

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

der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Romanos

Untersuchungen zum Einfluss serotonerger Genvariationen auf olfaktorische

Performanz

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sophia Leonie Carl

aus Würzburg

Würzburg, (September 2018)

Referent: Prof. Dr. med. M. Romanos

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Stefan Unterecker

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2019

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

I	Abbildungsverzeichnis.....	BB
II	Tabellenverzeichnis	CC
III	Abkürzungsverzeichnis	DD
1.	Einleitung	1
1.1	Das olfaktorische System	1
1.1.1	Definition des Riechens	1
1.1.2	Anatomie und Physiologie des olfaktorischen Systems	2
1.1.3	Domänen des Geruchssinns	5
1.2	Pathologie des olfaktorischen Systems.....	6
1.2.1	Verändertes Riechvermögen bei neurologischen Erkrankungen.....	6
1.2.2	Verändertes Riechvermögen bei psychiatrischen Erkrankungen	7
1.3	Das serotonerge System.....	9
1.3.1	Funktion	9
1.3.2	Serotoninsynthese und Komponenten des serotonergen Systems	9
1.4	Das serotonerge System im Zusammenhang mit dem Riechvermögen	11

1.5 Der aktuelle Forschungsstand.....	12
1.5.1 Physiologischer Forschungsstand der Signaltransduktion im Bulbus Olfactorius	12
1.5.2 Molekularbiologischer Forschungsstand der Kandidatengene	15
1.5.3 Methodischer Forschungsstand.....	18
1.5.3 Zusammenfassung	20
1.6 Fragestellung und Hypothesen	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Studienkonzept	22
2.2 Stichprobe.....	22
2.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien	22
2.2.2 Messinstrumente zur phänotypischen Charakterisierung	23
2.2.3 Genotypisierung.....	28
2.2.4 Ablauf einer Testung	29
2.3 Statistische Auswertung	30
3. Ergebnisse	32
3.1 Stichprobenbeschreibung.....	32
3.2 Hypothese 1: Der Genotyp des Serotonin-Syntheseenzym TPH2 (rs4570625) beeinflusst Riechsensitivität und Diskriminationsfähigkeit	39
3.3. Hypothese 2: Der Serotonintransporter-Längenpolymorphismus 5-HTTLPR beeinflusst Riechsensitivität und Diskriminationsfähigkeit	40
3.4 Hypothese 3: Die Genvariante des Serotoninrezeptors 5-HT2C (rs518147) beeinflusst Riechsensitivität und Diskriminationsfähigkeit5	42
3.5 Post-hoc Poweranalyse	43
4. Diskussion.....	44

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Einfluss serotonerger Genpolymorphismen auf die Riechleistung	44
4.2 Interpretation der Ergebnisse.....	45
4.3 Aussagekraft und Gültigkeit der Ergebnisse	47
4.4 Ausblick.....	49
5. Zusammenfassung	52
6. Literaturverzeichnis	54
IV Anhang	A
V Danksagung.....	I
VI Curriculum vitae	J

I Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Signaltransduktion im OB, in Anlehnung an (Kandel et al., 2000)
- Abb. 2: Die zentralnervösen Projektionen der olfaktorischen Neurone, in Anlehnung an (Albrecht and Wiesmann, 2006)
- Abb. 3: Serotoninsynthese und serotonerge Signaltransduktion, in Anlehnung an (Kriegebaum et al., 2010)
- Abb. 4: Weiterleitung des olfaktorischen Signals im Bulbus Olfactorius;
Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. M. Romanos
- Abb. 5: Genvarianten des SERT
- Abb. 6: Sniffin` Sticks, Firma Burghardt Medizintechnik GmbH-1
- Abb. 7: Sniffin` Sticks: Riechschwellentestung mit schematischer Darstellung der Verdünnungsreihen
- Abb. 8: Sniffin` Sticks, Firma Burghardt Medizintechnik GmbH-2
- Abb. 9: Testablauf und Konzept der Studie
- Abb. 10: Veranschaulichung der Genotypenverteilung der TPH2
- Abb. 11: Veranschaulichung der Genotypenverteilung des 5-HTTLPR
- Abb. 12: Veranschaulichung der Genotypenverteilung des 5-HT2C Rezeptors
- Abb. 13: TPH2: Mittelwerte der erzielten Riechleistung und Genotypen
- Abb. 14: 5-HTTLPR: Mittelwerte der erzielten Riechleistung und Genotypen
- Abb. 15: 5-HT2C: Mittelwerte der erzielten Riechleistung und Genotypen

II Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Zusammensetzung der Gesamtstichprobe
- Tabelle 2: Geschlecht, Alter, IQ, Riechsensitivität, Diskrimination und Fragebögen der Einzelstichproben
- Tabelle 3: Geschlecht, Alter, IQ, Riechsensitivität, Diskrimination und Fragebögen der Gesamtstichprobe
- Tabelle 4: Genotypenverteilung (TPH2) der Gesamtstichprobe mit Geschlechterverteilung
- Tabelle 5: Genotypenverteilung (5-HTTLPR) der Gesamtstichprobe mit Geschlechterverteilung
- Tabelle 6: Genotypenverteilung (5-HT2C) der Gesamtstichprobe mit Geschlechterverteilung
- Tabelle 7: Unterschiede der Riechleistung nach Genotyp des TPH2 Gens
- Tabelle 8: Unterschiede der Riechleistung nach Genotyp des 5-HTTLPR
- Tabelle 9: Unterschiede der Riechleistung nach Genotyp des 5-HT2C Rezeptors
- Tabelle 10: Post-hoc-Poweranalyse

III Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin
5-HT1A-Rezeptor	Serotoninrezeptor 1A
5-HT2C-Rezeptor	Serotoninrezeptor 2C
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
5-HTTLPR	Serotonintransporter-Längenpolymorphismus
AAAD	Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase
ADHS	Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung
ANOVA	analysis of variance
CBCL	Child Behaviour Checklist
CNV	Contingent Negative Variation
COMT	Catechol-O-Methyl-Transferase
DIKJ	Depressionsinventar für Kinder und Jugendliche
DIPS	..Diagnostisches Interview bei psychischen Störungen im Kindes- und Jugendalter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRD2	Dopaminrezeptor D2
DSM-IV	Diagnostischer und statistischer Leitfaden psychischer Störungen
FBB-ADHS	Fremdbeurteilungsbogen für ADHS
GABA	γ-Aminobuttersäure
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
ICD-10	International Classification of Diseases and Related Health Problems
IQ	Intelligenzquotient
OB	Bulbus olfactorius
OBP	odorant binding protein
OEP	olfaktorisch evozierte Potentiale
PCR	Polymerasekettenreaktion
PTBS	Posttraumatische Belastungsstörung
SERT	Serotonintransporter
SMT	Sniff Magnitude Test
SNP	single-nucleotide polymorphism
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SSRI	selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren
TPH	Tryptophanhydroxylase

Trp *Tryptophan*
ZNS..... *zentrales Nervensystem*

1. Einleitung

1.1 Das olfaktorische System

1.1.1 Definition des Riechens

Der Geruchssinn oder olfaktorische Sinn (aus dem Lateinischen *olfacere* „riechen“) als wichtiger Bestandteil unserer Sinneswahrnehmung sorgt dafür, dass wir Geruchsstoffe in unserer Umgebung wahrnehmen können. Diese gelangen durch die Atmung zu Rezeptoren im Nasen- und Rachenraum. Er wird deshalb als ein exterozeptiver Sinn (von lateinisch *exter* „außen befindlich“ und *recipere* „aufnehmen“) bezeichnet (Albrecht and Wiesmann, 2006). Der Geruchssinn ist bei der Geburt schon gut ausgebildet. Bereits im Mutterleib kann das Kind Gerüche über das Fruchtwasser wahrnehmen. Die Geruchsunterscheidung beginnt mit der Geburt, bei dem das Kind den Geruch der Mutter wahrnimmt und von anderen unterscheiden kann. Im Laufe der ersten Monate erlernt das Baby Gerüche mit Ereignissen und Emotionen zu verbinden (Schaal, 1988). Emotionen stehen in enger Beziehung zu Gerüchen, dies liegt an der engen Verbindung des olfaktorischen zum limbischen System. Die Wechselwirkungen zwischen Emotionen und Geruchswahrnehmung sind weitgehend unverstanden. Jedoch finden sich in der Literatur zahlreiche Studien zu neuropsychiatrischen Erkrankungen oder bestimmten Emotionszuständen (wie beispielsweise Angst), die im Zusammenhang mit der Riechleistung untersucht wurden (Haehner et al., 2009; Serby et al., 1985; Takahashi et al., 2015). Der Geruchssinn spielt von dem Beginn des Lebens bis zum Tod eine entscheidende Rolle.

Man unterscheidet bei der Geruchswahrnehmung das olfaktorische und das trigeminale System. Je nach Geruchsstoff wird entweder das olfaktorische oder das trigeminale System oder beide gleichzeitig aktiviert (Brand, 2006). Um vom olfaktorischen System wahrgenommen zu werden, sollte der Geruchsstoff flüchtig sein, ein niedriges Molekulargewicht und eine hohe Oberflächenaktivität besitzen. Zusätzlich sollte er wasser- und fettlöslich sein. Beispiele hierfür sind Alkohole und Ether. (Albrecht and Wiesmann, 2006). Im klinischen Alltag werden hierfür Kaffee, Nelke, Vanille, Lavendel und Zimt verwendet.

Das trigeminale System ist zuständig für die Wahrnehmung von Berührungs-, Temperatur- und Schmerzempfindungen (Brand, 2006). Zum Beispiel reizt Meerrettich vorwiegend das trigeminale System und sorgt für ein brennendes Gefühl (Damm, 2007).

1.1.2 Anatomie und Physiologie des olfaktorischen Systems

1.1.2.1 Peripheres olfaktorisches System

Durch die Atmung gelangen Geruchsstoffe durch die Nase zur Riechschleimhaut, die aus einem mehrreihigen Flimmerepithel besteht. Dieses olfaktorische Neuroepithel befindet sich im Bereich der *Lamina cribrosa* des Siebbeins, am oberen Nasenseptum und der oberen Nasenmuschel (Strutz and Mann, 2009). Das Epithel der Riechschleimhaut ist von einer Mukusschicht bedeckt, die von den sogenannten Bowman'schen Drüsen erzeugt wird. Die Schleimschicht schützt vor Austrocknung, hat eine immunologische Funktion und sorgt durch im Mukus gelöste Duftstoffproteine (= odorant binding protein= OBP) für eine Anreicherung der Duftstoffmoleküle (Albrecht and Wiesmann, 2006). Das Riechepithel setzt sich aus einer Schichtung von drei Zellarten zusammen: Stützzellen bilden die oberste Schicht. Darunter befinden sich die Zellkörper der Riechzellen, deren Dendriten an der Oberfläche des Epithels mit zilienbestückten Knöpfen enden. Riechzellen sind primär bipolare Neurone mit einem Axon, das in die paarig angelegten Riechkolben (= Bulbi olfactorii) läuft. Die unterste Schicht des Riechepithels bilden Basalzellen, die für die Regeneration des Epithels zuständig sind. Riechzellen werden alle vier bis sechs Wochen ersetzt (Hatt, 2007; Kandel et al., 2000).

Der Geruchsstoff löst sich im Mukus und bindet an das OBP, wodurch er zum Riechrezeptor, der sich auf den Zilien der Riechzelle befindet, transportiert wird. Durch die Bindung zum Rezeptor wird über ein G-Protein eine Adenylatzyklase aktiviert, wodurch es zu einem Na⁺, Ca²⁺, und Cl⁻ Einstrom kommt und die Zelle depolarisiert wird (Albrecht and Wiesmann, 2006).

Es gibt für jeden Geruchsstoff ein charakteristisches Aktivierungsmuster der Riechrezeptoren. Bei geringen Geruchsstoffkonzentrationen werden nur Rezeptoren mit hoher Affinität aktiviert, während bei hohen Konzentrationen sowohl Rezeptoren mit

hoher als auch niedriger Affinität aktiviert werden. Jede Riechzelle exprimiert nur eine Art von Riechrezeptoren (Brewer et al., 2006).

1.1.2.2 Zentrales olfaktorisches System

Über die Axone der Rezeptorzellen (auch olfaktorische Rezeptorneurone genannt), die sogenannten *Filae olfactoriae* wird das Riechsignal zum Bulbus Olfactorius (OB) weitergeleitet, der dem primären olfaktorischen Kortex entspricht. Lokalisiert sind die paarig angelegten Riechkolben in der Fossa olfactoria. Die Axone der Riechzellen mit dem gleichen Rezeptorprotein lagern sich zusammen und ziehen zu jeweils einem Glomerulum auf jeder Seite. Im Glomerulum wird das Signal auf den Dendriten der Mitralzelle verschaltet. Folglich besteht ein Glomerulum aus Riechzellaxonen und Dendriten von Projektionsneuronen (Mitral- und tiefe Büschelzellen) (Albrecht and Wiesmann, 2006). An dieser Synapse wirken über dendrodendritische Verbindungen juxtglomeruläre Neurone. Hierzu zählen die sogenannten axonlosen Körnerzellen, kurzaxonige Zellen, oberflächliche Büschelzellen und periglomeruläre Zellen. Periglomeruläre Zellen und Körnerzellen wirken hemmend auf die Projektionsneurone. Die Inhibition der Interneurone wird durch GABA (γ -Aminobuttersäure) und Dopamin vermittelt (Ennis et al., 2001). An den selben Synapsen wirken die Mitralzellen wiederum erregend diesen entgegen (Kandel et al., 2000; Silbernagel, 2012). Die Erregung der Mitralzelle durch die olfaktorischen Rezeptorneurone erfolgt durch Freisetzung von Glutamat. Gleichzeitig wird durch diesen Mechanismus eine indirekte Hemmung der Mitralzelle erreicht, da periglomeruläre Zellen durch die Ausschüttung von Glutamat aktiviert werden (Linster and Cleland, 2016). Durch diese Aktivierung wird die periglomeruläre Zelle in Ihrem inhibitorischen Signal verstärkt. Diese Vorgänge sind in der Abbildung „Signaltransduktion im OB“ piktographisch dargestellt (Abb.1).

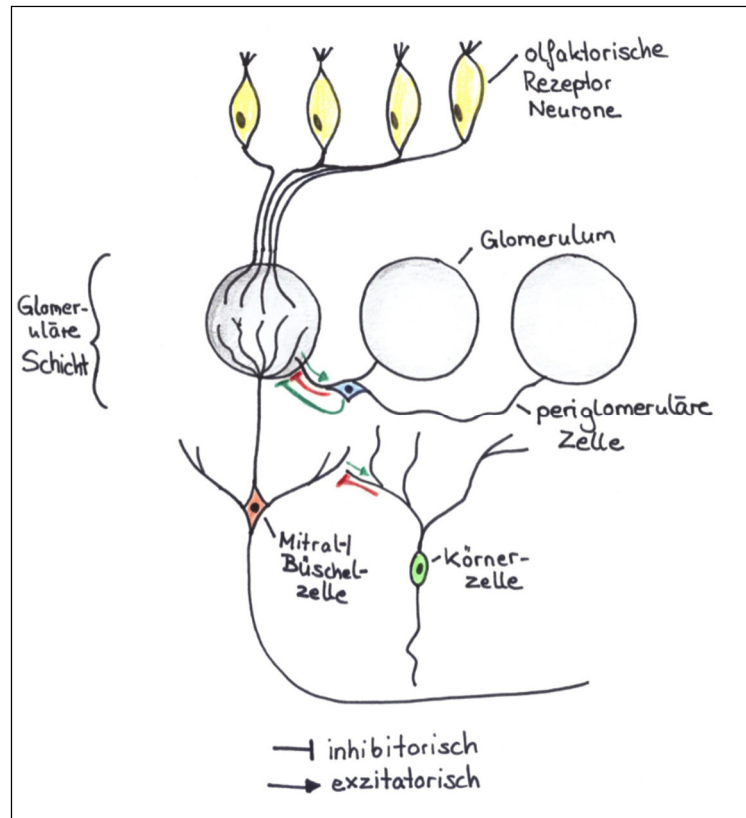


Abb. 1: Signaltransduktion im OB, in Anlehnung an (Kandel et al., 2000): Olfaktorische Rezeptorneurone übertragen das Signal im Glomerulum auf die Mitralzelle. Über das Axon der Mitralzelle findet die Transduktion zum sekundären olfaktorischen Kortex statt. Interneurone (periglomeruläre Zellen und Körnerzellen) entfalten ihre inhibitorische Wirkung. An denselben Synapsen setzt die Mitralzelle ihre exzitatorische Wirkung auf die Interneurone frei. Durch diesen Prozess wird die inhibitorische Funktion der periglomerulären Zelle verstärkt.

Der OB besteht aus sechs Schichten von außen nach innen: Die Nervenschicht mit den Axonen der olfaktorischen Rezeptorneurone, die glomeruläre Schicht mit periglomerulären Zellen, externen Bündelzellen und kurzaxonigen Zellen, die äußere plexiforme Schicht mit den Bündelzellen, die Mitralzellschicht, die innere plexiforme Schicht mit den kurzaxonigen Zellen und die Granularzellschicht mit den Körnerzellen und kurz-axonigen Zellen (Nagayama et al., 2014). Die olfaktorischen Rezeptorneurone in der Nervenschicht bilden in der zellarmen, glomerulären Schicht mit den apikalen Dendriten der Mitralzellen die Glomeruli.

Neben den inhibitorischen Neurotransmittern GABA und Dopamin und dem exzitatorischen Botenstoff Glutamat hat auch das serotonerge System Einfluss auf die Signalübertragung im OB. Serotonerge Fasern ziehen vor allem vom medianen Raphe-Kern zur glomerulären Schicht des OB (Steinfeld et al., 2015). Auf diesen Sachverhalt wird im späteren Verlauf genauer eingegangen.

Die Projektionsneurone, Mitral- und Büschelzellen, leiten das Signal zum sekundären und tertiären olfaktorischen Kortex weiter (s. Abb.2). Einige Bahnen haben keine Verbindung zum Thalamus, sondern verlaufen direkt zum limbischen System. Dies führt dazu, dass wir auch unbewusst Gerüche wahrnehmen.

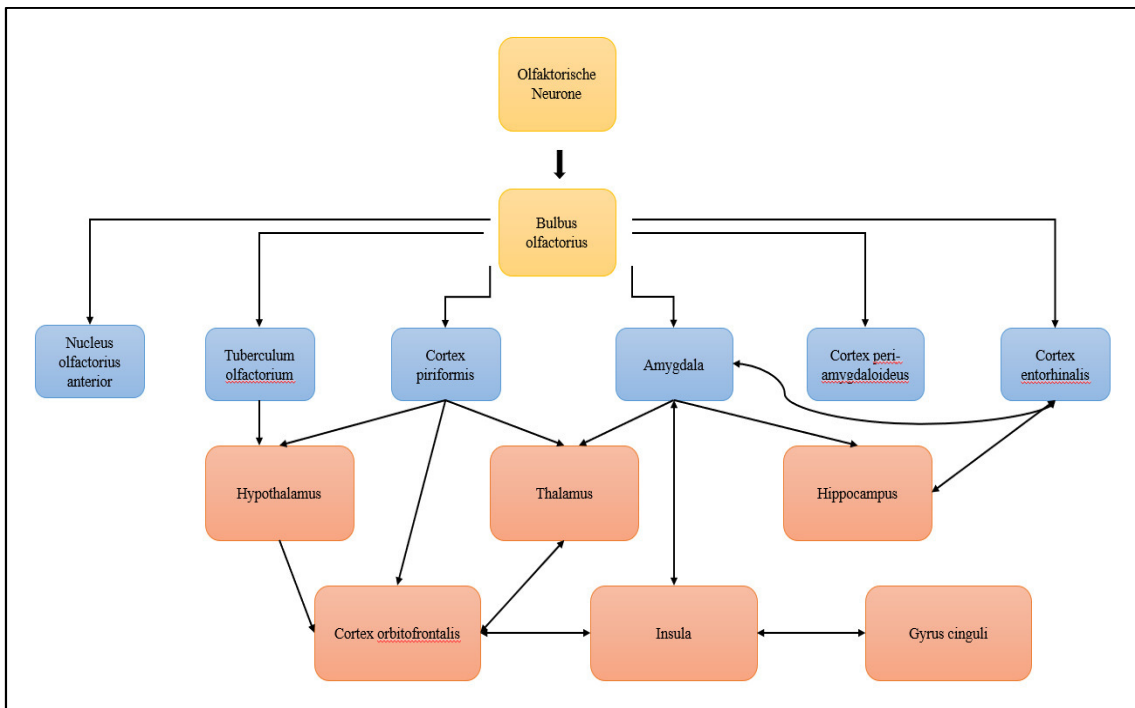


Abb. 2 : Die zentralnervösen Projektionen der olfaktorischen Neurone, in Anlehnung an (Albrecht and Wiesmann, 2006): Primärer olfaktorischer Kortex (gelb), sekundärer olfaktorischer Kortex (blau), tertiärer olfaktorischer Kortex (rot);

1.1.3 Domänen des Geruchssinns

Man unterscheidet den Geruchssinn nach seinen Charakteristika. Als Riechschwelle oder Sensitivität wird die Konzentration einer Substanz bezeichnet, bei der man den Geruch wahrnehmen kann. Also die niedrigste Konzentration eines olfaktorischen

Stimulus, durch den olfaktorische Rezeptoren aktiviert werden (Martzke et al., 1997). Die Diskriminationsfähigkeit ermöglicht uns Gerüche zu unterscheiden. Sie basiert auf der Messung der individuellen Fähigkeit die Qualität eines Geruches im Vergleich zu einem anderen zu unterscheiden oder beispielsweise einen schlechten Geruch aus einer Menge von guten Gerüchen zu erkennen (Atanasova et al., 2008). Die dritte Domäne ist die Identifikation eines Geruchsstoffs. Alle drei Bereiche des Riechens erlauben uns unsere Umwelt auf der Ebene der Düfte besser zu erfassen. Diese Unterscheidung nach Domänen wird vor allem in der klinischen Forschung angewandt. Dies ermöglicht eine Kategorisierung der Riechleistung bei der Untersuchung von psychiatrischen und neuropsychiatrischen Krankheiten (Martzke et al., 1997; Pause et al., 2001). Standardmäßig wird heute der so genannte Sniffin`Sticks Test (Firma Burghart Messtechnik GmbH, Wedel, Deutschland) verwendet. Dies ist eine validierte Testbatterie mit Riechstiften, die es ermöglicht nach den Domänen des Riechens zu unterscheiden (s. 2.2.2.2).

1.2 Pathologie des olfaktorischen Systems

1.2.1 Verändertes Riechvermögen bei neurologischen Erkrankungen

Verschiedene neurologische und neurodegenerative Erkrankungen gehen mit einer veränderten Riechleistung, also Riechsensitivität, Diskrimination oder Identifikation einher. Bei der Alzheimer- und der Parkinson-Krankheit wurden schwere olfaktorische Defizite im Bereich der Diskrimination festgestellt (Godoy et al., 2015). Bei Morbus Parkinson degenerieren dopaminerge Neurone im Striatum. Dies führt zu den charakteristischen Symptomen wie Rigor, Tremor und Hypokinesie. Auch der Rückgang der Riechfunktion wird bei der Parkinson-Krankheit als charakteristisches Frühsymptom beschrieben. Im Jahr 2009 belegte eine Multicenter-Studie, dass 95% der an Parkinson erkrankten Patienten an einem signifikanten Verlust des Riechvermögens leiden und dass dies als Marker zur Früherkennung der Erkrankung eingesetzt werden könnte (Haehner et al., 2009). Auch die Huntington-Erkrankung und die Amyotrophe Lateralsklerose gehen mit einer moderaten Reduktion des Reichvermögens einher (Godoy et al., 2015).

1.2.2 Verändertes Riechvermögen bei psychiatrischen Erkrankungen

Die Riechleistung scheint auch bei psychiatrischen Erkrankungen eine entscheidende Rolle zu spielen. Beispielsweise wurde bei Patienten mit Depressionen eine signifikant verminderte Riechsensitivität, also erhöhte Riechschwelle, festgestellt, welche sich nach erfolgreicher Therapie wieder normalisierte (Pause et al., 2001). Hierbei fand man heraus, dass mit aszendierendem Schweregrad der Depression (erzielter Depressions-Score) eine verminderte Riechsensitivität einhergeht. In einer weiteren Studie wurden die Riechfunktion und das Volumen des OB zwischen Gesunden und Patienten mit Depressionen verglichen. Es ergab sich eine geringere Riechsensitivität und ein reduziertes Volumen des OB bei Depressionen (Negoias et al., 2010). In einer Zusammenfassung vieler verschiedener Studien, die sich mit diesem Thema beschäftigen, fand man heraus, dass nicht nur Patienten mit Depressionen ein schlechteres Riechvermögen aufweisen, sondern dem entgegen auch Patienten mit olfaktorischer Dysfunktion Symptome einer Depression aufweisen (Kohli et al., 2016). Es lässt sich also sagen, dass eine bidirektionale Beziehung zwischen Depressionen und olfaktorischer Funktion besteht. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch noch nicht genügend erforscht.

Im Rahmen einer Studie zur Untersuchung des Riechvermögens bei Kindern mit ADHS (Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung) ohne Psychostimulanzienmedikation, wiesen diese Kinder eine verbesserten Sensitivität im Vergleich zu gesunden Kontrollkindern auf, während medizierte ADHS-Kinder sich nicht von der Kontrollgruppe unterschieden (Romanos et al., 2008). Hierbei wurde der Einfluss des dopaminergen Systems auf die Riechleistung untersucht, da man weiß, dass Psychostimulanzien, wie Methylphenidat, auf die dopaminerge Signalübertragung wirken und somit eine Beeinflussung der Riechschwelle zur Folge haben könnten. Daher ergibt sich die Frage, ob die Riechschwelle als funktioneller Marker für ADHS genutzt werden könnte, mit potentieller Relevanz für die Erfassung des Therapieansprechens.

Schizophrenie, als eine weitere Krankheitsgruppe, die im Zusammenhang mit der Riechleistung erforscht wurde, geht einher mit Defiziten im Bereich der Diskrimination

und Identifikation von Gerüchen (Schecklmann et al., 2013). Das Deletionssyndrom 22q11.2, welches mit einer Haploinsuffizienz der COMT (Catechol-O-Methyl-Transferase) einhergeht und damit zu einer dopaminergen Dysregulation führt, ist mit einigen neuropsychiatrischen Erkrankungen (wie zum Beispiel Schizophrenie) assoziiert. Dieses Deletionssyndrom wurde zusammen mit dem Riechvermögen untersucht. Dabei wurden Defizite in allen drei Domänen des Riechens erkannt. Basierend auf einer dopaminergen Dysfunktion bei diesem Syndrom könnte die Riechleistung als Biomarker zur Bestimmung der potentiellen Erkrankungswahrscheinlichkeit eingesetzt werden (Romanos et al., 2011).

Weiterhin fand man bei Patienten mit Angsterkrankungen Defizite im Bereich der Riechdiskrimination (Clepece et al., 2012). Einige Studien erkannten eine reduzierte Identifikationsleistung von Gerüchen bei Patienten mit PTBS (Posttraumatische Belastungsstörung) (Vasterling et al., 2000, Dileo et al., 2008).

Es stellt sich nun die Frage, welche Mechanismen im Gehirn zu diesen olfaktorischen Veränderungen führen. Neben dem dopaminergen System spielen auch andere Neurotransmittersysteme eine Rolle in der Signaltransduktion. Wir haben uns mit dem serotonergen System beschäftigt, da es an der Regulation kognitiver und emotionaler Prozesse beteiligt ist und vielfach im Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen wie Depressionen, Angsterkrankungen usw. untersucht wurde (Freitag et al., 2006; Jokisch et al., 2005). Bereits 1969 wurde die sogenannte „Serotonin-Hypothese“ aufgestellt, dass ein Serotoninmangel ursächlich für die Entstehung von Depressionen sei (Coppin, 1969). Zudem wissen wir, dass Serotonin an der Signaltransduktion im OB beteiligt ist und somit bedeutsam für das Verständnis des Riechvorganges ist. Des Weiteren wurden serotonerge Genpolymorphismen im Rahmen von psychiatrischen Erkrankungen untersucht und Zusammenhänge erkannt. Dies wird im weiteren Verlauf der Arbeit noch genauer erläutert. Wie verändert sich also die Riechleistung bei Veränderungen bzw. Genvariationen von Bestandteilen des serotonergen Systems und könnte die Riechsensitivität oder Diskrimination als Biomarker für die Diagnose und den Therapieverlauf bei psychiatrischen Erkrankungen eingesetzt werden?

1.3 Das serotonerge System

1.3.1 Funktion

Das serotonerge System hat im ZNS (zentrales Nervensystem) vor allem bei kognitiven, emotionalen und neuroendokrinen Prozessen eine große Bedeutung. Es reguliert den Schlaf-Wach-Rhythmus, die Nahrungsaufnahme, die Thermoregulation, das Herz-Kreislauf-System, das Brechverhalten, das Sexualverhalten, die Schmerzverarbeitung und viele motorische Funktionen. Auch peripher spielt das serotonerge System eine entscheidende Rolle. Hier hat es Einfluss auf die Blutgerinnung, die Blutplättchenfunktion, den Tonus der glatten Darmmuskulatur und auf die Vasokonstriktion oder die Vasodilatation der Gefäße (Jokisch et al., 2005; Rassow et al., 2006).

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) kann sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch wirken. Dies ist abhängig vom jeweiligen Serotoninrezeptor und ob dieser präsynaptisch oder postsynaptisch lokalisiert ist. Fast alle Serotoninrezeptoren werden im Gehirn exprimiert. Serotonin übt seine Wirkung hauptsächlich durch die Modulation von dopaminergen, cholinergen und GABAergen Neuronen aus (Jokisch et al., 2005).

1.3.2 Serotoninsynthese und Komponenten des serotonergen Systems

Der Botenstoff Serotonin gehört zu der Gruppe der Monoamine, einer Gruppe von Neuromodulatoren. Da Serotonin die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, muss es im Gehirn hergestellt werden. Die Synthese von Serotonin aus der Aminosäure Tryptophan (Trp) vollzieht sich in zwei Schritten. Zunächst wird Trp zu 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) hydroxyliert. Diese Reaktion wird durch das Enzym Tryptophanhydroxylase (TPH) katalysiert. Im zweiten Schritt wird 5-HTP durch die Vitamin B6 abhängige Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase (AAAD) zu Serotonin (5-HT). Das Serotonin wird in Vesikel verpackt und im Falle eines ankommenden Aktionspotentials in den synaptischen Spalt freigesetzt. Dort wirkt es über Serotoninrezeptoren (5-HT-Rezeptoren) an der präsynaptischen und postsynaptischen Membran auf die Signaltransduktion (Kriegebaum et al., 2010). Die Rezeptoren werden von 5-HT1- bis 5-HT7-Rezeptortypen eingeteilt (Jokisch et al., 2005). Beispielsweise befindet sich der 5-HT1- Rezeptor an der präsynaptischen Membran von Neuronen der

Raphe Kerne und in vielen anderen Regionen des Gehirns und zeigt eine inhibitorische Wirkung. Der in dieser Arbeit untersuchte 5-HT_{2C}-Rezeptor (Serotoninrezeptor 2C) wird in verschiedenen Zelltypen und unterschiedlichen Orten des ZNS exprimiert. Unter anderem in der Amygdala, dem dorsalen Raphe-Kern und dem Mittelhirn. Dieser Rezeptor soll auf GABAergen Neuronen exprimiert sein (Spoida et al., 2014). GABA hat eine inhibitorische Wirkung.

Damit das freigesetzte Serotonin wiederverwendet werden kann, transportiert der Serotonintransporter (SERT) den Neurotransmitter wieder zurück ins Zytosol der Zelle.

Diese Prozesse werden in der Abbildung: „Serotoninsynthese und serotonerge Signaltransduktion“ (Abb.3) veranschaulicht.

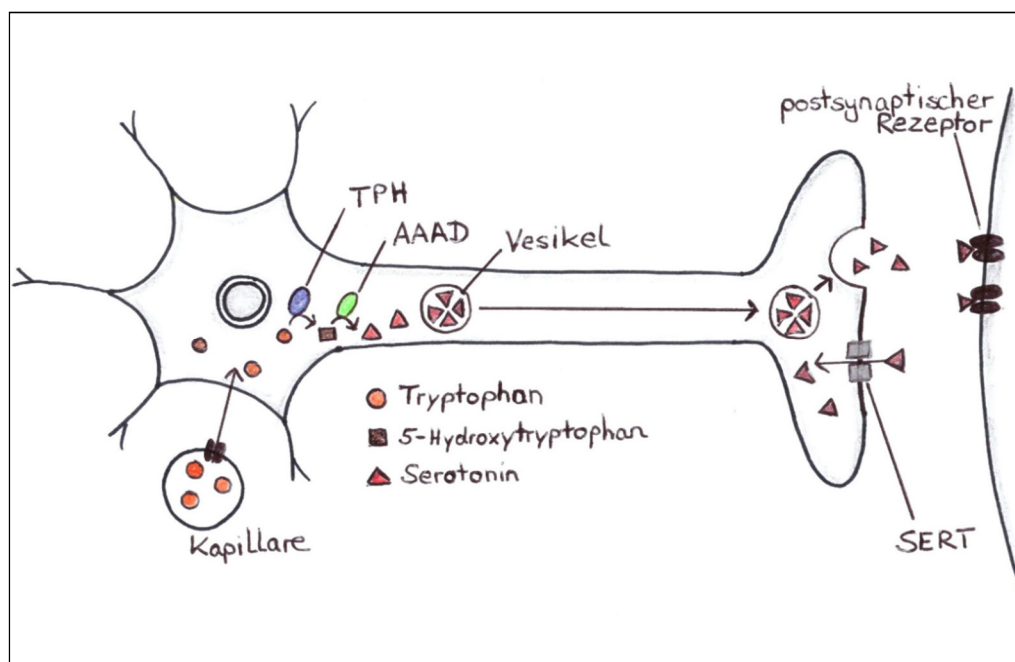


Abb. 3: Serotoninsynthese und serotonerge Signaltransduktion, in Anlehnung an (Kriegebaum et al., 2010): Synthese von Serotonin aus Tryptophan in zwei Schritten. Anschließend Verpackung in Vesikel und Transport zum Endknöpfchen. Freisetzung in den synaptischen Spalt und Rezeptoraktivierung an der postsynaptischen Membran. Rücktransport von Serotonin über SERT in das Neuron.

Die Zellkörper der serotonergen Neurone sind vor allem in den Raphe-Kernen des Hirnstamms lokalisiert. Zu den Raphe-Kernen gehören von rostral nach kaudal der

Nucleus raphe dorsalis, der *Nucleus raphe medianus*, der *Nucleus raphe pontis*, der *Nucleus raphe magnus*, der *Nucleus raphe obscurus* und der *Nucleus raphe pallidus*. Von dort projizieren diese Zellen in das gesamte ZNS. So kann das serotonerge System einen breitgestreuten Einfluss auf Wachzustand, Sinneswahrnehmung, Gefühle und höhere kognitive Fähigkeiten ausüben.

1.4 Das serotonerge System im Zusammenhang mit dem Riechvermögen

Es ist bekannt das serotonerge Fasern von den Raphe-Kernen, nämlich vorwiegend von dem *Nucleus raphe medianus*, zum OB verlaufen (Brill et al., 2016). In einer Tiermodellstudie mit Mäusen aus dem Jahr 2016 fand man heraus, dass durch Stimulierung der Raphe-Kerne, Mitralzellen im OB aktiviert werden (Kapoor et al., 2016a). Da wie oben beschrieben Serotonin seine Wirkung vorwiegend indirekt über andere Neurotransmitter ausübt und an der Signalübertragung im OB viele unterschiedliche Neurone (Projektionsneurone und Interneurone) mitwirken, sind diese Mechanismen äußerst komplex.

Eine 2010 veröffentlichte Tiermodellstudie mit Ratten ergab, dass serotonerge Fasern Kontakt zu GABAergen und non-GABAergen Neuronen in der glomerulären Schicht haben (Gracia-Llanes et al., 2010). Zu den GABAergen Neuronen im OB gehören die periglomerulären Zellen und die kurzaxonigen Zellen (s. Abb.4 rot eingezeichnetes Interneuron). Die kurzaxonigen Zellen entfalten Ihre Wirkung auch durch den Neurotransmitter Dopamin (Kiyokage et al., 2010). Zu non-GABAergen Neuronen zählen vor allem die Projektionsneurone wie Mitralzellen und Büschelzellen, welche über Glutamat wirken (s. Abb.4: gelb und blau markierte Mitralzelle). Man nehme nun an, dass die serotonergen Neurone im OB ihren Neurotransmitter freisetzen. Hierdurch werden Mitralzellen inhibiert, wodurch die olfaktorische Signaltransduktion vermindert wird (Huang et al., 2017) . Gleichzeitig wirken periglomeruläre Zellen, welche wiederum durch Serotonin aktiviert wurden, hemmend auf die Mitralzelle. Dieser Mechanismus wurde von Brill et al. in der Veröffentlichung „Serotonin increases synaptic activity in olfactory bulb glomeruli“ genau beschrieben (Brill et al., 2016).

Das serotonerge System hat viele Bestandteile: Rezeptoren, Enzyme und Transporter. Welche Funktion haben diese Proteine bei der Signalübertragung und welche

Genvariationen von Rezeptoren, Transportern und Enzymen sind mit einer besseren Riechleistung assoziiert? Wir haben uns drei Kandidatengene und deren Polymorphismen herausgesucht, die in der Literatur als Risikoallele für psychiatrische Erkrankungen gelten: Nämlich den Genpolymorphismus der Tryptophanhydroxylase 2 (TPH2, rs4570625 oder -703G/T), des Serotonintransporters (5-HTT, Serotonintransporter-Längenpolymorphismus 5-HTTLPR) und des Serotoninrezeptors 5-HT2C (rs518147 oder -697G/C). Da, wie oben beschrieben, das serotonerge System bei psychiatrischen Erkrankungen eine Rolle spielt, wäre es interessant zu wissen, welche Veränderungen in der Riechleistung dabei auftreten. Diese Differenzen könnten als potentielle Biomarker in der Diagnosefindung und dem Therapieansprechen der Erkrankungen fungieren.

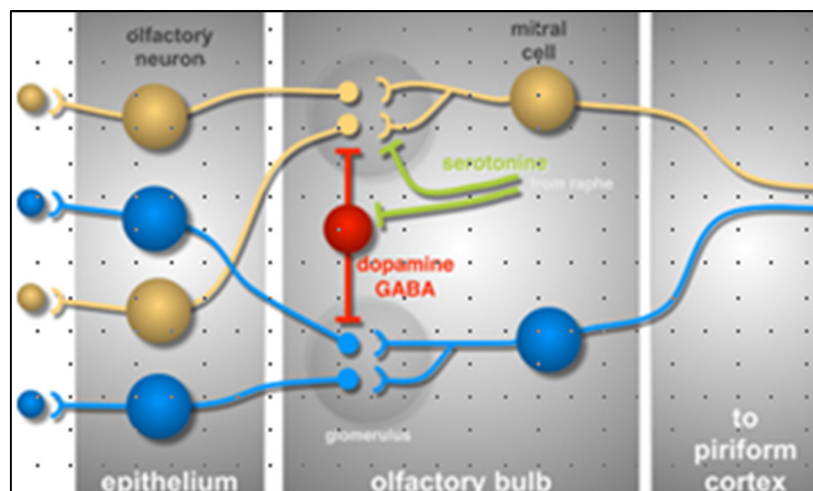


Abb. 4: Weiterleitung des olfaktorischen Signals im Bulbus olfactorius: Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. med. M. Romanos: Serotonin entfaltet seine inhibitorische Wirkung über direkte Hemmung im Glomerulum und indirekt über juxtaglomeruläre Neurone.

1.5 Der aktuelle Forschungsstand

1.5.1 Physiologischer Forschungsstand der Signaltransduktion im Bulbus Olfactorius

Im Folgenden wird auf die physiologischen Prozesse im OB mit Bezug auf aktuelle Forschungsergebnisse eingegangen. Hierbei ist zu beachten, dass in der Forschung vor allem Tiermodelle herangezogen werden, um molekulare Mechanismen beim Menschen

besser zu verstehen. Das besondere Augenmerk richtet sich hierbei auf die in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene und deren Proteine.

Im OB findet die erste synaptische Übertragung des olfaktorischen Signals statt. Das wahrgenommene Geruchssignal wird von den Axonen der olfaktorischen Rezeptorneurone auf die Dendriten der Mitralzelle und auf die Büschelzellen (Projektionsneurone) verschaltet. Dies findet in der glomerulären Schicht des OB statt. Die Signalübertragung wird durch den Neurotransmitter Glutamat vermittelt, der an glutamatergen Rezeptoren der Mitralzelle ein exzitatorisches Signal auslöst (Berkowicz et al., 1994). Die Zellkörper der Büschelzellen befinden sich in der äußeren plexiformen Schicht, während sich die Perikaryen der Mitralzellen in der Mitralzellschicht befinden (Nagayama et al., 2014). Neben diesen beiden Zelltypen gibt es weitere Neuronenarten, die an der Signalübertragung des olfaktorischen Signals mitwirken. Die Zellkörper der Körnerzellen befinden sich in der Körnerzellschicht und entfalten über Dendriten, die in die äußere plexiforme Schicht reichen, ihre inhibitorische Wirkung an den Projektionsneuronen. Dieser Mechanismus wird durch GABA vermittelt (Arnson and Strowbridge, 2017). Zu den juxtglomerulären Zellen, die sich in der glomerulären Schicht befinden, zählen periglomeruläre Zellen, kurzaxonige Zellen und externe Büschelzellen. Periglomeruläre Zellen setzen ebenfalls GABA frei. Kurzaxonige Zellen wirken sowohl über GABA, als auch über Dopamin (Kiyokage et al., 2010). Die externen Büschelzellen sollen neben einer glutamatergen Wirkung auch einen GABAergen Effekt haben (Tatti et al., 2014).

Neben den genannten Botenstoffen existieren weitere, die an der Signaltransduktion im OB beteiligt sind. Unter anderen das Serotonin. Serotonin wird, wie bereits beschrieben, in den Raphe-Kernen produziert. Fasern verlaufen von dort zum OB und enden in der glomerulären Schicht (Brill et al., 2016; Kapoor et al., 2016a) (s.1.5). Dort wird der Botenstoff freigesetzt und wirkt auf die an der Signalübertragung beteiligten Neurone. Der Effekt, den Serotonin bewirkt, ist abhängig vom jeweiligen Rezeptortyp und von Art der Zelle, auf der sich der Rezeptor befindet. Serotonin scheint eine Wirkung auf GABAerge und non-GABAerge Neurone zu haben (Gracia-Llanes et al., 2010). Auch im Neokortex zielen serotonerge Projektionen auf GABAerge Neurone, dies unterstreicht den Mechanismus im OB (Dugué and Mainen, 2009). Schmidt und

Strowbridge belegten 2014, dass die Freisetzung von Serotonin zu einer indirekten Hemmung von Mitralzellen vermittelt durch GABAerge Körnerzellen führt (Schmidt and Strowbridge, 2014). In einer weiteren Studie erkannte man, dass äußere Büschelzellen, vermittelt durch den 5HT_{2A}-Rezeptor, durch Serotonin aktiviert werden. Hierdurch kommt eine verstärkte Wirkung hemmender Interneurone zustande, die zu einem reduzierten sensorischen, olfaktorischen Input führt. Gleichzeitig sollen die äußeren Büschelzellen, im Sinne einer postsynaptischen Hemmung, eine direkte Wirkung auf Mitralzellen und Büschelzellen haben (Liu et al., 2011).

Im Jahr 2009 wurde der 5HT_{2C}-Rezeptor als wichtiger Bestandteil der serotonergen Signalübermittlung im OB erkannt (Petzold et al., 2009). Dieser Rezeptor befindet sich auf den GABAergen, periglomerulären Zellen. Hierdurch kommt eine Hemmung der terminalen Enden der olfaktorischen Rezeptorneurone zustande, wodurch das verminderte Riechsignal zu den Mitralzellen übermittelt wird. Nachdem man den Rezeptor geblockt hatte, zeigte sich dieser Effekt nicht mehr (Petzold et al., 2009). Des Weiteren wurden serotonerge Verbindungen zu kurzaxonigen Zellen über den 5HT_{2C}-Rezeptor erkannt (Brill et al., 2016).

Neben den Rezeptoren spielen auch Enzyme und Transporter eine Rolle bei der Wirkweise eines Neurotransmittersystems. Wie genau, die in dieser Arbeit untersuchten Proteine (TPH und SERT), Einfluss auf die Signalübertragung im OB und damit auf das Riechsignal haben könnten, wird im folgenden Abschnitt erläutert.

Die TPH ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Serotoninsynthese. Es sind zwei Isoformen dieses Proteins bekannt. Die TPH1 wird in vielen Zellen exprimiert, während die TPH2 vor allem im Gehirn nachweisbar ist (Püschel et al., 2011). Die TPH1 wird vornehmlich peripher in den enterochromaffinen Zellen des Darms, in der Zirbeldrüse, in der Milz und im Thymus exprimiert (Walther and Bader, 2003). Im Jahr 2003 wurde die TPH2 von Walther und Bader in Mäuseversuchen entdeckt. Die TPH2 liegt vor allem in den Raphe-Kernen vor, nicht nur bei Tieren, sondern auch beim Menschen (Zill et al., 2007). Es ist bekannt, dass eine vermindert aktive TPH2-Variante auch zu einer verminderten Serotoninproduktion führt (Mosienko et al., 2014). Somit wird eine geringere Menge an Serotonin in den synaptischen Spalt freigesetzt und kann

weniger an den Rezeptoren periglomerulärer Zellen, Büschelzellen und Mitralzellen wirken. Bezüglich der periglomerulären Zellen bedeutet dies, dass der inhibitorische Einfluss auf die Signaltransduktion im Glomerulum reduziert sein könnte. Eine höhere Aktivität der TPH2 könnte dementsprechend zu einer stärkeren Hemmung des Signals führen.

Der SERT ist ein Natrium-Neurotransmitter-Symporter und sorgt als Zellmembranprotein serotonerger Neurone für die Wiederaufnahme von Serotonin aus dem synaptischen Spalt. Die Lokalisation des SERT beschränkt sich im Gehirn auf den Raphe-Komplex und entlang der serotonergen Axone (Blakely et al., 1994). Er spielt eine wichtige Rolle bei der Terminierung der serotonergen Neurotransmission was folglich zu einer Beendigung der Serotoninwirkung führt (Kriegebaum et al., 2010). Die Aktivität des SERT könnte somit Einfluss auf die Signalübermittlung in der glomerulären Schicht des OB haben.

Folglich greifen viele Mechanismen an der Übermittlung des Riechsignals an der ersten Synapse der Riechbahn an.

1.5.2 Molekularbiologischer Forschungsstand der Kandidatengene

Um herauszufinden, wie das serotonerge System die Riechleistung beeinflusst, wurden aufgrund funktioneller Zusammenhänge für die vorliegende Arbeit drei Proteine ausgewählt, die Einfluss auf die serotonerge Signaltransduktion im OB nehmen könnten. Die hier untersuchten Genpolymorphismen dieser Proteine wurden bereits mit psychiatrischen Erkrankungen assoziiert. Auf diese Zusammenhänge wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

Verschiedene Polymorphismen der TPH2 wurden in der Vergangenheit mit Erkrankungen der Psyche assoziiert. Vor allem der hier untersuchte SNP (single-nucleotide-polymorphism) rs4570625 der TPH2 (auch -703G/T) ist bereits in einigen Studien, nicht nur mit psychiatrischen Erkrankungen, sondern auch mit bestimmten Persönlichkeitszügen erforscht worden. In einer Studie von 2006 wurde eine höhere Zahl von T-Allel Trägern (T/T,T/G) in einer Gruppe von Cluster B Persönlichkeitsstörungen erkannt, als bei der gesunden Kontrollgruppe (Gutknecht et

al., 2007). Im Rahmen einer anderen Studie wurde die Relevanz des serotonergen Systems auf die Impulskontrolle untersucht. Hierfür wurde ein neuropsychologischer Test verwendet. Der sogenannte Wisconsin Card Sorting Test, mit diesem die exekutive Kontrolle getestet wurde. Dabei machten T/T-Allel Träger dreimal mehr Fehler als Personen mit wenigstens einem G-Allel. Eine höhere Fehleranzahl könnte durch Impulsivität verursacht sein (Reuter et al., 2007b). Es ist jedoch unklar, ob das G-Allel oder das T-Allel für eine höhere Expression des Enzyms sorgt. In der Literatur wurde die TPH2 und deren Genpolymorphismen auf Unterschiede in der Genexpression hin untersucht (Chen et al., 2008). Der Genpolymorphismus rs4570625 (-703G/T) ist hier als mit einer geringeren Serotoninproduktion assoziiert, beschrieben worden.

Der SERT ist ein Zellmembranprotein, welches an der präsynaptischen Membran des serotonergen Neurons lokalisiert ist. Viele Psychopharmaka setzen an diesem Symporter an, zum Beispiel SSRI (selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren). Diese werden vornehmlich zur Behandlung von Depressionen verwendet. Für die Promotorregion des Gens, das für den SERT kodiert, existiert ein sogenannter Längenpolymorphismus (5-HTTLPR) (s. Abb. 3). Das „short“-Allel (s-Allel) resultiert in einer verminderten Expression des SERT. Dies führt dazu, dass weniger 5-HT pro Zeiteinheit zurück in das Zytosol des Neurons gelangt. Die basale Aktivität der langen Variante des Gens („long“-Allel (l-Allel)) ist dreifach höher als die der kurzen Variante (Heils et al., 1996). Dies könnte bei homozygoten l-Allel-Trägern zu einer verstärkten Expression des SERT und somit zu einer geringeren 5-HT Menge im synaptischen Spalt führen. Ängstliche Persönlichkeitszüge, Angsterkrankungen sowie Depressionen wurden mit diesem Polymorphismus assoziiert (Lesch, 2003; Lesch et al., 1996). Träger des s-Allels (ss/sl) sollen eine verstärkte Amygdalaaktivität aufweisen, die zu Angststörungen, Depressionen, Suizidalität und Bipolaren Störungen führen kann (Hariri et al., 2002; Kenna et al., 2012). In einer Studie, bei der ADHS-Patienten Stress ausgesetzt wurden, fand man heraus, dass s-Allel Träger eine signifikant höhere, positive Korrelation zwischen Stress und ADHS-Symptomen aufwiesen, als homozygote Träger des l-Allels (Meer et al., 2014). Insgesamt scheint der 5-HTTLPR eine große Rolle bei vielen psychischen Erkrankungen zu spielen und auch bei der Empathie bzw. sozialen Kognition (Canli and Lesch, 2007).

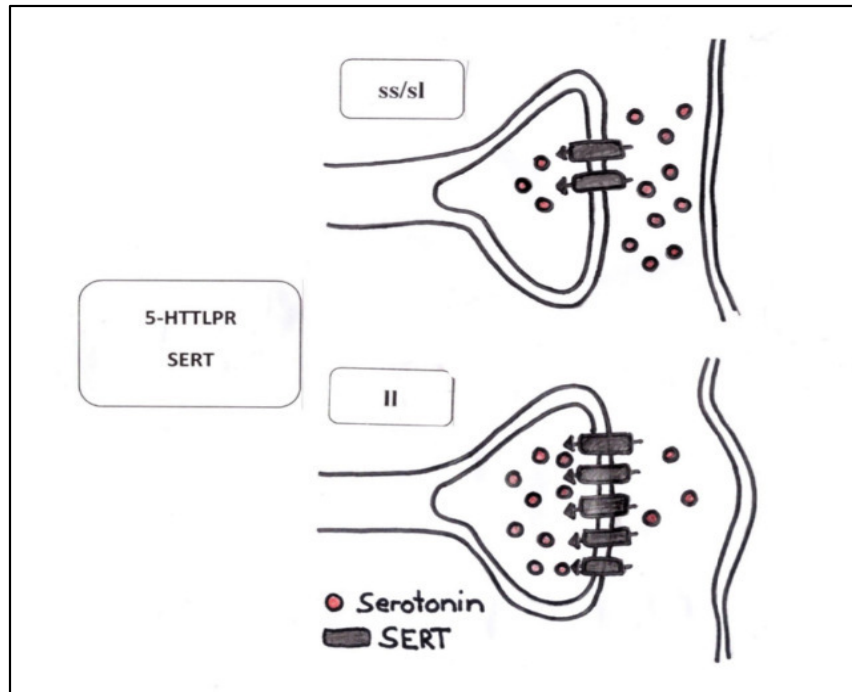


Abb. 5: Genvarianten des SERT: Genotyp ss/sl führt zu verminderter Expression des Transporters, somit verbleibt mehr 5-HT im synaptischen Spalt; Genotyp ll führt zu vermehrter Expression des Transporters, somit verbleibt weniger 5-HT im synaptischen Spalt.

Der 5-HT_{2C}-Rezeptor befindet sich auf der postsynaptischen Membran GABAerger Neurone. Im Jahr 2009 wurde er als der aktivierende Rezeptor auf periglomerulären Zellen identifiziert (Petzold et al., 2009). Durch die Aktivierung dieser Zellen kommt es zu einer Hemmung der Signalübertragung zwischen olfaktorischen Rezeptorneuronen und der Mitralzelle. Dies lässt darauf schließen, dass der 5-HT_{2C}-Rezeptor als wichtiger Bestandteil des serotonergen Systems Auswirkungen auf die Riechleistung haben könnte. Wir haben uns vor allem mit dem Polymorphismus rs518147 des 5-HT_{2C} auseinandergesetzt. Man unterscheidet bei diesem Genpolymorphismus G- und C-Allel Träger. Für C-Allel-Träger fand man einen protektiven Effekt für Gewichtszunahme unter antipsychotischer Therapie mit Olanzapin (Godlewska et al., 2009; Risselada et al., 2012). Weiterhin wurde dieser Polymorphismus im Zusammenhang mit ADHS untersucht (Xu et al., 2009). Hierbei fand man heraus, dass das G-Allel signifikant häufiger von Eltern auf ihre an ADHS erkrankten Kinder übertragen wurde.

1.5.3 Methodischer Forschungsstand

Der Sniffin`Sticks Test wurde 1995 von Kobal und Hummel erstmals vorgestellt. Er ermöglicht auf einfache Weise die Bestimmung von drei Riechqualitäten (Riechsensitivität, Diskrimination und Identifikation). In unserer Studie wurde auf die Identifikationstestung verzichtet, weil die Erkennung von Gerüchen keine Bedeutung für unsere Fragestellungen hat und wesentlich von schwer kontrollierbaren Lernfaktoren mitbeeinflusst sein kann. Der Test enthält Geruchskonzentrationen, die schwelennah als auch überschwellig sind. Er besitzt eine hohe Sensitivität und kontaminiert den Untersuchungsraum nicht. Beim Diskriminationstest ist keine exakte sprachliche Benennung des Duftreizes nötig, somit für die Testung von Kindern gut geeignet. Der zeitliche Aufwand der Untersuchung ist gering. Für die Sensitivitätstestung plus Diskrimination werden zwischen 20 und 30 Minuten eingerechnet. Der Test ist gut für die Nutzung im klinischen Alltag geeignet (Hummel et al., 1997). Er wird verwendet, um beispielsweise eine Anosmie bei neurologische Krankheiten zu erfassen (Kobal and Stefan, 1995). Vor allem bei der Parkinson-Krankheit hat der Sniffin`Sticks Test einen besonderen Stellenwert. In einer Studie wurden Patienten mit idiopathischem Parkinson Syndrom im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mittels des Sniffin`Sticks Tests auf alle drei Riechqualitäten hin untersucht. Es zeigten sich Defizite in allen drei Bereichen innerhalb der Patientengruppe (Daum et al., 2000). Auch werden Aufträge zur Begutachtung von Geruchsstörungen nach Schädelhirntraume, Operationen im Nasennebenhöhlenbereich, Infektionen und Medikamentennebenwirkungen immer häufiger (Wolfensberger and Schnieper, 1999). Die Patienten-Compliance ist wegen des geringen zeitlichen Aufwands und der geringen Kosten gut. Auch kann durch festgesetzte Richtwerte eine semiquantitative Beurteilung von partiellen Geruchsstörungen vorgenommen werden (Wolfensberger and Schnieper, 1999).

Auch in der Forschung findet der Sniffin`Sticks Test breite Anwendung, da durch die geringe Dauer des Tests eine große Probandenzahl erreicht werden kann, um repräsentativere Ergebnisse zu erreichen. Beispielsweise wird der Test unter anderem in der Multiplen Sklerose-Forschung (Caglayan et al., 2016) oder in der Schizophrenie-Forschung verwendet (Pelka-Wysiecka et al., 2015).

Es gibt eine Vielzahl von Tests, mit denen man das Riechvermögen beurteilen kann. Diese sind je nach Verfahren, Dauer und Aussagekraft unterschiedlich. Neben dem Sniffin`Sticks Test gibt es den Sniff Magnitude Test (SMT). Der SMT wurde von Gesteland und Frank entwickelt (Frank et al., 2003). Es handelt sich hierbei um einen Test, bei dem die Testpersonen anhand von Plastikbehältern (Geruchskanister), die mit unterschiedlichen Konzentrationen eines gelösten Duftstoffs gefüllt sind, auf ihr Atmungsverhalten abhängig vom dargebotenen Geruch, getestet werden. Hierfür trägt der Proband eine beidseitige Nasensonde, die mit dem Geruchskanister und einem computergestützten piezoelektrischen Druckumwandler verbunden ist. Es wird das Schnüffeln an Kanistern mit und ohne Geruchsstoff verglichen (Frank et al., 2004). Dabei werden unangenehme und angenehme Gerüche dargeboten. Durch die Nasensonde wird der Unterdruck gemessen, der beim Einatmen entsteht. Der Unterdruck ist bei unangenehmen Gerüchen kleiner als bei angenehmen. Die Differenz kann Aussage über die Riechfunktion geben. Ein Vorteil dieses Tests ist es, dass man sich nicht auf die subjektive Wahrnehmung des Probanden verlässt, sondern auf das objektive Ergebnis der Inhalation. Leider lässt sich dieser Test nicht für die Erfassung von Sensitivität und Diskrimination verwenden. Jedoch ist er ein erster Ansatz, um objektivere Ergebnisse zu erhalten.

Um ein noch objektiveres Ergebnis zu erhalten, ist es möglich elektrische Riechpotentiale mittels der „objektiven Olfaktometrie“ (Objektive Messung der Riechleistung) abzuleiten. Hierfür wird ein sogenanntes Olfaktometer verwendet. Ein Nasenstück sorgt für eine direkte Darbietung des Reizes, der in einen kontinuierlichen Luftstrom eingebettet ist, um eine mechanische Reizung der Riechschleimhaut zu verhindern (Kobal, 1981; Livermore and Hummel, 2004). Über die Kopfoberfläche werden dann die ausgelösten Potentiale mit Elektroden registriert. Die Messmethode heißt EEG (Elektroenzephalographie). Das durch den Reiz (hier ein Geruchsstoff) ausgelöste Signal lässt sich als charakteristische Welle darstellen und wird als „olfaktorisch evoziertes Potential“ (OEP) bezeichnet. Je nach Amplitude und Latenz kann man eine Aussage über die Stärke des empfundenen Geruchs treffen. Eine hohe Amplitude mit kurzer Latenzzeit spricht für eine große Geruchsintensität. Je nach dargebotenem Duftstoff wird das trigeminale oder olfaktorische System gereizt (Kobal

and Hummel, 1988). Heute wird diese Methode primär in der Forschung angewendet, da sie für den klinischen Alltag zu aufwendig ist. Durch die simultane Registrierung olfaktorisch evozierter kortikaler Potentiale und der Contingent Negative Variation (CNV) ist es möglich, nicht nur die Riechempfindung, sondern auch das Geruchsunterscheidungsvermögen zu testen (Matern et al., 1995). Die CNV ist eine langsame Potentialverschiebung zu negativen Werten, die auftritt, wenn ein Reiz einen zweiten Reiz angekündigt hat, auf den eine Reaktion erfolgen soll. Diese Veränderung wird als Vorbereitung auf einen nächsten Reiz interpretiert. Die selektive CNV besteht in der Unterscheidung von zwei Gerüchen, dabei wurde eine höhere Amplitude in der Ableitung festgestellt (Eichholz, 2004). Diese objektive Einschätzung der Diskriminationsleistung kann Aufschluss über das Vorliegen einer Parosmie bei Patienten geben (Gerull et al., 1981). In unserer Fragestellung haben wir uns mit der Signalübertragung im OB beschäftigt. Leider liefert uns die EEG-Messung nach olfaktorischer Reizung nur Signale, die zur Hirnrinde gelangen. Wir bekommen daher keinen Aufschluss über Veränderungen im OB je nach dargebotenem Geruch, unterschiedlicher Konzentration des Geruchsstoffs oder bei der Aufgabe der Unterscheidung von Gerüchen. Auch ist die Nutzung des Olfaktometers eine sehr aufwändige Methode und zusätzlich sehr kostspielig. Eine hohe Probandenzahl mit dieser Methode zu erreichen ist schwierig. Angewendet wird die Messung olfaktorischer Potentiale bei medizinischen Gutachten, bei Patienten mit Demenz oder Kindern.

Wir haben uns für den Sniffin`Sticks Test entschieden, weil er leicht bei Kindern zwischen 8 und 13 Jahren durchführbar ist. Er deckt verschiedenen Bereiche unserer Riechfunktion ab, nämlich ab welcher Konzentration wir einen Geruchsstoff gerade so wahrnehmen können (Sensitivität) und ob wir Gerüche voneinander unterscheiden können (Diskrimination).

1.5.3 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage wie Bestandteile des serotonergen Systems bzw. deren Genotyp sich auf die Riechleistung gesunder Kinder auswirken. Wie im Forschungsstand beschrieben, kommen die TPH2, der SERT und der 5-HT2C

Rezeptor hierfür in Frage, da die genannten Genpolymorphismen der TPH2 (rs4570625 oder -703G/T), des Serotonintransporters (5-HTT, Serotonintransporter-Längenpolymorphismus 5-HTTLPR) und des Serotoninrezeptors 5-HT2C (rs518147 oder -697G/C) im Zusammenhang mit einer Vielzahl von psychiatrischen Erkrankungen untersucht wurden (s.1.5.2). Durch Studien untermauert wissen wir, dass serotonerge Fasern von den Raphe-Kernen zum OB ziehen und somit das serotonerge System an der Signaltransduktion im OB mitwirkt (Kapoor et al., 2016a). Wir haben uns gefragt, wie die Riechleistung, in Abhängigkeit vom Genotyp, bei Kindern ohne psychiatrische Erkrankungen ausfällt. Das zukünftige Ziel wäre es die Riechleistung als diagnostischen Marker bei psychiatrischen Erkrankungen zu nutzen, die mit diesen Genpolymorphismen assoziiert sind. Zur Erfassung der Riechschwelle und der Diskriminationsleistung wurde der Sniffin`Sticks Tests eingesetzt, da er als Standardtest in der klinischen Forschung gilt und gut bei Kindern durchzuführen ist.

1.6 Fragestellung und Hypothesen

Fragestellung:

Zeigt sich bei gesunden Kindern ein Zusammenhang zwischen serotonergen Genvariationen und der olfaktorischen Leistung?

Hypothesen:

1. Der Genotyp des Serotonin-Syntheseenzym TPH2 (rs4570625) beeinflusst Riechsensitivität und Diskriminationsfähigkeit.
2. Der Serotonintransporter-Längenpolymorphismus 5-HTTLPR beeinflusst Riechsensitivität und Diskriminationsfähigkeit.
3. Die Genvariante des Serotoninrezeptors 5-HT2C (rs518147) beeinflusst Riechsensitivität und Diskriminationsfähigkeit.

2. Material und Methoden

2.1 Studienkonzept

Ziel dieser Studie war es die Bedeutung serotonerger Genvariationen im Zusammenhang mit der Riechleistung zu untersuchen. Insbesondere wurden hierfür die Varianten der Genpolymorphismen der TPH2 (rs4570625 oder -703G/T), der 5-HTTLPR und des 5-HT2C (rs518147 oder -697G/C) auf Unterschiede in Riechsensitivität und Diskriminationsfähigkeit untersucht. Eine gerichtete Hypothese war aufgrund der mangelnden Vorbefunde und geringen Kenntnisse über die funktionellen Zusammenhänge im Riechsystem nicht sicher zu formulieren. Insgesamt wurden 173 Kinder eingeschlossen. Davon lagen bereits die Datensätze von 71 Kindern vor, die im Rahmen der Testungen aus dem Jahr 2011 unter der Leitung von Prof. Marcel Romanos und Dr. Martin Scheckmann (aktuell Universität Regensburg, Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Deutschland) entstanden sind. Weitere 102 Kinder wurden zwischen April 2015 bis November 2015 an der Universität Würzburg getestet (Stichprobe Carl). Diese Kinder wurden aus einem Probandenkollektiv der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Würzburg rekrutiert, die ihr Einverständnis für eine weitere Kontaktaufnahme gegeben hatten. Die Studie wurde durch das Ethikkomitee Würzburg geprüft (6/07; 130/07) und als unbedenklich eingestuft.

2.2 Stichprobe

2.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Kinder zwischen 8 und 13 Jahren ohne Allergien. Im Falle des Vorliegens einer Allergie, wurde die Riechtestung im beschwerdefreien Intervall durchgeführt. Jedes Kind und dessen Eltern unterschrieben nach ausführlicher Aufklärung über die Studie eine Einverständniserklärung.

Ausgeschlossen von der Studie wurden Kinder, die durch schwere Allergien, Erkrankungen der Nase (z.B. Rhinitis, Sinusitis) oder der unteren Atemwege (z.B. Asthma bronchiale), neurologische Erkrankungen bzw. Verletzungen (z.B. Meningitis, Schädel-Hirn-Trauma, Schädelbasisbruch) in der Vorgeschichte, Operationen der

oberen Atemwege im Zeitraum des letzten Jahres und chronische Erkrankungen wie beispielsweise Epilepsie in ihrem Riechvermögen beeinträchtigt sein könnten. Auch die Einnahme von Medikamenten, die die Riechleistung beeinträchtigen (z.B. Psychopharmaka, Antiepileptika) galten als Ausschlusskriterium. Des Weiteren wurden psychische Erkrankungen durch Abfrage des Besuches bei einem Kinder- und Jugendpsychiater, Psychotherapeuten oder einer Beratungsstelle ausgeschlossen. Die Kinder wurden zeitnah zu einer anderen Studienteilnahme bei Julia Reinhardt rekrutiert. Im Rahmen dieser Studie wurde ein ausführliches klinisches Interview mittel des Kinder-DIPS (Diagnostisches Interview bei psychischen Störungen im Kindes- und Jugendalter) durchgeführt. Damit konnte das Vorliegen einer psychischen Erkrankung ausgeschlossen werden. Im Falle einer akuten Infektion der Atemwege am Testungstag wurde ein neuer Termin mit ausreichend zeitlichem Abstand festgelegt. Außerdem wurden Probanden mit Fragebogenwerten oberhalb des Cut-off-Wertes für klinische Bedeutsamkeit von der Auswertung ausgeschlossen. Die Fragebögen werden im Einzelnen im Abschnitt 2.2.2 genannt.

Geschwisterkinder wurden nicht getestet, damit die genetische Ähnlichkeit von Geschwistern die statistischen Berechnungen nicht verfälschen.

2.2.2 Messinstrumente zur phänotypischen Charakterisierung

Zur Beurteilung des Verhaltens des Kindes wurde von den Eltern der Fremdbeurteilungsbogen für Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörungen (FBB-ADHS) und die Child Behaviour Checklist (CBCL) ausgefüllt (Döpfner, M. et al., 2008; Döpfner, M. et al., 1995). Um eine Depression auszuschließen, wurde im Rahmen der Testung von jedem Probanden das Depressionsinventar für Kinder und Jugendliche (DIKJ) (Stiensmeier-Pelster, J., Braune-Krickau, M., Schürmann, M. Duda, K., 2014) ausgefüllt.

Die Riechleistung wurde mit dem „Sniffin`Sticks“ Test (Burghart Messtechnik, Wedel, Deutschland) erfasst.

2.2.2.1 Fragebögen

Der FBB-ADHS umfasst alle Kriterien der Hyperkinetischen Störung nach ICD-10 bzw. der Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung nach DSM-IV. Entnommen wurde der FBB-ADHS aus dem Diagnostik-System für psychische Störungen nach ICD-10 (International Classification of Diseases and Related Health Problems) und DSM-IV (Diagnostischer und statistischer Leitfaden psychischer Störungen) für Kinder und Jugendliche (Döpfner et al., 2008). Erfasst werden hiermit Aufmerksamkeit, Impulsivität und Hyperaktivität, um eine eventuelle ADHS Symptomatik bei den Teilnehmern auszuschließen bzw. subklinische Symptome zu erfassen.

Die Eltern jedes Probanden füllten die CBCL (Döpfner et al., 1994) aus, die Auffälligkeiten im Verhalten, auf emotionaler Ebene, somatischen Beschwerden sowie sozialen Kompetenzen des Kindes ermitteln soll. Hiermit sollten vor allem internale und externale Auffälligkeiten sowie ein Gesamtscore erfasst werden. Zu den internalisierenden Auffälligkeiten zählen beispielsweise sozialer Rückzug, körperliche Beschwerden und Depressivität. Aggressives oder dissoziales Verhalten wird zu den externalen Auffälligkeiten kategorisiert. Soziale Probleme, zwanghafte Verhaltensweisen und Aufmerksamkeitsprobleme beinhalten sowohl internalisierende, als auch externalisierende Elemente.

Jedes Kind bearbeitete während der Testung das DIKJ (Stiensmeier-Pelster, J., Braune-Krickau, M., Schürmann, M., Duda, K., 2014), um eine depressive Symptomatik auszuschließen. Hiermit sollen emotionale Störungen, die somatische Befindlichkeit, Einsamkeitsbefinden, negative Zukunftssicht oder negative Bewertung der Umwelt, schlechte Schulleistungen sowie Schuldgefühle erfasst werden. Hier wurde die Neuauflage mit einer Erweiterung um drei Fragen verwendet, um zusätzliche Informationen über beispielsweise Anhedonie, soziale Zurückgezogenheit und somatische Beschwerden zu erhalten. Bei den 29 Items soll eine von drei Antwortmöglichkeiten ausgewählt werden. Ab einem Score von 19 und höher wurde der Proband aus der Stichprobe ausgeschlossen.

Für alle eingeschlossenen Kinder lag bereits aus der früheren Studienteilnahme bei Julia Reinhardt ein IQ (Intelligenzquotient)-Test vor, nämlich der Grundintelligenztest CFT-

20R (Weiss, 2006). Teilnehmer mit einem IQ- Wert unter 80 wurden nicht in die Stichprobe aufgenommen.

Die Eltern wurden zusätzlich befragt, ob das Kind Medikamente einnimmt oder bereits einem Kinder- und Jugendpsychiater, Psychologen, Psychotherapeuten oder bei einer Beratungsstelle vorgestellt wurde. Wichtig war auch die Frage nach etwaigen chronischen und neurologischen Erkrankungen, sowie das Vorliegen von Erkrankungen der Nase bzw. der oberen Atemwege vor allem einer Allergie. Im Falle des Vorliegens einer der genannten Dinge wurde das jeweilige Kind nicht in die Studie inkludiert bzw. bei einer Allergie wurde ein beschwerdefreies Intervall für die Testung abgewartet.

Mit Hilfe dieser Befragungen konnte ein ganzheitliches Bild jedes Kindes eruiert werden, um vor allem psychische, aber auch somatische Erkrankungen des Kindes und der Eltern zu erfassen, die sich auf die Riechleistung auswirken könnten und somit zu einem verfälschten Ergebnis im Bereich der Riechsensitivität oder Diskrimination führen könnten.

2.2.2.2 Sniffin`Sticks

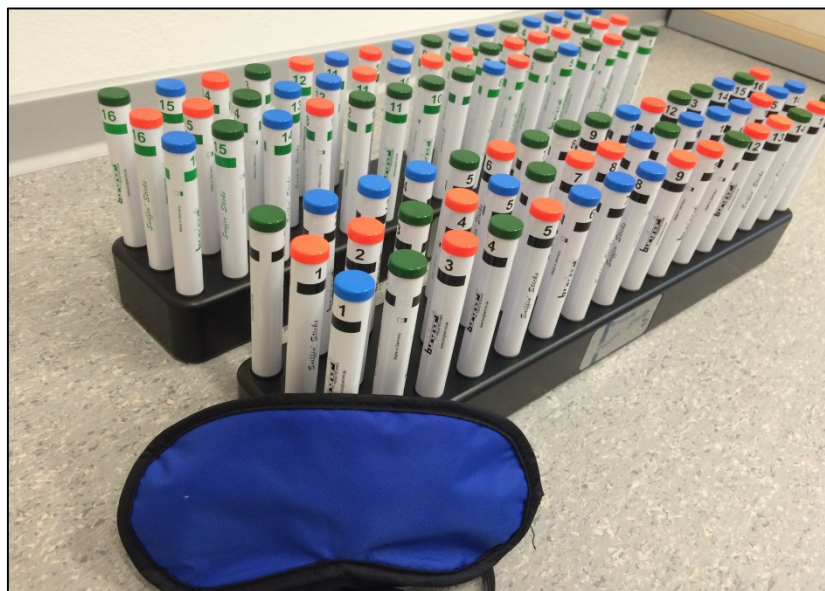


Abb. 6: Sniffin`Sticks, Firma Burghardt Medizintechnik GmbH-1: Testatterie mit schwarzer Stiftmarkierung für Schwellentestung, Testatterie mit grüner Stiftmarkierung für Diskriminationstestung

Die Riechleistung wurde mit einer validierten Riechtestbatterie der Firma Burghart Messtechnik GmbH, Wedel, Deutschland erfasst (Hummel et al., 1997; Wolfensberger, 2000). Diese Testbatterie ermöglicht es, die verschiedenen Riechqualitäten wie Riechsensitivität, Diskrimination und Identifikation zu objektivieren. Wir beschränkten uns bei den Testungen auf den Schwellenwert (Riechsensitivität) und die Diskriminationsfähigkeit. Die Sniffin`Sticks sind ca. 14 cm lange Filzstifte mit einem Innendurchmesser von ungefähr 1,3 cm. Die Stifte sind mit einer Kappe vor dem Austrocknen und damit Geruchsverlust geschützt und werden in einer Box transportiert. Bei der Testung wird dem Probanden der Filzstift im Abstand von ca. 2cm abwechselnd vor beide Nasenlöcher gehalten, wobei der Stift angekündigt wird. Dabei hat der Proband ein bis zwei Atemzüge Zeit den Geruchsstoff wahrzunehmen. Während der Testungsphase sind die Augen durch eine Schlafbrille verschlossen. Erst am Ende erfährt der Teilnehmer sein Riechergebnis. Der Testungsraum sollte stets gut gelüftet und ohne störende Gerüche sein. Auch sollte 15 min vor und während der Testung nicht gegessen oder geraucht werden.

Im Rahmen der Riechschwellenuntersuchung soll der Proband aus drei Stiften den Stift erkennen, der nach Phenylethylalkohol [ml](Rosenduft) riecht. Hierbei handelt es sich um einen rein olfaktorischen Duftstoff. Die anderen zwei Stifte enthalten Lösungsmittel. Insgesamt besteht dieser Test aus 16 Reihen mit jeweils drei Stiften. Der Stift mit der roten Kappe enthält den Rosenduft. Mit jeder Reihe nimmt die Verdünnung des Duftstoffs zu. Je höher die Reihe desto schwieriger ist es den Duft zu erkennen. Die Triplets werden mit einem zeitlichen Abstand von 20 Sekunden angeboten. Der Auftrag an den Probanden lautet: „Finde den Stift aus dreien, der nach Rosenduft riecht“. Man beginnt bei der Verdünnungsreihe 16 und geht bei nicht Erkennen über zur Reihe 14, anschließend Reihe 12 usw. (s. Abb. 7). Man führt dies fort bis zweimal hintereinander der Duftstoff richtig erkannt wurde. Dies ist der Startpunkt der Testung. Eine Verdünnungsstufe wird nur dann doppelt angeboten, wenn er direkt davor richtig erkannt wurde. Im Falle einer falschen Antwort wird direkt zur nächsthöheren Konzentration gewechselt. Nach Festlegung des Startpunktes wird die nächsthöhere Verdünnung genommen. Wird diese ebenfalls zweimal korrekt erkannt, wird zu der numerisch folgenden Reihe übergegangen, bis der Proband einmal falsch antwortet. Bei

dieser Verdünnungsstufe wird der erste Wendepunkt markiert. Die Testung läuft solange bis sieben Wendepunkte bestimmt wurden. Der Riechschwellenwert errechnet sich aus dem Mittelwert der letzten vier Wendepunkte.

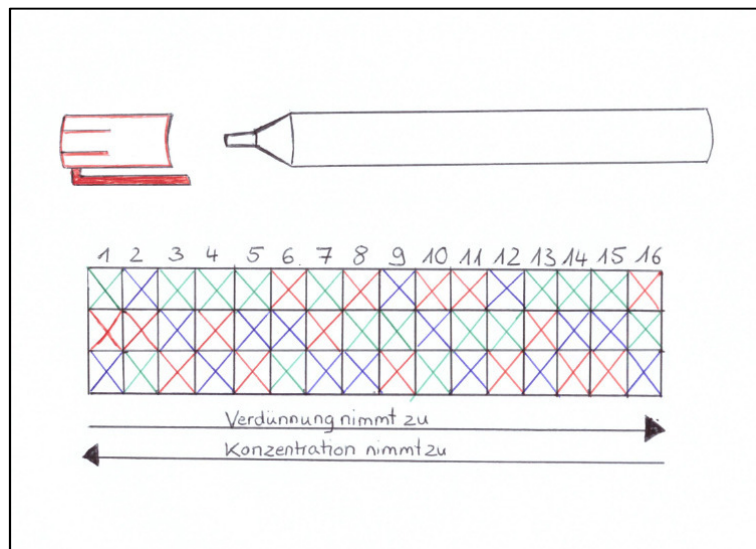


Abb. 7.: Sniffin' Sticks: Riechschellentestung mit schematischer Darstellung der Verdünnungsreihen. Oben: Riechstift (rote Kappe: Rosenduft); Unten: Testbatterie, jedes Kreuz steht für einen Riechstift (rote Kreuze: Rosenduftstift, blaue und grüne Kreuze: gleicher Duftstoff), Verdünnung nimmt von Reihe 1 bis 16 zu, dementsprechend nimmt Konzentration von Reihe 16 nach 1 zu.

Bei der Diskriminationsuntersuchung werden dem Teilnehmer 16 Reihen mit jeweils drei Stiften angeboten. Jede Reihe besteht aus zwei Stiften mit dem gleichen Geruchsstoff (beispielsweise: Kümmel, Banane und andere) und einem der anders riecht. Der Stift mit der grünen Kappe enthält den abweichenden Geruchsstoff. Der Auftrag an den Probanden lautet wieder: „Finde den Stift, der anders riecht als die anderen zwei Stifte“. Diesmal enthält jedes Triplet andere Geruchsstoffe. Die Reihenfolge der angebotenen Stifte, sollte bei jeder Reihe variiert werden. Das Ergebnis errechnet sich aus der Summe der richtig erkannten Triplets.

Aus dem Summenwert der Riechschwelle und der Diskrimination wird ein Gesamtscore, der SD-Score, ermittelt. Goldstandard zur quantitativen psychophysischen Untersuchung von Riechstörungen ist für den deutschsprachigen Raum der Sniffin'

Sticks-Test (Damm, 2007). In der Forschung wird er eingesetzt, um beispielsweise die Riechleistung bei bestimmten Krankheitsbildern mit der von gesunden Kontrollen zu vergleichen.



Abb. 8: Sniffin´ Sticks, Firma Burghardt Medizintechnik GmbH-2: Frau Kneer: Psychologin der Kinder- und Jugendpsychiatrie Universitätsklinikum Würzburg: Demonstration der Sniffin´Sticks Testbatterie

2.2.3 Genotypisierung

Bei allen Probanden wurde eine venöse Blutentnahme vorgenommen, diese lag bereits durch eine frühere Studienteilnahme vor. Die DNA-Extraktion (=Desoxyribonukleinsäure-Extraktion) erfolgte nach Standardprotokollen durch Mitarbeiter des Labors der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie der Universität Würzburg. Hierfür wurde die Salzfällungsmethode nach Miller verwendet (Miller et al., 1988). Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der Kältehämolysen kernfreier Erythrozyten und nachfolgender Salzfällung der DNA aus Leukozyten. Es wurden die Genotypen des Serotonin-Synthesenzym TPH2 (rs4570625 oder -703G/T), des Längenpolymorphismus 5-HTTLPR und die

Genvarianten des Serotoninrezeptors 5-HT_{2C} (rs518147 oder -697G/C) bestimmt. Nach Amplifizierung der DNA mittels PCR (=Polymerasekettenreaktion) und restriktionsenzymatischer Verdauung, wurde eine Gelelektrophorese eingesetzt.

2.2.4 Ablauf einer Testung

Die Rekrutierung der Kinder erfolgte telefonisch. Während des Telefonats wurden eventuelle Ausschlusskriterien abgefragt und ein Termin vereinbart. Den Eltern wurde per Post oder E-Mail detaillierte Informationsmaterialien zur Studie und zum verwendeten Testmaterial zugeschickt, ebenso die Einwilligungserklärungen für Kind und Eltern (s. Anhang). Zusätzlich wurde der FBB-ADHS und die CBCL zugesandt, die zum Termin ausgefüllt mitgebracht wurden. Die Hauptuntersuchung fand in den Räumen der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie des Universitätsklinikums Würzburg statt. Nach der Begrüßung wurden mit den Eltern die bearbeiteten Fragebögen und die Einverständniserklärungen durchgegangen. Anschließend fand eine erneute Abfrage der aktuellen HNO- (Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde) bzw. Allergie-Symptomatik, organischer und neurologischer Erkrankungen, der Einnahme von Medikamenten, ebenso des Kaffeekonsums und des Rauchens statt. Zuletzt wurden mittels der Sniffin`Sticks die Riechschwelle und Diskrimination bestimmt. Aus Intelligenztestungen aus vorheriger Studienteilnahme lagen bereits Werte für den IQ der Kinder vor. Auch lag für jedes der getesteten Kinder eine venöse Blutprobe vor, die für die Genotypisierung der drei untersuchten Genpolymorphismen verwendet wurde.

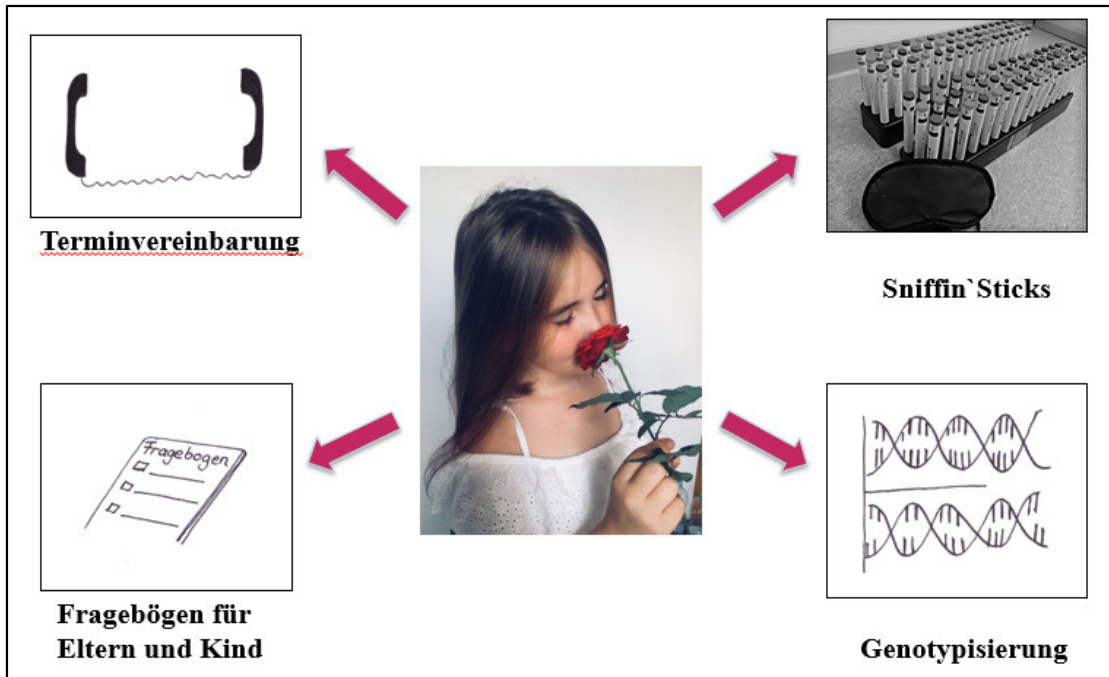


Abb. 9: Testablauf und Konzept der Studie: Bei der telefonischen Rekrutierung wurden Einschlusskriterien und Ausschlusskriterien erfasst, per Post wurden die Fragebögen zugeschickt, am Testungstag wurde der Sniffin`Sticks Test durchlaufen, jedes Kind wurde auf die drei untersuchten Genpolymorphismen getestet.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mittels SPSS 23.0 (Statistical Package for the Social Sciences 23.0) vorgenommen. Die Probanden wurden für jedes der getesteten Gene nach ihren Genotypen dichotomisiert, um einen Zusammenhang zwischen Genotypen und entsprechender Riechleistung herzustellen. Für den Genpolymorphismus TPH2 (rs4570625) wurden die Probanden in die Allelgruppe der T-Allel-Träger (T/T oder T/G) und die Allelgruppe homozygoter G-Allel-Träger (G/G) eingeteilt. Beim 5-HTTLPR wurden Träger des kurzen Allels (s/l oder s/s) versus homozygote Träger des langen Allels (l/l) ausgewertet. Der 5-HT2C Rezeptor Polymorphismus (rs518147) sorgte für die Einteilung der Gruppen in C-Allel Träger (C/G oder C/C) und G-Allel-Träger (G/G). Zunächst wurden Unterschiede der Stichprobe Schecklmann und der Stichprobe Carl erfasst, um eine homogene Gesamtstichprobe sicherzustellen. Die Geschlechterverteilung innerhalb der beiden Gruppen wurde mittels des Chi-Quadrat-Tests analysiert. Unterschiede im Bereich des

Alters, des IQs, der Scores der Fragebögen, der Riechsensitivität und Diskriminationsfähigkeit wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Anschließend wurde die Verteilung der Genotypen in der Gesamtstichprobe unter Berücksichtigung des Geschlechts für jedes der untersuchten Gene bestimmt. Die Differenzierung der Riechleistung nach Genotyp wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test vorgenommen. Um eventuelle Abhängigkeiten der Riechleistung vom Geschlecht für jedes einzelne getestete Gen zu erfassen, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Explorativ wurde eine Varianzanalyse (Englisch analysis of variance; ANOVA) durchgeführt, um Interaktionseffekte zwischen dem Faktor Geschlecht und den serotonergen Genen auf die Riechleistung zu erfassen.

Zur Berechnung der Post-hoc-Power mit G*Power (<http://www.gpower.hhu.de>) wurde die Effektstärke Cohen's d berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Stichprobenbeschreibung

Insgesamt sind 173 Kinder getestet worden, wobei 71 unter der Leitung von Prof. Marcel Romanos und Dr. Martin Schecklmann und 102 im Rahmen der aktuellen Testungen erhoben wurden (Stichprobe Carl). Genauere Angaben zu Dropouts sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Gesamtstichprobe

	Stichprobe		Gesamt
	Schecklmann	Carl	
Ausschluss	30	26	56
Einschluss	71	102	173
Gesamt	101	128	229

Die Stichproben waren vergleichbar bezüglich des Alters, des IQs und der Geschlechterverteilung. In Tabelle 2 sind Angaben zu durchschnittlichem Alter, IQ, Geschlecht, Riechsensitivität, Diskrimination, DIKJ, FBB-ADHS und CBCL dargestellt.

Die 56 Kinder, die von der Studie ausgeschlossen wurden, lagen außerhalb der Normbereiche des IQ-Werts, außerhalb der Fragebögen-Normwerte oder wiesen organische Erkrankungen mit Einfluss auf die Riechleistung auf.

Tabelle 2: Geschlecht, Alter, IQ, Riechsensitivität, Diskrimination und Fragebögen der Einzelstichproben

	Schecklmann n = 71		Carl n = 102		Gruppen- vergleiche <i>p</i>
Geschlechterver- teilung	33♂ ≅ 46% 38 ♀ ≅ 54%		44♂ ≅ 43% 58♀ ≅ 57%		0,66
	M	SE	M	SE	<i>p</i>
Alter	11,51	0,30	10,83	0,11	0,22
IQ	114,00	1,38	109,66	1,47	0,01
Sensitivität	8,83	0,31	9,14	0,23	0,68
Diskrimination	10,79	0,28	12,06	0,19	< 0,01
DIKJ-Score	6,71	0,59	7,05	0,45	0,5
FBB-Gesamt- Score	0,25	0,03	0,28	0,025	0,42
FBB- Aufmerksamkeits- -Score	0,36	0,04	0,42	0,04	0,93
FBB- Hyperaktivitäts- Score	0,09	0,02	0,11	0,02	0,90
FBB- Impulsivitäts- Score	0,28	0,04	0,27	0,03	0,88

CBCL- Internalisierend	3,59	0,49	3,26	0,25	0,45
CBCL- Externalisierend	3,99	0,40	4,14	0,31	0,62
CBCL-Gesamt- Score	11,62	1,17	11,63	0,73	0,46

Anmerkungen: n = Anzahl der Probanden, M = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler, p = Signifikanzwert

Um die Homogenität der Gesamtstichprobe sicherzustellen wurde die Geschlechterverteilung zwischen den beiden Stichproben untersucht, dabei zeigten sich keine Unterschiede in der Geschlechterzusammensetzung ($p = 0,66$).

In der Altersverteilung gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Einzelstichproben ($p = 0,223$).

Die IQ-Werte lagen in der Stichprobe Scheckmann bei einem etwas höheren Durchschnittswert ($p = 0,01$).

Beim Vergleich der Fragebogenwerte wurden keine Unterschiede zwischen der Stichprobe Carl und Scheckmann erfasst.

Im Gruppenvergleich ergab sich ein Unterschied im Bereich der Diskrimination, wobei die Stichprobe Carl höhere Diskriminationswerte erzielte ($< p = 0,01$). Für die Riechsensitivität ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,68$).

In der folgenden Tabelle 3 sind die Werte für Alter, IQ, Geschlecht, Riechsensitivität, Diskrimination, DIKJ, FBB-ADHS und CBCL für die Gesamtstichprobe zusammengefasst.

Tabelle 3: Geschlecht, Alter, IQ, Riechsensitivität, Diskrimination und Fragebögen der Gesamtstichprobe

	Gesamtstichprobe	
	n = 173	
Geschlechterverteilung	77 ♂ \triangleq 45%	
	96 ♀ \triangleq 55%	
	M	SD
Alter	11,11	1,87
IQ	111,45	13,61
Sensitivität	9,01	2,49
Diskrimination	11,54	2,2
DIKJ	6,91	4,70
FBB-Gesamt-Score	0,27	0,24
FBB-Aufmerksamkeits-Score	0,4	0,38
FBB-Hyperaktivitäts-Score	0,10	0,18
FBB-Impulsivitäts-Score	0,27	0,35
CBCL-Internalisierend	3,4	3,24
CBCL-Externalisierend	4,08	3,21
CBCL-Gesamt-Score	11,63	8,36

Anmerkungen: n = Anzahl der Probanden, M = arithmetisches Mittel, SD = Standardabweichung

Die Probanden wurden entsprechend ihrer Genvariante der TPH2, des 5-HTTLPR und des 5-HT2C-Rezeptors, wie bereits in 2.3 beschrieben, entsprechend in Gruppen eingeteilt. Um einen eventuellen Geschlechtereffekt unter den Genotypen zu erkennen, wurden die Geschlechterverteilungen unter den Genotypen miterfasst.

Für die TPH2 wurden, wie in Tabelle 4 und Abbildung 10 dargestellt, zwei Genotypgruppen definiert.

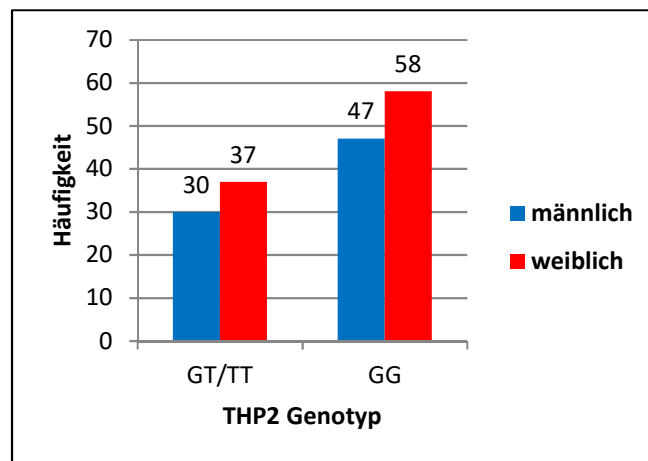


Abb. 10: Veranschaulichung der Genotypen-Verteilung der TPH2

Tabelle 4: Genotypen-Verteilung (TPH2) der Gesamtstichprobe mit Geschlechterverteilung

TPH2 (r s4570625)	Geschlecht		Gesamt
	weiblich	männlich	
GG	58	47	105
GT/TT	37	30	67
Gesamt	95	77	172

In Tabelle 5 und Abbildung 11 sind die zwei Genotyp-Gruppen für 5-HTTLPR dargestellt.

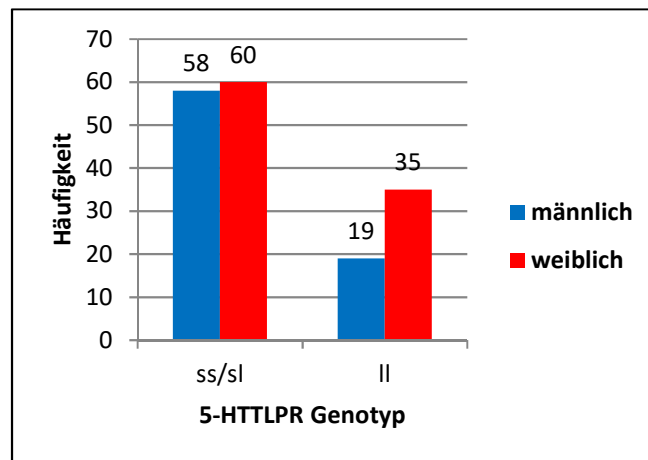


Abb. 11: Veranschaulichung der Genotypen-Verteilung des 5-HTTLPR

Tabelle 5: Genotypen-Verteilung (5-HTTLPR) der Gesamtstichprobe mit Geschlechterverteilung

5-HTTLPR	Geschlecht		Gesamt
	weiblich	männlich	
ss/sl	60	58	118
ll	35	19	54
Gesamt	95	77	172

Der 5-HT_{2C} Rezeptor, in Tabelle 6 und Abbildung 12 dargestellt, wurde in zwei Genotyp-Gruppen eingeteilt

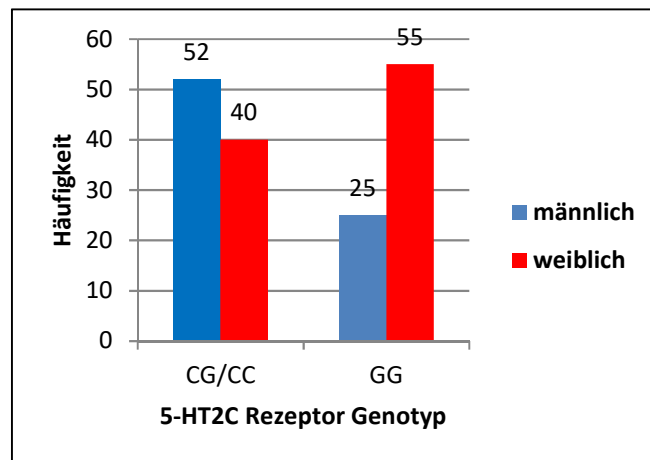


Abb. 12: Veranschaulichung der Genotypen-Verteilung des 5-HT_{2C} Rezeptors

Tabelle 6: Genotypen-Verteilung (5-HT_{2C}) der Gesamtstichprobe mit Geschlechterverteilung

5-HT _{2C} (rs518147)	Geschlecht		Gesamt
	weiblich	männlich	
CG/CC	40	52	92
GG	55	25	80
Gesamt	95	77	172

3.2 Hypothese 1: Der Genotyp des Serotonin-Synthesenzym TPH2 (rs4570625) beeinflusst Riechsensitivität und Diskriminationsfähigkeit

Tabelle 7: Unterschiede der Riechleistung nach Genotyp des TPH2 Gens

TPH2 (rs4570625)	Genotyp				Signifikanz
	GG		GT/TT		
	M	SE	M	SE	<i>p</i>
Sensitivität	8,71	0,25	9,46	0,28	0,09
Diskrimination	11,30	0,21	11,91	0,27	0,04

Anmerkungen: M = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler, *p* = Signifikanzwert

Die in Tabelle 7 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass T-Allel-Träger eine signifikant bessere Diskriminationsfähigkeit aufweisen, als homozygote G-Allel-Träger ($p = 0,04$). Bei der Riechsensitivität lässt sich ein Trend für eine verbesserte Leistung für T-Allel-Träger erkennen ($p = 0,09$).

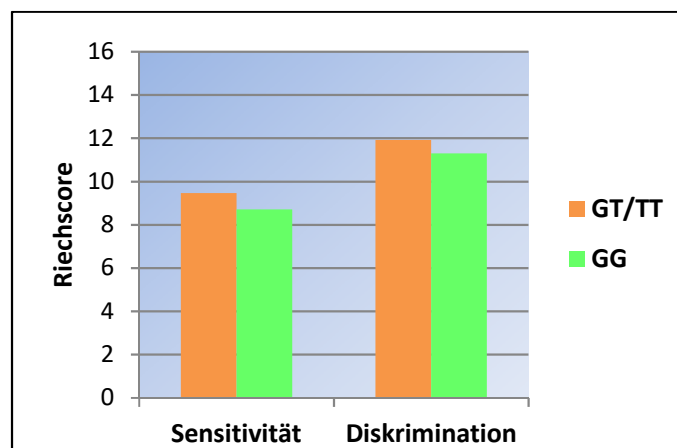


Abb. 13: TPH2: Mittelwerte der erzielten Riechleistung und Genotypen

3.3. Hypothese 2: Der Serotonintransporter-Längenpolymorphismus 5-HTTLPR beeinflusst Riechsensitivität und Diskriminationsfähigkeit

Tabelle 8: Unterschiede der Riechleistung nach Genotyp des 5-HTTLPR

5-HTTLPR	Genotypen				Signifikanz
	ss/sl		ll		
	M	SE	M	SE	<i>p</i>
Sensitivität	9,25	0,22	8,45	0,35	0,08
Diskrimination	11,87	0,18	10,81	0,35	0,01

Anmerkungen: M = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler, *p* = Signifikanzwert

Für den Längenpolymorphismus des 5-HTTLPR erkennt man eine Korrelation zwischen dem s-Allel und einer besseren Diskriminationsleistung ($p = 0,01$) und lediglich einen Trend für eine niedrigere Riechschwelle ($p = 0,08$).

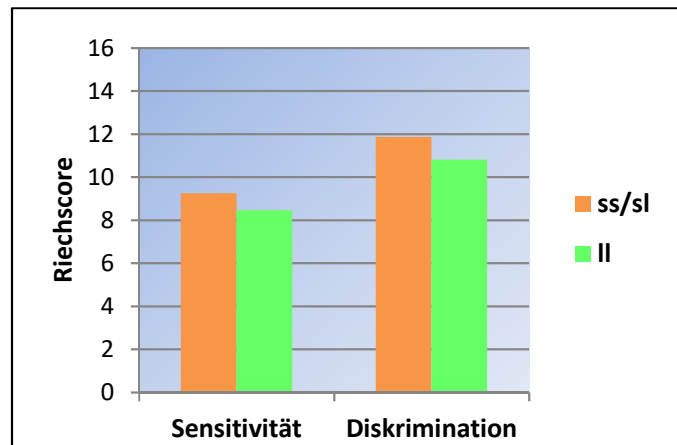


Abb. 14: 5-HTTLPR: Mittelwerte der erzielten Riechleistung und Genotypen

Um die Interaktion von Genotyp und Geschlecht auf die Riechleistung zu erfassen, wurden in einem non-parametrischen Verfahren vier Gruppen gebildet (1: Weiblich, ss/sl; 2: Männlich, ss/sl; 3: Weiblich, ll; 4: Männlich, ll). Die Gruppen wurden im

Bereich Sensitivität und auch Diskrimination untereinander verglichen. Es ergaben sich beim Vergleich der Gruppen 1 und 2, 3 und 4, als auch beim Vergleich der Gruppe 2 und 4 keine signifikanten Ergebnisse. Lediglich beim Vergleich der Mädchen mit Genotyp ss/sl und Genotyp ll wurde ein signifikanter Unterschied im Bereich der Diskrimination erkannt ($p = 0,01$). Die s-Allel-Trägerinnen wiesen eine bessere Unterscheidungsfähigkeit von Gerüchen auf, als ll-Allel-Trägerinnen. Vorher beschriebener Effekt von 5HTTLPR geht laut dieser Analyse nur auf weibliches Geschlecht zurück – bei Jungen wurde kein Einfluss des Genotyps gefunden.

3.4 Hypothese 3: Die Genvariante des Serotoninrezeptors 5-HT2C (rs518147) beeinflusst Riechsensitivität und Diskriminationsfähigkeit⁵

Tabelle 9: Unterschiede der Riechleistung nach Genotyp des 5-HT2C Rezeptors

5-HT2C (rs518147)	Genotypen				Signifikanz
	CG/CC		GG		
	M	SE	M	SE	<i>p</i>
Sensitivität	8,96	0,27	9,05	0,27	0,838
Diskrimination	11,49	0,22	11,60	0,26	0,679

Anmerkungen: M = arithmetisches Mittel, SE = Standardfehler, p = Signifikanzwert

Für den 5-HT2C Rezeptor ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse für einen Zusammenhang zwischen einer besseren Riechleistung und einem bestimmten Genotyp.

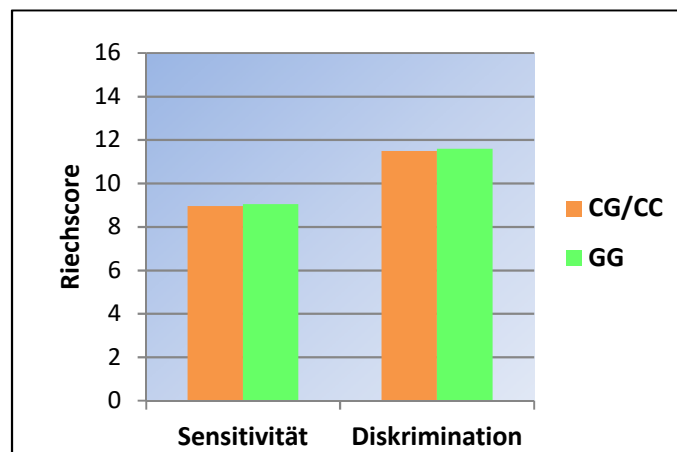


Abb. 15: 5-HT2C: Mittelwerte der erzielten Riechleistung und Genotypen

In den explorativen ANOVAs mit dem Faktor Geschlecht und den Genotypvarianten der TPH2 und des 5-HTTLPR fand sich keine Interaktion zwischen Geschlecht und Genotypen bzw. zwischen serotonergen Genotypen untereinander in Bezug auf die Riechschwelle (alle $p_s \geq 0,253$) oder die Diskriminationsleistung (alle $p_s \geq 0,207$).

3.5 Post-hoc Poweranalyse

Um die Verlässlichkeit der Ergebnisse zu überprüfen, wurde die erreichte Power post-hoc berechnet (G*Power, <http://www.gpower.hhu.de>). Die Post-hoc-Power beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der der vorliegende Test unter den realen Bedingungen für die Alternativhypothese entschieden hätte, wenn diese gültig wäre. Eine Power unter 0,8 wird als unzureichend bezeichnet. Für den 5-HTT Längenpolymorphismus betrug die erreichte Power mit der vorliegenden Zellbesetzung für die Sensitivität 0,48 und für die Diskrimination 0,8. Das Ergebnis in Bezug auf Diskriminationsfähigkeit bildet somit wahrscheinlich einen in der Population vorhandenen Unterschied ab. Für den Serotoninrezeptor 5-HT2C sowie TPH2 betrug die erreichte Power < 0.63 und die Ergebnisse sind somit kritisch zu bewerten.

Die Effektstärken sowie die erreichte Power für die Kandidatengene sind dargestellt in Tabelle 10.

Tabelle 10: Post-hoc-Poweranalyse

	TPH2 (rs4570625)		5-HTTLPR		5-HT2C (rs518147)	
	S	D	S	D	S	D
Eta²	0,02	0,02	0,02	0,04	0	0,001
Cohen`s d	0,26	0,32	0,27	0,43	0,03	0,06
Erreichte Power	0,49	0,63	0,48	0,8	0,07	0,11

Anmerkungen: Eta² = Effektstärke, S = Sensitivität, D = Diskrimination

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Einfluss serotonerger Genpolymorphismen auf die Riechleistung

In der vorliegenden Arbeit haben wir untersucht, ob sich bei gesunden Kindern ein Zusammenhang zwischen serotonergen Genvariationen (TPH2/5-HTTLPR/5-HT2C) und olfaktorischer Leistung (Diskrimination und Riechschwelle) zeigt.

Für die Untersuchung, ob der Genotyp des Serotoninsyntheseenzym TPH2 die Riechsensitivität und Diskriminationsfähigkeit beeinflusst, ergab sich folgendes Ergebnis: Für T-Allel-Träger zeigte sich eine signifikant bessere Diskriminationsfähigkeit im Vergleich zu homozygoten G-Allel-Trägern. Bei der Sensitivitätstestung fanden wir ebenfalls Hinweise auf eine verbesserte Leistung für T-Allel-Träger, welche sich statistisch allerdings lediglich als Trend manifestierte (vgl. 3.2).

Bei der Längenspolymorphismus-Typisierung von 5-HTTLPR fanden wir heraus, dass s-Allel-Träger einen signifikant höheren Diskriminationswert erzielten, im Vergleich zu homozygoten l-Allel-Trägern. Für die Riechschwelle fanden wir einen Trend mit einer etwas besseren Leistung bei s-Allel-Trägern (vgl. 3.3).

Bei der Testung, ob der Genotyp des 5-HT2C-Rezeptors Riechsensitivität und Diskrimination beeinflusst, ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse (vgl. 3.4).

Wir haben weiterhin untersucht, inwieweit sich das Geschlecht, abhängig von einem bestimmten Genotyp, auf die Riechleistung auswirkt. Hier fand sich für den 5-HTTLPR ein bedeutsamer Zusammenhang. Mädchen mit dem Genotyp ss/sl wiesen eine signifikant bessere Geruchsunterscheidung auf, als Mädchen des Genotyps ll (vgl. 3.3). Zwischen Jungen gab es keinen Unterschied. Damit geht der Einfluss des 5-HTTLPR maßgeblich auf Personen weiblichen Geschlechts zurück.

Insgesamt lässt sich sagen, dass Serotonin bzw. Bestandteile der Signalübertragung dieses Neurotransmittersystems eine Wirkung auf das Riechvermögen haben. Hierbei scheint es für die Diskriminationsfähigkeit und die Riechschwelle teilweise

unterschiedliche Mechanismen zu geben, da sich für die beiden Indikatoren des Riechvermögens nicht identische Ergebnisse zeigten. Ist also die Diskrimination stärker serotonerg beeinflusst? Im Gegensatz dazu könnte die Riechschwelle mehr durch andere neurophysiologische Mechanismen beeinflusst sein.

Hypothesenkonform (Hypothese 1 und 2) lässt sich der Einfluss des Genotyps der TPH2 und der 5-HTTLPR auf die Diskriminationsfähigkeit bestätigen. Für die Sensitivität können die Hypothesen 1 und 2 nach unseren Ergebnissen nicht eindeutig belegt werden, hier empfiehlt sich eine Vergrößerung der Stichprobengröße. Da der 5-HT2C-Polymorphismus keine signifikanten Ergebnisse aufwies, ist die Hypothese 3 zu verwerfen.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

Bisher gab es noch keine Studie, die einen Zusammenhang zwischen serotonergen Genvariationen und Riechleistung beim Menschen untersucht hat. Unsere Pilotstudie deutet darauf hin, dass Serotonin eine Rolle in der Signalübertragung beim Riechvorgang spielt. In Tierversuchen mit Mäusen wurde bereits 2009 festgestellt, dass das Geruchssignal, das im OB ankommt, durch das serotonerge System moduliert wird (Petzold et al., 2009). Durch ascendierende Stimulierung der Raphe-Kerne wurde vermehrt Serotonin im OB freigesetzt. Dies führte zu einer Verminderung des sensorischen Signals im OB. Mäuse atmen im Wachzustand sehr schnell, dies führt dazu, dass eine hohe Konzentration des Geruchsstoffes das Epithel erreicht und somit zu einem starken Signal führt. Dieses starke Signal könnte durch serotonerge Hemmung, abgeschwächt werden. Spekulativ lässt sich also sagen, dass Serotonin die Empfindlichkeit der Wahrnehmung reguliert, um möglicherweise eine Übersättigung des Systems zu verhindern (Petzold et al., 2009). Vielleicht führt diese Verbesserung der Geruchswahrnehmung zu einer verbesserten Diskriminationsfähigkeit von Gerüchen. Dies ist aber unklar. In jedem Fall scheint Serotonin im Riechsystem, sowohl beim Menschen, als auch beim Tier eine regulatorische Funktion zu besitzen.

Die TPH2 ist ein wichtiges Enzym in der Synthese von Serotonin. Sie stellt aus der Aminosäure L-Tryptophan, 5-Hydroxytryptophan her. Dies wird anschließend zu Serotonin umgewandelt. Das TPH2-Gen liegt auf Chromosom 12, dessen Produkt im

Gehirn synthetisiert wird (Walther and Bader, 2003). Der SNP rs4570625 wurde im Zusammenhang mit zahlreichen psychiatrischen Erkrankungen untersucht. Einige Studien zeigen, dass T-Allel-Träger anfälliger für Persönlichkeitsstörungen (Gutknecht et al., 2007) und Depressionen (Mandelli et al., 2012) sind. Eine weitere Studie beschäftigte sich ebenfalls mit Depressionen und diesem SNP. Hierbei erkannte man, dass ein starker Zusammenhang zwischen Depressionen und dem Promotorpolymorphismus besteht, wobei das T-Allel die Anfälligkeit dafür erhöht (Gao et al., 2012). Dem entgegen stehen Untersuchungen, bei denen das G-Allel mit Neurotizismus assoziiert wurde und homozygote T-Allel-Träger niedrigere Scores erzielten (Reuter et al., 2007a). Bei einer in vitro Studie wurde getestet, in wieweit der -703G/T Polymorphismus die Genexpression moduliert. Hierbei fand man heraus, dass je nach Genotyp die Expression von TPH2 unterschiedlich ist und dabei auch eine Interaktion mit einem anderen SNP (-473 T/A) zu einer veränderten Expression führt (Chen et al., 2008). Somit ist aber weiterhin unklar, ob das G-Allel oder das T-Allel für eine höhere Expression des Enzyms sorgt. Unsere Ergebnisse zeigten eine bessere Diskriminationsleistung bei Kindern mit T-Allel. Angenommen das T-Allel sorgt indirekt über eine vermehrte TPH2-Menge für eine höhere Serotoninproduktion, so könnte Serotonin z. B. auf GABAerge Neurone wirken (Gracia-Llanes et al., 2010), welche einen hemmenden Einfluss auf die Signalübertragung haben, wodurch eine Übersättigung des Systems verhindert wird. Dies könnte zu einer leichteren Unterscheidung von Gerüchen (Diskrimination) führen.

Für das Gen des Serotonintransporters gilt, dass das s-Allel („short-Allel“) zu einer geringeren Expression führt, als das l-Allel („long-Allel“). Dies bedeutet, dass s-Allel-Träger eine geringere Menge des Serotonintransporters besitzen und damit mehr Serotonin im synaptischen Spalt verbleibt. Die höhere Konzentration von Serotonin könnte eine verstärkte Wirkung auf andere Zellen, die an der Signalübertragung im OB beteiligt sind, haben und dadurch zu einer Ausschüttung von Dopamin (Gantz et al., 2015) und GABA führen (Schmidt and Stowbridge, 2014), was eine Hemmung der Signalübertragung zur Folge haben könnte. Dies ist aber weitestgehend unklar.

Man weiß, dass Depressionen mit einer reduzierten Riechleistung einhergehen. Beispielsweise haben depressive Patienten eine höhere Riechschwelle. Nach

erfolgreicher Therapie erreichen die Patienten einen normwertigen Riechschwellenwert (Pause et al., 2001). Eine Studie beschäftigte sich mit der Geruchsunterscheidung (Diskrimination) bei Depressionen. Hierbei fand man heraus, dass die Differenzierung von Gerüchen beim Vorliegen einer Depressionen schlechter ist (Croy et al., 2014). Bereits 1969 wurde die sogenannte „Serotonin-Hypothese“ aufgestellt, dass ein Serotoninmangel ursächlich für die Entstehung von Depressionen sei (Coppens, 1969). Da wir herausgefunden haben, dass bei homozygoten l-Allel-Trägern eine reduzierte Diskriminationsleistung vorliegt und das l-Allel mit einer geringeren 5-HT Konzentration im synaptischen Spalt assoziiert ist, passt unser Ergebnis zu dem Wissen, dass bei Depressionen eine 5-HT-Mangel-Situation vorliegt.

Für die TPH2 und für den Serotonintransporter könnten die Ergebnisse in die gleiche Richtung zeigen. Wenn mehr Serotonin im synaptischen Spalt zur Verfügung gestellt wird, könnte analog zu unseren Ergebnissen, eine bessere Differenzierung zwischen den Gerüchen erreicht werden, da eine Übersättigung des Systems durch die Wirkung hemmender Botenstoffe verhindert werden könnte.

4.3 Aussagekraft und Gültigkeit der Ergebnisse

Die vorliegende Studie befasst sich mit dem Einfluss serotonerger Genpolymorphismen auf die olfaktorische Leistung. Damit geht es auf einen aktuellen neurophysiologischen Forschungsschwerpunkt ein und trägt zum Verständnis des serotonergen Systems und dessen Einfluss auf die Riechleistung (auch im Rahmen von psychischen Erkrankungen) bei. Die Fragestellung und Hypothesen (s. 1.6) beschäftigen sich gezielt mit den kleinsten Bestandteilen der serotonergen Signalübertragung im OB. Ohne Verständnis der genauen physiologischen Zusammenhänge bei gesunden Menschen, ist es nicht möglich die Prozesse bei psychisch Erkrankten zu erklären. Deshalb wurden bei unserem Studiendesign gesunde Kinder untersucht. Zusätzlich hat diese Arbeit einen klinisch-diagnostischen Bezug. Sie zielt darauf ab, die Riechleistung als Biomarker in der Diagnostik psychischer und psychiatrischer Erkrankungen beispielsweise bei Kindern mit einem bestimmten Risikogenotyp zu nutzen.

Als Stärke im methodischen Teil der Untersuchung muss die genaue und wiederholte Erfassung von Ein- und Ausschlusskriterien genannt werden (s. 2.2.2). Psychische

Erkrankungen wurden vorab mittels des Kinder-DIPS ausgeschlossen sowie wiederholt abgefragt. Nämlich vorweg beim Telefonat zur Teilnahme an der Studie, durch die verwendeten Fragebögen (DIKJ und weitere, s. 2.2.2) und durch die erneute Befragung am Testungstag. Akribisch wurde auch auf die Erfassung von Allergien und Erkrankungen im HNO-Fachgebiet geachtet (s.2.2.4).

Zur Bestimmung der Riechleistung wurde die Testbatterie Sniffin`Sticks verwendet (s.2.2.2.2). Hierbei handelt es sich, um die standardmäßig, eingesetzte Methode in der klinischen Forschung. Sie ermöglicht valide die Unterscheidung von Gerüchen sowie die Riechschwelle zu ermitteln. Die Sniffin`Sticks Methode ist zwar zeitaufwendig, aber dadurch auch sehr genau, da beispielsweise bei der Riechschwellenbestimmung sieben Wendepunkte ermittelt werden. Aus den letzten vier Wendepunkten wird das Endergebnis errechnet. Sicherlich gibt es Unterschiede in der Durchführung je nach testender Person. Diese Fehlerquelle wurde möglichst geringgehalten, da die Testungen in der Stichprobe Carl nur von einer Person durchgeführt wurden.

Im folgenden Abschnitt soll auf mögliche Schwächen und Limitationen der Arbeit eingegangen werden. Unsere Gesamtstichprobe setzt sich aus zwei Einzelgruppen zusammen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten erhoben wurden. Man könnte meinen, dass dies einige Schwierigkeiten mit sich bringt. Trotz der zeitlichen Diskrepanz war es dennoch möglich das Studiendesign der Stichprobe Carl sehr gut auf die Stichprobe Schecklmann anzupassen. Die wichtigsten Bestandteile des Studiendesigns wurden übernommen: Ausschlusskriterien, Fragebögen, Methode der Riechtestung bzw. laborchemische Genotypisierung, statistische Auswertung. In diesem Zusammenhang könnte sich eventuell die etwas höhere Altersverteilung in der Stichprobe Schecklmann auf die Riechleistung auswirken. Es gibt Studien die zeigen, dass sich die Riechsensitivität zwischen 4 bis 14 Jahren und jungen Erwachsenen jedoch nicht signifikant unterscheidet (Lehrner et al., 1999).

In der Stichprobe Schecklmann lag der durchschnittliche IQ-Wert signifikant höher als bei der Stichprobe Carl. Jedoch wurden nur Kinder eingeschlossen mit einem IQ >80. Insgesamt nahmen an der Studie etwas mehr Mädchen als Jungen teil (m:w; 77:96). Deshalb wurden geschlechterspezifische Unterschiede der Riechleistung in

Abhängigkeit vom Genotyp untersucht. Hier fand sich nur ein signifikantes Ergebnis für Mädchen mit dem Genotyp ss/sl im Bereich der Diskrimination (s. 3.3).

Die Riechergebnisse der beiden Einzelstichproben wurden durch unterschiedliche Testleiter erhoben. Durch eventuelle geringfügige Unterschiede in der Durchführung des Sniffin`Sticks Tests könnten sich unterschiedliche Werte in der Diskriminations- und Sensitivitätsuntersuchung ergeben haben. Dies ist jedoch unklar. Die Durchführung des Tests könnte auch von der Motivation bzw. Aufmerksamkeit des Probanden abhängen, deshalb wurden die Testungen vorwiegend am Wochenende und vormittags durchgeführt.

Die Dropout-Rate lag mit ungefähr 24,5% (s. 3.1; 56 ausgeschlossene Probanden von 229 getesteten Probanden) relativ hoch. Dies lässt sich jedoch kaum vermeiden, da die Riechleistung beim Vorliegen einer psychischen Erkrankung oder Erkrankung im HNO-Fachgebiet oder durch die Einnahme von Medikamenten verändert sein kann. Um diese Fehlerquelle zu vermeiden, wurden diese Probanden ausgeschlossen.

Als Limitation ist anzumerken, dass die Zellenbesetzung der Genotypen für die Analyse des Einflusses genetischer Varianten für einige der Gene klein in Anbetracht der zu erwartenden Effekte war. In unserer Stichprobe war die Power nur für den 5-HTTLPR ausreichend. Folgeuntersuchungen mit einer größeren Stichprobe oder einer nach Genotyp stratifizierten Rekrutierung sind nötig, um den Zusammenhang zwischen serotonerem System und Riechvermögen abschließend zu klären.

4.4 Ausblick

Anknüpfend an unsere Ergebnisse werden im folgenden Text weiterführende Empfehlungen gegeben, um die Zusammenhänge der serotonergen Signalübertragung, der Riechleistung und der klinischen Relevanz wissenschaftlich zu erfassen.

Um die Ergebnisse zu bestätigen sollte eine Replikation der Studie erfolgen. Hierbei könnte auch die Untersuchung weiterer serotonerger Proteine, die nachweislich an der Signaltransduktion im OB beteiligt sind, interessant sein. Da wir keinen Einfluss des Genotyps des 5-HT_{2C}-Rezeptors auf die Riechleistung nachweisen konnten, wäre es sinnvoll weitere serotonerge Rezeptoren zu untersuchen. Hier lässt sich zum Beispiel

der 5-HT_{2A}-Rezeptor nennen. Dieser wurde auf äußeren Büschelzellen und Mitralzellen lokalisiert (Brill et al., 2016; Hardy et al., 2005). Für diesen Rezeptor wurde der -102T/C Genpolymorphismus im Zusammenhang mit suizidalem Verhalten bei depressiven Patienten untersucht (Arias et al., 2001).

Der 5-HT_{1A}-Rezeptor (Serotoninrezeptor 1A) ist in der somatodendritischen Region des Neurons lokalisiert, er kontrolliert die Aktivität der serotonergen Neurone in der Raphe (Lesch et al., 2003). Dieser Rezeptor wurde bereits im Zusammenhang mit affektiven Erkrankungen untersucht. Patienten mit Depressionen wiesen in bestimmten Hirnregionen eine geringere Menge des 5-HT_{1A}-Rezeptors auf (Wang et al., 2016). Da Depressionen mit einer schlechteren Riechleistung einhergehen (Pause et al., 2001), wäre es interessant den 5-HT_{1A}-Rezeptor im Zusammenhang mit der Riechschwelle und Diskriminationsfähigkeit zu untersuchen.

Auch die Untersuchung anderer Neurotransmittersysteme, die Einfluss auf die Signalübertragung im OB haben, könnte das Verständnis des Riechvorgangs verbessern. Einen bedeutenden Einfluss scheint neben dem serotonergen System, auch das dopaminerge System auf die Riechleistung zu haben (s. Abb.2). Dopaminerge Projektionen laufen von der *Substantia nigra* zum OB (Höglinger et al., 2015) und, wie bereits erklärt, hat das serotonerge System über Dopamin eine hemmende Wirkung auf die Signalübertragung. Diese Inhibition im OB wird vorwiegend durch den DRD₂-Rezeptor (Dopaminrezeptor D₂) vermittelt (Ennis et al., 2001), wodurch die Unterscheidungsfähigkeit von Gerüchen ermöglicht werden könnte. Das dopaminerge System ist an der Pathophysiologie von ADHS beteiligt, denn das Psychostimulanz Methylphenidat beeinflusst die dopaminerge Signaltransduktion. In diesem Zusammenhang wurde die Riechleistung bei ADHS Kindern mit und ohne Medikation untersucht. Es zeigte sich hier eine Normalisierung der Riechschwelle bei Probanden mit Medikation (Romanos et al., 2008). Die Interaktion des dopaminergen und serotonergen Systems sollte in zukünftigen Studien miteinbezogen werden.

Methodisch könnte die objektive Olfaktometrie, zur Erfassung genauerer Ergebnisse, in der klinischen Forschung Anwendung finden. Einige HNO-Zentren in Deutschland

(z.B. Berlin, Jena u.a.) nutzen das Olfaktometer bereits für Gutachterfragestellungen und aktuelle HNO-Forschungsthemen.

Insgesamt legt diese Arbeit eine komplexe Interaktion zwischen genetischen Varianten des serotonergen Systems und Riechdiskrimination bei Kindern und Jugendlichen nahe, welche durch weitere wissenschaftliche Untersuchungen erforscht werden sollte.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zum Thema „Untersuchungen zum Einfluss serotonerger Genvariationen auf olfaktorische Performanz“ beschäftigt sich mit dem Zusammenhang zwischen serotonergen Genvarianten und der olfaktorischen Leistung bei gesunden Kindern. Unsere Hypothesen befassen sich mit dem Einfluss des Genotyps der Tryptophanhydroxylase 2 (TPH2, rs4570625 oder -703G/T), des Serotonintransporters (5-HTT, Serotonintransporter-Längenpolymorphismus 5-HTTLPR) und des Serotoninrezeptors 5-HT2C (rs518147 oder -697G/C) auf die Riechsensitivität und Diskriminationsleistung.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Genotyp der TPH2 einen maßgeblichen Einfluss auf die Diskriminationsleistung im OB hat. Wir fanden heraus, dass T-Allel-Träger im Vergleich zu G-Allel Trägern Gerüche signifikant besser unterscheiden können. Das G-Allel könnte zu einer geringeren Expression von TPH2 führen. Dadurch würde weniger Serotonin synthetisiert als bei T-Allel-Trägern. Für den Serotonintransporter ergaben sich ebenfalls bei der Geruchsdiskrimination höhere Werte bei Kindern mit dem Genotyp ss/sl als bei Kindern mit dem Genotyp ll. S-Allel-Träger haben eine geringere Menge des Serotonintransporters. Somit verbleibt mehr Serotonin im synaptischen Spalt. Insgesamt lässt sich also sagen, dass mehr vorhandenes Serotonin zu einer besseren Geruchsunterscheidung führen könnte. Für beide genannten Gene zeigte sich auch ein Trend für eine verbesserte Riechsensitivität. Hierbei scheint es für die Diskriminationsfähigkeit und die Riechschwelle teilweise unterschiedliche Mechanismen zu geben, da sich für die beiden Indikatoren des Riechvermögens nicht identische Ergebnisse zeigten. Der 5-HTC-Rezeptorpolymorphismus hat scheinbar keinen Einfluss auf die Riechleistung.

Mit dieser Studie ist der Nachweis gelungen, dass der Genotyp der zwei oben genannten serotonergen Gene, die Diskriminationsleistung von gesunden Kindern beeinflusst. Diesen Ergebnissen könnte in Zukunft eine klinische Relevanz zukommen. Serotonin ist an der Pathophysiologie zahlreicher psychischer Erkrankungen beteiligt. Wir haben die oben genannten Kandidatengene ausgewählt, da sie in der Literatur bereits vielfach im Zusammenhang mit bestimmten psychiatrischen, auch kinderpsychiatrischen

Krankheiten untersucht wurden. Man weiß aus Tiermodell-Studien mit Mäusen, dass serotonerge Fasern von den Raphe-Kernen zum OB ziehen (Kapoor et al., 2016) und das serotonerge System an der Signalübertragung zwischen den verschiedenen Zelltypen im OB beteiligt ist. Da einige psychiatrische und neuropsychiatrische Erkrankungsbilder mit einer veränderten Riechleistung einhergehen, ist es interessant herauszufinden, zu welchen Veränderungen der Riechleistung, krankheitsbedingte Modifikationen im serotonergen System führen können. Dies zielt darauf ab, die Riechleistung als Biomarker für diagnostische und auch therapeutischen Fragestellungen zu nutzen.

6. Literaturverzeichnis

- Albrecht, J., Wiesmann, M. (2006). Das olfaktorische System des Menschen. *Nervenarzt*, 77, 931–939.
- Arias, B., Gastó, C., Catalán, R., Gutiérrez, B., Pintor, L., Fañanás, L. (2001). The 5-HT_{2A} receptor gene 102T/C polymorphism is associated with suicidal behavior in depressed patients. *American Journal of Medical Genetics*, 105, 801–804.
- Aranson, H.A., Strowbridge, B.W. (2017). Spatial structure of synchronized inhibition in the olfactory bulb. *Journal Neuroscience*, 1004–17.
- Atanasova, B., Graux, J., El Hage, W., Hommet, C., Camus, V., Belzung, C. (2008). Olfaction: A potential cognitive marker of psychiatric disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Review* 32, 1315–1325.
- Berkowicz, D.A., Trombley, P.Q., Shepherd, G.M. (1994). Evidence for glutamate as the olfactory receptor cell neurotransmitter. *Journal Neurophysiology*, 71, 2557–2561.
- Blakely, R.D., De Felice, L.J., Hartzell, H.C. (1994). Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *Journal of Experimental Biology*, 196, 263–281.
- Brand, G., 2006. Olfactory/trigeminal interactions in nasal chemoreception. *Neuroscience & Biobehavioral Review*, 30, 908–917.
- Brewer, W.J., Castle, D.J., Pantelis, C. (2006). *Olfaction and the Brain*. Cambridge University Press Cambridge.
- Brill, J., Shao, Z., Puche, A.C., Wachowiak, M., Shipley, M.T. (2016). Serotonin increases synaptic activity in olfactory bulb glomeruli. *Journal Neurophysiology*, 115, 1208–1219.
- Caglayan, H.Z.B., Irkeç, C., Nazliel, B., Gurses, A.A., Capraz, I. (2016). Olfactory functioning in early multiple sclerosis: Sniffin' Sticks Test study. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 12, 2143.
- Canli, T., Lesch, K.-P. (2007). Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nature Neuroscience*, 10, 1103–1109.
- Chen, G.-L., Vallender, E.J., Miller, G.M. (2008). Functional characterization of the human TPH2 5' regulatory region: untranslated region and polymorphisms modulate gene expression in vitro. *Human Genetics*, 122, 645–657.
- Clepce, M., Reich, K., Gossler, A., Kornhuber, J., Thuerauf, N. (2012). Olfactory abnormalities in anxiety disorders. *Neuroscience Letters* 511, 43–46.

- Coppen, A.J. (1969). Biochemical aspects of depression. *International Journal of Psychiatry in Clinical Practice*, 6, 53–81.
- Croy, I., Symmank, A., Schellong, J., Hummel, C., Gerber, J., Joraschky, P., Hummel, T. (2014). Olfaction as a marker for depression in humans. *Journal of Affective Disorders*, 160, 80–86.
- Damm, M. (2007). Diagnostik von Riechstörungen-Standards und Forschung. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 86, 565–572.
- Daum, R.F., Sekinger, B., Kobal, G., Lang, C.J. (2000). Olfactory testing with "sniffin'sticks" for clinical diagnosis of Parkinson disease. *Nervenarzt*, 71, 643–650.
- Dileo, J.F., Brewer, W.J., Hopwood, M., Anderson, V., Creamer, M. (2008). Olfactory identification dysfunction, aggression and impulsivity in war veterans with post-traumatic stress disorder. *Psychological Medicine*, 38, 523–531.
- Döpfner, M., Görtz-Dorten, A., Lehmkuhl, G., Breuer, D. (2008). Diagnostik-System für psychische Störungen nach ICD-10 und DSM-IV für Kinder und Jugendliche-II (DISYPS-II). Hogrefe.
- Döpfner, M., Melchers, P., Fegert, J., Lehmkuhl, G., Lehmkuhl, U., Schmeck, K., Steinhausen, H.-C., Poustka, F. (1994). Deutschsprachige Konsensus-Versionen der Child Behavior Checklist (CBCL 4-18), der Teacher Report Form (TRF) und der Youth Self Report Form (YSR). *Kindheit und Entwicklung*, 3, 54–59.
- Dugué, G.P., Mainen, Z.F. (2009). How serotonin gates olfactory information flow. *Nature Neuroscience*, 12, 673–675.
- Eichholz, S. (2004). Objektive Riechprüfung mit kognitiven Potentialen durch Aufzeichnung olfaktorisch evozierter Potentiale (OEP) und der kontingenten negativen Variation (CNV). Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät-Universitätsklinikum Charité.
- Ennis, M., Zhou, F.-M., Ciombor, K.J., Aroniadou-Anderjaska, V., Hayar, A., Borrelli, E., Zimmer, L.A., Margolis, F., Shipley, M.T. (2001). Dopamine D2 Receptor-Mediated Presynaptic Inhibition of Olfactory Nerve Terminals. *Journal Neurophysiology*, 86, 2986–2997.
- Frank, R.A., Dulay, M.F., Gesteland, R.C. (2003). Assessment of the Sniff Magnitude Test as a clinical test of olfactory function. *Physiology & Behavior*, 78, 195–204.
- Frank, R. A., Dulay, M.F., Niergarth, K.A., Gesteland, R.C. (2004): A comparison of the sniff magnitude test and the University of Pennsylvania Smell Identification Test in children and nonnative English speakers. *Physiology&Behavior*, 81, (3), 475-480.

- Freitag, C.M., Domschke, K., Rothe, C., Lee, Y.-J., Hohoff, C., Gutknecht, L., Sand, P., Fimmers, R., Lesch, K.-P., Deckert, J. (2006). Interaction of serotonergic and noradrenergic gene variants in panic disorder. *Psychiatric Genetics*, 16, 59–65.
- Gantz, S.C., Levitt, E.S., Llamosas, N., Neve, K.A., Williams, J.T. (2015). Depression of serotonin synaptic transmission by the dopamine precursor L-DOPA. *Cell Reports*, 12, 944–954.
- Gao, J., Pan, Z., Jiao, Z., Li, F., Zhao, G., Wei, Q., Pan, F., Evangelou, E. (2012). TPH2 gene polymorphisms and major depression—a meta-analysis. *Plos One*, 7, e36721.
- Gerull, G., Mielke, G., Mrowinski, D. (1981). Olfactory stimulation and contingent negative-variation (CNV). *EEG-EMG Zeitschrift für Elektroenzephalographie, Elektromyographie und Verwandte Gebiete*, 12, 125–127.
- Godlewska, B.R., Olajosy-Hilkesberger, L., Ciwoniuk, M., Olajosy, M., Marmurowska-Michalowska, H., Limon, J., Landowski, J. (2009). Olanzapine-induced weight gain is associated with the -759C/T and -697G/C polymorphisms of the HTR2C gene. *Pharmacogenomics Journal*, 9, 234–241.
- Godoy, M.D.C.L., Voegels, R.L., Pinna, F. de R., Imamura, R., Farfel, J.M. (2015). Olfaction in neurologic and neurodegenerative diseases: a literature review. *International Archives of Otorhinolaryngology*, 19, 176–179.
- Gracia-Llanes, F.J., Blasco-Ibáñez, J.M., Nacher, J., Varea, E., Liberia, T., Martínez, P., Martínez-Guijarro, F.J., Crespo, C. (2010). Synaptic connectivity of serotonergic axons in the olfactory glomeruli of the rat olfactory bulb. *Neuroscience*, 169, 770–780.
- Gutknecht, L., Jacob, C., Strobel, A., Kriegebaum, C., Müller, J., Zeng, Y., Markert, C., Escher, A., Wendland, J., Reif, A. (2007). Tryptophan hydroxylase-2 gene variation influences personality traits and disorders related to emotional dysregulation. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 10, 309–320.
- Haehner, A., Hummel, T., Reichmann, H. (2009). Olfactory dysfunction as a diagnostic marker for Parkinson's disease. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 9, 1773–1779.
- Hardy, A., Palouzier-Paulignan, B., Duchamp, A., Royet, J.-P., Duchamp-Viret, P. (2005). 5-Hydroxytryptamine action in the rat olfactory bulb: in vitro electrophysiological patch-clamp recordings of juxtglomerular and mitral cells. *Neuroscience*, 131, 717–731.
- Hariri, A.R., Mattay, V.S., Tessitore, A., Kolachana, B., Fera, F., Goldman, D., Egan, M.F., Weinberger, D.R. (2002). Serotonin transporter genetic variation and the response of the human amygdala. *Science*, 297, 400–403.

- Hatt, H. (2007). Geschmack und Geruch, in: Physiologie des Menschen. Springer, pp. 421–436.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stöber, G., Riederer, P., Bengel, D., Lesch, K.P. (1996). Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *Journal Neurochemistry*, 66, 2621–2624.
- Höglinger, G.U., Alvarez-Fischer, D., Arias-Carrión, O., Djufri, M., Windolph, A., Keber, U., Borta, A., Ries, V., Schwarting, R.K., Scheller, D. (2015). A new dopaminergic nigro-olfactory projection. *Acta Neuropathologica (Berlin)*, 130, 333–348.
- Huang, Z., Thiebaud, N., Fadool, D.A. (2017). Differential serotonergic modulation across the main and accessory olfactory bulbs. *Journal of Physiology*, 595, 3515–3533.
- Hummel, T., Sekinger, B., Wolf, S.R., Pauli, E., Kobal, G. (1997). ‘Sniffin’sticks’’: olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold. *Chemical Senses*, 22, 39–52.
- Jokisch, D., Bellebaum, C., Daum, I. (2005). Das serotonerge System und Kognition, in: *Das Serotonerge System Aus Neurologischer Und Psychiatrischer Sicht*. Springer, pp. 39–53.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Biochemistry, D. of, Jessell, M.B.T., Siegelbaum, S., Hudspeth, A.J. (2000). *Principles of neural science*. McGraw-hill New York.
- Kapoor, V., Provost, A.C., Agarwal, P., Murthy, V.N. (2016). Activation of raphe nuclei triggers rapid and distinct effects on parallel olfactory bulb output channels. *Nature Neuroscience*, 19, 271–282.
- Kenna, G.A., Roder-Hanna, N., Leggio, L., Zywiak, W.H., Clifford, J., Edwards, S., Kenna, J.A., Shoaff, J., Swift, R.M. (2012). Association of the 5-HTTLPR gene-linked promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with psychiatric disorders: review of psychopathology and pharmacotherapy, 5, 19–35.
- Kiyokage, E., Pan, Y.-Z., Shao, Z., Kobayashi, K., Szabo, G., Yanagawa, Y., Obata, K., Okano, H., Toida, K., Puche, A.C. (2010). Molecular identity of periglomerular and short axon cells. *Journal Neuroscience*, 30, 1185–1196.
- Kobal, G. (1981). *Elektrophysiologische Untersuchungen des menschlichen Geruchssinns*. Thieme.
- Kobal, G., Hummel, C. (1988). Cerebral chemosensory evoked potentials elicited by chemical stimulation of the human olfactory and respiratory nasal mucosa. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section*, 71, 241–250.

- Kobal, G., Stefan, H. (1995). Diagnostische Methoden zur Erfassung von Riechstörungen bei neurologischen Erkrankungen. *Nervenarzt*, 66, 869–884.
- Kohli, P., Soler, Z.M., Nguyen, S.A., Muus, J.S., Schlosser, R.J. (2016). The Association Between Olfaction and Depression: A Systematic Review. *Chemical Senses*, 41, 479–486.
- Kriegebaum, C., Gutknecht, L., Schmitt, A., Lesch, K.-P., Reif, A. (2010). Serotonin Kompakt–Teil 1. *Fortschritte der Neurologie Psychiatrie*, 78, 319–331.
- Lehrner, J.P., Glück, J., Laska, M. (1999). Odor identification, consistency of label use, olfactory threshold and their relationships to odor memory over the human lifespan. *Chemical Senses*, 24, 337–346.
- Lesch, K.P. (2003). Neuroticism and serotonin: a developmental genetic perspective in: *Behavioral genetics in the postgenomic era*. American Psychological Association, pp. 389–423.
- Lesch, K.-P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S.Z. (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*, 274, 1527.
- Linster, C., Cleland, T.A. (2016). Neuromodulation of olfactory transformations. *Current Opinion in Neurobiology*, 40, 170–177.
- Liu, S., Aungst, J.L., Puche, A.C., Shipley, M.T. (2011). Serotonin modulates the population activity profile of olfactory bulb external tufted cells. *Journal Neurophysiology*, 107, 473–483.
- Livermore, A., Hummel, T. (2004). The influence of training on chemosensory event-related potentials and interactions between the olfactory and trigeminal systems. *Chemical Senses*, 29, 41–51.
- Mandelli, L., Antypa, N., Nearchou, F.A., Vaiopoulos, C., Stefanis, C.N., Serretti, A., Stefanis, N.C. (2012). The role of serotonergic genes and environmental stress on the development of depressive symptoms and neuroticism. *Journal of Affective Disorders*, 142, 82–89.
- Martzke, J.S., Kopala, L.C., Good, K.P. (1997). Olfactory dysfunction in neuropsychiatric disorders: review and methodological considerations. *Biological Psychiatry*, 42, 721–732.
- Matern, G., Matthias, C., Mrowinski, D. (1995). Olfaktorisch evozierte Potentiale (OEP) und Contingent Negative Variation (CNV) bei der Begutachtung von Riechstörungen. *Laryngo-Rhino-Otologie*, 74, 118–121.
- Meer, D., Hartman, C.A., Richards, J., Bralten, J.B., Franke, B., Oosterlaan, J., Heslenfeld, D.J., Faraone, S.V., Buitelaar, J.K., Hoekstra, P.J. (2014). The serotonin transporter gene polymorphism 5-HTTLPR moderates the effects of

- stress on attention-deficit/hyperactivity disorder. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 55, 1363–1371.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215.
- Mosienko, V., Matthes, S., Hirth, N., Beis, D., Flinders, M., Bader, M., Hansson, A.C., Alenina, N. (2014). Adaptive changes in serotonin metabolism preserve normal behavior in mice with reduced TPH2 activity. *Neuropharmacology*, 85, 73–80.
- Nagayama, S., Homma, R., Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 8, 98.
- Negoias, S., Croy, I., Gerber, J., Puschmann, S., Petrowski, K., Joraschky, P., Hummel, T. (2010). Reduced olfactory bulb volume and olfactory sensitivity in patients with acute major depression. *Neuroscience*, 169, 415–421.
- Pause, B.M., Miranda, A., Göder, R., Aldenhoff, J.B., Ferstl, R. (2001). Reduced olfactory performance in patients with major depression. *Journal of Psychiatric Research*, 35, 271–277.
- Pelka-Wysiecka, J., Wronski, M., Samochowiec, J. (2015). Odors Identification Differences in Deficit and Nondeficit Schizophrenia. *European Psychiatry*, 30, 1678.
- Petzold, G.C., Hagiwara, A., Murthy, V.N. (2009). Serotonergic modulation of odor input to the mammalian olfactory bulb. *Nature Neuroscience*, 12, 784–791.
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R., Deutzmann, R. (2006). *Biochemie. Duale Reihe*. Stuttgart.
- Reuter, M., Kuepper, Y., Hennig, J. (2007a). Association between a polymorphism in the promoter region of the TPH2 gene and the personality trait of harm avoidance. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 10, 401–404.
- Reuter, M., Ott, U., Vaitl, D., Hennig, J. (2007b). Impaired executive control is associated with a variation in the promoter region of the tryptophan hydroxylase 2 gene. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 19, 401–408.
- Risselada, A.J., Vehof, J., Bruggeman, R., Wilffert, B., Cohen, D., Al Hadithy, A.F., Arends, J., Mulder, H. (2012). Association between HTR2C gene polymorphisms and the metabolic syndrome in patients using antipsychotics: a replication study. *Pharmacogenomics Journal*, 12, 62–67.
- Romanos, M., Renner, T.J., Schecklmann, M., Hummel, B., Roos, M., von Mering, C., Pauli, P., Reichmann, H., Warnke, A., Gerlach, M. (2008). Improved odor sensitivity in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological Psychiatry*, 64, 938–940.

- Romanos, M., Schecklmann, M., Kraus, K., Fallgatter, A.J., Warnke, A., Lesch, K.-P., Gerlach, M. (2011). Olfactory deficits in deletion syndrome 22q11. 2. *Schizophrenia Research*, 129, 220–221.
- Schaal, B. (1988). Olfaction in infants and children: developmental and functional perspectives. *Chemical Senses*, 13, 145–190.
- Schecklmann, M., Schwenck, C., Taurines, R., Freitag, C., Warnke, A., Gerlach, M., Romanos, M. (2013). A systematic review on olfaction in child and adolescent psychiatric disorders. *Journal of Neural Transmission*, 120, 121–130.
- Schmidt, L.J., Strowbridge, B.W. (2014). Modulation of olfactory bulb network activity by serotonin: synchronous inhibition of mitral cells mediated by spatially localized GABAergic microcircuits. *Learning & Memory*, 21, 406–416.
- Serby, M., Corwin, J., Conrad, P., Rotrosen, J. (1985). Olfactory dysfunction in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *American Journal of Psychiatry* 142, 781-a–782.
- Silbernagel, S. (2012). *Taschenatlas Physiologie*, 8. Auflage. ed. Thieme, Würzburg.
- Spoida, K., Masseck, O.A., Deneris, E.S., Herlitze, S. (2014). Gq/5-HT_{2c} receptor signals activate a local GABAergic inhibitory feedback circuit to modulate serotonergic firing and anxiety in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 6479–6484.
- Steinfeld, R., Herb, J.T., Sprengel, R., Schaefer, A.T., Fukunaga, I. (2015). Divergent innervation of the olfactory bulb by distinct raphe nuclei. *Journal of Comparative Neurology*, 523, 805–813.
- Strutz, J., Mann, W.J. (2009). *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf-und Halschirurgie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Takahashi, T., Itoh, H., Nishikawa, Y., Higuchi, Y., Nakamura, M., Sasabayashi, D., Nishiyama, S., Mizukami, Y., Masaoka, Y., Suzuki, M. (2015). Possible relation between olfaction and anxiety in healthy subjects. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 69, 431–438.
- Tatti, R., Bhaukaurally, K., Gschwend, O., Seal, R.P., Edwards, R.H., Rodriguez, I., Carleton, A. (2014). A population of glomerular glutamatergic neurons controls sensory information transfer in the mouse olfactory bulb. *Nature Communications*, 5, 3791.
- Vasterling, J.J., Brailey, K., Sutker, P.B. (2000). Olfactory identification in combat-related posttraumatic stress disorder. *Journal of Traumatic Stress*, 13, 241–253.
- Walther, D.J., Bader, M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochemical Pharmacology*, 66, 1673–1680.

- Weiss, R.H. (2006). CFT 20-R: Grundintelligenztest Skala 2-Revision. Hogrefe.
- Wolfensberger, M. (2000). Sniffin'Sticks: a new olfactory test battery. *Acta Oto-Laryngologica* (Stockholm), 120, 303–306.
- Wolfensberger, M., Schnieper, I. (1999). Sniffin'Sticks®: Ein neues Instrument zur Geruchsprüfung im klinischen Alltag. *HNO* 47, 629–636.
- Xu, X., Brookes, K., Sun, B., Ilott, N., Asherson, P. (2009). Investigation of the serotonin 2C receptor gene in attention deficit hyperactivity disorder in UK samples. *BMC Research Notes*, 2, 71.

IV Anhang

IV.1 Aufklärung und Einverständniserklärung für Eltern von Kontrollkindern

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie,
Psychosomatik und Psychotherapie

Direktor: Prof. Dr. med. Marcel Romanos

KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN UND GENOMISCHE HIRNFUNKTIONSMESSUNG ZU RIECHSTÖRUNGEN BEI PSYCHIATRISCHEN ERKRANKUNGEN

SINN UND ZWECK DER UNTERSUCHUNG

Bei Kindern mit verschiedenen kinder- und jugendpsychiatrischen Krankheitsbildern ergaben sich Hinweise darauf, dass bei den Betroffenen die Riechwahrnehmung beeinträchtigt sein könnte. Bei anderen Erkrankungen wie Morbus Parkinson (Schüttellähmung) werden Riechtests als Früherkennungsmethoden eingesetzt. Wir möchten daher untersuchen, inwiefern Kinder und Jugendliche mit einer Aktivitäts- und Aufmerksamkeitsstörung, Psychose oder Anorexie in Riechtests Defizite aufweisen.

Außerdem wollen wir überprüfen, ob sich die klinische Riechleistung in einer neurophysiologischen Untersuchung widerspiegelt. Um die Ergebnisse sinnvoll auswerten zu können, benötigen wir eine gesunde Vergleichsgruppe. Möglicherweise könnten die Ergebnisse dazu beitragen, zukünftig die Diagnostik und Therapie der Störung zu verbessern.

WIE FUNKTIONIERT EIN RIECHTEST?

In der Untersuchung findet ein kommerzieller Riechtest („Sniffin Sticks“, Firma Burghart, Wedel) Verwendung. Die Testung dauert insgesamt maximal 30 Minuten. Der Test besteht aus drei Teilen, die der Bestimmung der Wahrnehmungsschwelle, der Unterscheidung von Gerüchen, sowie der Erkennung von Gerüchen dienen. Den Probanden werden nach Ankündigung für ca. 3 Sekunden filzstiftähnliche Stifte 2 cm vor die Nase gehalten. Nach Öffnen der Kappe verströmen natürliche und künstliche

Aromen. Teilweise muss bei der Testung eine Schlafbrille getragen, um das Ergebnis durch unterschiedliches Aussehen der Stifte nicht zu verfälschen.

Nach der Auswertung wird das Ergebnis der Riechprüfung sofort mitgeteilt.

WELCHE NEBENWIRKUNGEN KÖNNEN AUFTRETEN?

Nebenwirkungen sind nicht bekannt. Alle dargebotenen Gerüche sind gesundheitlich unbedenklich und in herkömmlichen Kosmetikprodukten enthalten.

WIE FUNKTIONIERT DIE HIRNFUNKTIONSMESSUNG?

Der Test dauert höchstens 45 Minuten. Mit der Nah-Infrarot Spektroskopie (NIRS) kann man ohne Schmerzen und ohne in den Körper eingreifen zu müssen, die Durchblutung des Gehirns messen. Dazu werden Messinstrumente in einer kleinen Gummipatte auf die Kopfhaut gelegt und mit einem Gummiband befestigt. Diese Messinstrumente sind kleine Lampen, die ganz bestimmtes unschädliches Licht abgeben und die messen können, wie viel Licht vom Gehirn zurückgeworfen wird. Aus diesem Messergebnis kann dann errechnet werden, wie sich die Durchblutung des Gehirns ändert.

Mit dem Elektroenzephalogramm (EEG) werden an der Kopfoberfläche die schwachen elektrischen Ströme gemessen, mit denen das Gehirn arbeitet. Hierfür werden mit einer Paste Messelektroden auf die Kopfhaut geklebt. Die Hirnstrommessung selbst ist nicht zu bemerken. Die Paste lässt sich problemlos durch Haare waschen wieder entfernen.

IST DIE UNTERSUCHUNG GEFÄHRLICH?

Sowohl die NIRS wie auch die EEG-Untersuchung sind völlig ungefährlich und es gibt keine bekannten Nebenwirkungen.

BLUTENTNAHME

Zur genetischen Analyse werden 20 ml Blut aus der Armvene entnommen. An der Einstichstelle kann es zu einem Hämatom („blauen Fleck“) kommen.

WELCHE ANDEREN UNTERSUCHUNGEN WERDEN GEMACHT?

Die Untersuchungen, die abgesehen von der eigentlichen Riechtestung durchgeführt werden, dienen dem klinischen Ausschluss kinder- und jugendpsychiatrischer Störungen und werden in gleicher Weise bei allen Patientengruppen durchgeführt. Es kommen verschiedene Fragebögen zum Einsatz, außerdem führen wir mit Ihnen ein Interview durch, in dem wir Sie nach verschiedenen möglichen Problemen Ihres Kindes befragen.

IST DIE TEILNAHME FREIWILLIG? KANN SIE WIDERRUFEN WERDEN?

Die Teilnahme an dieser Studie ist absolut freiwillig. Die Teilnahme kann jederzeit und ohne Angabe von Gründen auch während der Untersuchung widerrufen werden, ohne dass daraus irgendwelche Nachteile entstehen.

DATENSCHUTZERKLÄRUNG

Für diese Untersuchung werden die personenbezogenen Daten und die Ergebnisse der Riechprüfung elektronisch gespeichert. Alle Daten werden vertraulich behandelt und nur zu wissenschaftlichen Zwecken verwendet. Die Bestimmungen des Datenschutzes werden eingehalten.

EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG

Diese Informationen habe ich gelesen und verstanden. Die Studie wurde vom Untersuchungsleiter erklärt, alle auftretenden Fragen wurden ausreichend beantwortet. Mit der Durchführung der oben beschriebenen Untersuchungen sowie einer Speicherung, Verarbeitung und evtl. Veröffentlichung der erhobenen Messwerte in wissenschaftlichen Fachzeitschriften in anonymisierter Form (d. h. ohne Angabe des Namens) bin ich einverstanden.

Ich erkläre mich einverstanden, dass mein Kind _____ an der oben beschriebenen Studie teilnimmt.

_____:_____:_____

Datum

Sorgeberechtigte/r

Untersuchungsleiter/in

IV.2 Aufklärung und Einverständniserklärung für gesunde Kinder & Jugendliche

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie,
Psychosomatik und Psychotherapie

Direktor: Prof. Dr. med. Marcel Romanos

KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN UND HIRNFUNKTIONELLE MESSUNGEN ZU RIECHSTÖRUNGEN BEI PSYCHIATRISCHEN ERKRANKUNGEN

SINN UND ZWECK DER UNTERSUCHUNG

Manche Kinder und Jugendliche mit bestimmten psychischen Erkrankungen scheinen schlechter riechen zu können als gesunde Kinder. Mit einer Riechprüfung und einer Hirnfunktionsmessung können wir den Geruchssinn dieser Kinder mit dem von gesunden vergleichen. Durch Deine Teilnahme hilfst Du uns, diese Riechstörungen bei psychisch kranken Kindern zu erkennen, und möglicherweise kann die Untersuchung dazu beitragen, zukünftig den Kindern besser zu helfen.

WIE FUNKTIONIERT EIN RIECHTEST?

Der Test dauert insgesamt maximal 30 Minuten. Dabei ist es wichtig, dass Du eine Brille trägst, durch die Du nichts sehen kannst. Erst dann halten wir Dir Geruchsproben, die wie Filzstifte ausschauen, nah an Deine Nase. Du hast drei verschiedene Aufgaben: 1. Einen bestimmten Geruch herausriechen, der immer schwächer wird, 2. verschiedene Gerüche unterscheiden, 3. Gerüche erkennen und beim Namen nennen.

Nach der Auswertung wird Dir das Ergebnis der Riechprüfung sofort mitgeteilt.

WELCHE NEBENWIRKUNGEN KÖNNEN AUFTRETEN?

Nebenwirkungen sind nicht bekannt. Alle Gerüche sind ungefährlich und in vielen anderen Kosmetikprodukten enthalten.

WIE FUNKTIONIERT DIE HIRNFUNKTIONSMESSUNG?

Der Test dauert höchstens 45 Minuten. Mit der Nah-Infrarot Spektroskopie (NIRS) kann man ohne Schmerzen und ohne in den Körper eingreifen zu müssen, die Durchblutung des Gehirns messen. Dazu werden Messinstrumente in einer kleinen Gummipatte auf die Kopfhaut gelegt und mit einem Gummiband befestigt. Diese Messinstrumente sind kleine Lampen, die ganz bestimmtes unschädliches Licht abgeben und die messen können, wie viel Licht vom Gehirn zurückgeworfen wird. Aus diesem Messergebnis kann dann errechnet werden, wie sich die Durchblutung des Gehirns ändert.

Mit dem Elektroenzephalogramm (EEG) werden an der Kopfoberfläche die schwachen elektrischen Ströme gemessen, mit denen das Gehirn arbeitet. Hierfür werden mit einer Paste Messelektroden auf die Kopfhaut geklebt. Die Hirnstrommessung selbst ist nicht zu bemerken. Die Paste lässt sich problemlos durch Haare waschen wieder entfernen.

IST DIE UNTERSUCHUNG GEFÄHRLICH?

Sowohl die NIRS wie auch die EEG-Untersuchung sind völlig ungefährlich und es gibt keine bekannten Nebenwirkungen.

BLUTENTNAHME

Um zu sehen, ob das Riechen mit der Vererbung zusammenhängt nehmen wir Dir zwei Röhrchen Blut ab. Manchmal bildet sich dort ein blauer Fleck, der aber nach ein paar Tagen wieder weggeht.

WELCHE ANDEREN UNTERSUCHUNGEN WERDEN GEMACHT?

Zusätzlich zum Riechtest füllen Du und Deine Eltern Fragebögen aus und wir stellen Dir und Deinen Eltern noch weitere Fragen. Dies wird genauso gemacht bei den Kindern mit psychischen Erkrankungen, um zu erfahren, in welchen Situationen sie bestimmte Schwierigkeiten haben.

IST DIE TEILNAHME FREIWILLIG? KANN SIE WIDERRUFEN WERDEN?

Die Teilnahme an dieser Studie ist absolut freiwillig. Die Teilnahme kann jederzeit und ohne Angabe von Gründen auch während der Untersuchung abgebrochen werden, ohne dass Dir daraus irgendwelche Nachteile entstehen.

DATENSCHUTZERKLÄRUNG

Für diese Untersuchung werden die Daten über Dich und die Ergebnisse des Riechtests im Computer gespeichert. Die Bestimmungen des Datenschutzes werden eingehalten.

EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG

Diese Informationen habe ich gelesen und verstanden. Die Studie wurde vom Untersuchungsleiter erklärt, alle auftretenden Fragen wurden ausreichend beantwortet. Mit der Durchführung der oben beschriebenen Untersuchungen sowie einer Speicherung, Verarbeitung und evtl. Veröffentlichung der erhobenen Messwerte in wissenschaftlichen Fachzeitschriften in anonymisierter Form (d. h. ohne Angabe des Namens) bin ich einverstanden.

Ich wurde darüber informiert, dass die Teilnahme an der Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für mich abgebrochen werden kann.

Ich, _____

Vor- und Nachname

erkläre mich somit einverstanden, an der oben beschriebenen Studie teilzunehmen.

Datum

Proband/in

Untersuchungsleiter/in

Schwelle: Beidseitige Testung

Verdünnung	↑(++)	↓(-)	↑(++)	↓(-)	↑(++)	↓(-)	↑(++)
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							

Diskrimination: Beidseitige Testung

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Rot																
Grün																
Blau																

Grün ist korrekt!

V Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Romanos für die Überlassung des Dissertationsthemas, die wissenschaftlichen Anregungen und auch die freundliche Unterstützung.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Frau Dr. Julia Geissler, sowie Herrn Dr. Carsten Drepper für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Umsetzung, Durchführung sowie schriftlichen Ausarbeitung des Themas bedanken. Beide waren jederzeit offen für meine Fragen und trugen zu neuen Anregungen bei. Vielen Dank für das großartige Engagement!

Allen Mitarbeitern/innen der Forschungsabteilung der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie der Universität Würzburg danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ich danke auch Herrn Dr. M. Schecklmann, dass wir seine Forschungsergebnisse verwenden durften.

Nicht zuletzt ein herzliches Dankeschön an alle Mitarbeiter des Labors für Klinische und Molekulare Psychobiologie für die Genotypisierung.

Ich bedanke mich bei allen Probanden für die freiwillige Teilnahme an der Untersuchung.

Bei meinen Eltern, sowie meinem Bruder bedanke ich mich für den Rückhalt und die positiven Ermutigungen.

VI Curriculum vitae

