie Schlafstörungen, Appetitlosigkeit und vegetative Symptome.

Die bipolare Störung ist durch das zyklische Auftreten manischer (bipolar I) bzw. hypomanischer (bipolar II) Phasen im Wechsel mit depressiven Episoden gekennzeichnet. Eine manische Episode kann sich in einer euphorisch-glücklichen oder gereizt-aggressiven Grundstimmung zeigen. Gesteigertes Selbstwertgefühl und

Größenideen, starker Rededrang, Ideenflucht, Steigerung zielgerichteter Aktivitäten und psychomotorische Unruhe sowie ein auffallend vermindertes Schlafbedürfnis bilden die klassische Symptomatik einer manischen Episode (Berger, 1999).

Ätiologie, Pathogenese und Genetik affektiver Störungen. In der Regel muss zur Erklärung von Ätiologie und Pathogenese gerade psychischer Erkrankungen von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen werden, in das auch die Lebensgeschichte des einzelnen Patienten, aktuelle sowie länger zurückliegende belastende Ereignisse einbezogen werden müssen. Allgemeine Gültigkeit wird in diesem Zusammenhang dem Vulnerabilitäts-Stress-Modell beigemessen, das die Interaktion von Prädisposition und aktuellen Ereignissen beschreibt, die letztendlich zur Manifestation der Erkrankung führt. Die Vulnerabilität beschreibt dabei eine bestimmte Krankheitsdisposition, die ihrerseits wiederum multifaktoriell, sowohl durch genetische Faktoren als auch durch die persönliche Lebens- und Lerngeschichte bestimmt ist, die jedoch alleine die Erkrankung nicht hinreichend erklären kann. Erst wenn als Stressoren wirkende Umweltfaktoren hinzutreten – Ereignisse aus dem psychosozialen Umfeld oder sog. „kritische Life-Events“ – führt dies zur Manifestation der Erkrankung (Gaebel und Zielasek, 2008). Nach der allostatischen Belastungshypothese besitzt der menschliche Organismus neurale, neuroendokrine und immunologische Mechanismen, um adaptiv auf Stress reagieren zu können und so die sog. Allostasis aufrecht zu erhalten (McEwan, 1998). Besteht eine Beeinträchtigung dieser adaptiven Systeme – seien es Überstimulation, inadäquate Aktivierung oder ausbleibende Abschaltung – führt dies zu einer allostatischen Belastung („*allostatic load*“), die über einen längeren Zeitraum wiederum Krankheiten unterschiedlichster Art hervorrufen kann (McEwan, 1998). Im Gegenzug dazu bezeichnet die Resilienz die Widerstandsfähigkeit des Organismus, Angriffe auf sein Gleichgewicht abzufedern. Nach Karatsoreos und McEwan ist das Gehirn das Schlüsselorgan der Resilienz, da es die allostatischen Systeme steuert, die auf den gesamten Körper wirken und gleichzeitig auf dessen Rückmeldungen mit adaptiver Plastizität reagiert (Karatsoreos und McEwan, 2011). Mediatoren dieser Plastizität, beispielsweise exzitatorische Aminosäuren und Glukocortikoide, führen so zu neuralem Remodeling, das sowohl positive als auch negative Folgen haben kann, bis hin zur Atrophie von Hirnstrukturen. So nimmt man an, dass Depressionen und die

damit assoziierte kognitive Beeinträchtigung ein Ergebnis der Unfähigkeit ist, nach einer psychologischen oder physischen Stresssituation zu der normalen Funktion (Allostasis) zurückzukehren. Hier kann man also annehmen, dass eine reduzierte Plastizität und /oder mangelnde Resilienz zugrunde liegt, was mit Berichten über mit langjähriger Depression assoziierte Atrophie hippocampaler und präfrontaler Hirnareale in Zusammenhang stehen könnte (Karatsoreos und McEwan, 2011). Andererseits scheint eine antidepressive Therapie die Neuroplastizität zu verbessern, so zeigte sich beispielsweise unter einer Behandlung mit selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (*selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRIs) eine Volumenzunahme des Hippocampus. Geht man davon aus, dass diese Vorgänge durch unterschiedliche modulierende Faktoren (z.B. Neurotrophine wie der *brain derived neurotrophic factor*, BDNF) vermittelt werden (Karatsoreos und McEwan, 2011), geraten diese und die für sie kodierenden Gene in den Fokus des Interesses, da Modulationen durch genetische Varianten beispielsweise für eine erhöhte Vulnerabilität verantwortlich sein könnten.

Aufgrund der molekulargenetischen Ausrichtung der vorliegenden Arbeit, wird im Folgenden der Schwerpunkt auf die Ergebnisse zur genetischen Determinierung der Krankheitsdisposition (Vulnerabilität) gelegt.

Für alle affektiven Störungen ließ sich in zahlreichen Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien eine genetische Disposition nachweisen. Am stärksten ist diese bei den bipolaren Störungen ausgeprägt. So tragen Verwandte eines an einer bipolaren Störung Erkrankten ein deutlich erhöhtes Lebenszeitrisiko, selbst an einer affektiven Störung zu erkranken: für eine bipolare Störung liegt die Konkordanz bei eineiigen Zwillingen zwischen 45-75% (Craddock und Jones, 2001) (nach anderen Angaben gar bei 80% (Laux, 2008a)), unter zweieiigen Zwillingen und erstgradig Verwandten sinkt das Risiko auf 4-9% im Vergleich zu einem Lebenszeitrisiko von 0,5-1% in der Normalbevölkerung. Für an unipolarer Depression Erkrankte fallen die entsprechenden Zahlen deutlich niedriger aus, jedoch lässt sich bei monozygoten Zwillingen immer noch eine Konkordanz von 15-20% nachweisen, bei erstgradig Verwandten beträgt das Risiko 8-20% im Gegensatz zu 5-10% bei nicht verwandten Personen (Craddock und

Jones, 2001). Für die Major Depression (MD) wird eine Heritabilität von 40-50% (Levinson, 2006) bzw. 35-70 % (Schulte-Körne und Allgaier, 2008) angegeben.

Bis heute ließ sich kein kausales, die Krankheit induzierendes Gen nachweisen (monogene Vererbung), sondern man geht inzwischen davon aus, dass es sich um eine komplexe Störung handelt. Das Krankheitsmodell komplexer Störungen besagt, dass ein Zusammenspiel mehrerer, möglicherweise gekoppelter, Varianten in mehreren Suszeptibilitätsgenen mit jeweils nur moderatem Einfluss die Krankheitsdisposition bedingen und in Kombination mit Umweltfaktoren zur Manifestation der Erkrankung führen (Maier et al., 2008). Ein Fokus der molekulargenetischen Forschung richtet sich auf genetische Variationen, wie beispielsweise die im menschlichen Genom häufig auftretenden *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) und dadurch die Identifikation von Suszeptibilitätsgenen.

Die Rolle des serotonergen Systems in der Ätiopathogenese affektiver Erkrankungen. Es steht inzwischen außer Frage, dass Veränderungen der Neurotransmission bei depressiven Störungen vorhanden sind. Die in den letzten Jahrzehnten aufgestellten Amindefizithypothesen, also die Serotonin- und Noradrenalinmangelhypothese (Schildkraut, 1965; Coppen, 1972) bildeten den Beginn der intensiven Erforschung der serotonergen und noradrenergen Transmittersysteme, ließen sich jedoch nie vollständig bestätigen, wenngleich der Wirkmechanismus der meisten Antidepressiva nachweislich serotonerge und noradrenerge Effekte moduliert (Ressler und Nemeroff, 2000; Moretti et al., 2003). So besteht allgemeiner Konsens, dass diese Neurotransmittersysteme in die Ätiopathogenese affektiver Störungen involviert sind. Heute geht man zum einen aufgrund der intensiven Vernetzung der einzelnen Transmittersysteme von einer die Krankheitssymptome verursachenden Transmitterdysbalance aus. So vermutet man auch aufgrund der Wirkweise nichtselektiver Antidepressiva wie der Trizyklika, dass die Modulation eines anderen Transmittersystems – beispielsweise des noradrenergen oder dopaminergen Systems – durch die enge Vernetzung auch auf das serotonerge System rückwirkt (Kriegebaum et al., 2010a). Zum anderen zeigen sich auch auf Rezeptorebene Veränderungen in Dichte und Empfindlichkeit, die mit der Erkrankung

bzw. auch mit dem Wirkmechanismus der Antidepressiva in Zusammenhang zu stehen scheinen. Gerade die Wirkungslatenz der meisten Antidepressiva (z.B. der selektiven Serotonin Reuptake Inhibitoren, SSRIs) von ca. 2 Wochen deutet darauf hin, dass sie durch eine sukzessive Veränderung der Sensitivität und Expression der prä- und postsynaptischen 5-HT-Rezeptoren eine Normalisierung der serotonergen Neurotransmission bewirken und damit ihre antidepressive Wirkung entfalten (Kriegebaum et al., 2010a). Weiterhin steht die Signaltransduktion auf zellulärer Ebene, als Folge der Rezeptorbindung des Transmitters, unter dem Einfluss zahlreicher Mechanismen, wie beispielsweise der Kontrolle durch Transkriptionsfaktoren, die über eine Veränderung der Genexpression zu adaptiven Vorgängen führen kann (Laux, 2008b; Riederer et al., 2008). Auch eine Störung dieser Mechanismen wird zunehmend als ätiopathogenetisch disponierend diskutiert.

Der Umstand, dass 5-HT und die serotonerge Genexpression in die Prozesse während der Hirnentwicklung involviert (siehe oben) und im adulten Gehirn an der neuronalen Plastizität beteiligt sind legt nahe, dass die genetisch verursachte Variabilität der 5-HT-Funktion einen Einfluss auf depressionsbezogene Persönlichkeits- und Verhaltensstrukturen hat (Lesch, 2004). Solche für Depression und Angsterkrankungen prädisponierenden Persönlichkeitsmerkmale werden auch als Endophänotypen bezeichnet. Endophänotypen wurden von Gottesman und Gould als „...unsichtbare messbare Komponenten auf dem Weg zwischen Krankheit und fern liegendem Genotyp“ definiert. Nach ihnen wurde das Konzept der Endophänotypen adaptiert, um die Lücke zwischen dem Gen und den schwer fassbaren Krankheitsprozessen zu füllen und können im Prinzip der Identifikation aberranter Gene in den hypothetisierten polygenetischen Modellen dienen. Man nimmt an, dass die Assoziation mit einem Endophänotyp stärker ist als mit der ferner gelegenen Erkrankung, da er einen engeren Bezug zu der genetischen Herkunft hat. Endophänotypen sind typischerweise quantitative Züge (Traits), die generell in einer Population gemessen werden können (Gottesman und Gould, 2003). Die Idee dahinter besagt, dass einige psychiatrische Störungen das extreme Ende bestimmter Persönlichkeitsvariationen darstellen könnten. Genetische Faktoren des Neurotizismus überlappen zu ungefähr 50% mit denen für Depression (Burmeister et al., 2008). Die dimensionale Struktur von Neurotizismus schließt Merkmale wie Ängstlichkeit (*fearfulness*), Depression (*depression*), negative

Emotionalität (*negative emotionality*) und Stressreaktivität mit ein und wurde so durch systematische Forschung entworfen (Lesch, 2004). In der Depressionsforschung erscheint vor allem der Zusammenhang zwischen genetisch bestimmter Variabilität der 5-HT-Funktion und Neurotizismus viel versprechend. Nachgewiesen werden konnte beispielsweise eine Assoziation der kurzen Variante des *5-HTTLPR* (*5-HT transporter length polymorphic region*) mit dem Persönlichkeitsmerkmal der negativen Emotionalität, die Ängstlichkeit, Depression und Aggressivität einschließt (Neurotizismus und Agreeableness), sowie die Assoziation eines funktionalen SNP des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens (*HTR1A*, C-1019G, *transcriptional control region*), ebenfalls mit depressions- und ängstlichkeitsassoziierten Persönlichkeitsmerkmalen, aber auch mit Depression und Suizidalität (Lesch, 2004). Man nimmt an, dass genetische Faktoren für 40-60% der Varianz der genannten Merkmale verantwortlich sind, die eher moderate Effektstärke der gefundenen Variationen (*5-HTTLPR*, weniger als 5% Varianzaufklärung) zeigt, dass dies erst der Anfang ist (Lesch, 2004).

Die Rolle des serotonergen Systems in der Hirnentwicklung und während der Hirnreifungsprozesse erscheint besonders interessant, da hier der Grundstein einer Prädisposition für affektive Störungen im Sinne der oben genannten Persönlichkeitsmerkmale gelegt wird. Studien zur Gen-Umwelt-Interaktion konnten die Relevanz beider Faktoren eindrucksvoll bestätigen. Caspi und Mitarbeiter wiesen in einer prospektiven longitudinalen Studie nach, dass frühkindliche Traumata wie beispielsweise Kindesmisshandlung und später eintretende stressvolle Life-Events bei homozygoten und heterozygoten Trägern der kurzen (short = s) Variante (s/s und s/l) des *5-HTTLPR*-Polymorphismus signifikant häufiger zur Entwicklung affektiver Störungen führten, als bei homozygoten Trägern der langen (long = l) Variante (l/l) (Caspi et al., 2003). Allerdings konnte in jüngeren Metaanalysen diese Assoziation nicht bestätigt werden (Risch et al., 2009), was jedoch auch mit unterschiedlichen methodischen Herangehensweisen und nicht einheitlicher Ausprägung der Assoziation in einzelnen Altersgruppen bzw. zwischen den Geschlechtern zusammen hängen könnte (Uher und McGuffin, 2008; Caspi et al., 2010). So werden diese Ergebnisse weiterhin intensiv und kontrovers diskutiert und erfordern eine differenzierte Betrachtung.

Die Erforschung der molekularen Strukturen des serotonergen Systems - insbesondere der unterschiedlichen 5-HT-Rezeptoren, des Serotonintransporters und der TPH - und

der mögliche Einfluss genetischer Varianten auf das gesamte System und seine Funktion, zeigen bereits erstaunliche Ergebnisse. Trotzdem bleiben weiterhin viele Fragen offen und ein in der embryonalen Hirnentwicklung aktives Gen wie *FEV*, dessen Expression zudem auf Neuronen des serotonergen Systems beschränkt ist, erscheint in diesem Zusammenhang als vielversprechendes Kandidatengen.

2.2.2 ADHS im Erwachsenenalter

Überblick und Symptomatik. Bekannt ist das Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätssyndrom (ADHS) vor allem als Erkrankung des Kindes- und Jugendalters. Für diese Altersgruppe wird eine Prävalenz zwischen 3 und 5% (Sobanski und Alm, 2004; Warnke et al., 2008) bzw. 7% (Alm und Sobanski, 2008) angegeben. Damit ist das ADHS eine der häufigsten kinder- und jugendpsychiatrischen Erkrankungen. Die Kernsymptome des ADHS sind Aufmerksamkeitsstörungen, Hyperaktivität und Impulsivität und fallen bei den betroffenen Kindern häufig schon im Vorschulalter (bis zum 7. Lebensjahr), spätestens aber im Schulalter (bis zum 12. Lebensjahr) auf (Alm und Sobanski, 2008; Möller et al., 2008). Im Kindesalter wird die Diagnose in der Regel nach den Kriterien des DSM-IV oder des ICD-10 gestellt, die auch speziell auf diese Altersgruppe ausgerichtet sind.

In Studien, die den Langzeitverlauf der Erkrankung dokumentierten, konnte nachgewiesen werden, dass ein Teil der Kinder bis ins Erwachsenenalter hinein an der vollen bzw. an Teilen der Symptomatik leidet. Faraone et al. fanden in einer Metaanalyse mehrerer Studien eine Persistenz des vollen Krankheitsbildes in ca. 15%, einer in Teilen remittierten Symptomatik jedoch in ca. 40-60% der Fälle (Faraone et al., 2006). In einer anderen Studie betrug die Prävalenz für das Vollbild 2,9%, für Residuen der Symptomatik 16,4% (Faraone und Biederman, 2005), während Alm und Mitarbeiter eine Prävalenz von 4-5% angeben (Alm und Sobanski, 2008). Die Symptomatik im Erwachsenenalter ist jedoch anders geprägt: die Aufmerksamkeitsstörung persistiert häufig und zeigt sich in Desorganisiertheit, Ablenkbarkeit und Vergesslichkeit, und der Unfähigkeit, sich längere Zeit zu konzentrieren. Die motorische Hyperaktivität des Kindesalters wandelt sich im Erwachsenenalter meist in eine innere Unruhe, häufig mit

der Unfähigkeit, sich zu entspannen, teilweise zeigt sie sich in einer feinmotorischen Unruhe. Weitere Symptome sind mangelnde Alltagsorganisation, ineffiziente Arbeitsweise, schlechte Impulskontrolle, sowie emotionale Labilität. Betroffene Erwachsene zeigen häufig eine schwerwiegende und klinisch relevante Beeinträchtigung der kognitiven und exekutiven Funktionen, sowie der Stressresistenz und Emotionsregulation (Renner et al., 2008). Auch die Impulsivität kann bis ins Erwachsenenalter bestehen bleiben. Sie äußert sich z.B. in ausgeprägter Ungeduld, sowie in voreiligen Äußerungen und Handlungen. Trotz normaler kognitiver und intellektueller Fähigkeiten haben Betroffene ein deutlich erhöhtes Risiko, eine nur unzureichende schulische und berufliche Qualifikation zu erlangen mit daraus folgendem unterdurchschnittlichem Einkommen, häufigerem Arbeitsplatzwechsel und Arbeitslosigkeit. Eingeschränkte psychosoziale Fähigkeiten zeigen sich in dysfunktionalen Beziehungen und Familienstrukturen, sowie in verhältnismäßig häufigeren Gesetzesverletzungen und Straffälligkeiten aufgrund erhöhter Impulsivität und Risikobereitschaft. Insgesamt führen die durch die Krankheit verursachten psychosozialen, ökonomischen und gesundheitlichen Belastungen zu einem deutlichen Leidensdruck der Patienten (Sobanski und Alm, 2004; Renner et al., 2008). Die Rate an komorbiden Störungen wird schon im Kindes- und Jugendalter mit bis zu 50% angegeben, scheint sich aber bei Fortbestehen der Erkrankung mit höherem Alter noch zu steigern (77-86%) (Sobanski und Alm, 2004). Die wichtigsten komorbiden Störungen sind im Erwachsenenalter Suchterkrankungen, die Depression, Angsterkrankungen und antisoziale Persönlichkeitsstörungen (Renner et al., 2008). Die Diagnosestellung des adulten ADHS beinhaltet ein Interview und einen psychopathologischen Befund, Fragebögen, testpsychologische Untersuchungen sowie die erforderliche Differenzialdiagnostik (Ebert et al., 2003). Die Diagnose kann sowohl nach den Kriterien des DSM-IV als auch des ICD-10 gestellt werden sowie nach den speziell für das Erwachsenenalter entwickelten Wender-Utah-Kriterien (Ebert et al., 2003).

Ätiologie und Genetik des ADHS. Nach heutiger Überzeugung handelt es sich wie bei allen psychischen Erkrankungen auch beim ADHS um eine komplexe Erkrankung, deren Erbllichkeit multifaktoriell bestimmt wird. Das heißt, die Störung wird durch die

additive Wirkung mehrerer Gene und ihrer Varianten mit geringem eigenem Effekt verursacht. Nach diesem Modell werden Ausprägungsgrad und klinischer Phänotyp durch die Anzahl und das Zusammenwirken der individuell vorhandenen genetischen Polymorphismen in Wechselwirkung mit Umwelteinflüssen bestimmt (Alm und Sobanski, 2008). Als beeinflussende Umweltfaktoren konnten für das ADHS Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen wie Frühgeburtlichkeit, perinatale Hypoxie und niedriges Geburtsgewicht identifiziert werden, sowie der Konsum von Nikotin, Alkohol und anderen Drogen während der Schwangerschaft (Alm und Sobanski, 2008; Warnke et al., 2008). Andererseits gibt es auch protektive Faktoren wie gut entwickelte kognitiv-intellektuelle Fähigkeiten und ein wohl strukturiertes und unterstützendes familiäres Umfeld (Renner et al., 2008).

Die Heritabilität des ADHS wird mit 0,75 bzw. 0,8 angegeben, was bedeutet, dass 75-80% der Ätiologie genetisch determiniert ist. Damit gehört das ADHS zu den psychischen Erkrankungen mit der höchsten Erblichkeit (Spencer et al., 2002; Faraone et al., 2005; Walitza et al., 2005). Daten aus Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien belegen diese wesentliche genetische Komponente: Monozygote Zwillinge zeigen in 60-90% der Fälle Konkordanz (Sobanski und Alm, 2004), bei 45% der Eltern erkrankter Kinder konnte ebenfalls ADHS diagnostiziert werden. Für erstgradig Verwandte wird ein 2- bis 6-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko angegeben (Alm und Sobanski, 2008).

In den molekulargenetischen Untersuchungen konnte ein evidenter, wenn auch geringer Zusammenhang bestimmter Polymorphismen einzelner, vor allem das dopaminerge, aber auch das serotonerge und das noradrenerge System betreffender Gene mit ADHS gefunden werden. Für folgende Gene und deren Varianten konnte eine Assoziation mit ADHS gezeigt werden: *Dopamintransporter* (*DAT*, VTNR, 10 repeat), *Dopamin D4-Rezeptor* (*DRD4*, Exon III, VTNR, 7 repeat), *Dopamin D5-Rezeptor* (*DRD5*, CA repeat, 148 bp), *Dopamin β -Hydroxylase* (*TaqI A*), *SNAP-25* (T1065G), *Serotonintransporter* (*5-HTTLPR* long), *Serotoninrezeptor 5-HTR1B* (G861C) (Faraone et al., 2005; Renner et al., 2008). Der kausale Zusammenhang zwischen Störungen des dopaminergen

Systems und ADHS ist von mehreren Seiten plausibel. Zum einen ist gerade das Striatum, dessen Volumenreduktion in Patienten mit ADHS nachgewiesen werden konnte, reich an dopaminergen Synapsen und mithilfe von SPECT-Untersuchungen (Single-Photonemissionscomputertomographie) stellte man in diesem Bereich eine Reduktion der Dopamitransporterichte bei unbehandelten Patienten fest (Alm und Sobanski, 2008). Die in der Therapie mit Erfolg eingesetzten Stimulanzien (insbesondere Methylphenidat) erhöhen bekanntermaßen u.a. durch Hemmung des Dopamintransporters (DAT) und Noradrenalintransporters (synonym Norepinephrintransporter, NET) vor allem die Dopamin- aber auch die NoradrenalinKonzentration im synaptischen Spalt, sodass eine Dysregulation der Neurotransmission sowie der neuronalen Netzwerke des dopaminergen, aber auch des noradrenergen und serotonergen Systems eine ätiologische Relevanz zu besitzen scheint (Biederman und Faraone, 2005; Alm und Sobanski, 2008; Renner et al., 2008). Auch hier wird man mit der Fokussierung auf einzelne Transmittersysteme der Komplexität des Gehirns und seiner Funktion sowie der Komplexität des ADHS nicht gerecht, und so schließt die aktuelle molekulargenetische Forschung neben den Suszeptibilitätsgenen des dopaminergen Systems auch solche des noradrenergen und des serotonergen Systems mit ein. Als Kandidatengene des serotonergen Systems wurden bereits verschiedene 5-HT-Rezeptoren (*5-HTR_{1B}*, *5-HTR_{2A}*), der Serotonintransporter (*5-HTT*, *SCL6A4*) und auch die *TPH2* untersucht (Faraone et al., 2005).

Die Rolle des serotonergen Systems in der Ätiopathogenese des ADHS. Das serotonerge System kann als übergeordnetes, die Aktivität und Interaktion einiger anderer Neurotransmittersysteme beeinflussendes und koordinierendes System gesehen werden. Es wird als Hauptmodulator emotionalen Verhaltens angesehen und integriert komplexe Hirnfunktionen wie Kognition, sensorische und motorische Prozesse (Lesch und Merschdorf, 2000). Eine enge anatomische und funktionelle Vernetzung und Interaktion des serotonergen Systems mit dem dopaminergen System ist bekannt. So innervieren serotonerge Neurone des dorsalen Raphe-Komplexes sowohl die dopaminergen Kerngebiete in der Substantia nigra und im ventralen Tegmentum, als auch eines der Zielgebiete dieser dopaminergen Projektionen, das Striatum. Weitere Überlappungen

von Projektionen beider Systeme findet man im präfrontalen Kortex und im Nucleus accumbens (Hüther und Rüter, 2000).

Gerade die Merkmale Impulsivität und Impulskontrolle sowie Aggression werden einer serotonergen Dysfunktion zugeschrieben, während die Hyperaktivität eher mit einer dopaminergen Dysfunktion in Verbindung gebracht wird. Dabei stellt sich die Impulsivität als heterogenes Phänomen dar, das einen Verlust der inhibitorischen Verhaltenskontrolle, Intoleranz gegenüber Belohnungsverzögerung und voreiliges Entscheiden beinhaltet, jedoch nicht zwingend dysfunktional sein muss (Kriegebaum et al., 2010a). So unterscheidet man beispielsweise die mit emotionaler Labilität assoziierte aggressive Impulsivität, die leicht zu physischer Gewalt führen kann, von den kognitiven Elementen, die mit einem Ausfall der inhibitorischen Exekutivfunktionen assoziiert sind und häufig voreilige und falsche Entscheidungen nach sich ziehen (Oades et al., 2008). Gerade eine niedrige Toleranz für negative emotionale Zustände scheint mit der Veranlagung zu impulsiv-aggressiven Verhaltensweisen einherzugehen und zeigt damit die intensive Vernetzung zwischen Kognition, Emotion und Aggression, wobei negative Affekte wie etwa Furcht oder Angst aggressiven Reaktionen häufig vorausgehen. Es erscheint somit naheliegend, dass das serotonerge System sowohl das affektive Geschehen als auch impulsive und aggressive Verhaltensweisen moduliert (Kriegebaum et al., 2010a). In Tierversuchen zeigten Ratten, deren serotonerge Strukturen zerstört wurden, eine verminderte Inhibition impulsiver Reaktionen und somit verstärkte impulsive und aggressive Verhaltensweisen (Kriegebaum et al., 2010a). Wenngleich es sehr unterschiedliche Ergebnisse sowohl aus der Human- als auch der Tierforschung gibt, die teils eine Assoziation mit einer verminderten, teils mit einer erhöhten serotonergen Aktivität zeigen, so ist die Beteiligung dieses hochkomplexen Systems bei Impuls- und Aggressionshandlungen wohl unbestritten (Kriegebaum et al., 2010a). Wenngleich Ratten mit impulsiv-aggressiven Verhaltensweisen durch Beeinträchtigung ihres serotonergen Systems mit SSRIs therapiert werden konnten (Kriegebaum et al., 2010a), haben bei Menschen Antidepressiva wie SSRIs – wenn überhaupt – nur marginale Wirkung auf die Symptomatik der ADHS, können allerdings bei anderen Impulskontrollstörungen wie beispielsweise Spielsucht u. ä. durchaus erfolgreich

eingesetzt werden (Winstanley et al., 2006). Molekulargenetische Assoziationsstudien konnten einen Zusammenhang zwischen bestimmten Genvarianten des *5-HTT*-Gens (*SLC6A4*), des für den 5-HT_{1B}-Rezeptor kodierenden Gens sowie für *TPH2* mit ADHS nachweisen, wenngleich negative oder widersprüchliche Studienergebnisse die außerordentliche Komplexität des serotonergen Systems mit zahlreichen Einflussmöglichkeiten allein durch über 14 verschiedene 5-HT-Rezeptoren verdeutlichen und damit weiteren Forschungsbedarf offenbaren (Winstanley et al., 2006; Renner et al., 2008).

2.3 Formen des Studiendesigns und Begriffe der genetischen Epidemiologie

Kopplung (*lat. copola* = Band) und **Assoziation** (*lat. associare* = verbinden) sind zwei Grundbegriffe der genetischen Epidemiologie. Sie bestimmen den jeweils zu wählenden Studienansatz, um krankheitsassoziierte Genvarianten zu identifizieren. Die Kopplung beschreibt den Umstand, dass eine Krankheit (allgemeiner: Phänotyp) und ein genetischer Marker überzufällig häufig in Familien kosegregieren. In einer Kopplungsstudie untersucht man also nach Möglichkeit alle Mitglieder von Familien, in denen eine bestimmte Krankheit gehäuft auftritt. Eine Assoziation liegt hingegen vor, wenn ein spezifisches Allel eines genetischen Markers (bzw. ein bestimmter Genotyp) überzufällig häufiger in der Population erkrankter Personen als in der Kontrollstichprobe auftritt. Einer Assoziationsstudie liegt also der Aufbau einer klassischen Fall-Kontroll-Studie zugrunde (Ziegler, 2002). Mit diesem Design werden die Genotyp- oder Allelfrequenzen in der Fallpopulation mit dem der Kontrollgruppe verglichen. Eine signifikant höhere Frequenz im Patientenkollektiv wird im Allgemeinen als Hinweis gewertet, dass das untersuchte Allel mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung assoziiert ist. So kann die Veränderung eines einzelnen Nukleotids in der genetischen Sequenz, also ein *single nucleotide polymorphism*, SNP, als funktioneller SNP beispielsweise über die Beeinflussung der Genexpression das erhöhte Risiko selbst bewirken, oder aber er liegt als Marker in der Nähe einer krankheitsassoziierten Genvariante (Hirschhorn et al., 2002). Nach Risch und

Merikangas sind Assoziationsstudien gerade in der Identifikation von Polymorphismen mit geringem Effekt Kopplungsstudien überlegen (Risch und Merikangas, 1996).

Eine positive Assoziation eines Markerallels stellt jedoch noch keinen Beweis für eine kausale Beziehung mit der Erkrankung dar. So kann es sein, dass die Assoziation des Markers durch das so genannte *Linkage Disequilibrium (LD)* mit einem kausalem Polymorphismus zustande kommt. Dieses *Linkage Disequilibrium*, auch als Kopplungsungleichgewicht bezeichnet, beschreibt das durch räumliche Nähe bedingte, voneinander abhängige Auftreten bestimmter Allele. Damit lässt sich bei Vorhandensein des einen Allels mit erheblicher Wahrscheinlichkeit auf das des anderen schließen. Je geringer der Abstand zwischen den Allelen ist, desto wahrscheinlicher ist ihr gemeinsames Auftreten. Dieser Umstand ergibt sich aus der Blockstruktur des menschlichen Genoms, in der sich weite Regionen (Blöcke) mit stark ausgeprägtem Kopplungsungleichgewicht mit zumeist kürzeren Regionen mit nur geringem Kopplungsungleichgewicht abwechseln. Nahezu alle Rekombinationsereignisse der Populationsgeschichte ereignen sich in den letzteren Abschnitten. Durch die Abhängigkeit der Allele verschiedener Polymorphismen in Blöcken mit hohem LD, ist die Anzahl beobachteter Allelkombinationen stark eingeschränkt. Die beobachteten Kombinationen miteinander vererbter Allele auf einem einzelnen Chromosom werden als **Haplotypen** bezeichnet (Freudenberg et al., 2002; Ziegler, 2002; Burton et al., 2005). Bei einem Haplotyp handelt es sich um eine Kombination spezifischer Allele, die aufgrund ihrer räumlichen Nähe in einer polymorphen Region eines Chromosoms gemeinsam vererbt werden. Man ist der Überzeugung, dass durch die Einbeziehung von Haplotypen in Assoziationsstudien mit Kandidatengenen die statistische Aussagekraft erhöht werden kann (Clark, 2004).

3 Fragestellung

Gene, die für Komponenten des serotonergen Systems kodieren, stehen im Mittelpunkt von Kandidatengenuntersuchungen im Bereich psychischer Störungen, bei denen eine Alteration des serotonergen Systems in hohem Maße wahrscheinlich ist (Lesch, 2001; Lesch et al., 2003). Dazu zählen unter anderem der Formenkreis der affektiven Störungen sowie das ADHS. In der vorliegenden Arbeit wurde stets der Ansatz einer Assoziationsstudie gewählt, bei der eine Fall- mit einer Kontrollstichprobe nichtverwandter Individuen (Patienten/gesunde Probanden) verglichen wird.

3.1 Einzelmarker- und Haplotyp-Assoziationsstudie des Kandidatengens *FEV*

Aufgrund der Erkenntnis, dass der murine Transkriptionsfaktor Pet-1 für die Entwicklung des serotonergen Systems und das Verhalten der Tiere (Hendricks et al., 2003) relevant ist, ist sein humanes Ortholog *FEV* ein interessantes Kandidatengens für psychische Erkrankungen. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit untersucht daher, ob Polymorphismen und entsprechende Haplotypen im *FEV*-Gen mit affektiven Erkrankungen assoziiert sind. Die vorliegende Arbeit geht damit der Frage nach, ob *FEV* nicht ein für affektive Störungen relevantes Suszeptibilitäts-gen darstellt und sich ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit des Auftretens bestimmter *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) dieses Gens und der Erkrankung an einer Depression nachweisen lässt. Die ausgewählten SNPs entstammen den Angaben der Datenbank (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index). Der SNP *rs452985* befindet sich 37 bp stromaufwärts von Exon 3 (Position 220049554, UCSC), der SNP *rs860573* innerhalb des Exon 3 im Bereich der ETS-Transkriptions-Domäne (Position 220049288, UCSC) und der SNP *rs16859448* 687 bp stromabwärts von Exon 3.

Darüber hinaus wurden in einem eigenen explorativen Untersuchungsansatz in 20 DNA-Proben depressiver Patienten ein Großteil von Exon 3 sequenziert, welches 270 bp stromabwärts der angegebenen ETS-Transkriptions-Domäne liegt. In diesem DNA-

Abschnitt befinden sich laut Datenbank (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index) sieben SNPs [*rs2301296* (C/A), *rs435910* (C/A), *rs443017* (G/T), *rs13025223* (G/T), *rs13025054* (G/T), *rs6749120* (T/A) und *rs451253* (G/A)]. Diese Sequenzierungs-Studie sollte dabei helfen, die Häufigkeit des Auftretens dieser sieben Genvarianten abzuschätzen und gegebenenfalls weitere, bisher noch nicht beschriebene SNPs zu identifizieren.

3.2 Einzelmarker- und Haplotyp-Assoziationsstudie des Kandidatengens *TPH2*

TPH2, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der zentralnervösen Serotoninsynthese, wurde schon in früheren Untersuchungen mit ADHS in Verbindung gebracht. Unter Annahme einer inversen Korrelation serotonerger Aktivität und aggressiver, sowie impulsiver Verhaltensweisen stellt *TPH2* ein interessantes Kandidatengen in Zusammenhang mit ADHS dar (Lesch und Merschdorf, 2000; Walitza et al., 2005). Walitza und Mitarbeiter konnten ein Transmissionsdisequilibrium für die auch hier untersuchten SNPs in von ADHS betroffenen Familien nachweisen. Demnach werden das G-Allel des *rs4570625* und das T-Allel des *rs11178997* signifikant häufiger an von ADHS betroffene Kinder vererbt, weshalb diese Allele auch als ADHS-Risikoallele bezeichnet wurden (Walitza et al., 2005; Baehne et al., 2009). Für die folgenden Untersuchungen wurden eben diese zwei SNPs ausgewählt, die sich in der Region für die transkriptionale Kontrolle der *TPH2*-Expression befinden (Promotor-Polymorphismen). Die Positionen der SNPs *rs4570625* und *rs11178997* befinden sich -703 bzw. -473 bp stromaufwärts von der kodierenden Sequenz (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index) (Walitza et al., 2005). Dieser zweite Teil der Arbeit untersucht mithilfe einer Fall-Kontroll-Studie, ob eine Assoziation des einen oder anderen Allels dieser SNPs mit der adulten Form des ADHS vorliegt. Dies geschieht sowohl in Form eines Einzelmarker-Assoziationstests als auch einer Haplotyp-Analyse.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Stichproben zur Untersuchung von *FEV*-Polymorphismen

Für die Untersuchung einer Assoziation ausgewählter *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) des *FEV*-Gens mit der Erkrankung an Störungen des affektiven Formenkreises wurde genetisches Material einer Patientenstichprobe und einer Kontrollgruppe genotypisiert und unter Anwendung statistischer Methoden verglichen. Für die Voruntersuchungen wurden jeweils Teile dieser Stichproben verwendet.

Patienten: Die Stichprobe umfasste insgesamt 270 Patienten (davon 179 weiblich) mittleren Alters (Durchschnittsalter 50,9 Jahre, $SD \pm 14,7$), die nicht miteinander verwandt sind. Bei allen Patienten wurde die Diagnose einer Störung aus dem affektiven Formenkreis gestellt. 180 dieser Patienten litten an einer bipolar-affektiven Störung gemäß den DSM-IV Kriterien, 66% von ihnen wiesen eine positive Familienanamnese für affektive Störungen auf. Weitere 90 Patienten litten an einer rezidivierenden unipolaren depressiven Störung. Die Probanden stammten alle aus der unterfränkischen Region. Die Diagnosestellung erfolgte durch ein ausführliches, semi-strukturiertes klinisches Interview analog dem AMDP Interview (Arbeitsgemeinschaft für Methodik und Dokumentation in der Psychiatrie 2000), durchgeführt von einem erfahrenen Psychiater der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universitätsklinik Würzburg, insbesondere von Herrn Prof. Dr. med. A. Reif. Zusätzlich erfolgte die Durchsicht der Krankenakte und, soweit vorhanden, auch auswärtiger Arztbriefe und dokumentierter Angehörigeninterviews. Alle Patienten befanden sich mindestens einmal in stationärer Behandlung in der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universitätsklinik Würzburg. Signifikante neurologische Komorbiditäten, die zu organischen Psychosen führen können (wie beispielsweise Epilepsie, mentale Retardierung oder andere organische Erkrankungen), konnten bei allen Patienten ausgeschlossen werden.

Kontrollgruppe: Das Material für die Kontrollstichprobe stammte von 362 gesunden Probanden, von denen 174 weiblich waren. Das Alter betrug 32,6, $SD \pm 10,2$ Jahre. Da die Probanden ebenfalls der unterfränkischen Gegend entstammten, ist bei ihnen ein den Patienten vergleichbarer genetischer Hintergrund anzunehmen. 90 Probanden wurden auf das Vorliegen psychiatrischer Krankheiten untersucht, alle anderen wiesen eine negative Medikamentenanamnese auf und wurden ausführlich über den Inhalt der Studie informiert.

Den Regeln der Deklaration von Helsinki folgend, wurden nur Patienten und Freiwillige in die Studie aufgenommen, die schriftlich informiert ihre Zustimmung gaben. Vor Beginn der Studie wurde die Untersuchung durch die Ethik-Kommission der Universität Würzburg genehmigt.

4.1.2 Stichproben zur Untersuchung von *TPH2*-Polymorphismen

Patienten: Für die Untersuchung der ausgewählten SNPs des *TPH2*-Gens wurde genetisches Material von Patienten mit der adulten Form der ADHS (aADHS, syn. Hyperkinetisches Syndrom, HKS) verwendet. Die Stichprobe der Patienten umfasste insgesamt 284 Probanden (140 davon weiblich) mittleren Alters ($M = 35,5$ Jahre, $SD \pm 10,4$).

Die Patienten wurden von einem erfahrenen Psychiater der Klinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universitätsklinik Würzburg ausführlich sowohl anhand eines offenen Interviews als auch anhand des Strukturierten Klinischen Interviews des DSM-IV für Achse-I und Achse-II-Störungen (Structured Clinical Interview, SCID-I; SCID-II) diagnostiziert, was auch die Registrierung komorbider Störungen erlaubt. Die retrospektive Feststellung des Schweregrades der ADHS erfolgte mithilfe der Kurzfassung der Wender Utah Rating Scale (WURS-k (Wender, 1995; Retz-Junginger et al., 2002)). Wo vorhanden, wurden auch Krankenakten, Informationen Angehöriger, Schulberichte und ähnliche Dokumente in die Diagnosestellung mit einbezogen. Depressive Symptome wurden anhand des Beck Depression Inventory (BDI, Beck et al., 1961) eingestuft, Persönlichkeitsmerkmale mithilfe des NEO Personality Inventory (NEO PI-R, Costa und McCrae, 1998) und des

Tridimensional Personality Questionnaire (Cloninger et al., 1991) bestimmt. Zur Einschätzung der Impulsivität wurde der I₇ Fragenkatalog nach Eysenck (1985) verwendet, der Nikotinabusus wurde anhand des Fagerstrom Tolerance Questionnaire (FTQ, Fagerström, 1978) quantifiziert.

Einschlusskriterien für diese Studie waren das Vorliegen der aADHS entsprechend der diagnostischen Kriterien des DSM-IV (Krankheitsbeginn vor dem 7. Lebensjahr, lebenslange Persistenz der Symptome, aktuelle Erfüllung der Diagnosekriterien) und ein Alter zwischen 18 und 65 Jahre bei Erhebung der Daten.

Ausschlusskriterien waren ein beschränktes Auftreten von Konzentrationsdefiziten, Hyperaktivität und Impulsivität im Rahmen einer anderen Achse-I Störung sowie die aktuelle Diagnose nicht behandelter Alkohol- und/oder Drogenabhängigkeit oder des Missbrauchs dieser Substanzen. Ausgeschlossen wurden auch Probanden mit anderen psychiatrischen Diagnosen wie Bipolar-I Störungen, Schizophrenie oder anderen psychotischen Störungen, sowie Patienten mit mentaler Retardierung (IQ < 80, MWT-B < 13 Punkte).

Alle Patienten waren kaukasischen Ursprungs und stammten aus der unterfränkischen Region. Weitere Details zur Stichprobe finden sich bei (Jacob et al., 2007).

Kontrollgruppe: Für die Kontrollgruppe wurde genetisches Material von freiwilligen Probanden, die zum Zeitpunkt der Probeentnahme körperlich und psychisch gesund waren, eingesetzt. Die Stichprobe umfasst insgesamt 120 Personen (61 davon weiblich) mittleren Alters (M = 36,4 Jahre, SD ± 9,7). 90 Probanden sind sowohl Teil dieser als auch der oben beschriebenen Kontrollstichprobe für affektive Erkrankungen (siehe Abschnitt 4.1.1.).

Die Regeln der Deklaration von Helsinki einhaltend, wurden auch hier nur Patienten und Freiwillige in die Studie aufgenommen, die schriftlich informiert ihre Zustimmung gaben. Vor Beginn der Studie wurde die Untersuchung durch die Ethik-Kommission der Universität Würzburg genehmigt.

4.1.3 Oligodesoxynukleotide

Tabelle 4.1 bietet eine Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxynukleotide.

Tabelle 4.1: Übersicht über die verwendeten Primer (T_A Annealingtemperatur)

<i>Gen</i>	<i>SNP</i>	<i>Primer</i>	<i>Primer Sequenz</i>	T_A (°C)
<i>FEV</i>	<i>rs452985</i>	F (Forward)	5'-CGG TAA GGC TAC ACA CCA CTC TGC T-3'	67,4
		R (Reverse)	5'-TGA ACT CGC CGT GAC CGC CCT-3'	
	<i>rs16859448</i>	F	5'-TCC CTA TCC CTC ACA AAC CGT CC-3'	67,4
		R	5'-CCT CTG CTG GTC GGA GGA GGG TAC-3'	
	<i>rs16859448</i>	SNaPshot	5'-GCC GTC TTT CTT CTG CTC GGC CTC-3'	67,4
	Sequenzierung	F	5'-TAC CAC TAG ACG GGG CGG TCG GGT G-3'	65,6
R		5'-CGA GTG CCA AAT CTT TTC CCA CT-3'		
	MALDI-ToF		56,0	
<i>TPH2</i>	<i>rs4570625</i>	NOR*	5'-TTT CCA TGA TTT CCA GTA GAG AG-3'	55,0
		MOD*	5'-AAG CTT TTT CTG ACT TGA CAA AT-3'	
	<i>rs11178997</i>	PROM F	5'-CAC ATT TGC ATG CAC AAA ATT AGA ATA TGT-3'	68,0
		PROM R	5'-GAA CCC TGG TGC TGA AGA GCA AT-3'	
		473 F	5'-TCT TGA TTA CCT TAT TTG ATC ATT ACA CCT-3'	
		473 R	5'-CAC ATG TGA TAT TTT GAC ACA AGC GTA CCT-3'	

*NOR = Forward normal, MOD= Reverse modifiziert

Sie wurden zur Untersuchung verschiedener SNPs als Primer in der PCR, der Sequenzierung und der Minisequenzierung (SNaPshot) eingesetzt. Nebstehend sind

ihre Sequenz sowie die optimale Annealing-Temperatur (T_A) angegeben. Soweit vorgesehen, wird ein Paar aus Forward (F)- und Reverse (R)-Primer angegeben. Alle Primer wurden bei MWG Biotech AG, Ebersberg, bezogen.

4.1.4 Desoxynukleotide

<u>Nukleotide</u>	<u>Hersteller</u>
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 100 mM	PROMEGA GmbH, Mannheim
100 bp DNA-Leiter	PEQLAB, Erlangen

4.1.5 Enzyme

<u>Enzym (SNP)</u>	<u>Hersteller</u>
<i>BsrBI</i> (SNP <i>rs452985</i>)	NEW ENGLAND BIOLABS™, Inc.,USA
<i>ApoI</i> (SNP <i>rs450625</i>)	NEW ENGLAND BIOLABS™, Inc.,USA
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Eigenherstellung
Hotstar <i>Taq</i> DNA-Polymerase	QIAGEN GmbH, Hilden
SAP (<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i> , 1U/ μ l)	SEQUENOM Inc., San Diego, CA, USA
<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i> (1U/ μ l)	FERMENTAS GmbH, Leon-Rot

4.1.6 Puffer

<u>Puffer</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Goldstar 10×	750 mM Tris-HCl (pH 9,0) 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 % TWEEN 20
MgCl ₂ -Puffer (10, 15, 25 mM)	500 mM KCl

	100 mM Tris-HCl (pH 8,3)
	0,25 % (v/v) Tween [®] 20
	0,25 mg/ml BSA
	10 oder 15 oder 25 mM MgCl ₂
1 x TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat
	1 mM EDTA (pH 8,0)
Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau
	0,25 % Xylen Cyanol FF
	30 % Glycerol in A. bidest.

4.1.7 Weitere Substanzen

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller</u>
Agarose	BIOZYM, Scientific GmbH, Oldendorf
Big Dye [®] Terminator v 1.1. Cycle Sequencing Kit	APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA
Bromphenolblau	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
ddH ₂ O	MERCK, Darmstadt
Ethanol absolut (mind. 99,8 %)	APPLICHEM GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
ExoSap-IT [®]	USB Europe GmbH, Staufen

GeneScan™-120 LIZ™Size Standard	APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA
Glycerol	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
Hi-Di™ Formamide	APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA
Ionenaustauscherharz	SEQUENOM Inc., San Diego, CA, USA
iPLEX® Termination Mix	SEQUENOM Inc., San Diego, CA, USA
KCl	APPLICHEM GmbH, Darmstadt
MgCl ₂	APPLICHEM GmbH, Darmstadt
MgCl ₂ (25 mM)	QIAGEN GmbH, Hilden
Natrium-Acetat (3 M NaAc, pH 4,6)	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim
PCR-Purification Kit (50) QIAquick®	QIAGEN GmbH, Hilden
POP 6™ (Performance Optimized Polymer 6)	APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA
SNaPshot® Multiplex Kit	APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA
SpectroChip® 384er	SEQUENOM Inc., San Diego, CA, USA
Tween® 20 (Polysorbat 20)	APPLICHEM GmbH, Darmstadt
Xylen Cyanol FF	SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim

4.1.8 Geräte inklusive gegebenenfalls dazugehöriger Programme

<u>Gerät</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>
Dokumentationssystem	Chemi Doc [®]	BIORAD Laboratories GmbH, München
Heizrüttelplatte	GLW M32	GLW, Würzburg
Massenspektrometer	Bruker AutoFlex [®] MALDI- ToF Massenspektrometer mit Typer 3.4 [®] -Software	SEQUENOM Inc., San Diego, CA, USA
Nanodispenser	MassARRAY [®] Nanodispenser	SEQUENOM Inc., San Diego, CA, USA
PCR-Gradienten- Thermocycler	T-Gradient Thermocycler [®]	BIOMETRA, Göttingen
Photometer	Nanodrop [®] ND 1000 Spectrophotometer mit ND 1000 V3 3.0-Software	PEQLAB, Erlangen
Pipetten	Lamda [™]	CORNING, Corning, USA
Roboter	Reference [®] / Research [®] EpMotion 5075	EPPENDORF GmbH, Wesseling-Berzdorf EPPENDORF GmbH, Wesseling-Berzdorf
Sequenzierer	MATRIX HYDRA II Microdispenser ABI PRISM 310 [®] Genetic Analyzer mit GeneScan [®] Analysis – Software	THERMO FISHER SCIENTIFIC Inc., New Hampshire, USA APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA
Spannungsgerät	Power Supply [®]	LKB, Bromma, Schweden
Statistikprogramm	HaploView	(Barrett et al., 2005)

Ultraviolett Transilluminator		UVP, Upland, USA
Vortexer / Heizrührplatte		SCIENTIFIC INDUSTRIES, Inc, USA
Waage	PM 300	METTLER, Gießen
Wasserbad		GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Mikro Rapid K	HETTICH, Tuttlingen
	Microspin FV 2400	BIOSAN, Riga, Latvia
Tubes	Multiply [®] -μStrip ProBiospere [®] G310-T Tubes (0,5 ml) für ABI Prism310 [®] G310-S Septa für ABI Prism310 [®]	SARSTEDT, Nümbrecht G.KISKER, GbR, Steinfurt
Pipettenspitzen	Biosphere [®] -Qualitätsspitzen Filter Tips 10μl / 100μl Tip One [®] Filter Tips 0,1-10μl Tips 101-1000μl	SARSTEDT, Nümbrecht STARLAB GmbH, Ahrensburg
Gelkammern, Kämme, Spacer, Spatel, Klammern		PEQLAB, Erlangen

4.2 Methoden

4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die erstmals von Kary Mullis 1984 entwickelte Methode der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) dient der Multiplikation eines bestimmten DNA-Abschnitts, der in darauf folgenden Schritten weiter untersucht

werden kann. Für eine effiziente Multiplikation der DNA in einer automatisierten Abfolge mehrerer Amplifikationszyklen ist eine hitzestabile, die Reaktion katalysierende, DNA-Polymerase nötig. Die *Taq*-DNA-Polymerase erfüllt diese Voraussetzung, sie wird aus dem in heißen Quellen vorkommenden thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen. Im Gegensatz zu den meisten anderen Polymerasen weist sie ein im Vergleich hohes Temperaturoptimum von 72°C auf und ist thermostabil, d.h. sie übersteht unbeschadet Temperaturen von bis zu 95°C (wie im Denaturierungsschritt, siehe unten). Jeder Amplifikationszyklus besteht aus drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Extensionsphase. In der Denaturierungsphase werden die komplementären Stränge der Ausgangs-DNA durch kurzes Erhitzen auf 95°C voneinander getrennt. Die Wasserstoffbrückenbindungen, durch die die beiden Polynukleotidstränge eine Doppelhelix bilden, werden so gelöst. Für die nachfolgenden Schritte stehen nun zwei einzelsträngige Moleküle (+- und - Strang) als Matrize für die Neusynthese zur Verfügung. In der darauf folgenden Annealingphase bindet ein Primerpaar (bestehend aus Forward (F)- und Reverse (R)-Primer) an jeweils einen der komplementären Stränge und begrenzt so das gewünschte DNA-Fragment. Hierbei wird die jeweils für die spezifischen Primerpaare optimale Annealingtemperatur gewählt (Einzelheiten s. Tabelle 4.1). Eine Rückbildung des Doppelstrangs wird durch die im Überschuss zugegebenen Primer verhindert. Durch die Bindung der *Taq* DNA-Polymerase an die Primer wird die Extensionsphase eingeleitet. Bei einem Temperaturoptimum von 72°C katalysiert die DNA-Polymerase den Aufbau des zur Matrize komplementären Strangs als Verlängerung des Primers. Die für die Synthese der DNA-Polymerase notwendigen Substrate, die Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), werden dem Ansatz zugefügt. Die Pufferbedingungen variieren leicht in den einzelnen Protokollen (siehe Kapitel 4.2.4), sie dienen der Stabilisierung des Enzyms und optimieren die Bedingungen für das Primer-Annealing. Häufig zugesetzt wird dem Ansatz Magnesiumchlorid ($MgCl_2$) in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 15, 25 mM), da die DNA-Polymerase für eine erfolgreiche Synthese Mg^{2+} als Cofaktor benötigt. Wird nun der Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Extension wiederholt, dient auch das neu synthetisierte DNA-Fragment wieder als Matrize für Primer und DNA-Polymerase. So kann durch eine 35- bis 40-malige Wiederholung des Amplifikationszyklus die Zielsequenz in

relativ kurzer Zeit exponentiell vermehrt werden (Lottspeich und Engels, 2006; Brown, 2007).

Soweit nicht anders beschrieben, wurde für jede konventionelle PCR ein Reaktionsansatz nach dem in Tabelle 4.2 dargestellten Schema unter Verwendung des jeweils spezifischen Primerpaares und den für die Amplifikation optimalen Pufferbedingungen hergestellt. Tabelle 4.3 zeigt schematisch die Reaktionsbedingungen, unter denen die PCR mit der jeweils spezifischen Annealingtemperatur in einem PCR-Gradienten-Thermocycler durchgeführt wurde.

Tabelle 4.2: Standardzusammensetzung eines PCR-Ansatzes (Endvolumen 25 µl)

Substrat	Menge (µl)
DNA-Template	2,00
Puffer (z.B. Goldstar 10x, Mg Cl ₂ (10, 15, 25 mM))	Variabel
Alle vier Nukleotide (je 2,5 mM)	1,00
Primer F (100 pmol/µl)	1,00-1,50
Primer R (100 pmol/µl)	1,00-1,50
Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,05-0,50
dH ₂ O	Variabel

Tabelle 4.3: Schematische Darstellung der PCR-Bedingungen

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	ca. 95,0 °C	5 min	1 x
Denaturierung	ca. 95,0 °C	30 s	
Annealing	Zwischen 55-67,4 °C	40 s	35-40 x
Extension	72,0 °C	45 s	
Extension	72,0 °C	5 min	1 x
Pause	10,0 °C		

Genauere Informationen zu den Reaktionsansätzen und -bedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten PCRs zur Bestimmung der SNPs *rs452985 (FEV)*, *rs4570625 (TPH2)* und *rs11178997 (TPH2)* sind im Abschnitt 4.2.4 aufgeführt. Sowohl für die SNaPshot-Minisequenzierung (Kapitel 4.2.5), die MALDI-ToF-Analyse (Kapitel 4.2.6) als auch für die Sequenzierung (Kapitel 4.2.7) wird ebenfalls eine PCR durchgeführt. Die Aufführung der dafür verwendeten Ansätze und Bedingungen findet sich im jeweiligen Kapitel der genannten Methoden.

4.2.2 Restriktionsenzym-Verdau

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs. Sie sind in der Lage, die Phosphodiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Moleküls an einer spezifischen Stelle hydrolytisch zu spalten. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen umfassen meist 4 bis 8 Nukleotide und sind in der Regel palindromisch. In der Mehrzahl der Fälle liegt die Schnittstelle innerhalb dieser Sequenz, nur selten dahinter. Die entstehenden Restriktionsfragmente haben eine durch die Lage der Spaltstellen definierte Länge mit bekannten Schnittenden und können mithilfe der Gelelektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und bestimmt werden.

Ist die Nukleotidfolge der Erkennungssequenz verändert, wie im Falle eines SNP, kann dies entweder dazu führen, dass sich die für die Restriktionsendonuklease spezifische Bindungsstelle ergibt und es so zur Spaltung der DNA in zwei Restriktionsfragmente kommt, oder aber sie ist so verändert, dass das Enzym nicht mehr bindet und die Ausgangssequenz (das PCR-Produkt) intakt bleibt. Aus der Analyse des in der Gelelektrophorese entstehenden Bandenmusters der Restriktionsfragmente lässt sich dann eine Aussage treffen, ob der spezifische SNP in der untersuchten DNA vorhanden war oder nicht.

In dem Reaktionsansatz wird die zu analysierende DNA (PCR-Produkt) mit dem spezifischen Restriktionsenzym unter definierten Pufferbedingungen bei 37°C mindestens zwei Stunden im Wasserbad inkubiert. Der Puffer enthält die für die

Enzymaktivität notwendigen Ionen (z.B. Mg^{2+}), stabilisierende Substanzen (z.B. Sulfhydrylreagenzien) und sorgt für einen optimalen pH-Wert des Ansatzes, der meist zwischen pH 7,5 und pH 8,0 liegt (Lottspeich und Engels, 2006). In Tabelle 4.4 ist der Standardansatz für einen Restriktionsenzym-Verdau dargestellt, die exakte Zusammensetzung des Ansatzes für den jeweiligen SNP ist in Kapitel 4.2.4 aufgeführt. In besagtem Absatz findet sich auch die Darstellung des spezifischen Bandenmusters für SNP *rs452985* (G/C), *rs4570625* (G/T) und *rs11178997* (A/T).

Tabelle 4.4: Standardansatz für eine Restriktionsanalyse (Endvolumen 20 μ l)

Substrat	Menge (μl)
PCR-Produkt	10,00
Enzym (z.B. <i>BsrB1</i> , 10 U/ μ l)	1,00
Puffer (z.B. NeBuffer2 [®])	2,00
dH ₂ O	7,00

4.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde sowohl zur Überprüfung einer erfolgreichen Amplifikation des PCR-Produkts als auch zur Feststellung des Genotyps nach Restriktionsanalyse eingesetzt.

Die Gelelektrophorese ist eine Standardmethode, um die Basenpaarlänge von DNA- und RNA-Sequenzen abzuschätzen, da die einzelnen Moleküle in einem elektrischen Feld ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Man macht sich für die Gelelektrophorese den Umstand zunutze, dass Nukleinsäuren in neutralem bis alkalischem Milieu elektrisch negativ geladen sind. Als Anionen wandern die DNA-Moleküle also im elektrischen Feld in Richtung der positiven Elektrode. Trägermaterial der Gelelektrophorese war in dieser Arbeit ausschließlich Agarose. Agarose, ein Polysaccharid, bildet ein Netzwerk mit Poren, durch das die DNA-Fragmente hindurch wandern und so in Abhängigkeit von ihrer Größe aufgetrennt werden. Moleküle gleicher Länge bilden im Gel so genannte Banden, die Anordnung unterschiedlich langer Moleküle (Banden) im Gel ein Bandenmuster. Je nach erwarteter Größe und

Größendifferenz der Fragmente wird der optimale Trennbereich durch Auswahl der Konzentration des Agarosegels (in unserem Fall zwischen 1% und 5%) bestimmt. Je höher die Agarosekonzentration (2-5%) des Gels gewählt wird, desto besser lassen sich kleine DNA-Moleküle und Oligonukleotide sowie geringe Größendifferenzen der einzelnen Moleküle darstellen. In 1-1,5%igen Gelen besitzen kleine Moleküle eine konstante Laufgeschwindigkeit, verschmelzen zu einer Bande und lassen sich damit nicht mehr differenzieren.

Um eine sichere Größenzuordnung der Banden und damit ihre richtige Bestimmung zu gewährleisten, wird bei jeder Gelelektrophorese entsprechend der Basenpaarlänge der erwarteten Fragmente eine DNA-Leiter als Größenmarker verwendet. Sie enthält DNA-Fragmente definierter Basenpaarlänge, die ebenfalls elektrophoretisch aufgetrennt werden und einen Vergleich der Banden ermöglichen. In unseren Versuchen wurde stets eine 100 bp-DNA-Leiter eingesetzt. Das Produkt (PCR-Produkt 5 µl, Restriktionsanalyse 20 µl) wurde zusammen mit dem unter 4.1.5 aufgeführten Ladepuffer auf das Gel aufgetragen, als Laufpuffer diente 1xTAE (Zusammensetzung siehe unter 4.1.5). Die Agarosegele wurden bei ihrer Herstellung mit Ethidiumbromid (3 µl pro 100 ml Gel, versetzt, das zwischen den Basenpaaren der DNA interkaliert und bei Anregung durch UV-Strahlung fluoresziert. Hierdurch können die DNA-Banden sichtbar gemacht werden und das Ergebnis anschließend mithilfe des Dokumentationssystems Chemi Doc[®] fotografiert und dokumentiert werden. Das elektrische Feld wurde durch das Spannungsgerät Power Supply[®] erzeugt, die angelegte Spannung lag zwischen 90 und 100 V (Lottspeich und Engels, 2006; Brown, 2007).

4.2.4 Detaillierte Reaktionsansätze der PCR- und Restriktionsenzym-Verdau-Untersuchungen

SNP rs452985 des FEV-Gens: Der erste Schritt zur Genotypisierung des SNP rs452985 (G/C) bestand in der Durchführung einer **PCR**, der exakte Reaktionsansatz enthielt neben 2,0 µl DNA-Template 2,5 µl Goldstar Puffer (10x), 1,0 µl MgCl₂ (25 mM), 1,0 µl dNTPs (je 2,5 mM), je 1,0 µl des F- und des R- Primers FEV SNP2 sowie 0,05 µl *Taq* DNA-Polymerase und 16,45 µl dH₂O, das Endvolumen betrug 25 µl. Die Bedingungen

entsprachen dem in Tabelle 4.3 dargestellten Schema, die Annealingtemperatur lag bei 67,4°C, der Ansatz durchlief 35 Zyklen.

Das PCR-Produkt umfasste 295 bp und wurde mittels Gelelektrophorese (1%iges Gel) nachgewiesen. Der Nachweis des SNP erfolgte mithilfe eines **Restriktionsenzym-Verdau**. Der Ansatz (20 µl Endvolumen) enthielt 10 µl des PCR-Produkts, 1,0 µl des Restriktionsenzym *BsrBI* (10 U/µl) sowie 2,0 µl des dazugehörigen 10fach-Puffers NeBuffer® 2 und 7,0 µl dH₂O. und wurde mindestens 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

In der nachfolgenden Gelelektrophorese (3%iges Gel, 1 bis 1 ½ Stunden Laufzeit bei 90 bis 100 V) konnte das für den jeweiligen Genotyp spezifische Bandenmuster nachgewiesen werden. Tabelle 4.5 zeigt alle möglichen Ergebnisse und die daraus folgende Bestimmung des vorliegenden Genotyps.

Tabelle 4.5: Bestimmung des Genotyps (*FEV rs452985*) anhand des Ergebnisses der Gelelektrophorese nach Restriktionsenzym-Verdau

	Genotyp	Anzahl der Banden	DNA-Fragmentgröße
G/G	Stammallel homozygot	2	161 bp und 134 bp
C/C	Variante homozygot	1	295 bp
G/C	heterozygot	3	161 bp, 134 bp und 295 bp

SNP rs4570625 des TPH2-Gens: Die Genotypisierung des SNP *rs4570625* (G/T) im *TPH2*-Gen wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: zunächst wurde eine **PCR** durchgeführt, der Reaktionsansatz enthielt neben 2,0 µl DNA-Template 2,5 µl MgCl₂-enthaltender PCR-Puffer (15 mM), 1,0 µl dNTPs (je 2,5 mM), je 1,0 µl der Primer *MOD SNP25* (100 nM/µl) und *NOR SNP25* (100 nM/µl), sowie 0,5 µl der *Taq* DNA-Polymerase und 17,0 µl dH₂O. Das Endvolumen betrug pro Probe 25 µl. Die Bedingungen der PCR entsprachen dem in Tabelle 4.3 aufgeführten Ablauf, die Annealingtemperatur lag bei 55,0°C und der Ansatz durchlief 40 Zyklen.

Das amplifizierte DNA-Fragment hatte eine Größe von 309 bp und konnte in einem 3%igen Agarosegel mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden. Anschließend

wurde durch **Restriktionsenzym-Verdau** der Genotyp bestimmt. Hierfür wurden 10 µl des PCR-Produkts mit 0,5 µl des Restriktionsenzym *ApoI* (10 U/µl) und 2,0 µl des dazugehörigen 10fach-Puffers SE Buffer B[®] sowie 7,5 µl dH₂O (Endvolumen 20µl) mindestens 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Die entstandenen Fragmente wurden anschließend mittels Gelelektrophorese mit einem 4-5%igen Agarosegel und ca. 1 Stunde Laufzeit bei 90 bis 100 V aufgetrennt. Anhand des Bandenmusters konnte der individuelle Genotyp bestimmt werden, siehe dazu Tabelle 4.6.

Tabelle 4.6: Bestimmung des Genotyps (*TPH2*, SNP *rs4570625*) anhand des Ergebnisses der Gelelektrophorese nach Restriktionsenzym-Verdau

	Genotyp	Anzahl der Banden	DNA-Fragmentgröße
<i>G/G</i>	Stammallel homozygot	2	285 bp und 24 bp
<i>T/T</i>	Variante homozygot	1	309 bp
<i>G/T</i>	heterozygot	3	285bp, 24 bp und 309 bp

SNP rs11178997 des TPH2-Gens: Durch Verwendung zweier Primerpaare in der PCR konnte bei der Untersuchung des SNP *rs11178997* (A/T) ein eindeutiger Nachweis des vorliegenden Genotyps erbracht und somit auf weitere Methoden verzichtet werden. Beide Primerpaare enthalten eine je für ein Allel spezifische Bindungsstelle, wodurch es - je nach vorliegendem Genotyp – zur Bindung nur eines der beiden Primer oder aber bei Heterozygotie zur Bindung beider Primerpaare kommt. Es entstehen so unterschiedlich lange DNA-Fragmente. Ein Fragment beider Primer hat die gleiche Länge, das andere unterscheidet sich jedoch in seiner Länge um 244 bp. Bei Homozygotie bindet also jeweils nur ein Primerpaar, bei heterozygotem Genotyp jedoch beide, es entstehen drei Fragmente. Der Reaktionsansatz der PCR enthielt 2,0 µl DNA-Template, 2,5 µl MgCl₂ (10 mM), 1,0 µl dNTPs (je 2,5 mM), jeweils 1,5 µl der zwei Primerpaare, *TPH2 Prom F* und *R* und *TPH2 473 (T) F* und *R*, sowie 0,1 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl) und 13,4 µl dH₂O, das Endvolumen betrug 25 µl. Der Ansatz durchlief 35 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 60,0°C.

In der Gelelektrophorese entstand durch Trennung der amplifizierten Fragmente mithilfe eines 2-3%igen Agarosegels ein Bandenmuster, anhand dessen die einzelnen Genotypen bestimmt werden konnten, siehe hierzu Tabelle 4.7.

Tabelle 4.7: Bestimmung des Genotyps (*TPH2*, SNP *rs11178997*) anhand des Ergebnisses der Gelelektrophorese nach PCR

Genotyp		Anzahl der Banden	DNA-Fragmentgröße
<i>T/T</i>	Stammallel homozygot	2	749 bp und 526 bp
<i>A/A</i>	Variante homozygot	2	749 bp und 282bp
<i>A/T</i>	heterozygot	3	749 bp, 526 bp und 282 bp

4.2.5 Minisequenzierung

Die Minisequenzierung ist eine an die Sequenzierung nach Sanger angelehnte Methode zur Untersuchung eines oder mehrerer SNPs. Sie wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der Häufigkeitsverteilung des SNP *rs16859448* (G/T) im *FEV*-Gen in einer begrenzten Patientenstichprobe verwendet.

Ausgangsprodukt bildet auch für die Minisequenzierung ein gereinigtes PCR-Produkt der DNA-Region, in der sich der zu untersuchende SNP befindet. Mit diesem wird eine so genannte Primer-Extensions-Reaktion (oder auch *single base extension*, SBE) durchgeführt, für die zunächst ein Primer benötigt wird, der exakt eine Base vor der polymorphen Stelle endet. Im Gegensatz zur Sequenzierung nach Sanger werden dem Ansatz ausschließlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) als Substrate für die DNA-Polymerase zugegeben, die je nach Sequenz komplementär eingebaut werden. Der Primer wird also stets nur um ein Didesoxynukleotid (ddNTP) verlängert, danach erfolgt der Abbruch der Reaktion, weshalb die Methode den Namen Minisequenzierung bekam. Das erhaltene Produkt wird nach Abtrennung überschüssiger ddNTPs und anschließender Denaturierung mithilfe des ABI PRISM 310[®] Genetic Analyzers kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Die farbkodierte Darstellung des den Primer verlängernden ddNTPs erlaubt die exakte Identifizierung des vorliegenden SNP. Liegen das Stammallel bzw. die Variante homozygot vor, wird dies jeweils durch einen einfarbigen Peak angezeigt, ist eine Probe bezüglich des Locus

heterozygot, treten in der graphischen Darstellung zwei Peaks unterschiedlicher Farbe auf. Die Minisequenzierung ermöglicht so auf relativ einfache Weise die exakte Detektion eines SNP, ohne dass ganze Abschnitte sequenziert werden müssen. Abbildung 4 zeigt noch einmal schematisch den Ablauf der Reaktion (Aydin und Bähring, 2000; Turner et al., 2002; Zill et al., 2004b).

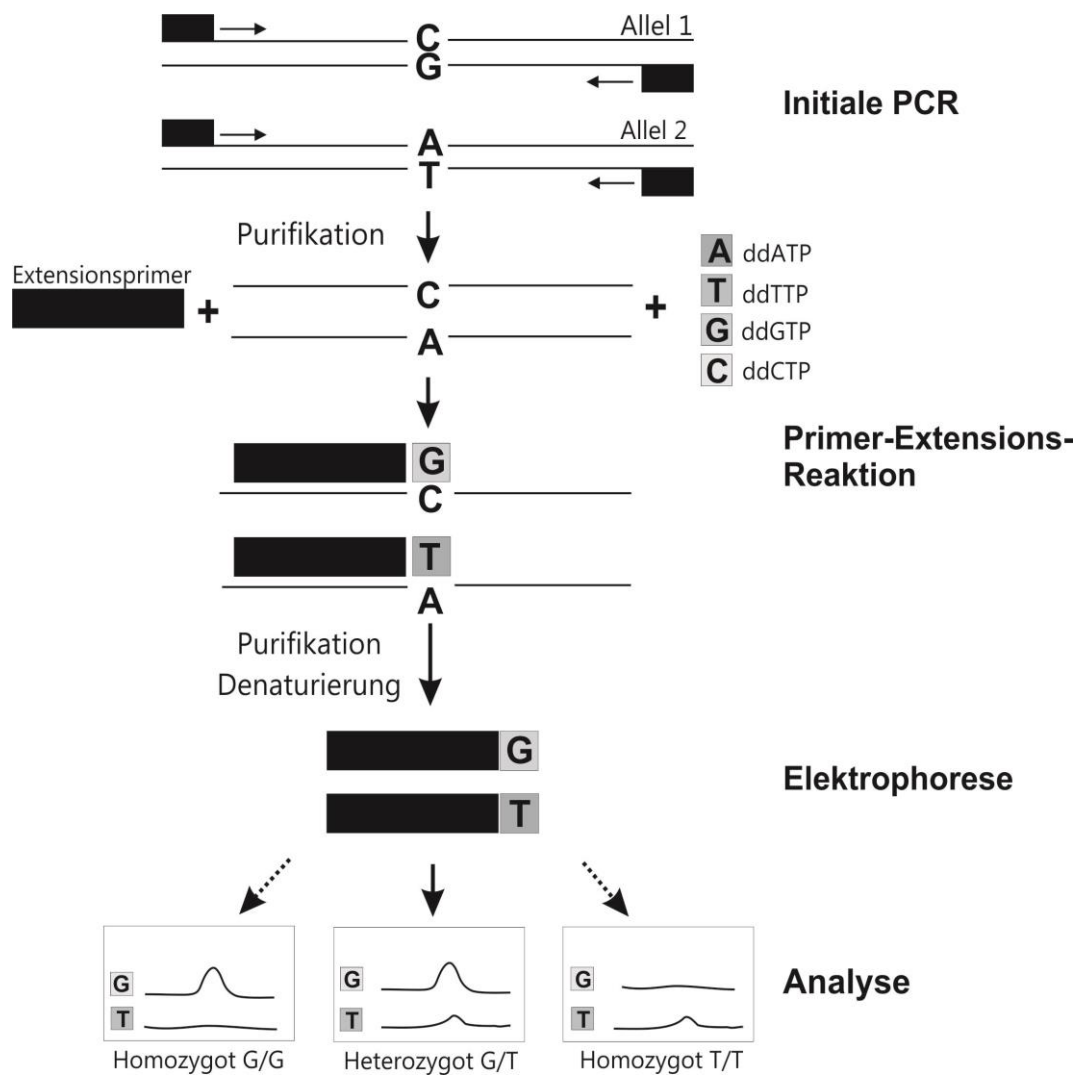


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Ablaufs einer Minisequenzierung

Der Ablauf des Protokolls der Minisequenzierung gliedert sich in folgende Schritte: konventionelle **PCR**, erste **Purifikation**, **Primer-Extensions-Reaktion**, zweite **Purifikation**, **Denaturierung** und **Kapillarelektrophorese mit Analyse**.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Region, in der sich der SNP *rs16859448* befindet, unter Verwendung des entsprechenden Primerpaares (*FEV* SNP *rs16859448* F/R, je 1 μ l, Sequenz siehe Tabelle 4.1) mithilfe einer konventionellen PCR amplifiziert. Der Ansatz wurde nach dem in Tabelle 4.2 dargestellten Schema mit 2,0 μ l DNA-Template unter Hinzunahme der Puffer Goldstar (10x, 2,5 μ l) und $MgCl_2$ (25 mM, 1,0 μ l) hergestellt, das Endvolumen betrug 25 μ l. Der Ansatz durchlief 35 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 67,4°C entsprechend den in Tabelle 4.3 aufgeführten Bedingungen.

Die **erste Purifikation** des PCR-Produkts (5 μ l) erfolgte mithilfe von ExoSap-IT[®] (USB Europe GmbH, Staufeu) (1 μ l), eines Gemischs aus *Exonuklease I* und *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)* bei 37°C für 45 min. Dies sind hydrolytisch wirkende Enzyme, die verbleibende Primer und dNTPs abbauen, ohne das PCR-Produkt anzugreifen. Die *Exonuklease I* zersetzt überschüssige Primer, die *SAP* dephosphoryliert restliche dNTPs. So wird eine Kontamination des Ansatzes verhindert. Der Ansatz wurde am Ende für 15 min auf 83°C erhitzt, um die Enzyme zu inaktivieren.

Für die anschließende **Primer-Extensions-Reaktion** wurde ein Ansatz aus gereinigtem PCR-Produkt (1 μ l), Extensions-Primer (*FEV* SNaPshot, 1 μ l (10 pmol/l), Primersequenz siehe Tabelle 4.1) und SNaPshot Multiplex Kit[®] (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA, 1 μ l) hergestellt. Das Endvolumen betrug 10 μ l. Der Reaktionsansatz durchlief 25 Zyklen der folgenden Schritte: Denaturierung 10 s bei 96°C, Annealing 5 s bei 50°C und Extension 30 s bei 60°C.

Für die **zweite Purifikation** wurde das PCR-Produkt (10,0 μ l) mit der *Calf Intestine Alkaline Phosphatase* (1,0 μ l (1 U/ μ l), FERMENTAS GmbH, Leon-Rot,) 45 min bei 37°C inkubiert, das Enzym entfernt die Phosphatgruppe des 5'-Endes der Polynukleotide. Auch hier wurde zur Inaktivierung des Enzyms der Ansatz am Ende für 15 min auf 83°C erhitzt.

Die **Denaturierung** stellt den letzten Schritt des Protokolls dar, bevor die fluoreszenzmarkierten Polynukleotide analysiert werden. Zu diesem Zweck wird dem SNaPshot[®]-Produkt (0,5 μ l) HiDi[™]Formamide (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA, 12,0 μ l) zugesetzt, sowie einmalig GeneScan[™]-120 LIZ[™]Size Standard

(APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA, 0,5 µl), um in der nachfolgenden Analyse eine exakte Bestimmung der farblich kodierten Signale zu gewährleisten. Die Denaturierung erfolgte über 5 min bei 95,0°C im Biometra T-Gradient Thermocycler® (BIOMETRA, Göttingen, Germany).

Die Auftrennung der einzelnen fluoreszenzmarkierten Polynukleotide fand im ABI PRISM 310® Genetic Analyzer mithilfe der **Kapillarelektrophorese** (POP 6™-Polymer) statt und wurde mit der GeneScan® Analysis Software (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA) analysiert.

4.2.6 Genotypisierung mittels MALDI-ToF MS (MassARRAY®)-Methode

Da mit der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Massenspektrometrie (MALDI-ToF MS, MassARRAY®) im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Untersuchungen in kurzer Zeit ungleich mehr DNA-Proben (384 Proben in einem Durchlauf) auf mehrere SNPs gleichzeitig untersucht werden können, genotypisierten wir die bereits vorher beschriebenen SNPs *rs452985* (G/C) und *rs16859448* (G/T) sowie zusätzlich den SNP *rs860573* (G/A) des *FEV*-Gens mithilfe dieser MassARRAY®-Methode.

Hierzu werden zunächst mithilfe der **PCR** und spezifischen Primern, die jeweils direkt vor dem zu untersuchenden Basenpaar enden, einzelsträngige DNA-Moleküle amplifiziert. Der Ansatz wird aufgereinigt, indem durch **enzymatischen Verdau** mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) überschüssige dNTPs entfernt werden. In der **iPLEX® Reaktion** erfolgt nun die *Single Base Extension* (SBE), in der die einzelnen Primer um genau eine Base (ddNTP) verlängert werden. Verunreinigende Ionen werden durch Zusatz eines Ionenaustauscherharzes entfernt und das Produkt anschließend mit einem Nanodispenser auf der Matrix (SpectroChip®) platziert. Hierauf folgt die **MALDI-ToF MS Analyse** im Bruker AutoFlex® MALDI-ToF Massenspektrometer. Voraussetzung für den MALDI Prozess ist die Kokristallisation des DNA-Moleküls und der Matrix (Silicium basierter Chip mit 3'-hydroxy picolinic acid Matrix Spots). Im Hochvakuum (8×10^{-7} mbar) wird das Kristall mit einem kurzen Laserpuls bestrahlt, wodurch der Analyt ionisiert und in die Gasphase übergeht. Die Masse des Moleküls wird bestimmt, indem die benötigte Zeit gemessen wird, die es für eine genau definierte

Strecke (ca. 1 m langes Flugrohr) zwischen Elektrode und Detektor benötigt. Der Einbau der sich in ihrer Masse unterscheidenden Basen (ddNTPs) während der Einzelstrangverlängerung führt zu detektierbaren Massendifferenzen der DNA-Moleküle, wodurch in der Analyse eindeutige Rückschlüsse auf den vorliegenden Genotyp möglich sind. Diese Analyse erfolgte mithilfe der Software Typer 3.4[®] der Firma Sequenom (San Diego, CA, USA) (Tost und Gut, 2005; Ragoussis et al., 2006). Ansätze und Reaktionsbedingungen sind im Folgenden detailliert aufgeführt:

PCR: Der Ansatz der PCR enthielt für eine 384er Platte 300 µl Hotstar-Puffer (10x), 156 µl MgCl₂ (25 mM), 48 µl dNTPs (25 mM), 480 µl Primer-Mix (0,5 µM each), 48 µl Hotstar *Taq* (0,5 U/µl) sowie 888 µl ddH₂O. Im Biometra Thermocycler durchlief der Ansatz nach einer einmaligen Denaturierung (94°C, 15 min) 44-mal den Zyklus aus Denaturierung, 20 s bei 94°C, Annealing, 30 s bei 56°C, und Extension, 1 min bei 72°C. Abschließend wurde der Ansatz einmalig für 3 min auf 72°C erwärmt, und anschließend für 5 min auf 4°C abgekühlt.

SAP-Verdau: Der Ansatz für den SAP-Verdau enthielt je Probe 0,17 µl SAP-Buffer (10x), 0,30 µl SAP-Enzym (1 U/µl) sowie 1,53 µl ddH₂O. Die enzymatische Reaktion erfolgte über 20 min bei 37°C, anschließend wurde das Enzym durch Erhitzen auf 85°C (5 min) deaktiviert und der Ansatz auf 4°C abgekühlt.

iPLEX[®]-Reaktion: Der iPLEX Reaktionsmix enthielt 412 µl Nanopure H₂O, jeweils 109 µl iPLEX Buffer Plus (10x) und iPLEX Termination Mix, 438 µl Extension primer mix (mit steigender Konzentration und Masse) und 21,8 µl iPLEX Enzym. Zu den gereinigten PCR Produkten wurden je 2 µl dieses Mix pipettiert. Die Primer-Extensions-Reaktion erfolgte im Thermocycler: Nach einer initialen Denaturierung für 30 s bei 94°C erfolgten 40 Zyklen mit jeweils 5 s bei 94°C, 5 s bei einer Annealingtemperatur von 52°C und schließlich die SBE bei 80°C für 5 s. In jedem Zyklus wurden die beiden letzteren Schritte fünfmal wiederholt. Abschließend wurde der Ansatz einmalig 3 min auf 72°C erwärmt.

Purifikation mit Ionenaustauscherharz: Hierfür wurden dem Ansatz je Probe 16 µl ddH₂O sowie 6 mg Ionenaustauscherharz zugefügt, die Platten anschließend verschlossen und 20 min lang gewendet. Zuletzt erfolgte die Zentrifugation.

Mithilfe eines Nanodispensers wurde der so entstandene Reaktionsansatz auf 384er SpectroChip[®] Platten platziert und anschließend erfolgte die **Messung** im Bruker Autoflex[®] MALDI ToF MS.

4.2.7 Sequenzierung

Mithilfe der Sequenzierung wurde in der vorliegenden Arbeit ein Abschnitt des Exon 3 des *FEV*-Gens untersucht, in dem sich nach Auskunft der Datenbank (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index) nachfolgend aufgeführte sieben SNPs befinden: *rs2301296* (C/A), *rs435910* (C/A), *rs443017* (G/T), *rs13025223* (G/T), *rs13025054* (G/T), *rs6749120* (T/A) und *rs451253* (G/A).

Die Methode der Sequenzierung mithilfe des hier verwendeten ABI PRISM 310[®] Genetic Analyzers (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA) ist eine in weiten Zügen automatisierte Form der von Frederick Sanger (Sanger et al., 1977) entwickelten Kettenabbruchmethode. Diese stellte 1977 einen methodischen Durchbruch für die umfassende Erforschung des Genoms dar.

Das Ausgangsmaterial für die Sequenzierung bildet doppelsträngige DNA des zu untersuchenden Abschnitts, die durch eine vorangestellte **PCR** gewonnen wird. Es folgt eine **Aufreinigung** des PCR-Produkts (QIAquick[®] PCR Purification Kit, QIAGEN GmbH, Hilden), da kontaminierende Substanzen wie Proteine, Kohlenhydrate oder Salze das Milieu unkontrolliert beeinflussen und optimale Sequenzierungsergebnisse verhindern können. Da für die Reaktion einzelsträngige DNA benötigt wird, wird die DNA zunächst denaturiert. Es werden je Probe zwei Ansätze hergestellt, denen entweder ein Forward (F)-Primer oder ein Reverse (R)-Primer zugesetzt werden. Die Primer definieren einerseits die Startstelle der Sequenzierung und bilden andererseits den Initiationskomplex für die Synthese eines zur Matrize komplementären Strangs durch die DNA-Polymerase. Im Unterschied zu einer gewöhnlichen PCR sind in dem unter Verwendung des Big Dye[®] Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA) hergestellten Ansatz für die

Sequenzierungsreaktion nicht nur die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP und dTTP) als Substrate für die Synthese enthalten, sondern zusätzlich in wesentlich geringerer Menge die als Terminatoren bezeichneten Didesoxyribonukleosidtriphosphate. Jedes der vier Didesoxynukleotide (ddNTPs: ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) ist mit einem anderen Fluoreszenzmarker versehen, wodurch die einzelnen Basen farblich kodiert werden. Diese werden zufällig - wie auch die Desoxyribonukleosidtriphosphate - von der DNA-Polymerase der Matrize entsprechend in den neuen Strang eingebaut, da das Polymeraseenzym nicht zwischen Desoxy- und Didesoxynukleotiden unterscheiden kann. Der Einbau eines Didesoxynukleotids führt jedoch zum Abbruch des neu synthetisierten Strangs, da dem Molekül die 3'-Hydroxylgruppe fehlt, die für die Verbindung mit dem nächsten Nukleotid notwendig ist. Da die gewöhnlichen Desoxynukleotide in weitaus größerer Anzahl vorhanden sind, können durchaus Stränge von einigen hundert Nukleotiden entstehen, bevor es zum Abbruch durch ein Didesoxynukleotid kommt. So entstehen multiple unterschiedlich lange DNA-Polynukleotide, die jeweils ein fluoreszenzmarkiertes Didesoxynukleotid am Ende aufweisen und sich in ihrer Länge um nur eine Base unterscheiden.

Die anschließende **Kapillarelektrophorese** in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (POP 6™-Polymer) trennt die einzelnen DNA-Polynukleotide der Länge nach auf und erfolgte im ABI PRISM 310® Genetic Analyzer. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Agarosegelelektrophorese besitzt die Polyacrylamidgelelektrophorese ein ungleich größeres Auflösungsvermögen. Dies ist nötig, um die DNA-Moleküle, die sich in ihrer Länge nur in einem Nukleotid unterscheiden, differenzieren zu können und somit zuverlässig die Nukleotidfolge der Sequenz bestimmen zu können. Durch einen Argon-Ionen-Laser angeregt emittieren die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide am Ende eines jeden Stranges jeweils Licht einer spezifischen Wellenlänge. Alle vier Farben respektive Basen können so von einer Kamera detektiert werden. Auf diese Weise wird die exakte Basenfolge der untersuchten Sequenz ermittelt (Lottspeich und Engels, 2006; Brown, 2007).

Im Folgenden sind die einzelnen Schritte der Sequenzierung eines 342 bp umfassenden Abschnitts des Exon 3 des *FEV*-Gens aufgeführt:

PCR: Der Reaktionsansatz für die PCR-Amplifikation enthielt 2,0 µl DNA-Template, 2,5 µl Goldstar Puffer (10x), 2,5 µl MgCl₂ (25 mM), 1,0 µl dNTPs (je 2,5 mM), jeweils 1,0 µl des Primers *FEV Seq Ex3 F* und R, sowie 0,05 µl *Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl) und 16,45 µl ddH₂O das Endvolumen betrug 25 µl. Er durchlief 35 Zyklen nach dem oben dargestellten Schema, die Annealingtemperatur lag bei 65,6°C.

Purifikation: 20 µl des PCR-Produkts wurden mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit (50) (QIAGEN GmbH, Hilden) nach den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Das Produkt wurde anschließend in 50 µl ddH₂O eluiert und zentrifugiert. Die DNA-Konzentration wurde zur Kontrolle mit dem Nanodrop[®] ND 1000 Spektrophotometer (PEQLAB, Erlangen) sowie dem dazugehörigen Programm ND 1000 V3 3.0 (PEQLAB, Erlangen) photometrisch bestimmt.

Sequenzierungsreaktion: Unter Verwendung des Big Dye[®] Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA) und dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll entstanden unterschiedlich lange fluoreszenzmarkierte Polynukleotide. Pro Probe wurde mit 5 µl PCR-Produkt jeweils ein Ansatz für den Forward (F)-Primer und ein Ansatz für den Reverse (R)-Primer (siehe Tabelle 3.1) hergestellt. Der Ansatz wurde einmalig auf 96,0°C (1 min) erhitzt und durchlief dann 35-mal den Zyklus 96,0°C (10 s) und 50,0°C (4 min). Verwendet wurde der Biometra T-Gradient Thermocycler[®] (BIOMETRA, Göttingen, Germany).

Fällung: Um ein gereinigtes und aufkonzentriertes Endprodukt zu erhalten, wurde das Sequenzierprodukt mit Natrium-Acetat (3 M, pH 4,6, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH, Steinheim) und Ethanol absolut (mind. 99,8%, APPLICHEM GmbH, Darmstadt) gefällt. Danach wurde die Lösung bei + 4°C zentrifugiert, ein zweites Mal mit Ethanol (80%) gewaschen und der Überstand verworfen. Das anschließend leicht angetrocknete Pellet wurde im letzten Schritt in 20,0 µl ddH₂O gelöst und mithilfe der **Kapillarelektrophorese** (POP 6TM-Polymer) im ABI PRISM 310[®] Genetic Analyzer (APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA) aufgetrennt und mit der zugehörigen Software (GeneScan[®] Analysis, APPLIED BIOSYSTEMS, Foster City, USA) analysiert.

4.2.8 Statistische Methoden

Genotypanalyse, Bestimmung des Hardy-Weinberg-Equilibriums und Einzelmarker-Assoziationstest. Bei den in dieser Studie untersuchten SNPs handelt es sich um Einzelbasenaustausche an einem bestimmten Locus der DNA. Um als Polymorphismus bezeichnet zu werden, müssen beide Allele eine Frequenz von >1% aufweisen. Der Genlocus kann also in zwei Varianten vorliegen, als Allel 1 (A_1, p) oder Allel 2 (A_2, q), wobei jedes Individuum einer Population (n) diploid bezüglich dieses Locus ist. Homozygote Individuen tragen also entweder den Genotyp $A_1 A_1$ oder $A_2 A_2$ (n_{11} oder n_{22}), während heterozygote Träger beide Allele, A_1 und A_2 (n_{12}) besitzen. Aus den mithilfe der oben beschriebenen molekulargenetischen Methoden ermittelten Genotypen von erkrankten und gesunden Probanden können also zunächst die Genotyp- und Allelfrequenzen bestimmt werden.

Hardy-Weinberg-Equilibrium: Nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz (Hardy-Weinberg-Equilibrium, HWE) für ideale Populationen gilt $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ (bzw. $n_{11} + n_{12} + n_{22} = 1$). Genotypisierungsdaten von Assoziationsstudien mit Fall-Kontroll-Design werden in der Regel mithilfe verschiedener statistischer Tests auf Abweichungen vom HWE hin untersucht. Eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium kann verschiedene Ursachen haben. Ganz allgemein führt jede Verletzung der für die ideale Population angenommenen Bedingungen (diploider Organismus, sexuelle Reproduktion, nicht-überlappende Generationen, gleiche Allelfrequenzen bei Männern und Frauen, zufällige Partnerwahl, große Population, keine Migration, keine Mutationen, keine Selektion) zu einer Abweichung vom HWE. Beispielsweise kann es durch Inzucht, Mischung der Population durch Migration aber auch durch Genotypisierungsfehler oder durch Zufall dazu kommen. Von besonderem Interesse sind im Falle einer Assoziationsstudie Unterschiede in der Abweichung vom HWE zwischen Fall- und Kontrollkollektiv aufgrund von Selektion, da sie durch einen funktionalen Locus selbst oder durch einen mit ihm gekoppelten (LD) Marker SNP zustande gekommen sein könnten. Signifikante Abweichungen vom HWE indizieren somit vor allem, dass etwas Interessantes geschieht, seien es starke Selektion oder Genotypisierungsfehler. Zur Identifikation einer Assoziation müssen weitere Tests erfolgen. Die Berechnung des HWE enthält also

vor allem indikative Informationen und ist abhängig vom Ausmaß der Abweichung, der Stichprobengröße und dem festgelegten α - Niveau (Li und Leal, 2009). Für diese Arbeit wurde ein exakter HWE-Test unter Anwendung des Programms Haploview gewählt (Wigginton et al., 2005).

Einzelmarker-Assoziationstest: Um festzustellen, ob signifikante Unterschiede im Auftreten eines Allels zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv bestehen, also eine Assoziation zwischen Erkrankung und Polymorphismus vorliegt, wurde ein χ^2 -Test nach Pearson mithilfe des Programms Haploview berechnet. Für alle Tests wurde ein α -Niveau von 5% ($p = 0,05$) festgelegt.

Haplotypanalyse: Die Daten der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich einer Haplotypanalyse unter Verwendung des Programms Haploview unterzogen. Durch die Einbeziehung der Haplotypen in Assoziationsstudien kann der Informationsgehalt der genetischen Analyse deutlich gesteigert werden und eine höhere statistische Aussagekraft erreicht werden (Clark, 2004; Barrett et al., 2005). So kann es sein, dass ein Haplotyp mehrere krankheitsassoziierte Loci umfasst und erst durch die Haplotypanalyse ein additiver bzw. kombinierter Effekt nachgewiesen werden kann. In diesem Modell führt nicht ein einzelner SNP zu dem Effekt, sondern erst die Kombination mit bestimmten benachbarten Allelen. Da aus den Genotypisierungsdaten bei Vorliegen eines heterozygoten Genotyps nicht auf die exakte Kombination der Allele (sog. Phase) geschlossen werden kann, bedient sich das Programm eines Algorithmus, der diese rekonstruiert. Wie bei der Analyse der Einzelmarker wird auch hier getestet, ob signifikante Unterschiede zwischen dem Patientenkollektiv und der Kontrollgruppe vorliegen, die durch eine positive Assoziation auf eine Erhöhung des Erkrankungsrisikos durch den untersuchten Haplotyp hinweisen (Barrett et al., 2005). Die statistische Auswertung erfolgte durch Herrn Prof. Dr. med. A. Reif.

5 Ergebnisse

5.1 FEV

5.1.1 Genotypanalyse des SNP *rs452985*

Der im Intron zwischen Exon 2 und Exon 3 nahe der Splicingsequenz von Exon 3 gelegene SNP *rs452985* (G/C) (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index) wurde zunächst mithilfe eines Restriktionsenzym-Verdaus (Einzelheiten siehe Kapitel 4.2.4) in 210 Proben depressiver Patienten untersucht und mit einer Kontrollgruppe (N = 380) verglichen. Durch einzelne Ausfälle minimierte sich die Probenanzahl in der Patientengruppe auf 198 und in der Kontrollgruppe auf 314.

Im Patientenkollektiv fanden sich 191 Probanden mit einem für das G-Allel homozygoten Genotyp, das entspricht 96,5%. Den heterozygoten Genotyp G/C wiesen 5 Patienten (2,5%) auf, lediglich zwei Probanden (1,0%) waren für das C-Allel homozygot. Die Allelfrequenz für G beträgt damit 97,7% und für C 2,3%.

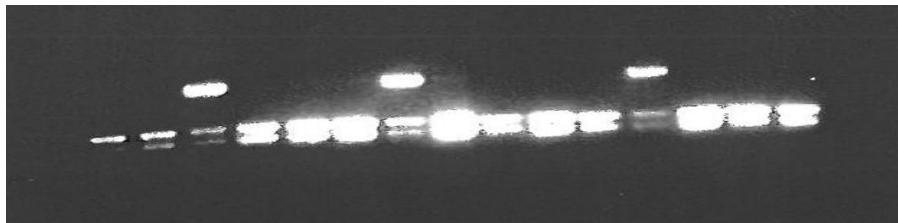
In der Kontrollgruppe fand sich der homozygote Genotyp G/G bei 302 Probanden, also bei 96,2%. Bei 12 Personen (3,8%) konnte der heterozygote Genotyp G/C nachgewiesen werden, es fand sich jedoch kein einziger homozygoter Träger des C-Allels. Die Allelfrequenz beläuft sich damit für G auf 98,1% und für C auf 1,9%.

In der inferenzstatistischen Auswertung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patientenkollektiv und Kontrollgruppe bezüglich der Häufigkeit dieses SNP. Dies zeigte sich durch die Berechnung des χ^2 , für das sich folgender Wert ergab: Genotyp: $\chi^2 = 3,8$, $p = 0,15$, der für $df = 2$ aus entsprechenden Tabellen abzulesende kritische Wert von $\chi^2_{0,05} = 5,99$ wird nicht erreicht. Allelfrequenz: $\chi^2 = 0,158$ (0,16), $p = 0,691$ (0,69), $df = 1$. Tabelle 5.1 fasst diese Ergebnisse in einer Übersicht zusammen.

Tabelle 5.1.: SNP *rs452985* (*FEV*): Vergleich der Genotypen und Allelfrequenzen zwischen Patienten- und Kontrollgruppe

	Genotyp					Allelfrequenz				
		<i>G/G</i>	<i>G/C</i>	<i>C/C</i>	χ^2	<i>p</i>	<i>G</i>	<i>C</i>	χ^2	<i>p</i>
Patienten	<i>N</i>	191	5	2			387	9		
(<i>N</i> =198)	%	96,5	2,5	1,0			97,7	2,3		
					3,8	0,15			0,16	0,69
Kontrolle	<i>N</i>	302	12	0			616	12		
(<i>N</i> =314)	%	96,2	3,8	0			98,1	1,9		

Anmerkungen: *N* = Anzahl, % = Prozent; χ^2 -Tests beziehen sich auf den Vergleich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe

**Abbildung 6:** Bandenmuster des SNP *rs452985*

Mithilfe der MALDI-ToF MS (Kapitel 4.2.6) wurde der SNP *rs452985* erneut in einem Patientenkollektiv mit 270 Personen untersucht und mit dem Auftreten in der Kontrollgruppe (362 Freiwillige) verglichen. Zudem wurde das Patientenkollektiv (*N*=270) hinsichtlich der vorliegenden affektiven Störung in unipolar Depressive (*N*=90) und an einer bipolaren Störung (*N*=180) leidende Patienten unterteilt. Von den 180 Patienten mit bipolarer Störung wiesen 97% den Genotyp *G/G* auf, 2% waren heterozygot und bei 1% konnte die Variante *C/C* nachgewiesen werden. 90 Patienten litten an einer unipolaren Depression, sie alle waren homozygot für das Stammallel (*G/G*). 98% der Kontrollpersonen war ebenfalls homozygot für das Stammallel, 2% heterozygot, die Variante trat in homozygoter Form nicht auf. Die Allelfrequenz beträgt für die Variante *C* bei den Patienten mit bipolarer Störung somit 2%, bei den Patienten mit unipolarer Depression 0% und bei den Kontrollpersonen 1%. Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 5.2 dargestellt.

5.1.2 Genotypanalyse des SNP *rs16859448*

Mithilfe der Minisequenzierung (SNaPshot®) (Kapitel 4.2.5) wurde der in der 3'-UTR gelegene SNP *rs16859448* (G/T) (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index) zunächst in einer Stichprobe depressiver Patienten (N = 61) untersucht. Dabei konnten 49 homozygote Träger des G-Allels identifiziert werden, das entspricht 80,3%. 12 Patienten (19,7%) wiesen den heterozygoten Genotyp G/T auf, es fand sich in dieser Stichprobe jedoch kein homozygoter Träger des T-Allels. Die daraus berechnete Allelfrequenz beträgt für G 90,2% und für T 9,8%.

In der MALDI-ToF MS (Kapitel 4.2.6) wurden 270 Patienten (180 mit bipolarer Störung, 90 mit unipolarer Depression) und 362 Kontrollpersonen erneut untersucht. Es zeigten sich folgende Ergebnisse: 80% der 180 an einer bipolaren Störung leidenden Patienten zeigte einen homozygoten Genotyp für das Stammallel G, 19% waren heterozygot und 1% wies den varianten Genotyp T/T auf. Bei den unipolar depressiven Patienten (N=90) zeigte sich eine ähnliche Verteilung der Genotypen: 75% waren homozygot für das Stammallel G, 24% heterozygot und 1% homozygot für die Variante T. Bei den Kontrollpersonen verteilten sich die Genotypen wie folgt: 77% G/G, 22% G/T und 1% T/T. Daraus errechnet sich die Allelfrequenz der Variante T von 13% bei der bipolaren Störung, 10% bei der unipolaren Depression und 12% bei den Kontrollpersonen. Statistisch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Tabelle 5.2 stellt diese Ergebnisse zusammenfassend dar.

5.1.3 Genotypanalyse des SNP *rs860573*

Der im Exon 3 des *FEV*-Gens gelegene SNP *rs860573* (G/A) wurde zusammen mit den beiden zuvor erwähnten SNPs mithilfe MALDI-ToF Massenspektrometrie (Kapitel 4.2.6) bei 270 Patienten und 362 Kontrollpersonen untersucht. Die 90 Patienten mit unipolarer Depression waren bei der Genotypisierung allesamt homozygot für das Stammallel G (100%), unter den 180 Patienten mit bipolarer Störung fanden 96% homozygote Träger des Stammallels G, 3% Heterozygote und 1% homozygote Träger der Variante A. In der Kontrollgruppe wiesen 98% den Genotyp G/G auf sowie 2% den Genotyp G/A. Homozygote Träger der Variante A fanden sich nicht. Die sich daraus errechnende Allelfrequenz beträgt für G im Patientenkollektiv für die unipolare

Depression 100%, für die bipolare Störung 98% und in der Kontrollgruppe 99%.
Signifikante Unterschiede konnte auch hier nicht gefunden werden. Eine Übersicht der MALD-ToF Massenspektrometrie-Ergebnisse folgt in Tabelle 5.2.

Tabelle 5.2: FEV Genotyp- und Allelfrequenzen der SNP Analyse (MALDI-ToF)

SNP rs16859448					
Phänotyp	Genotyp (%)			Allel (%)	
	<i>G/G</i>	<i>G/T</i>	<i>T/T</i>	<i>G</i>	<i>T</i>
<i>Kontrolle</i>	77	22	1	88	12
<i>Unipolare Depression</i>	75	24	1	90	10
<i>Bipolare Störung</i>	80	19	1	87	13

SNP rs860573					
Phänotyp	Genotyp (%)			Allel (%)	
	<i>G/G</i>	<i>G/A</i>	<i>A/A</i>	<i>G</i>	<i>A</i>
<i>Kontrolle</i>	98	2	0	99	1
<i>Unipolare Depression</i>	100	0	0	100	0
<i>Bipolare Störung</i>	96	3	1	98	2

SNP rs452985					
Phänotyp	Genotyp (%)			Allel (%)	
	<i>G/G</i>	<i>G/C</i>	<i>C/C</i>	<i>G</i>	<i>C</i>
<i>Kontrolle</i>	98	2	0	99	1
<i>Unipolare Depression</i>	100	0	0	100	0
<i>Bipolare Störung</i>	97	2	1	98	2

5.1.4 Einzelmarker-Assoziationsanalyse

Unter Verwendung des Programms HaploView (Barrett et al., 2005) testeten wir, ob polymorphe Varianten des *FEV*-Gens mit der Erkrankung an unipolarer bzw. bipolarer Depression assoziiert sind. Auf dem Einzelmarker-Niveau zeigte sich keine signifikante Assoziation mit der Erkrankung (alle $p > 0,1$). Auch das Zusammenfassen der bipolaren Störung und der unipolaren Depression zu einem einzigen Phänotyp (alle) brachte kein Ergebnis, das auf eine signifikante Assoziation hinweisen würde. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst dargestellt. Alle hier untersuchte SNPs des *FEV* Gens befanden sich im Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE).

Tabelle 5.3.: *FEV* Einzelmarker-Assoziationstest

SNP	Phänotyp	Allel	χ^2	p
rs16859448	alle	G	0,189	0,66
	unipolar	T	0,159	0,69
	bipolar	G	0,468	0,49
rs860573	alle	A	0,554	0,46
	unipolar	G	1,061	0,30
	bipolar	A	1,117	0,29
rs452985	alle	C	0,889	0,35
	unipolar	G	1,602	0,21
	bipolar	C	1,915	0,17

5.1.5 Haplotyp-Assoziationsanalyse

Abbildung 6 stellt das Linkage Disequilibrium (LD) der untersuchten Polymorphismen graphisch dar. Es wurde mithilfe des Programms HaploView nach der *solid spine* Methode ermittelt. SNP *rs860573* und *rs452985* stehen demnach in einem hohen LD zueinander, d.h. sie werden in einem Haploblock vererbt. Dies wird durch das rote Quadrat angezeigt.

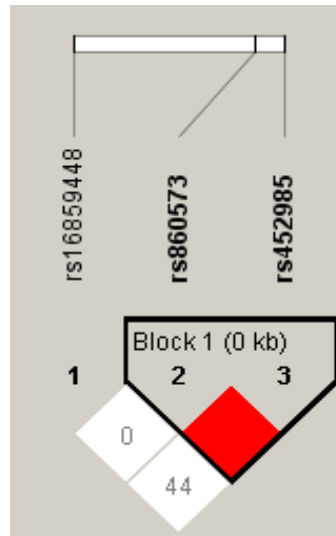


Abbildung 7: Graphische Darstellung des LD der untersuchten Polymorphismen des FEV-Gens (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview>).

Auch die Haplotypanalyse, durch die getestet wird, ob SNPs, die in einem Haploblock gemeinsam vererbt werden, im Patientenkollektiv signifikant häufiger auftreten, brachte keine signifikante Assoziation dieses Haploblocks mit der Erkrankung ($p > 0,1$). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.4. detailliert aufgeführt.

Tabelle 5.4.: FEV Haplotyp-Assoziationstest der SNPs *rs860573* und *rs452985*

<i>Haplotyp</i>	<i>Phänotyp</i>	χ^2	<i>p</i>
G-G	Alle	0,445	0,50
	Unipolar	1,943	0,16
	bipolar	1,346	0,25
C-A	Alle	0,515	0,47
	Unipolar	1,749	0,19
	bipolar	1,414	0,23

5.1.6 Sequenzierung

Im Exon 3 des *FEV*-Gens lassen sich nach Angaben der Datenbank (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index) sieben SNPs finden. Mithilfe der Sequenzierung (Kapitel 4.2.7) dieses Abschnitts des Exon 3 wurde explorativ an 20 Patientenproben nach dem Auftreten der angegebenen Varianten gesucht. Es wurde ein 342 Basenpaare umfassender Abschnitt (Base 14008-14350) nach der oben beschriebenen Methode sequenziert. Folgende SNPs befinden sich in diesem Bereich: *rs2301296* (C/A), *rs435910* (C/A), *rs443017* (G/T), *rs13025223* (G/T), *rs13025054* (G/T), *rs6749120* (T/A) und *rs451253* (G/A).

Bei einer einzigen Probe fand sich für SNP *rs2301296* (C/A) ein heterozygoter Genotyp. Alle anderen Proben wiesen keinerlei Polymorphismen auf, weder der beschriebenen SNPs noch im Bereich der übrigen Sequenz. Da sich die gesamte untersuchte Sequenz somit nahezu unverändert darstellte, wurde auf weitere Untersuchungen dieses Genabschnitts verzichtet.

5.2 *TPH2*

5.2.1 Genotypanalyse des SNP *rs4570625*

Der SNP *rs4570625* befindet sich auf Chromosom 12 an Position 70618190. Durch einen Restriktionsenzym-Verdau (Kapitel 4.2.4) wurden die Genotypen des SNP *rs4570625* (G/T) des *TPH2*-Gens bestimmt. Die Restriktionsenzymfragmente wurden mithilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt, das Bandenmuster unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Ergebnis mit dem Dokumentationssystem Chemi Doc[®] festgehalten. Der homozygote Genotyp G/G stellte sich durch zwei Banden der Größe 285 bp und 24 bp dar, T/T hingegen durch eine einzige Bande bei 309 bp. Bei Vorliegen des heterozygoten Genotyps G/T konnten drei Banden (309 bp, 285 bp und 24 bp) nachgewiesen werden.

Im Patientenkollektiv (N = 284) zeigten die Ergebnisse der Genotypisierung folgende Verteilung: 174 Patienten waren homozygote Träger des G-Allels, das entspricht 61,3%. Bei 93 Patienten konnte der heterozygote Genotyp G/T nachgewiesen werden

(32,7%) und 17 waren für das T-Allel homozygot (6,0%). Hieraus errechnet sich für G eine Allelfrequenz von 77,6% und für T von 22,4%.

In der Kontrollgruppe (N = 120) fanden sich ähnliche Häufigkeitsverteilungen: Homozygot für das G-Allel waren 79 Probanden, also 65,8%. 35 Personen zeigten den heterozygoten Genotyp G/T (29,2%) und bei 6 Proben konnte der homozygote Genotyp T/T (5,0%) nachgewiesen werden. Damit ergibt sich in der Kontrollgruppe für G eine Allelfrequenz von 80,4% und für T von 19,6%. Tabelle 5.5 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

5.2.2 Genotypanalyse des SNP *rs11178997*

Der SNP *rs11178997* des *TPH 2*-Gens befindet sich auf Chromosom 12 an Position 70618420. Mithilfe der PCR (Kapitel 4.2.4) wurden die Proben des Patienten- und des Kontrollkollektiv bezüglich der Variante des SNP *rs11178997* (T/A) genotypisiert. Die klinische Stichprobe umfasste 284 an der adulten Form des ADHS leidende Patienten und wurde mit einer Kontrollgruppe gesunder Probanden (N = 120) verglichen. Die durch die PCR entstandenen DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt, das entstandene Bandenmuster unter UV-Bestrahlung sichtbar gemacht und die Ergebnisse der Genotypisierung mithilfe des Systems Chemi Doc[®] dokumentiert. Bei Homozygotie stellte sich der Genotyp A/A durch zwei Banden der Größe 282 bp und 749 bp, der Genotyp T/T hingegen durch zwei Banden der Größe 526 bp und 749 bp dar. Bei Heterozygotem Genotyp T/A zeigte das Muster drei Banden (282 bp, 526 bp und 749 bp).

Die Genotypisierung ergab folgende Ergebnisse: 242 Patienten waren homozygote Träger des T-Allels, das entspricht 85,2%. 41 Patienten waren heterozygot für die Allele T und A (14,4%) und nur ein Patient homozygot für das A-Allel (0,4%). Die Allelfrequenz im Patientenkollektiv beträgt somit für T 92,4%, für A 7,6%.

In der Kontrollgruppe zeigte die Verteilung der Genotypen ein ähnliches Bild: 104 Personen waren homozygote Träger des T-Allels, also 86,7%. 16 Kontrollpersonen wiesen den heterozygoten Genotyp T/A auf (13,3%), bei keinem Probanden fand sich hingegen der homozygote Genotyp A/A. In der Kontrollgruppe beträgt die

Allelfrequenz für T somit 93,3% und für A 6,7%. Tabelle 5.5. bietet eine Übersicht über die hier beschriebenen Ergebnisse:

Tabelle 5.5.: *TPH2* Genotyp- und Allelfrequenzen von *rs4570625* und *rs11178997* in Patienten- und Kontrollstichprobe

SNP	Stichprobe		Genotyp			Allel		
			<i>G/G</i>	<i>G/T</i>	<i>T/T</i>	<i>G</i>	<i>T</i>	
<i>rs4570625</i>	<i>Patienten</i> (<i>N</i> =284)	<i>N</i>	174	93	17	441	127	
		%	61,3	32,7	6,0	77,6	22,4	
	<i>Kontrolle</i> (<i>N</i> =120)	<i>N</i>	79	35	6	193	47	
		%	65,8	29,2	5,0	80,4	19,6	
	<i>rs11178997</i>	<i>Patienten</i> (<i>N</i> =284)	<i>N</i>	242	41	1	525	43
			%	85,2	14,4	0,4	92,4	7,6
<i>Kontrolle</i> (<i>N</i> =120)		<i>N</i>	104	16	0	224	16	
		%	86,7	13,3	0	93,3	6,7	

5.2.3 Einzelmarker-Assoziationstest

Mithilfe des Programms Haploview wurde untersucht, ob zwischen den untersuchten Kollektiven signifikante Unterschiede im Auftreten eines bestimmten Allels und damit eine signifikante Assoziation mit der Erkrankung an der adulten Form des ADHS besteht. Da jedoch weder für *rs4570625* ($\chi^2=0.769$, $p=0.380$, $df=1$) noch für *rs11178997* ($\chi^2=0.204$, $p=0.652$, $df=1$) signifikante Unterschiede festzustellen waren, konnte keine Assoziation nachgewiesen werden.

Zudem konnten in den untersuchten Populationen sowohl für SNP *rs4570625* (*G/T*, $p=0.2577$) als auch für SNP *rs11178997* (*T/A*, $p=0.7067$) des *TPH2*-Gens keine Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWE) festgestellt werden. Getestet wurde das HWE mithilfe des Programms HaploView (Barrett et al., 2005).

Tabelle 5.6.: *TPH2* Einzelmarker-Assoziationstest *rs4570625* und *rs11178997*

SNP	Allel	χ^2	p	HWE (p)
<i>rs4570625</i>	T	0.769	0.380	0.2577
<i>rs11178997</i>	A	0.204	0.652	0.7067

5.2.4 Haplotyp-Assoziationstest

Der Haplotyp-Assoziationstest untersucht, ob in den genotypisierten Stichproben signifikante Unterschiede im Auftreten eines des durch SNP *rs4570625* und *rs11178997* gebildeten Haploblocks besteht. Hierdurch ließe sich eine Assoziation der Erkrankung an ADHS mit einem bestimmten Haplotyp nachweisen. Der Haplotyp-Assoziationstest wurde mithilfe des Programms HaploView durchgeführt. SNP *rs4570625* und *rs11178997* liegen 230 bp voneinander entfernt. Von den vier möglichen Haplotypen erfüllten nur drei (G-T, T-T, T-A) das Kriterium einer Häufigkeit von >1%. Doch auch hier konnte für keinen der ermittelten Haplotypen ein signifikanter Unterschied im Auftreten zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv nachgewiesen werden, womit in diesen Stichproben keine Assoziation eines Haplotypen mit der Erkrankung an ADHS besteht. Beide SNPs stehen in starkem Linkage Disequilibrium (LD) zueinander.

Tabelle 5.7.: *TPH2* Haplotyp-Assoziationstest der SNPs *rs4570625* und *rs11178997*

Haplotyp	Frequenz (%)	Patienten (%)	Kontrolle (%)	χ^2	P
G-T	0.785	0.776	0.804	0.769	0.380
T-T	0.142	0.148	0.129	0.484	0.486
T-A	0.073	0.76	0.67	0.204	0.651

6 Diskussion

6.1 Das Kandidatengen *FEV*

6.1.1 Bestimmte *FEV*-Genvarianten zeigen keine Assoziation mit der unipolaren Depression und der bipolaren Störung

In dieser Assoziationsstudie wurden mithilfe verschiedener Techniken (PCR mit Restriktionsenzym-Verdau, Minisequenzierung sowie MALDI-ToF Massenspektrometrie) drei SNPs des *FEV*-Gens (*rs452985*, *rs16859448* und *rs860573*) in einer Stichprobe an einer affektiven Störung leidender Patienten sowie einer Kontrollgruppe untersucht. Das Patientenkollektiv umfasste sowohl unipolar Depressive als auch an einer bipolaren Störung leidende Patienten. Es wurde sowohl auf Einzelmarker- als auch auf Haplotyp-Niveau nach einer signifikanten Assoziation gesucht. Es konnte jedoch in keiner Untersuchung eine Assoziation der untersuchten Genvarianten mit der Erkrankung nachgewiesen werden.

Im Folgenden wird nun versucht, durch Überlegungen zu den einzelnen methodischen Ansätzen (Kandidatengenansatz, Assoziationsstudie), den Herausforderungen komplexer genetischer Erkrankungen und den Problemen in der Zusammenstellung eines geeigneten Patientenkollektivs (Diagnosegenauigkeit, Subgruppen, Endophänotypen) Erklärungsansätze für diesen Umstand zu finden und weiterführende Perspektiven zu entwickeln.

6.1.2 Die Rolle von *FEV* als Kandidatengen

Grundlage für die Wahl von *FEV* als Kandidatengen waren einerseits die neuen Erkenntnisse über seine Rolle als Transkriptionsfaktor in der Entwicklung des serotonergen Systems und andererseits die interessanten und viel versprechenden Ergebnisse aus der Forschung am murinen Homolog *Pet-1*. So konnte einerseits gezeigt werden, dass sich bei *Pet-1*-defizienten Tieren das serotonerge System nur rudimentär ausbildet (Hendricks et al., 2003) und andererseits, dass diese *Pet-1*-KO-Mäuse durch veränderte Verhaltensweisen auffallen, wie z.B. durch eine deutlich verstärkte Ängstlichkeit (Hendricks et al., 2003). Für das Verhaltensmerkmal Ängstlichkeit sowie

für Depressionen ist ein Zusammenhang mit Alterationen der serotonergen Neurotransmission in vielerlei Hinsicht belegt (siehe dazu Murphy und Lesch, 2008). Untersuchungen zu Assoziationen von Polymorphismen des *FEV* mit psychischen Erkrankungen beim Menschen fehlten jedoch bisher. Diese Studie ist somit nach jetzigem Erkenntnisstand die erste, die einen solchen Zusammenhang mithilfe einer Assoziationsstudie beim Menschen untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch ungeachtet der vielfältigen Hinweise aus dem Mausmodell keinen Zusammenhang zwischen Polymorphismen des *FEV* und affektiven Störungen. So erscheint es notwendig, zunächst das Wissen über die zugrunde liegende Wirkungsweise von *FEV*, seine Regulation, Expression und Einflüsse auf das sich entwickelnde und adulte serotonerge System des Menschen zu erweitern, um dann gezielter möglicherweise pathogenetisch relevante Abschnitte auf Polymorphismen zu untersuchen. Neuere Studien zeigen wiederum am Tiermodell in dieser Hinsicht interessante Ergebnisse. So konnten Defizite des serotonergen Systems bei *Pet-1*-KO-Mäusen durch ein *FEV*-kodierendes artifizielles bakterielles Chromosom aufgefangen werden, wodurch *FEV* als Ortholog von *Pet-1* bestätigt wurde. Die *Pet-1*-KO-Mäuse zeigten in dieser Untersuchung ein deutlich defizitäres maternales Pflegeverhalten, was zum Tod der Nachkommen in den ersten Lebenstagen führte. Dahingegen überlebten die Nachkommen der transgenen *FEV/Pet-1*-KO-Mäuse zumindest teilweise, sodass angenommen werden kann, dass durch die Präsenz von *FEV* das Pflegeverhalten verbessert wurde. Von den Autoren werden diese Ergebnisse als mögliches Äquivalent für eine postpartale Depression bezeichnet (Lerch-Haner et al., 2008). Zudem war im Gehirn von *Pet-1*-KO Mäusen nicht nur die Serotoninkonzentration reduziert, sondern auch die Menge von TPH2- und SERT-RNA, was für einen unmittelbaren regulatorischen Einfluss von *FEV* auf deren Genexpression spricht (Krueger und Deneris, 2008; Lerch-Haner et al., 2008). Zuletzt konnten Krueger und Mitarbeiter neue Ergebnisse zur Regulation (*cis*-regulatorische Kontrolle) und Interaktion (*Gata2*) von *FEV/Pet-1* und daraus resultierende Veränderungen des serotonergen Systems publizieren (Krueger und Deneris, 2008).

Neueste Studien mit *Pet-1*-KO Mäusen zeigen weitere Wirkungsweisen dieses Transkriptionsfaktors als Teil eines Netzwerks von Transkriptionsfaktoren, das die Differenzierung zu 5HT-Neuronen in postmitotischen Vorläuferzellen bewirkt. Der

Ausfall eines jeden dieser Transkriptionsfaktoren (Gata2, Insm1, Gata3, Lmx1b, Pet-1 u.a.) führt zum Abbruch der Differenzierung in unterschiedlichem Maße. Pet-1 kommt hierbei eine Rolle in der Koordination der Expression von *TPH2*, *Ddc*, *Slc6a4*, *Slc18a2* sowie *5-HTR_{1B}* und *5-HTR_{2A}* zu, deren Expression in Pet-1-KO Mäusen deutlich reduziert ist. Zusätzlich zeigte sich jedoch auch der Einfluss auf einerseits den Syntheseweg von Tetrahydrobiopterin (BH₄), eines obligatorischen Kofaktors der TPH2, sowie andererseits auf die Oct3-Expression (*Scf22a3*), einen weiteren Transporter mit niedriger Affinität und hoher Kapazität für 5HT und wichtiger Angriffsort für SSRIs. Oct3 war in Pet-1-KO Mäusen nahezu nicht mehr nachweisbar (Wyler et al., 2015).

Andersherum gelang kürzlich in *in vitro* Versuchen die Differenzierung humaner Fibroblasten in induzierte 5HT-Neurone durch Einsatz der relevanten Transkriptionsfaktoren (Ascl, Foxa2, FEV), wodurch die Relevanz dieses Transkriptionsfaktors in Zusammenspiel mit den anderen genannten für die Entwicklung der 5HT-Neuronen unterstrichen wird (Xu et al., 2016). Insofern bleibt *FEV* ein gerade für die psychiatrische Forschung weiterhin interessantes Kandidatengen, wenngleich die weitere Entschlüsselung der Regulations- und Wirkungsmechanismen zunächst vordergründig erscheint.

6.1.3 Depression ist eine komplexe Störung

Nach heutiger Überzeugung handelt es sich bei der Mehrzahl der häufig auftretenden Erkrankungen um komplexe Störungen, in deren Pathogenese neben einer ebenfalls komplexen genetischen Disposition viele andere Faktoren mit einfließen. So zählen auch Depressionen, wie die überwiegende Mehrheit psychischer Erkrankungen, zu den komplexen genetischen Störungen (Maier et al., 2008). Die hohe Heritabilität beweist den wichtigen Anteil genetischer Variationen an der Ätiopathogenese dieser Erkrankungen, die nicht vollständige Konkordanz bei monozygoten Zwillingen jedoch auch die Bedeutung von Umweltfaktoren, weshalb die Gen-Umwelt-Interaktion immer mehr in den Blickpunkt der Forschung rückt. In der derzeitigen Vorstellung haben Depressionen eine multifaktorielle Ätiologie, wobei sowohl multiple genetische Varianten als auch Umweltfaktoren zur Krankheitsentwicklung beitragen. Der pathogenetische Effekt eines einzelnen Gens kann somit sehr gering sein, was es deutlich erschwert, diesen nachzuweisen (van Belzen und Heutink, 2006; Maier et al.,

2008). Nach Meinung verschiedener Autoren ist kein einzelner Faktor – genetisch oder umweltbedingt – für mehr als 5% der Varianz zwischen depressiven und gesunden Individuen verantwortlich (Leonardo und Hen, 2006; Ansorge et al., 2007). So ist es möglich, dass die hier angewandten Methoden nicht in der Lage sind, einen solchen Effekt nachzuweisen, oder sich dieser erst durch Zusammenwirken mit anderen, noch unbekanntem Faktoren (z.B. Gen-Gen-Interaktionen) ergibt.

6.1.4 Bewertung der Assoziationsstudien

Da bislang keine weiteren Studien bekannt sind, die *FEV* im Zusammenhang mit psychischen Erkrankungen untersuchen, ist es möglich, dass ähnliche Untersuchungen mit anderen Kollektiven durchaus erfolgversprechend sind. Genetische Studien stellen seit einigen Jahren eine gute Möglichkeit dar, Assoziationen von Erkrankungen mit genetischen Varianten auch mit kleinem individuellem Effekt nachzuweisen, weshalb auch wir dieses Studiendesign wählten. Sie sind deshalb ein Hauptfokus psychiatrisch-genetischer Studien seit 1996 (Risch und Merikangas, 1996; Burmeister et al., 2008). Die Bewertung der nachgewiesenen Assoziation einzelner Erkrankungen mit bestimmten Genen und ihren Varianten erscheint jedoch immer wieder fraglich. So sind unter den positiven Berichten eine nicht zu unterschätzende Anzahl an falsch positiven oder nicht reproduzierbaren Ergebnissen (Burmeister et al., 2008). Metaanalysen, die weiterführende Analyse der biologischen Relevanz genetischer Varianten auf Genexpression, Transkription und Zellstoffwechsel sowie die Einbeziehung der Gen-Umwelt-Interaktion erscheinen als Möglichkeiten, die Bedeutung nachgewiesener Assoziationen von Kandidatengenen weiter zu untermauern und zu einem besseren Verständnis der komplexen Zusammenhänge in der Ätiopathogenese psychiatrischer Erkrankungen zu gelangen. Wenngleich in der vorliegenden Studie keine Assoziation gefunden wurde, könnten weitere Untersuchungen in anderen Populationen - seien es andere Erkrankungen des psychiatrischen Formenkreises oder aber Probanden anderer ethnischer Abstammung - durchaus differierende Ergebnisse liefern. Ein Anhaltspunkt bietet hierfür die Studie von Rand und Mitarbeitern zum plötzlichen Kindstod, die ein signifikant häufigeres Auftreten der untersuchten Insertionsmutation des *FEV*-Gens bei Probanden afroamerikanischer Abstammung als bei Probanden kaukasischen Ursprungs fanden (Rand et al., 2007). Diese Ergebnisse konnten jedoch von Broadbelt und

Mitarbeitern nicht repliziert werden, vielmehr stellte sich hier die Insertionsmutation als gewöhnliche Variante in der afroamerikanischen Population dar (Broadbelt et al., 2009).

6.1.5 Die Herausforderungen durch phänotypische und genetische Heterogenität

Eines der Hauptprobleme genetischer Forschung in der Psychiatrie ist zudem die Etablierung eindeutiger Diagnosen. Wie in keinem anderen Teilbereich der Medizin fehlen objektive diagnostische Krankheitskorrelate wie Laborparameter, histologische oder physikalische Untersuchungen, die eine symptomatische Diagnose untermauern könnten. Die für klinische Belange ausreichenden Diagnosekriterien nach DSM-IV oder ICD-10 sind für genetische Forschungszwecke zu generell, da diese auf der Annahme beruhen, dass der beobachtete Phänotyp indikativ für den zugrunde liegenden Genotyp ist. So ist anzunehmen, dass innerhalb eines Patientenkollektivs nicht nur eine nicht unerhebliche phänotypische Heterogenität besteht, sondern damit vermutlich auch genetische Heterogenität. Genetische Heterogenität kennzeichnet den Einfluss verschiedener genetischer Varianten auf dieselbe klinisch definierte Erkrankung (Maier et al., 2008). Um Suszeptibilitätsloci mit geringer Effektstärke identifizieren zu können, ist die Entwicklung verschiedener Strategien, die der Minimierung der genetischen Heterogenität und damit der Maximierung der Aussagekraft (Power) der Ergebnisse dienen, ein wichtiger Fokus geworden (van Belzen und Heutink, 2006). Zu diesem Zweck wird empfohlen, die Stichproben z.B. einer strengen Auswahl der einzelnen Diagnosen, oder auch der Stratifizierung nach Schweregrad, *early onset*-Formen oder familiär gehäuften Fällen zu unterziehen. Diesen Überlegungen folgend werteten wir die Daten sowohl gemeinsam, als auch getrennt in die Subgruppen unipolare Depression und bipolare Störung aus. Doch auch dieses Vorgehen ergab keine signifikante Veränderung der Ergebnisse.

Man kann auch bezüglich dieser erfolgreich angewendeten Strategien zur Spezifizierung fragen, ob eine Beschränkung auf eng gefasste Untergruppen nicht gerade im Bereich der affektiven Störungen wiederum einen Verlust an Information darstellt, da Patienten mit einem weiter gefassten Symptomspektrum unterrepräsentiert bleiben und die Studien damit wiederum an Aussagekraft verlieren. Auch die Vermutung, dass Alterationen bestimmter Gene offenbar verschiedenen Störungen zugrunde liegen, lässt eine nach anderen Kriterien generalisierende anstatt

spezifizierende Sichtweise sinnvoll erscheinen. Denn Angehörige eines an einer bipolaren Störung leidenden Patienten haben beispielsweise nicht nur ein erhöhtes Risiko, selbst an einer bipolaren Störung zu erkranken, sondern weisen auch ein im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich erhöhtes Risiko für unipolare Depressionen oder Angststörungen auf. Zudem wird beobachtet, dass in bestimmten Familien unterschiedliche psychische Erkrankungen gehäuft auftreten. Diese Beobachtungen und Überlegungen führten zu der Suche nach biologisch relevanteren und für bestimmte Erkrankungen disponierenden Parametern, was eine Abkehr von den dichotomen Merkmalen der Krankheit hin zu quantitativ messbaren Persönlichkeitszügen (Traits) bewirkte (van Belzen und Heutink, 2006; Burmeister et al., 2008). Diese sind der Theorie zufolge auch in der gesunden Bevölkerung mehr oder weniger ausgeprägt, individuell dem Temperament und der Persönlichkeit entsprechend, und bestimmen als grundlegende Veranlagung das Verhalten des einzelnen mit. Demzufolge bilden psychische Erkrankungen wie affektive Störungen die extremen und damit pathologischen Endpunkte bestimmter Persönlichkeitszüge (in diesem Fall bspw. Neurotizismus) (van Belzen und Heutink, 2006; Burmeister et al., 2008).

Die Fokussierung auf Endophänotypen als quantitativ messbare Persönlichkeitszüge bietet zahlreiche Vorteile. Verallgemeinert lässt sich sagen, dass multiple Gene in einem System [auch als *quantitative trait loci* (QTL) bezeichnet] zu Verhaltens- und Persönlichkeitsdimensionen führen, die wiederum ihrerseits die Suszeptibilität für bestimmte Erkrankungen erhöhen (Eley und Plomin, 1997; McGuffin et al., 2001). Zum einen prädisponiert z.B. ein stark ausgeprägter Neurotizismus (charakterisiert durch Merkmale wie Dysphorie, Ängstlichkeit, Spannung und emotionale Reaktivität (Levinson, 2006)) nicht nur für die Erkrankung an einer unipolaren Depression oder bipolaren Störung, sondern auch für Angststörungen, womit sich die klinischen Überschneidungen erklären lassen. Das lässt darauf schließen, dass gemeinsame DNA-Sequenz-Variationen als genetische Faktoren sowohl für einen hohen Ausprägungsgrad des Neurotizismus als auch für unipolare Depression und generalisierte Angststörung prädisponieren (Levinson, 2006). Zum anderen wird vermutet, dass diese Endophänotypen durch eine im Verhältnis zur Erkrankung kleinere Anzahl an genetischen Faktoren beeinflusst werden, was die Wahrscheinlichkeit, diese Variationen zu entdecken, erhöht. Endophänotypen scheinen somit eine stärkere Verbindung zu

genetischen Faktoren zu haben als die eigentlichen Erkrankungen (Gottesman und Gould, 2003; van Belzen und Heutink, 2006; Burmeister et al., 2008). Der Ansatz, Assoziationsstudien mit quantitativ messbaren Endophänotypen anstelle der dichotomen Merkmale „krank“ und „gesund“ durchzuführen, konnte schon bald Erfolge in der Identifikation von Suszeptibilitätsgenen verzeichnen, eine der am besten beschriebenen ist die Assoziation des 5-HTTLPR mit Neurotizismus (Lesch et al., 1996; van Belzen und Heutink, 2006; Canli und Lesch, 2007; Burmeister et al., 2008). Da der größte Einfluss von FEV als Transkriptionsfaktor im serotonergen System während der Phase der Hirnentwicklung zu bestehen scheint und hier eher die Anlage einer für Depression prädisponierenden Persönlichkeit anzunehmen ist als die Prädisposition für die Krankheit selbst, erscheint eine Assoziationsstudie mit dem Persönlichkeitsfaktor Neurotizismus als möglicherweise aussichtsreicher.

6.1.6 FEV ist ein stark konserviertes Gen

Darüber hinaus wurde in einer Sequenzanalyse ein ausgewählter Abschnitt des Exon 3 des *FEV*-Gens in einer Stichprobe von 20 Patienten untersucht. Die Sequenzierung des 342 Basenpaare umfassenden Abschnitts des Exon 3 zeigte bis auf eine Ausnahme keine genetischen Varianten der in der Datenbank verzeichneten sieben SNPs. Zudem stimmte die Sequenz mit der Datenbank exakt überein, es fanden sich keine Mutationen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf eine weitere Untersuchung des Abschnitts in einer größeren Patientenstichprobe und einer Kontrollgruppe verzichtet. Bei einer Frequenz < 1% der polymorphen Varianten erscheint eine Assoziation mit der Erkrankung an einer affektiven Störung unwahrscheinlich. In weiteren Arbeiten (Kriegebaum et al., 2010c) wurde die Promotorregion und somit das gesamte Exon 3 (608 bp) explorativ auf Polymorphismen hin untersucht. Auch hier fanden sich keine Mutationen oder Polymorphismen. Die Ergebnisse zeigen insgesamt eine hochgradige Konservierung der Sequenz des *FEV*-Gens.

Nicht nur die hoch konservierte ETS-Transkriptionsdomäne, sondern auch andere Regionen weisen kaum Variationen auf (Peter et al., 1997; Maurer et al., 2003). Selbst zwischen den einzelnen Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie sowie zwischen den unterschiedlichsten Spezies in denen sie exprimiert werden - von der Fruchtfliege bis

hin zum Menschen – sind viele Regionen bekannt, die sich in ihrer Sequenz nur geringfügig unterscheiden (Sharrocks, 2001). Auch stehen die Ergebnisse dieser Arbeit im Einklang mit der Untersuchung von Rand und Mitarbeitern, die zwar ein signifikant häufigeres Auftreten einer Insertionsmutation in Intron 2 bei SIDS-Fällen nachweisen konnten, jedoch auch mittels Sequenzanalyse feststellten, dass darüber hinaus kaum Polymorphismen nachzuweisen sind (Rand et al., 2007). Auch eine Region oberhalb der Promotorsequenz, der nach Scott eine Enhancer-Funktion zukommt und eine 70-90% Übereinstimmung zwischen *Pet-1* und *FEV* aufweist (Scott et al., 2005), zeigte in der Untersuchung von Rand und Mitarbeitern keinerlei Variationen (Rand et al., 2007). Die Sequenzierung sowohl der Promotorregion als auch des für das Exon 3 kodierenden Bereichs – also ein Großteil des Gens – in einem Kollektiv an affektiven Störung leidender Patienten zeigte nahezu keine genetischen Variationen (ausgenommen den oben erwähnte SNP *rs2301296*) (Kriegebaum et al., 2010c). Die Ergebnisse zeigen also übereinstimmend, dass *FEV* ein hochgradig konserviertes Gen ist.

Die ETS-Transkriptionsfaktoren besitzen in vielen Organismen sowohl in der adulten als auch während der embryonalen Entwicklung essentielle Funktionen (Sharrocks, 2001). Eine Dysregulation dieser ETS-Domänenproteine kann schwerwiegende Konsequenzen haben, wie aus Beispielen der Tumorforschung zu erkennen ist. Dort spielen diese Transkriptionsfaktorgene als Fusionsgene eine zentrale Rolle in der Tumorgenese. Dabei handelt es sich um die unterschiedlichsten Tumoren, darunter Brust- und Prostatakrebs, Leukämien sowie Ewing-Sarkoma (Sharrocks, 2001; Seth und Watson, 2005). *FEV* wurde bislang nur in Ewing-Tumoren identifiziert (Peter et al., 1997; Llombart-Bosch et al., 2000; Navarro et al., 2002). Dies, die essentielle Bedeutung von *FEV* für die Entwicklung des serotonergen Systems sowie die Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Störungen der Entwicklung des serotonergen Systems und einem erhöhten Risiko für den plötzlichen Kindstod (SIDS) (Rand et al., 2007), lassen es möglich erscheinen, dass funktional bedeutsame Alterationen dieses Gens schwerwiegende Folgen haben.

Gerade aufgrund der Ergebnisse aus Tierstudien bleibt *FEV* interessant für die psychiatrische Grundlagenforschung, da sowohl die Bedeutung im adulten serotonergen System als auch die Wirkung während der frühen Hirnentwicklung weiterer Entschlüsselung bedarf. Die Ergebnisse dieser Arbeit können diesbezüglich keine neuen

Erkenntnisse liefern, sie zeigen jedoch, dass, sollten Zusammenhänge zwischen genetischen Alterationen des *FEV*-Gens und psychischen Erkrankungen bestehen, diese wahrscheinlich sehr komplexer Natur sind und durch eine solche Assoziationsstudie nicht nachzuweisen waren. Die untersuchten genetischen Varianten des Kandidatengens zeigen keine signifikante Verbindung zur Erkrankung an Störungen des affektiven Formenkreises. Die Aufklärung der spezifischen Wirkung von *FEV* im serotonergen System sowohl beim Erwachsenen als auch in der Phase der frühkindlichen Entwicklung und insbesondere die Folgen relevanter Mutationen im Bereich der hochgradig konservierten *FEV* -Sequenz, bieten interessante weitere Forschungsmöglichkeiten.

6.2 Das Kandidatengen *TPH2*

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwieweit einzelne Polymorphismen des *TPH2*-Gens mit der Erkrankung am adulten ADHS assoziiert sind. In den hier untersuchten Stichproben konnte keine Assoziation zwischen dem Auftreten der polymorphen Variante des SNP *rs4570625* (G/T) und des SNP *rs11178997* (T/A) des *TPH2*-Gens und der Erkrankung am adulten ADHS gefunden werden. Sowohl die Analyse im Sinne eines Einzelmarker-Assoziationstests als auch eines Haplotyp-Assoziationstests führte zu keinem signifikanten Ergebnis. In den hier untersuchten Stichproben besteht somit kein Hinweis auf eine Assoziation der untersuchten *TPH2*-Promotorpolymorphismen mit adultem ADHS.

Meta-Analysen von Kandidatengen-Studien konnten erfolgreich Assoziationen einiger Gene mit ADHD identifizieren, wenngleich mit jeweils kleinen Effektstärken. So ist sowohl für Gene des dopaminergen [Dopamintransporters (DAT1), Dopaminrezeptor-4 (DRD4), Dopaminrezeptor-5 (DRD5)], als auch des serotonergen Signalwegs [Serotonintransporter (5-HTTLPR), Serotoninrezeptor 1B (HTR1B)] sowie für das Synaptosomal-associated-Protein-25 (SNAP25) eine mehrheitlich positive Assoziation belegt, wenngleich es auch stets Studien gibt, die über negative Ergebnisse berichten (Faraone et al., 2005; Brookes et al., 2006; Renner et al., 2008). Eine entscheidende Rolle des serotonergen Systems in der Pathogenese der ADHS wird angenommen, seitdem bekannt ist, dass es vor allem die Symptome Impulsivität, Impulskontrolle und

Aggressivität mitbestimmt (Lesch und Merschdorf, 2000; Winstanley et al., 2006). *TPH2*, als Gen des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Serotoninsynthese und nahezu ausschließlich zentral exprimiert (Walther und Bader, 2003; Zill et al., 2007b), bot sich deshalb schon bald als interessantes Kandidatengen für die Suche nach genetischen Faktoren an, die eine Erkrankung an der ADHS begünstigen. Ein Zusammenhang verschiedener Variationen der Sequenz des *TPH2*-Gens mit Erkrankungen konnte an einem Spektrum klinischer Populationen nachgewiesen werden. Im weitesten Sinne handelte es sich um Störungen der Emotionsregulation. Zill und Mitarbeiter fanden in einer SNP- und Haplotyp-Assoziationsstudie einen Zusammenhang mit unipolarer Depression (*Major Depression Disorder*, MDD) (Zill et al., 2004b), Harvey und Mitarbeiter konnten einen mit Bipolar I- und Bipolar II-Störungen assoziierten Haplotyp identifizieren (Harvey et al., 2004), Van Den Bogaert und Mitarbeiter konnten sowohl Assoziationen mit unipolarer als auch mit bipolarer Depression in einem schwedischen Patientenkollektiv feststellen (Van Den Bogaert et al., 2006), und Gutknecht und Mitarbeiter wiesen schließlich eine Assoziation mit Persönlichkeitsstörungen, affektiven und angstbezogenen Störungen sowie mit Persönlichkeitszügen (Harm Avoidance, Neurotizismus) nach (Gutknecht et al., 2007). Es gibt noch weitere Publikationen, die Assoziationen mit psychiatrischen Erkrankungen feststellen konnten (Zhang et al., 2005; Zhou et al., 2005), wengleich zu erwähnen bleibt, dass zahlreiche Arbeiten auch negative Ergebnisse lieferten und die Replikation positiver Resultate oft fehlschlug (De Luca et al., 2004; De Luca et al., 2005; Zill et al., 2007a; Mann et al., 2008). Auch die Suche nach Zusammenhängen von ADHS mit Polymorphismen des *TPH2*-Gens trug ihre Früchte. So konnten sowohl Walitza und Mitarbeiter als auch Sheehan und Mitarbeiter ein Transmissionsdisequilibrium für verschiedene SNPs bei Kindern und Jugendlichen mit ADHS nachweisen, wengleich Brookes und Mitarbeiter diese Ergebnisse zum Teil nicht replizieren konnten (Sheehan et al., 2005; Walitza et al., 2005; Brookes et al., 2006). Es entsteht also auch hier ein widersprüchliches Bild, niedrige statistische Leistungsfähigkeit sowie die angenommene geringe Effektstärke syndromrelevanter Genvarianten minimieren die Aussagekraft der einzelnen Studien. Es braucht wohl noch weitere systematische Metaanalysen, um der tatsächliche Bedeutung der untersuchten Genpolymorphismen und ihrer ätiopathologischen Relevanz näher zu kommen (Renner

et al., 2008). Hierfür sind auch negative Ergebnisse wie die in dieser Arbeit erzielten wichtig (wenngleich seltener veröffentlicht), da erst sie ein ausgewogenes Bild ermöglichen. Eine neuere, deutlich größere Assoziationsstudie konnte ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen Polymorphismen, weder des *TPH2*- noch des *TPHI*-Gens, und adultem ADHS finden (Johansson et al., 2010). Andererseits unterstützen diese Ergebnisse das quantitative Modell der komplexen Störungen, wonach die Polymorphismen einzeln betrachtet nur einen geringen Einfluss auf neurophysiologische Abläufe oder die Verhaltensebene haben, jedoch als Risikoallele zur Ausprägung von Persönlichkeitsmerkmalen beitragen. So nimmt man an, dass erst ein kombiniertes Auftreten mehrerer Risikoallele, sowie begünstigende Umwelteinflüsse, zur Akzentuierung dieser auch in der Allgemeinbevölkerung vorhandenen Merkmale bis hin zur klinisch relevanten Störung führen.

Durch die oben erwähnten Studien wurde eine Vielzahl der bekannten SNPs des *TPH2*-Gens untersucht, viele davon in nicht kodierenden Regionen lokalisiert. Die in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen SNP *rs4570625* (-703 G/T) und *rs11178997* (-473 T/A) befinden sich im Bereich des Promoters, also der Region, die mutmaßlich für die transkriptionale Kontrolle des *TPH2*-Gens essentiell ist. Es wird vermutet, dass solche SNPs im Gegensatz zu den sehr viel seltener zu findenden kodierenden Varianten nicht über das Protein selbst, sondern durch Beeinträchtigung der Genexpression über eine Veränderung der zu Verfügung stehenden Menge des Proteins ihre dysfunktionale Wirkung entfalten. Für beide SNPs wiesen Walitza und Mitarbeiter ein Transmissionsdisequilibrium nach: das G-Allel des *rs4570625* und das T-Allel des *rs11178997* wurden signifikant häufiger an die vom ADHS betroffenen Kinder weitergegeben, wodurch diese SNPs als mögliche funktionelle ADHS-Risikoallele identifiziert werden konnten (Walitza et al., 2005). Gutknecht und Mitarbeiter fanden für das T-Allel des *rs4570625* und das A-Allel des *rs11178997* eine Assoziation mit Persönlichkeitsstörungen (Cluster B und C) und den Persönlichkeitsmerkmalen Neurotizismus und Harm Avoidance, die mit angst- und depressionsbezogenen Störungen in Verbindung gebracht werden und im weitesten Sinne durch eine Emotionsdysregulation gekennzeichnet sind (Gutknecht et al., 2007). Dieses Ergebnis konnte durch Studien, die neuropsychologische und funktionell bildgebende mit molekulargenetischen Methoden kombinierten – so genannte „*imaging genetics*“-

Studien – untermauert werden. Sie wiesen zum einen eine erhöhte Amygdala-Reaktivität der T-Allel-Träger (*rs4570625*) auf emotionale Stimuli mithilfe des fMRT nach (Brown et al., 2005; Canli et al., 2005). Zum anderen konnte ein additiver Effekt der *short*-Variante des *5-HTTLPR* und des T-Allels des *rs4570625* auf neuronale Korrelate emotionaler Verarbeitungsprozesse festgestellt werden (Herrmann et al., 2007; Canli et al., 2008). Die erhöhte Aktivität in Bereichen des Gehirns, die entscheidend an der Modulation emotionaler Verhaltensweisen beteiligt sind und die mit einer Disposition für affektive Störungen in Verbindung gebracht werden, könnte für eine durch die Promotorvariante bewirkte gesteigerte TPH2 Expression sprechen, aus der eine erhöhte 5-HT-Synthese resultiert (Brown et al., 2005). Die nachgewiesene Gen-Gen-Interaktion bietet einen Einblick in die mögliche synergistische Wirkung, die mehrere Genvarianten nach der Multigenhypothese der komplexen Störung haben und die gemeinsam zu einer Krankheitsdisposition führen.

Der Ansatz, intermediäre Phänotypen und neuropsychologisch messbare Krankheitskorrelate wie beispielsweise Reaktionskontrolldefizite im Hinblick auf molekulargenetische Varianten zu untersuchen, erscheint Erfolg versprechend. So untersuchten Baehne und Mitarbeiter die kognitive Reaktionskontrolle bei adulten ADHS Patienten und gesunden Probanden mithilfe des Elektroenzephalogramms (EEG) und einer Go-NoGo-Aufgabe (*continious performance test*, CPT) im Hinblick auf durch den Genotyp hervorgerufene Unterschiede (Baehne et al., 2009). Die Träger der ADHS-Risikoallele G (*rs4570625*) und T (*rs11178997*) zeigten EEG-Veränderungen in der Reaktionsinhibition (reduzierte No-Go-Anteriorisation, NGA). Dieser Effekt trat jedoch unabhängig von der spezifischen psychiatrischen Diagnose gleichermaßen in Patienten- und Kontrollgruppe auf (Walitza et al., 2005; Baehne et al., 2009).

Aufgrund dieser und der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse, erscheinen diese *TPH2*-Polymorphismen als nicht ADHS-spezifisch, sie mögen jedoch durch weitere Gen-Gen- und/oder Gen-Umwelt-Interaktionen an der Entwicklung einer ADHS beteiligt sein. Dass beiden Allelen dieser SNPs möglicherweise ein funktioneller Einfluss zukommt und es durch sie zu einer Alteration serotonerger Neurotransmission kommt, zeigen die Ergebnisse der hier erwähnten Studien im Sinne des „*imaging genetics*“-Ansatzes (Brown et al., 2005; Canli et al., 2005; Herrmann et al., 2007; Canli et al., 2008; Baehne et al., 2009). Nichtsdestotrotz sind weitere Studien nötig, um diesen

Einfluss zu bestätigen und die Zusammenhänge der einzelnen Effekte besser zu verstehen.

Auch eine neuere genomweite Assoziationsstudie (*genome-wide association study*, *GWAS*) gibt Hinweise auf eine positive Assoziation einiger SNPs des *TPH2*-Gens, wenngleich ausreichende Signifikanz für keinen einzelnen SNPs erzielt werden konnte. Hier konnten auch weitere Polymorphismen in unterschiedlichen Genen detektiert werden, sie erreichten jedoch alle keine genomweite Signifikanz (Zayats et al., 2015). Ähnliches zeigt eine GWA-Studie zu Aggressivität als zugrundeliegendem Trait bei ADHS-Kindern und adulten ADHS-Patienten, die zwar auch mehrere mögliche biologische Marker identifiziert, von denen jedoch ebenfalls keiner genomweite Signifikanz erreicht (Brevik et al., 2016). Es bleibt somit weiterhin ein spannendes Forschungsfeld, die genetischen Mechanismen der nachgewiesenen Heritabilität aufzudecken.

7 Zusammenfassung

Das serotonerge System bildet schon seit Jahrzehnten einen Schwerpunkt in der psychiatrischen Grundlagenforschung. Seinen weit verzweigten Leitungsbahnen wird eine global-modulatorische Eigenschaft für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen unterschiedlichen Hirnregionen und unterschiedlichen Neurotransmittersystemen zugeschrieben (Hüther und Rüter, 2000). Darüber hinaus ist die serotonerge Neurotransmission ein Hauptmodulator emotionalen Verhaltens, das Angst und Ängstlichkeit ebenso umfasst wie Aggression und Impulsivität (Lesch et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden im Sinne eines Kandidatengenansatzes zwei Assoziationsstudien durchgeführt. Im ersten Teil wurde versucht, eine mögliche Assoziation zwischen der Erkrankung an affektiven Störungen und drei vorbeschriebenen SNPs des *FEV*-Gens aufzudecken. *FEV* ist das humane Homolog des in mehreren Tierversuchen untersuchten *Pet-1*-Gens, dem vor allem eine zentrale Bedeutung in der embryonalen Entwicklung des serotonergen Systems zugeschrieben wird. Zusätzlich wurde ein 286 bp langer Abschnitt des Exon 3 sequenziert, um die Häufigkeit der sieben in diesem Abschnitt beschriebenen SNPs bei unipolar depressiven Patienten abzuschätzen und ggf. neue Varianten zu detektieren. Der zweite Teil untersuchte das Auftreten zweier bereits von anderen Autoren beschriebener SNPs des *TPH2*-Gen bei an der adulten Form des ADHS leidenden Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Die im zentralen serotonergen System dominierende Tryptophanhydroxylase 2 (TPH2) ist das erste, geschwindigkeitsbegrenzende Enzym der Serotonin-Biosynthese. Die Genotypisierung der einzelnen SNPs erfolgte mit unterschiedlichen Methoden. So kam sowohl die PCR, der Restriktionsenzymverdau, die Minisequenzierung (SNaPshot[®]) als auch die MALDI-ToF Massenspektrometrie und die Sequenzierung zum Einsatz, die Auftrennung einzelner Schnittprodukte erfolgte durch die Gelelektrophorese.

Die erste Stichprobe umfasste 270 Patienten (davon 179 weiblich) mittleren Alters mit einer Diagnose aus dem affektiven Formenkreis (180 mit bipolar-affektiver Störung gemäß den DSM-IV Kriterien, weitere 90 Patienten mit einer rezidivierenden unipolaren depressiven Störung) sowie 362 (davon 174 weibliche) Kontrollpersonen. Die Stichproben der zweiten Studie umfassten 284 am adulten ADHS (Diagnose nach

DSM IV) leidende Patienten (140 davon weiblich) und 120 Kontrollpersonen (61 davon weiblich).

Statistisch wurden die Daten sowohl auf Einzelmarker- als auch auf Haplotypniveau ausgewertet. In beiden Studien konnte keine Assoziation der untersuchten Polymorphismen des *FEV*- bzw. *TPH2*-Gens mit der jeweiligen Erkrankung (affektive Störung / adultes ADHS), weder auf Einzelmarker- noch auf Haplotypniveau, nachgewiesen werden. Die Sequenzierung des 286 bp langen Abschnitts von Exon 3 des *FEV*-Gens zeigt eine ausgeprägte Konservierung der Sequenz dieses Gens, wie sie auch von anderen Autoren beschrieben wurde.

Die hier untersuchten Kandidatengene *FEV* und *TPH2* sind auch weiterhin interessante Ansatzpunkte für die psychiatrische Grundlagenforschung. Die Aufklärung der genauen Wirkungsweise von FEV und seine Rolle in der Entwicklung des menschlichen serotonergen Systems erscheint jedoch vordergründig, um zunächst Funktion, Interaktionen und mögliche pathogenetische Mechanismen aufzudecken und dann gezielter die Einflüsse bestimmter Polymorphismen zu untersuchen.

8 Literaturverzeichnis

- Alm B, Sobanski E (2008) Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörung (ADHS) im Erwachsenenalter. In: Psychiatrie und Psychotherapie - Spezielle Psychiatrie (Möller H-J, Laux G, Kampfhammer H-P, eds), pp 923-946. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Ansorge MS, Hen R, Gingrich JA (2007) Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Curr Opin Pharmacol* 7:8-17.
- Aydin A, Bähring S (2000) Nachweis von SNPs mit einem automatischen Kapillarelektrophoresesystem und fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden. *Biospektrum* 4:309-310.
- Azmitia EC (2001) Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res Bull* 56:413-424.
- Baehne CG, Ehliis A-C, Plichta MM, Conzelmann A, Pauli P, Jacob C, Gutknecht L, Lesch KP, Fallgatter AJ (2009) *Tph2* gene variants modulate response control processes in adult ADHD patients and healthy individuals. *Mol Psychiatry* 14:1032–1039.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD an haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263-265.
- Beck AT, Ward CH, Mendelson M, Mock J, Erbaugh J (1961) An Inventory for Measuring Depression. *Arch Gen Psychiatry* 4:561-571.
- Berger M (1999) Affektive Erkrankungen. In: Psychiatrie und Psychotherapie (Berger MH, ed), pp 483-566. München: Urban&Schwarzenberg.
- Biederman J, Faraone SV (2005) Attention-deficit hyperactivity disorder. *Lancet* 366:237-248.
- Birbaumer N, Schmidt RF (1999) Biologische Psychologie, 4. Auflage Edition. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Brevik EJ et al. (2016) Genome-Wide Analyses of Aggressiveness in Attention-Deficit Hyperactivity Disorder. *Am J Med Genet Part B* 9999:1-15.
- Broadbelt KG, Barger MA, Paterson DS, Holm IA, Haas EA, Krous HF, Kinney HC, Markianos K, Beggs AH (2009) The Serotonin-Related *FEV* Gene Variant in the Sudden Infant Death Syndrome is a common Polymorphism in the African-American Population. *Paediatr Res* 66:631-635.

- Brookes K et al. (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* 11:934-953.
- Brown SM, Peet E, Manuck SB, Williamson DE, Dahl RE, Ferrell RE, Hariri AR (2005) A regulatory variant of the human tryptophan hydroxylase-2 gene biases amygdala reactivity. *Mol Psychiatry* 10:884-888.
- Brown TA (2007) *Genome und Gene, Lehrbuch der molekularen Genetik*, 3. Edition. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, Spektrum Akademischer Verlag
- Burmeister M, McInnis MG, Zöllner S (2008) Psychiatric genetics: progress amid controversy. *Nat Rev Genet* 9:527-540.
- Burton PR, Tobin MD, Hopper JL (2005) Key concepts in genetic epidemiology. *Lancet* 366:941-951.
- Buznikov GA, Lambert HW, Lauder JM (2001) Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell Tissue Res* 305:177-186.
- Canli T, Lesch KP (2007) Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nat Neurosci* 10:1103-1109.
- Canli T, Congdon E, Constable RT, Lesch KP (2008) Additive effects of serotonin transporter and tryptophan hydroxylase-2 gene variation on neural correlates of affective processing. *Biol Psychol* 79:118-125.
- Canli T, Congdon E, Gutknecht L, Constable RT, Lesch KP (2005) Amygdala responsiveness is modulated by tryptophan hydroxylase-2 gene variation. *J Neural Transm* 112:1479-1485.
- Caspi A, Hariri AR, Holmes A, Uher R, Moffitt TE (2010) Genetic Sensitivity to the Environment: The Case of the Serotonin Transporter Gene and its Implications for Studying Complex Diseases and Traits. *Am J Psychiatry* 167:509-527.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003) Influence of Life Stress on Depression: Moderation by a Polymorphism in the 5-HTT Gene. *Science* 301:386-389.
- Chen Z-F, Ding Y-Q (2006) Transcriptional control of the development of central serotonergic neurons In: *Transcription factors in the nervous system: Development, brain function, and diseases* (Thiel G, ed), pp 143-160. Weinheim: WILEY-VCH.
- Clark AG (2004) The Role of Haplotypes in Candidate Gene Studies. *Genet Epidemiol* 27:321-333.

- Cloninger CR, Przybeck TR, Svrakic DM (1991) The tridimensional personality questionnaire: U.S. normative data. *Psychol Rep* 69:1047-1057.
- Coppen A (1972) Indolamines and Affective Disorders. *J Psychiatric Res* 9:163-171.
- Costa PT, McCrae RR (1998) Revised NEO Personality Inventory (NEO PI-R and NEO Five-Factor Inventory NEO-FFI) professional manual. Lutz FL, USA: Psychological Assessment Resources, Inc.
- Craddock N, Jones I (2001) Molecular genetics of bipolar disorder. *Br J Psychiatry* 178:128-133.
- De Luca V, Mueller DJ, Tharmalingam S, King N, Kennedy JL (2004) Analysis of the novel TPH2 gene in bipolar disorder and suicidality. *Mol Psychiatry* 9:896-899.
- De Luca V, Voineskos D, Wong GWH, Shinkai T, Rothe C, Strauss J, Kennedy JL (2005) Promoter polymorphism of second tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) in schizophrenia and suicidality. *Psychiatry Res* 134:195-198.
- Ebert D, Krause J, Roth-Sackenheim C (2003) ADHS im Erwachsenenalter - Leitlinien auf der Basis eines Expertenkonsensus mit Unterstützung der DGPPN. *Nervenarzt* 10:939-946.
- Eley TC, Plomin R (1997) Genetic analysis of emotionality. *Curr Opin in Neurobiol* 7:279-284.
- Erspamer V (1940) Pharmakologische Studien über Enteramin. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 196:366-390.
- Eysenck SBG, Pearson PR, Easting G, Allsopp JF (1985) Age norms for impulsiveness, venturesomeness and empathy in adults. *Pers individ Dif* 6:613-619.
- Fagerström K-O (1978) Measuring degree of physical dependence to tobacco smoking with reference to individualization of treatment. *Addict Behav* 3:235-241.
- Faraone SV, Biederman J (2005) What is the Prevalence of adult ADHD? Results of a Population Screen of 966 Adults. *J Atten Disord* 9:384-391.
- Faraone SV, Biederman J, Mick E (2006) The age-dependent decline of attention deficit hyperactivity disorder: a meta-analysis of follow-up studies. *Psychol Med* 36:159-165.
- Faraone SV, Perlis RH, Doyle AE, Smoller JW, Goralnick JJ, Holmgren MA, Sklar P (2005) Molecular Genetics of Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder. *Biol Psychiatry* 57:1313-1323.
- Freudenberg J, Cichon S, Nöthen MM, Propping P (2002) Blockstruktur des menschlichen Genoms - Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität. *Dtsch Arztebl* 99:A 3190-3195.

- Gaebel W, Zielasek J (2008) Ätiopathogenetische Konzepte und Krankheitsmodelle in der Psychiatrie. In: Psychiatrie und Psychotherapie - Allgemeine Psychiatrie, 3.Auflage Edition (Möller H-J, Laux G, Kampfhammer H-P, eds), pp 30-54. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Gottesman II, Gould TD (2003) The Endophenotype Concept in Psychiatry: Etymology and Strategic Intentions. *Am J Psychiatry* 160:636-645.
- Gutknecht L, Kriegebaum C, Waider J, Schmitt A, Lesch K-P (2009) Spatio-temporal expression of tryptophan hydroxylase isoforms in murine and human brain: Convergent data from *Tph2* knockout mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 19:266-282.
- Gutknecht L, Waider J, Kraft S, Kriegebaum C, Holtmann B, Reif A, Schmitt A, Lesch KP (2008) Deficiency of brain 5-HT synthesis but serotonergic neuron formation in *Tph2* knockout mice. *J Neural Transm* 115:1127-1132.
- Gutknecht L, Jacob C, Strobel A, Kriegebaum C, Müller J, Zeng Y, Markert C, Escher A, Wendland J, Reif A, Mössner R, Gross C, Brocke B, Lesch K-P (2007) Tryptophan hydroxylase-2 gene variation influences personality traits and disorders related to emotional dysregulation. *Int J Neuropsychopharmacol* 10:309-320.
- Harvey M, Shink E, Tremblay M, Gagné B, Raymond C, Labbé M, Walther DJ, Bader M, Barden N (2004) Support for the involvement of TPH2 gene in affective disorders. *Mol Psychiatry* 9:980-981.
- Hendricks TJ, Francis N, Fyodorov D, Deneris ES (1999) The ETS domain factor Pet-1 is an early and precise marker of central serotonin neurons and interacts with a conserved element in serotonergic genes. *J Neurosci* 19:10348-10356.
- Hendricks TJ, Fyodorov DV, Wegman LJ, Lelutiu NB, Pehek EA, Yamamoto B, Silver J, Weeber EJ, Sweatt JD, Deneris ES (2003) Pet-1 ETS gene plays a critical role in 5-HT neuron development and is required for anxiety-like and aggressive behavior. *Neuron* 37:233-247.
- Herrmann M, Huter T, Müller F, Mühlberger A, Pauli P, Reif A, Renner TJ, Canli T, Fallgatter AJ, Lesch KP (2007) Additive Effects of Serotonin Transporter and Tryptophan Hydroxylase-2 Gene Variation on Emotional Processing. *Cereb Cortex* 17:1160-1163.
- Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K (2002) A comprehensive review of genetic association studies. *Genet Med* 4:45-61.
- Hornung J-P (2003) The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J Chem Neuroanat* 26:331-343.

- Hüther G, Rüter E (2000) Das serotonerge System. Bremen: UNI-MED Verlag AG.
- Iyo AH, Porter B, Deneris ES, Austin MC (2005) Regional distribution and cellular localization of the ETS-domain transcription factor, FEV, mRNA in the human postmortem brain. *Synapse* 57:223-228.
- Jacob C, Romanos J, Dempfle A, Heine M, Windemuth-Kieselbach C, Kruse A, Reif A, Walitza S, Romanos M, Strobel A, Brocke B, Schäfer H, Schmidtke A, Böning J, Lesch KP (2007) Co-morbidity of adult attention-deficit /hyperactivity disorder with focus on personality traits and related disorders in a tertiary referral center. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257:309-317.
- Johansson S et al. (2010) Common Variants in the TPH1 and TPH2 Regions Are Not Associated With Persistent ADHD in a Combined Sample of 1,636 Adult Cases and 1,923 Controls From four European Populations. *Am J Med Genet Part B* 153 B:1008-1015.
- Karatsoreos IN, McEwan BS (2011) Psychobiological allostasis: resistance, resilience and vulnerability. *Trends Cogn Sci* 15:576-584.
- Kiyasova V, Gaspar P (2011) Development of raphe serotonin neurons from specification to guidance. *Eur J Neurosci* 34:1553-1562.
- Kiyasova V, Fernandez SP, Laine J, Stankovski L, Muzerelle A, Doly S, Gaspar P (2011) A Genetically Defined Morphologically and Functionally Unique Subset of 5-HT Neurons in the Mouse Raphe Nuclei. *J Neurosci* 31:2756-2768.
- Kriegebaum C, Gutknecht L, Schmitt A, Lesch K-P, Reif A (2010a) Serotonin Kompakt - Teil 2, Verhaltensgenetik und Psychopathologie. *Fortschr Neurol Psychiatr* 78:332-342.
- Kriegebaum C, Gutknecht L, Schmitt A, Lesch K-P, Reif A (2010b) Serotonin Kompakt - Teil 1, Neurobiologische und entwicklungsgenetische Grundlagen. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 78:319-331
- Kriegebaum C, Gutknecht L, Bartke L, Reif A, Buttenshon HN, Mors O, Lesch K-P, Schmitt A (2010c) The expression of the transcription factor FEV in adult human brain and its association with affective disorders. *J Neur Transm* 117:831-836.
- Krueger KC, Deneris ES (2008) Serotonergic Transcription of Human *FEV* Reveals direct GATA Factor Interactions and Fate of *Pet-1*-Deficient Serotonin Neuron Precursors. *J Neurosci* 28:12748-12758.
- Lauder JM (1990) Ontogeny of the Serotonergic System in the Rat: Serotonin as a Developmental Signal. *Ann N Y Acad Sci* 660:297-314.

- Laux G (2008a) Bipolar affektive Störungen. In: Psychiatrie und Psychotherapie - Spezielle Psychiatrie (Möller H-J, Laux G, Kampfhammer H-P, eds), pp 471-498. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Laux G (2008b) Depressive Störungen. In: Psychiatrie und Psychotherapie - Spezielle Psychiatrie (Möller H-J, Laux G, Kampfhammer H-P, eds), pp 399-470. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Leonardo ED, Hen R (2006) Genetics of Affective and Anxiety Disorders. *Annu Rev Psychol* 57:117-137.
- Lerch-Haner JK, Frierson D, Crawford LK, Beck SG, Deneris ES (2008) Serotonergic transcriptional programming determines maternal behavior and offspring survival. *Nat Neurosci* 11:1001-1003.
- Lesch KP (2001) Variation of serotonergic gene expression: neurodevelopment and the complexity of response to psychopharmacologic drugs. *Eur Neuropsychopharmacol* 11:457-474.
- Lesch KP (2004) Gene-environment interaction and the genetics of depression. *J Psychiatry Neurosci* 29:174-184.
- Lesch KP, Merschdorf U (2000) Impulsivity, Aggression, and Serotonin: A Molecular Psychobiological Perspective. *Behav Sci Law* 18:581-604.
- Lesch KP, Zeng Y, Reif A, Gutknecht L (2003) Anxiety-related traits in mice with modified genes of the serotonergic pathway. *Eur J Pharmacol* 480:185-204.
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Müller CR, Hamer DH, Murphy DL (1996) Association of Anxiety-Related Traits with a Polymorphism in the Serotonin Transporter Gene Regulatory Region. *Science* 274:1527-1531.
- Levinson DF (2006) The Genetics of Depression: A Review *Biological Psychiatry* 60:84-92.
- Li B, Leal SM (2009) Deviations from Hardy-Weinberg Equilibrium in Parental and Unaffected Sibling Genotype Data. *Human Hered* 67:104-115.
- Llombart-Bosch A, Pellin A, Carda C, Noguera R, Navarro S, Peydro-Olaya A (2000) Soft tissue Ewing Sarcoma-peripheral Primitive Neuroectodermal Tumor with atypical clear cell pattern shows a new type of *EWS-FEV* fusion transcript. *Diagn Mol Pathol* 9:137-144.
- Lottspeich F, Engels JWH (2006) Bioanalytik, 2. Edition. München: Elsevier GmbH Spektrum Akademischer Verlag.

- Lüllmann H, Mohr K, Wehling M (2003) *Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*, 15., komplett überarbeitete Auflage Edition. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Maier W, Zobel A, Schwab S (2008) *Genetik psychischer Störungen*. In: *Psychiatrie und Psychotherapie - Allgemeine Psychiatrie* (Möller H-J, Laux G, Kampfhammer H-P, eds), pp 71-108. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Mann JJ, Currier D, Murphy L, Huang Y, Galfalvy H, Brent D, Greenhill L, Oquendo M (2008) No association between a TPH2 promotor polymorphism and mood disorders or monoamine turnover. *J Affect Disord* 106:117-121.
- Maurer P, Rorive S, de Kerchove d'Exaerde A, Schiffmann SN, Salmon I, de Launoit Y (2004) The Ets transcription factor Fev is specifically expressed in the human central serotonergic neurons. *Neurosci Lett* 357:215-218.
- Maurer P, T'Sas F, Coutte L, Callens N, Brenner C, van Lint C, de Launoit Y, Baert J-L (2003) FEV acts as a transcriptional repressor through its DNA-binding ETS domain and alanin-rich domain. *Oncogene* 22:3319-3329.
- McEwan B (1998) Stress, Adaption, and Disease: Allostasis and Allostatic Load. *Ann N Y Acad Sci* 840:33-44.
- McGuffin P, Riley B, Plomin R (2001) Genomics and Behavior: Towards Behavioral Genomics. *Science* 291:1232-1249.
- Möller H-J, Laux G, Kampfhammer H-P (2008) *Psychiatrie und Psychotherapie - Spezielle Psychiatrie* (2.Bd), 3. Auflage Edition. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Moretti A, Gorini A, Villa RF (2003) Affective disorders, antidepressant drugs and brain metabolism. *Mol Psychiatry* 8:773-785.
- Murphy DL, Lesch K-P (2008) Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nat Rev Neurosci* 9:85-96.
- Navarro S, Noguera R, Pellin A, Lopez-Guerrero JA, Rosello-Sastre E, Cremandes A, Llombart-Bosch A (2002) Atypical pleomorphic extraosseous Ewing-Tumor/peripheral Primitive Neuroektodermal Tumor with unusual phenotypic/genotypic profile. *Diagn Mol Pathol* 11:9-15.
- Oades RD, Lasky-Su J, Christiansen H, Faraone SV, Sonuga-Barke EJS, Banaschewski T, Chen W, Anney RJL, Buitelaar JK, Ebstein RP, Franke B, Gill M, Miranda A, Roeyers H, Rothenberger A, Sergeant JA, Steinhausen H-C, Taylor EA, Thompson M, Asherson P (2008) The influence of serotonin- and other genes on impulsive behavioral aggression and cognitive impulsivity in children with attention-

- deficit/hyperactivity disorder (ADHD): Findings from a family-based association test (FBAT) analysis. *Behav Brain Funct.*
- Peter M, Courturier J, Paquement H, Michon J, Thomas G, Magdelenat H, Delattre O (1997) A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene* 14:1159-1164.
- Pfaar H, von Holst A, Vogt Weisenhorn DM, Brodski C, Wurst W (2002) mPet-1, a mouse ETS-domain transcription factor, is expressed in central serotonergic neurons. *Dev Genes Evol* 212:43-46.
- Ragoussis J, Elvidge GP, Kaur K, Colella S (2006) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time-of-Flight Mass Spectrometry in Genomics Research. *PLoS Genet* 2:0920-0929.
- Rand CM, Berry-Kravis EM, Zhou L, Fan W, Weese-Meyer D (2007) Sudden Infant Death Syndrome: Rare Mutation in the Serotonin System *FEV* Gene. *Pediatr Res* 62:180-182.
- Rapport MM, Green AA, Page IH (1948) Crystalline Serotonin. *Science* 24:329-330.
- Reif A, Lesch K-P (2003) Toward a molecular architecture of personality. *Behav Brain Res* 139:1-20.
- Renner TJ, Gerlach M, Romanos M, Herrmann M, Reif A, Fallgatter AJ, Lesch KP (2008) Neurobiologie des Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätssyndroms. *Nervenarzt* 79:771-781.
- Ressler KJ, Nemeroff MD (2000) Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12:2-19.
- Retz-Junginger P, Retz W, Blocher D, Weljers H-G, Trott G-E, Wender PH, Rösler M (2002) Wender Utah Rating Scale (WURS-k) - Die deutsche Kurzform zur retrospektiven Erfassung des hyperkinetischen Syndroms bei Erwachsenen. *Nervenarzt* 73:830-838.
- Riederer P, Müller WE, Eckert A, Thome J (2008) Störungen der Neurotransmission und Signaltransduktion als Grundlage psychischer Erkrankungen. In: *Psychiatrie und Psychotherapie - Allgemeine Psychiatrie* (Möller H-J, Laux G, Kampfhammer H-P, eds), pp 157-183. Heidelberg: Springer Medizin verlag.
- Risch N, Merikangas K (1996) The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273:1516-1517.
- Risch N, Herrell R, Lehner T, Liang K-Y, Eaves L, Hoh J, Griem A, Kocacs M, Ott J, Ries Merikangas K (2009) Interaction Between the Serotonin Transporter Gene (5-

- HTTLPR*), Stressful Life Events, and Risk of Depression. *J Am Med Assoc* 301:2462-2471.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122:509-522.
- Schulte-Körne G, Allgaier A-K (2008) Genetik depressiver Störungen. *Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother* 36:27-43.
- Scott MM, Krueger KC, Deneris ES (2005) A differentially autoregulated *Pet-1* enhancer region is a critical target of the transcriptional cascade that governs serotonin neuron development. *J Neurosci* 25:2628-2636.
- Seth A, Watson DK (2005) ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *Eur J Cancer* 41:2462-2478.
- Sharrocks AD (2001) The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:827-837.
- Sheehan K, Lowe N, Kirley A, Fitzgerald M, Gill M, Hawi Z (2005) Tryptophan Hydroxylase 2 (TPH2) gene variants associated with ADHD. *Mol Psychiatry* 10.
- Sobanski E, Alm B (2004) Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) bei Erwachsenen - Ein Überblick. *Nervenarzt* 75:697-716.
- Spencer T, Biederman J, Wilens TE, Faraone SV (2002) Overview and Neurobiology of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Clin Psychiatry* 63 (suppl 12):3-9.
- Tost J, Gut IG (2005) Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications. *Clin Biochem* 38:335-350.
- Turner D, Choudhury F, Reynard M, Railton D, Navarrete C (2002) Typing of multiple single nucleotide polymorphisms in cytokine and receptor genes using SNaPshot. *Hum Immunol* 63:508-513.
- Uher R, McGuffin P (2008) The moderation by the serotonin transporter gene of environmental adversity in the aetiology of mental illness: review and methodological analysis. *Mol Psychiatry* 13:131-146.
- van Belzen MJ, Heutink P (2006) Genetic analysis of psychiatric disorders in humans. *Genes, Brain Behav* 5 (Suppl.2):25-33.
- Van Den Bogaert A, Slegers K, De Zutter S, Heyrman L, Npörrback K-F, Adolfsson R, Van Broeckhoven C, Del-Favero J (2006) Association of Brain-Specific Tryptophan-

- Hydroxylase, *TPH2*, with Unipolar and Bipolar Disorder in a Northern Swedish, Isolated Population. *Arch Gen Psychiatry* 63:1103-1110.
- Walitza S, Renner TJ, Dempfle A, Konrad K, Wewetzer C, Halbach A, Herpetz-Dahlmann B, Remschmidt H, Smidt J, Linder M, Flierl L, Knölker U, Friedel S, Schäfer 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*:1-7.
- Walther DJ, Bader M (2003) A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol* 66:1673-1680.
- Warnke A, Wewetzer C, Trott G-E, Wirth S, Hemminger U (2008) Verhaltens- und emotionale Störungen mit Beginn in der Kindheit und Jugend In: *Psychiatrie und Psychotherapie - Spezielle Psychiatrie (2.Bd.)* (Möller H-J, Laux G, Kampfhammer H-P, eds), pp 1161-1214. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Wasyluk B, Hahn S, Giovane A (1993) The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 211:7-18.
- Wender PH (1995) *Attention-deficit hyperactivity disorder in adults*. New York-Oxford: Oxford University Press.
- Whitaker-Azmitia P (1999) The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacol* 21:2S-8S.
- Whitaker-Azmitia P (2001) Serotonin and brain development: Role in human developmental disease. *Brain Res Bull* 56:479-485.
- Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR (2005) A Note on Exact Tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. *Am J Hum Genet* 76:887-883.
- Winstanley CA, Eagle DM, Robbins TW (2006) Behavioral models of impulsivity in relation to ADHD: Translation between clinical and preclinical studies. *Clin Psychol Rev* 26:379-395.
- Wyler SC, Donovan LJ, Yeager M, Deneris E (2015) *Pet-1* controls tetrahydrobiopterin pathway and *Slc22a3* transporter genes in serotonin neurons. *ACS Chem Neurosci* 6:1198–1205.
- Xu Z, Jiang H, Zhong P, Yan Z, Chen S, Feng J (2016) Direct conversion of human fibroblasts to induced serotonergic neurons. *Molecular Psychiatry* 21:62–70.
- Zayats T, Athanasiu L, Sonderby I, Djurovic S, Westlye L, Tamnes C, Fladby T, Aase H, Zeiner P, Reichborn-Kjennerud T, Knappskog PM, Knudsen GP, Andreassen OA,

- Johansson S, Haavik J (2015) Genome-Wide Analysis of Attention Deficit Hyperactivity Disorder in Norway. PLoS ONE 10:e0122501.
- Zhang X, Gainetdinov RR, Beaulieu J-M, Sotnikova TD, Burch LH, Williams RB, Schwartz DA, Ranga R, Krishnan K, Caron MG (2005) Loss-of-Function Mutation in Tryptophan Hydroxylase-2 Identified in Unipolar Major Depression. Neuron 45:1-16.
- Zhou Z, Roy A, Lipsky R, Kuchipudi K, Zhu G, Taubman J, Enoch M-A, Virkkunen M, Goldman D (2005) Haplotype-based Linkage of Tryptophan Hydroxylase 2 to Suicide Attempt, Major Depression, and Cerebrospinal Fluid 5-hydroxyindoleacetic Acid in 4 Populations. Arch Gen Psychiatry 62:1109-1118.
- Ziegler A (2002) Genetische Epidemiologie - Gegenwart und Zukunft. Dtsch Arztebl 99:A 2342-2346.
- Zill P, Preuss UW, Koller G, Bondy B, Soyka M (2007a) SNP-and Haplotype Analysis of Tryptophan Hydroxylase 2 Gene in Alcohol-Dependent Patients and Alcohol-Related Suicide. Neuropsychopharmacol 32:1687-1694.
- Zill P, Büttner A, Eisenmenger W, Möller H-J, Bondy B, Ackenheil M (2004a) Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase Isoform (TPH2) gene in suicide victims. Biol Psychiatry 56:581-586.
- Zill P, Büttner A, Eisenmenger W, Möller H-J, Ackenheil M, Bondy B (2007b) Analysis of tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: A post-mortem study. J Psychiatr Res 41:168-173.
- Zill P, Baghai TC, Zwanzger P, Schüle C, Eser D, Rupperecht R, Möller H-J, Bondy B, Ackenheil M (2004b) SNP and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene provide evidence for association with major depression. Mol Psychiatry 9:1030-1036.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Frau PD Dr. rer. nat. Angelika Schmitt-Böhrer und Herrn Prof. Dr. med. Klaus-Peter Lesch für die freundliche Überlassung des Themas und die Ermöglichung dieser Arbeit danken. Dabei danke ich Frau PD Dr. rer. nat. Angelika Schmitt-Böhrer für die fachliche Betreuung und insbesondere für ihre stetige Unterstützung bis zur Fertigstellung dieser Arbeit. Frau Dr. rer. nat. Claudia Kriegebaum danke ich v.a. für die Betreuung des praktischen Teils dieser Arbeit und die Einweisung in die Labortätigkeit. Herrn Prof. Dr. med. Andreas Reif danke ich für die Durchführung der statistischen Auswertung der Daten. Ein Dankeschön geht auch an die Mitarbeiterinnen des Labors für ihre freundliche Hilfsbereitschaft. Meinen Eltern danke ich für die stets uneingeschränkte Unterstützung meines Studiums, dieser Arbeit und meiner Familie. Zuletzt geht mein ganz besonderer Dank an meinen Ehemann Dirk Adolph für alles, was so entscheidend zum Gelingen und Beenden dieser Arbeit beigetragen hat. Alles Liebe meinen Kindern.

Lebenslauf

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

[REDACTED] [REDACTED]

Publikation

2010 Kriegebaum, C., Gutknecht, L., Bartke, L., Reif, A., Buttenschon, H. N., Mors, O., et al. (2010). The expression of the transcription factor FEV in adult human brain its association with affective disorders. *Journal of Neural Transmission*, 117, 831-836.