

**Aus dem Institut für Kinder- und Jugendpsychiatrie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Prof. Dr. med. A. Warnke

**Molekulargenetische Untersuchungen
serotonerger Kandidatengene
bei Zwangsstörungen
im Kindes- und Jugendalter**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der**

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Michael Göbler

aus Esslingen/a.N.

Würzburg, Juli 2007

Referent:
Prof. Dr. med. A. Warnke

Koreferent:
Prof. Dr. med. T. Grimm

Dekan:
Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:
16. Juli 2007

Der Promovend ist Arzt

Abkürzungsverzeichnis

(Autor, Datum) – Verweis auf das Quellen- und Autorenverzeichnis im Anhang
(Kap.10)

5-HT – 5-Hydroxy-Tryptamin (Serotonin)

A - 2-Desoxy-Ribose Adenosin (Nukleosid)

A218C – Polymorphismus an der Stelle 218, bei dem das Nukleotid Adenin gegen
Guanin ausgetauscht wurde

Acc.No. - Accession Number; Registernummer der Veröffentlichungen z.B. in PubMed

Ade - Purinbase Adenin (Nucleotid)

aqua ad injectabile - aqua didest., Syn.: ddH₂O – Zweifach, destilliertes, hochreines
Wasser

bp - Basenpaare

C - 2-Desoxy-Ribose Cytidin (Nukleosid)

Cyt - Pyrimidinbase Cytosin (Nucleotid)

DNS – Desoxyribonukleinsäure

DSM-III – Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen, dritte
Version

DSM-IV – Diagnostisches und statistisches Manual psychischer Störungen, vierte,
aktuelle Version

EDTA - Ethylenediamin-Tetraaceticacid

et al. – *et aliter* (dt.: und andere (Autoren))

f. – und folgende (Seite)

ff. – und folgende (Seiten)

G - 2-Desoxy-Ribose Guanosin (Nukleosid)

G861C - Polymorphismus an der Stelle 861, bei dem das Nukleotid Guanin gegen
Cytosin ausgetauscht wurde

Gua - Die Purinbase Guanin, ein Nucleotid

HTR – Hydroxy-Tryptamin-Rezeptor (Serotonin-Rezeptor)

HTR1B – Serotonin-Rezeptor der Klasse 1, Unterklasse B

HTR1D – Serotonin-Rezeptor der Klasse 1, Unterklasse D

ICD-10 – *International Statistical Classification of Diseases*, 10. Version (WHO)

Kap. – Kapitel

M – Mol (Molekulargewicht)

mRNA - messenger RNA (Für die Transkription bestimmte RNS)

n / N – Anzahl (z.B. an Probanden, Patienten, Vergleichspersonen)

OCD – *Obsessive-Compulsive Disorder* (Zwangserkrankung, Zwangsstörung)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Polymerase-Ketten-Reaktion)

PubMed – Internetseite der *National library of medicine* mit medizinischen Veröffentlichungen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>)

RNS - Ribonukleinsäure

rpm - *Rounds per minute* (Umdrehungsgeschwindigkeit von Zentrifugen)

SNP - *Single-Nucleotid-Polymorphism* (Polymorphismus durch einfachen Basentausch)

SSRI - *Selective Serotonin reuptake Inhibitors* (Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmstoffe)

T - 2-Desoxy-Ribose Thymidin (Nukleosid)

Taq-Polymerase – Hitzestabile Restriktionsendonuklease des Bakteriums *thermus aquaticus*

Thy - Pyrimidinbase Thymin (Nucleotid)

TPH – Tryptophan-Hydroxylase

T_s - Schmelzpunkt eines *Primers*

WHO – *World Health Organization*, Weltgesundheitsorganisation

ZNS – Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Definition des Krankheitsbildes und Untersuchungsgegenstand	2
2	Theoretische Grundlagen und Forschungsstand	4
2.1	Formalgenetische Befunde	4
2.2	Pathogenetische Befunde	6
2.3	Forschungsstand pharmakologischer und molekulargenetischer Befunde zur Tryptophanhydroxylase 1	11
2.4	Forschungsstand pharmakologischer und molekulargenetischer Befunde zum Serotonin-1B-Rezeptor	12
2.5	Forschungsstand pharmakologischer und molekulargenetischer Befunde zum Serotonintransporter	14
2.6	Zusammenfassung der molekulargenetischen Befunde	17
2.7	Fragestellung und Hypothesen	18
3	Stichprobe und Methoden	21
3.1	Stichprobe	21
3.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien	21
3.1.2	Diagnostik, Untersuchungsinventare	21
3.1.3	Probandengruppe	21
3.1.4	Merkmale der Ausgangsstichprobe	22
3.1.5	Durchführung der Untersuchung	22
3.1.6	Versuchsplan	23
3.2.1	DNS-Extraktion	24
3.2.2	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	24
3.2.3	Restriktion	26
3.2.4	Die Gel-Elektrophorese	26
3.2.5	Dokumentation	27
3.2.6	TPH 1: PCR und Restriktion zum Tryptophanhydroxylase-1-Gen	27
3.2.7	HTR1B: PCR und Restriktion zum Serotonin-1B-Rezeptor-Gen	30
3.2.8	SLC6A4: PCR zum Serotonintransporter	32
3.4	Statistische Auswertung	34
3.4.1	TDT-Test	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Die Tryptophanhydroxylase 1 (TPH1)	36
4.2	Der Serotonin-Rezeptor Serotonin-1B-Rezeptor (HTR1B)	36
4.3	Der Serotonintransporter (SLC6A4)	37
5	Diskussion	38
5.1	Das Tryptophanhydroxylase-1-Gen (TPH1)	40
5.2	Das Serotonin-Rezeptor-1B-Gen (HTR1B)	43
5.3	Das Serotonintransporter-Gen (SLC6A4)	44
6	Ausblick	49
7	Zusammenfassung	50
8	Literaturverzeichnis	52
Anhang		60
A	Verwendete Materialien	60
B	Zusammensetzung und Vorbereitung der Reagenzien	63
C	Genomische Struktur der untersuchten Gene	65
D	Textkästen	68
E	Abbildungsverzeichnis	70

F Tabellenverzeichnis.....	71
G Textkastenverzeichnis.....	73
Danksagung.....	74
Lebenslauf.....	75

1 Einleitung

1.1 Einführung

Zwangsstörungen, im englischen als *Obsessive Compulsive Disorder (OCD)* bezeichnet, sind sowohl in der Erwachsenen- als auch in der Kinder- und Jugendpsychiatrie bekannte Krankheitsbilder, die mit einer Lebenszeitprävalenz von 2,5 – 3% zu den häufigsten psychiatrischen Erkrankungen im Kindes- und Jugendalter gehören (Wewetzer, 2004). Sie stellen in der Regel eine erhebliche Belastung sowohl für die betroffenen Kinder als auch für deren Familie dar und schränken den alltäglichen Lebensablauf je nach Ausprägung erheblich ein.

Familien- und Zwillingsuntersuchungen zeigen, dass bei Zwangsstörungen eine deutliche **familiäre Belastung** vorliegt. Gerade bei einer frühen Manifestation im Kindesalter (auf englisch als *early onset* bezeichnet) konnten Familienstudien zeigen, dass genetische Faktoren eine besonders ausgeprägte Rolle spielen (Rasmussen *et al.*, 1986; Pauls *et al.*, 1995; Nestadt *et al.*, 2000). Diese formalgenetischen Studien legen weitere Untersuchungen auf molekulargenetischer Ebene für Zwangsstörungen im Kindes- und Jugendalter nahe.

Pharmakologische Studien und erste molekulargenetische Studien verweisen zudem auf einen Zusammenhang zwischen Zwangs- und Angstsymptomen und dem **Serotoninstoffwechsel** (Lesch *et al.*, 1996; Zohar *et al.*, 2000; Koran *et al.*, 2001; Walitza *et al.*, 2002). Selektive Serotonin Wiederaufnahme-Hemmer (*Selective Serotonine Reuptake Inhibitors, SSRI*) und tricyclische Antidepressiva sind bei der Behandlung von Zwangsstörungen besonders wirksam (Pigott *et al.*, 1990; Zohar *et al.*, 2000). Auch im Kindes- und Jugendalter sind diese Medikamente aufgrund ihrer positiven Wirkung bei Zwangsstörungen Mittel der ersten Wahl (Wewetzer *et al.*, 2003). Insgesamt wird die Pathogenese der Zwangsstörungen nach aktuellem Forschungsstand als multifaktoriell angenommen (Wewetzer, 2004). Dabei bezieht sich bisher die überwiegende Zahl der Untersuchungen auf Zwangsstörungen erwachsener Patienten. Nach aktuellem Kenntnisstand handelt es sich bei der vorliegenden Arbeit um die ersten familienbasierten Assoziationsstudien bei Kindern und Jugendlichen mit

1.1 Einführung

Zwangsstörungen.

Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung einer Assoziation von Varianten in ausgewählten Genen des serotonergen Systems und juvenilen Zwangsstörungen.

Die Auswahl der Kandidatengene für Zwangsstörungen erfolgte auf pathophysiologischen Überlegungen: Die Tryptophanhydroxylase als geschwindigkeitsbestimmendes Enzym in der Synthese von Serotonin, der Serotonin-1B-Rezeptor als Zielorgan mit autoregulierender Funktion auf das serotonerge System, sowie der Serotonintransporter, der, therapeutisch genutzt, von *SSRIs* blockiert wird.

Untersuchungen zu den genannten Kandidatengenegen liegen bei erwachsenen Patienten mit Zwangsstörungen vor, die Ergebnisse sollten in unserer Studie repliziert werden.

64 Kinder und Jugendliche, sowie deren leibliche Eltern wurden in die Untersuchung eingeschlossen.

In den vorliegenden molekulargenetischen Untersuchungen konnten für Varianten im Tryptophanhydroxylase-1-Gen und dem Serotonin-1B-Rezeptor-Gen kein Zusammenhang mit Zwangsstörungen bei Kindern und Jugendlichen gesehen werden. Die funktionelle Variante des Serotonintransporter-Gens, die zu einer höheren Aktivität des Transporters führt, wurde tendenziell häufiger bei den Patienten mit Zwangsstörungen beobachtet. Der Befund entspricht damit in der Richtung den früheren Befunden von erwachsenen Patienten.

1.2 Definition des Krankheitsbildes und Untersuchungsgegenstand

Zwangsgedanken sind fast immer quälend, der Patient versucht häufig erfolglos, Widerstand zu leisten. Die Gedanken werden als zur eigenen Person gehörig erlebt, selbst wenn sie als unsinnig und häufig abstoßend empfunden werden. Ihr Inhalt bezieht sich im Wesentlichen auf Befürchtungen aller Art, wie z.B. die Angst vor Erkrankungen durch Schmutz oder Infektionen oder vor Verantwortlichkeit für den Tod Dritter.

Zwangshandlungen werden weder als angenehm empfunden, noch dienen sie dazu, an sich nützliche Aufgaben zu erfüllen. Der Patient erlebt sie oft als Vorbeugung gegen ein objektiv unwahrscheinliches Ereignis, das ihm Schaden bringen, oder bei dem er selbst

Unheil anrichten könnte. Sie können dazu dienen, unerwünschte oder bedrohliche Gedanken zu „neutralisieren“. Werden Zwangshandlungen unterdrückt, kann sich die Angst deutlich verstärken. Solche Handlungen können exzessives Kontrollieren oder Waschen betreffen, aber auch einfache motorische Abläufe wie z.B. Berühren oder Ordnen von Gegenständen (Steinhausen, 2002). Oftmals liegen Zwangshandlungen und Zwangsgedanken zusammen vor, isolierte Zwangsgedanken oder –Handlungen sind seltener (Rasmussen *et al.*, 1986).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung des serotonergen Systems bzw. serotonerger Kandidatengene und deren Varianten bei Patienten mit Zwangstörungen im Kindes- und Jugendalter. Alle Patienten erfüllten die *DSM-IV*-Kriterien für eine Zwangsstörung.

Untersucht wurden die Varianten in folgenden Kandidatengenen, zu denen es jeweils bereits Vorbefunde gab: Der *Single-Nucleotid*-Polymorphismus (*SNP*) rs1800532 im Gen der Tryptophanhydroxylase 1 (TPH1), der 5HTTLPR-Polymorphismus im Promotor-Gen des Serotonintransporters (SLC6A4) und der *SNP* rs6296 im Gen des Serotonin-1B-Rezeptors (HTR1B).

2 Theoretische Grundlagen und Forschungsstand

2.1 Formalgenetische Befunde

In einigen Studien wird auf die in früheren Untersuchungen gefundene, mit 80-87% bei eineiigen und 47-50% bei zweieiigen Zwillingen außergewöhnlich hohe Konkordanz einer Zwangssymptomatik hingewiesen, wobei die jeweiligen Studiendesigns als teilweise unzureichend bemängelt wurden (Rasmussen *et al.*, 1984; Hettema *et al.*, 2001).

Rasmussen *et al.* (1986) untersuchten 44 erwachsene Patienten mit Zwangsstörungen mit Hilfe von umfangreichen semistrukturierten Interviews. Die Autoren fanden zwei geschlechtsunabhängige Altersgipfel, bei denen die Krankheit das erste Mal auftritt: Der frühere (auf englisch als *early onset* bezeichnet) lag bei 12–14 Jahren, der spätere (*late onset*) bei 20-22 Jahren. Bei dieser Untersuchung ergaben sich Hinweise auf die Hereditabilität von Zwangssymptomen: 16% der hierbei befragten Patienten mit der Diagnose Zwangsstörungen beschrieben ein Vorhandensein von Zwangssymptomen auch bei ihren Eltern. 70% der Patienten konnten subjektiv keine auslösenden Erlebnisse oder Umgebungseinflüsse berichten (Rasmussen *et al.*, 1986).

Pauls *et al.* (1995) untersuchten in einer umfangreichen Familienstudie 100 erwachsene Probanden mit Zwangsstörungen und deren biologische Verwandten ersten Grades, sowie 133 erwachsene gesunde Vergleichspersonen ohne Zwangsstörungen in der Familienanamnese. Dabei fanden sie bei weiblichen und männlichen Personen ein mit 10,3% gleichermaßen signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko unter Verwandten ersten Grades von Patienten mit Zwangsstörungen, gegenüber der gesunden Vergleichsgruppe mit 1,9% ($p < 0,05$). Auch in dieser Studie konnten zwei Altersgipfel einer Erstmanifestation bestätigt werden. Dabei wurde bei 82 % aller Patienten ein Beginn vor dem 18. Lebensjahr gefunden, sowie ein fast doppelt so hohes Erkrankungsrisiko unter Verwandten ersten Grades bei einem Erkrankungsbeginn der Patienten zwischen dem 5. und 9. Lebensjahr. Letzteres spricht für eine besonders starke erbliche Komponente bei jungen Patienten mit *early onset* (Pauls *et al.*, 1995).

Nestadt *et al.* (2000) konnten diese Ergebnisse in Bezug auf eine Zweiteilung des

Beginns der Zwangssymptomatik ebenfalls bestätigen und definieren *early onset* als Beginn zwischen dem 5. und dem 17. Lebensjahr und *late onset* als Beginn ab dem 18. Lebensjahr.

In ihrer Studie konnten Nestadt *et al.* (2000) eine signifikant erhöhte Lebenszeit-Prävalenz von Zwangsstörungen bei Verwandten betroffener Patienten zeigen ($p < 0,001$), sowie ein Erkrankungsrisiko von 11,7% gegenüber 2,7% bei der gesunden Vergleichsgruppe, dies betraf allerdings nur Patienten und deren Verwandten mit einer *early onset*-Symptomatik. Umgekehrt fanden sie bei den 80 untersuchten Patienten und 343 Verwandten ersten Grades keinen Fall, in dem Verwandten von Patienten mit einer *late onset*-Zwangsstörung ebenfalls von Zwangsstörungen betroffen waren. Letzteres bestätigt die von Pauls *et al.* (1995) beschriebene besonders starke erbliche Komponente gerade bei jungen Patienten mit *early onset*.

Alle drei genannten Untersuchungen (Rasmussen *et al.*, 1986; Pauls *et al.*, 1995; Nestadt *et al.*, 2000) differenzieren damit trotz unterschiedlichen Altersangaben einen Beginn der Zwangssymptomatik als *early-onset* von einem *late-onset*, eine allgemeingültige Definition bezüglich des Manifestationsalters des Begriffes *early onset* existiert dabei jedoch noch nicht.

Die Angaben zur Geschlechterverteilung von Zwangsstörungen im Kindes- und Jugendalter variierten von einer Knabenwendigkeit von 2:1, die möglicherweise auch durch das frühere Auftreten von Zwängen bei Knaben bedingt ist, bis hin zu einer fast ausgeglichenen Verteilung der Erkrankung bei Knaben und Mädchen (Wewetzer, 2004). Die Lebenszeitprävalenz von Zwangsstörungen im Kindes- und Jugendalter von 2,5 – 3% unterscheidet sich nur gering von Angaben zur Punktprävalenz, was auf eine hohe Persistenz der Störung hindeutet (Wewetzer, 2004).

Bei Zwangshandlungen und -gedanken im Kindes- und Jugendalter haben sich multimodale Behandlungsprogramme bewährt, die eine Behandlung mit Psychopharmaka und verhaltenstherapeutische Verfahren beinhaltet (Süllwold *et al.*, 2000).

2.2 Pathogenetische Befunde

Die als multifaktoriell angenommene Pathogenese von Zwangsstörungen (Wewetzer, 2004) wird bisher auf verschiedenen Ebenen untersucht. Biochemische Ansätze, die die Untersuchung von Neurotransmittern berücksichtigen, schreiben dabei dem serotonergen System eine besondere Bedeutung zu (Wewetzer, 2004). Serotonin ist ein biogenes Amin (Abb. 1), das als Mediator und Neurotransmitter unter anderem innerhalb des zentralen Nervensystems in präsynaptischen Vesikeln gespeichert und nach einem entsprechenden Reiz in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird.

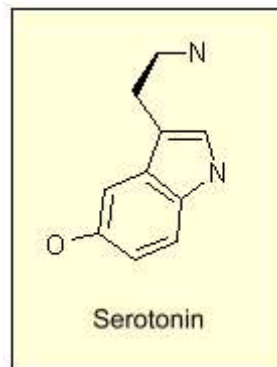


Abbildung 1: Chemische Struktur von Serotonin

Als Neurotransmitter kann es an prä- und postsynaptische Serotoninrezeptoren binden und dadurch Impulse an eine nachgeschaltete Nervenzelle weiterleiten (Forth, 1996; Löffler *et al.*, 1998).

Psychopharmakologisch sind bei Kindern und Jugendlichen sowie bei Erwachsenen, neben den klassischen trizyklischen Antidepressiva (z.B. Clomipramin), selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (*SSRI*) besonders effektiv und Medikation der ersten Wahl bei Zwangsstörungen (Süllwold *et al.*, 2000; Zohar *et al.*, 2000; Wewetzer *et Walitza*, 2005), ungefähr 70% der Betroffenen reagieren positiv auf solche Medikamente, die die serotonerge Regulation beeinflussen (Zohar *et al.*, 2000; Wewetzer *et Walitza*, 2005). Dabei zeigte sich, dass klassische Antidepressiva ohne Wirkung am Serotonintransporter die Zwangssyptomatik nicht beeinflussen (Wewetzer, 2004). Weitere pharmakologische Studien konnten den Zusammenhang zwischen

Zwangs- und Angstsymptomen und dem Serotoninstoffwechsel bestätigen. Eine Studie konnte bei fünf Patienten eine signifikante Verstärkung der Zwangssymptomatik unter Verabreichung von Sumatriptan, einem Serotoninrezeptor-Agonisten am HTR1B, zeigen (Koran *et al.*, 2001).

Im Rahmen von molekulargenetischen Studien ist es möglich, Zusammenhänge zwischen Varianten in den Genen von ausgewählten Proteinen, die am Serotoninmetabolismus beteiligt sind, zu untersuchen. So konnten positive Assoziationen mit Zwangsstörungen bei Erwachsenen bereits u.a. für Polymorphismen in den Genen des Serotonin-1B-Rezeptors (Mundo *et al.*, 2000; 2002) und des Serotonintransporters (McDougle *et al.*, 1998; Bengel *et al.*, 1999) gefunden werden. Als Assoziation wird dabei der Zusammenhang einer molekulargenetischen Variante mit dem Auftreten einer Erkrankung bezeichnet. Für den Serotonin-2A-Rezeptor hatte sich eine Assoziation sowohl bei Erwachsenen (Huang *et al.*, 2001) und erstmals auch bei Kindern mit Zwangsstörungen gezeigt (Walitza *et al.*, 2002).

Die meisten bisherigen Assoziationsstudien wurden in Form von Fall-Kontroll-Studien durchgeführt. Problematisch ist bei diesen Studien, daß ethnisch bedingte Unterschiede in den Allelverteilungen die Ergebnisse u.U. beeinflussen können. Um dies zu vermeiden, wurde in der vorliegenden Studie eine familienbasierte Assoziationsstudie mit Trios durchgeführt. Ein Trio besteht aus einem Patienten und dessen leiblichen Eltern. Ohne die Normalverteilung der untersuchten Allele eines Polymorphismus in einer bestimmten Bevölkerungsgruppe berücksichtigen zu müssen, wird untersucht, welches der beiden Allele bei heterozygoten Elternpaaren häufiger auf das an Zwangsstörungen erkrankte Kind übertragen wurde.

Kommt es, im Sinne von signifikanten Transmissionsunterschieden, zu einer solchen bevorzugten Vererbung eines der beiden Allele auf das erkrankte Kind, so wird von einem Transmissionsungleichgewicht gesprochen.

Folgende Punkte sind hierbei von Relevanz:

1. Ein Allel bzw. ein Basenaustausch kann funktionell relevant sein, wenn die

2.2 Pathogenetische Befunde

ausgetauschte Base des *SNP* aufgrund des genetischen Codes eine veränderte Aminosäuresequenz bewirkt (Siehe Abb. 2). Jeweils drei Basen kodieren durch ihre definierte Abfolge eine Aminosäure. Die Aminosäuren lagern sich ihrerseits zu Proteinen zusammen. Ändert sich eine Base, so kann es zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz kommen und damit zu einer veränderten Funktionsweise des Proteins. Eine weitere Möglichkeit mit funktioneller Relevanz ist z.B. eine Veränderung im Regulator-Bereich eines Genes, wie es beim Polymorphismus im Promotorbereich des Serotonintransporters der Fall ist.

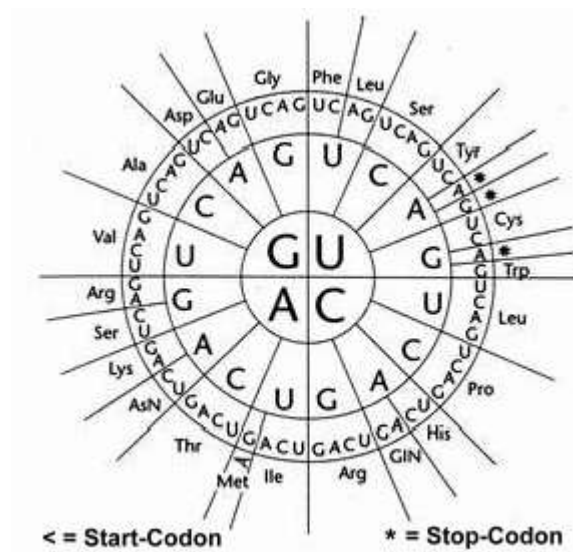


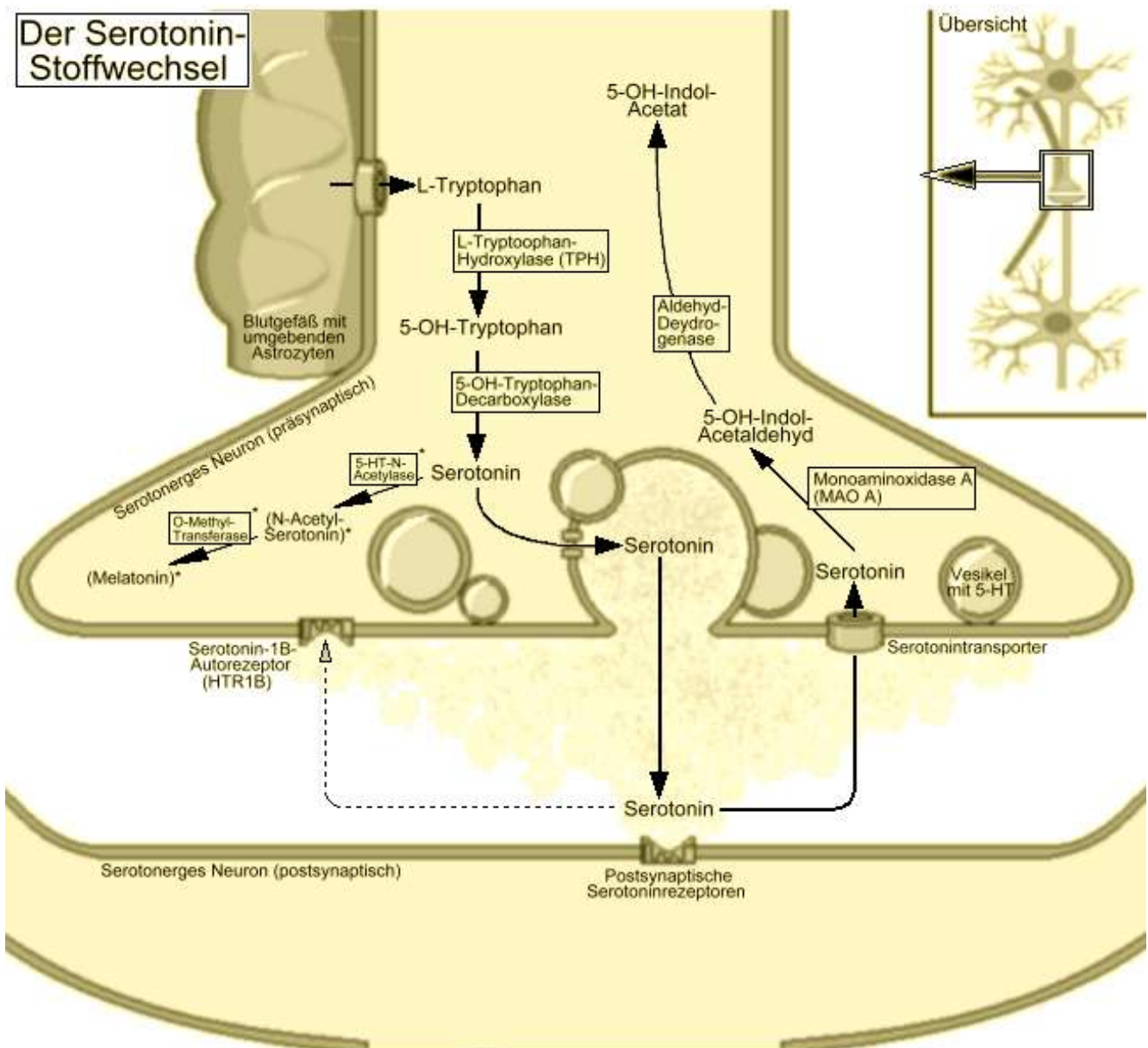
Abbildung 2: Der genetische Code. Von innen nach außen gelesen kodieren jeweils drei Basen eine Aminosäure (ganz außen). Bei einigen Kombinationen ergibt sich, wie dies bei „stillen“ Polymorphismen der Fall ist, trotz unterschiedlicher Basen-Triplets keine Änderung der resultierenden Aminosäure. Ein Beispiel hierfür sind mehrere mögliche Kodierungen für die Aminosäure Valin (Val). Abb. verändert nach Koolman *et* Röhm (1998).

2. Liegen zwei Polymorphismen nahe beieinander, können sie gekoppelt sein. Solche Kopplungen können z.B. „stille“ Polymorphismen betreffen, bei denen ein Basenaustausch keine Veränderung in der Aminosäuresequenz bewirkt (stumme Mutationen). Ein an eine solche stumme Mutation gekoppelter, evtl. noch unbekannter Polymorphismus könnte dabei durchaus von funktioneller Relevanz in Bezug auf die Pathogenese einer Erkrankung sein.

Bei den Allelen eines biallelischen Polymorphismus unterscheidet man zwischen dem Wildtyp-Allel, welches in einer Population häufiger vorkommt und dem Allel, welches seltener auftritt. Bei letzterem handelt es sich um eine relativ häufige Variante in einer Population, sodass es nicht mit einer Spontanmutation zu verwechseln ist. Bei Assoziationssudien ist daher hilfreich, nur Varianten zu untersuchen, die in mehr als 1% der Fälle zu erwarten sind, damit bei der Untersuchung mit dem Auftreten einer solchen Variante zu rechnen ist.

Vor allem in Anbetracht der deutlichen und gut untersuchten Wirksamkeit von *SSRI* wie Clomipramin und anderer, das serotonerge System beeinflussender Antidepressiva bei Zwangsstörungen stützt sich die Auswahl relevanter Kandidatengene für molekulargenetische Untersuchungen in erster Linie auf Gene, die am Serotoninstoffwechsel beteiligt sind. Dies betrifft umso mehr Komponenten, die spezifisch in den Serotoninstoffwechsel einbezogen sind. Um solche serotoninspezifischen Proteine handelt es sich bei sämtlichen Serotoninrezeptoren, der Tryptophanhydroxylase, sowie dem Serotonintransporter. Eine Übersicht des Serotonin-Stoffwechsels und der daran beteiligten Komponenten findet sich in Abbildung 3.

2.2 Pathogenetische Befunde



Legende: Mit Stern* markiert: Abzweigung zur Melatonin-Synthese (nur in der Hypophyse); Synonyme: Serotonin = 5-HT, OH = Hydroxy

Abbildung 3: Serotonerge Synapse und halbschematische Darstellung des Serotonin-Stoffwechsels.

In der vorliegenden Arbeit wurden aus den oben genannten sowie aus weiteren Gründen, die in den folgenden Abschnitten näher dargestellt werden, Varianten in den Genen der Tryptophanhydroxylase 1 (TPH1), des Serotonin-1B-Rezeptors (HTR1B) und des Serotonintransporters (SLC6A4) untersucht.

2.3 Forschungsstand pharmakologischer und molekulargenetischer Befunde zur Tryptophanhydroxylase 1

Serotonin wird beim Menschen in zwei Syntheseschritten enzymatisch aus Tryptophan hergestellt: Das erste Enzym ist die geschwindigkeitsbestimmende L-Tryptophan-Hydroxylase (Nielsen *et al.*, 1992). Den zweiten Schritt und damit die eigentliche Synthese des Serotonin übernimmt eine auch für die Dopaminbildung zuständige Decarboxylase (Forth, 1996). Beim Menschen gelten die Tryptophanhydroxylasen aufgrund ihrer zentralen Stellung im Serotoninmetabolismus als interessante Kandidaten zur Erforschung der Pathogenese von Erkrankungen, bei denen eine Störung des Serotoninstoffwechsels als ursächlich angenommen wird (Nielsen *et al.*, 1992; Frisch *et al.*, 2000). Eine Dysfunktion der Tryptophanhydroxylasen könnte den relativen Serotoninmangel im synaptischen Spalt erklären, der durch die Wirkung der *SSRI* behoben bzw. gemindert wird. Die *SSRI* erhöhen, wie im Kapitel 2.5 beschrieben, die Serotoninkonzentration durch Wiederaufnahmehemmung und haben eine therapeutische Wirkung bei Zwangsstörungen (Nielsen *et al.*, 1992).

Bei der vorliegenden Arbeit wurde die TPH1, eine der beiden bisher bekannten Tryptophanhydroxylase-Isoformen, untersucht. Im ZNS kann sie mit starker Expression im *Corpus pineale* gefunden werden, einer u.a. für den Tag-Nacht-Rhythmus verantwortlichen Hirnanhangsdrüse, in der mit hohem Umsatz Melatonin aus Serotonin synthetisiert wird.

Im Gen der auf dem Chromosomenabschnitt 11p14/15 (Intron 7) liegenden *TPH1* konnte ein biallelischer *Single-Nucleotid*-Polymorphismus (*SNP*) gefunden werden (Nielsen *et al.*, 1992), für dessen eines Allel (C-Allel, in einigen Veröffentlichungen als L-Allel bezeichnet) eine Assoziation mit einer niedrigen Konzentration des Serotonin-Metaboliten 5-Hydroxy-Indolacetat (5-HIAA) im Liquor und suizidalem Verhalten in einer Gruppe von finnischen alkoholabhängigen Patienten mit aggressivem Verhalten gesehen wurde (Nielsen *et al.*, 1994). Die Autoren gingen davon aus, daß ein mit diesem Polymorphismus assoziierter veränderter Serotoninmetabolismus mit Einfluss auf das Verhalten auch für andere psychiatrische Erkrankungen gefunden werden könnte (Nielsen *et al.*, 1992, 1994).

Die Assoziation zwischen diesem als rs1800532 benannten intronischen *SNP* und suizidalem Verhalten konnten in zwei weiteren Untersuchungen bestätigt werden, ohne dass sich ein Zusammenhang mit Alkoholismus fand (Mann *et al.*, 1997; Arrango *et al.*, 2003). Eine Assoziation eines homozygoten Vorliegens des C-Allels mit impulsivem, aggressivem Verhalten fand sich bei New *et al.* (1998). Den Zusammenhang des rs1800532 und niedrigem 5-HIAA-Spiegel im Liquor wiederum konnten Jonsson *et al.* (1997) replizieren.

Eine solche Assoziation zwischen Zwangsstörungen und niedrigem 5-HIAA-Spiegel im Liquor konnte bei 39 erwachsenen Patienten nicht festgestellt werden (Leckman *et al.*, 1995). Ebenfalls fanden Frisch und Kollegen (2000) bei der Untersuchung zweier ethnischer Gruppen keine Assoziation zwischen dem o.g. Polymorphismus rs1800532 und Zwangsstörungen bei Erwachsenen; hierbei handelte es sich zudem um die bisher einzige Untersuchung einer Assoziation zwischen diesem *SNP* und Zwangsstörungen bei Erwachsenen.

Insgesamt gab es jedoch noch keine Studien, die sich explizit auf die Altersgruppe von Kindern und Jugendlichen mit Zwangsstörungen bezogen.

2.4 Forschungsstand pharmakologischer und molekulargenetischer Befunde zum Serotonin-1B-Rezeptor

An der Oberfläche jeder Zielzelle für das Hormon Serotonin befinden sich als transmembranäre Proteine die Serotonin-Rezeptoren. Durch die Vielzahl an Rezeptortypen können die vielfältigen Aufgaben des Serotonins vermittelt werden. Außer den unterschiedlichen, meist postsynaptisch lokalisierten 5-HT-Rezeptoren, finden sich am synaptischen Spalt auch präsynaptisch Rezeptoren: Der auf dem Chromosomenabschnitt 6q13 liegende, als 1B bezeichnete Rezeptor (Hamblin *et al.*, 1992; Jin *et al.*, 1992) ist über eine negative Rückkopplung als Autorezeptor für die Selbststeuerung der Serotonin ausschüttenden Nervenzelle zuständig (Lappalainen *et al.*, 1995): Eine erhöhte 5-HT-Konzentration im synaptischen Spalt bewirkt unter

anderem eine stärkere Aktivierung dieses Rezeptors, wodurch anhand des ihm angeschlossenen, inhibitorischen G-Proteins, sowie eines im Einzelnen noch unbekanntem intrazellulären Mechanismus die weitere Serotoninausschüttung gedrosselt bzw. die 5HT-Synthese vermindert wird (Löffler und Petrides, 1998). Dieser Mechanismus hat eine zentrale Bedeutung zur Begrenzung überschießender Erregungen und Erregungsausbreitungen. Durch seine autoregulierende Funktion nimmt der HTR1B unter den Serotonin-Rezeptoren daher funktionell eine besondere Stellung ein.

Der auf Chromosom 6 kodierte Autorezeptor findet sich v.a. im zentralen Nervensystem, im Bereich des *Striatum* (Jin *et al.*, 1992), den basalen Stammganglien des Gehirns, welches wiederum Projektionen von den dorsalen Raphekernen erhält, einem wichtigen Syntheseort von Serotonin im ZNS (Duus, 2001). Durch dieses fast ausschließlich auf das ZNS beschränkte Vorkommen ist der HTR1B für Untersuchungen im Rahmen psychiatrischer Erkrankungen von besonderem Interesse. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu dem auf Chromosom 1 kodierten Serotonin-1D-Rezeptor (HTR1D) wurde er ursprünglich als Serotonin-1D β -Rezeptor bezeichnet, und später im Rahmen einer Neuordnung der Serotoninrezeptoren zu HTR1B umbenannt (PubMed-OMIM, 2004). In einigen Veröffentlichungen wird der HTR1B noch unter seinem alten Namen (5HT1D β) aufgeführt.

Durch seine exponierte Stellung an der präsynaptischen Membran und seinen möglichen Einfluss auf eine Dysregulation des serotonergen Systems ist der HTR1B zur Untersuchung der Pathogenese von Zwangsstörungen relevant. In einer placebokontrollierten Doppelblind-Studie konnte bei fünf zuvor nicht medikamentös behandelten Patienten eine signifikante Verstärkung der Zwangssymptomatik unter Verabreichung von Sumatriptan, einem für die strukturell sehr ähnlichen Rezeptoren 1B und 1D selektiven Agonisten, gezeigt werden (Koran *et al.*, 2001). In einer weiteren pharmakologischen Studie ließ sich jedoch eine solche Symptomverstärkung durch den am Serotonin-1B-Rezeptor vergleichbar wirksamen, und im Vergleich zu Sumatriptan besser liquorgängigen Agonisten Zolmitriptan, nicht bestätigen (Boshuisen *et al.*, 2000).

Sidenberg *et al.* (1993) waren die Erstbeschreiber eines als G861C bezeichneten *single-*

nucleotid-Polymorphismus (*snp*) im *HTR1B*-Gen. In zwei aufeinander folgenden Assoziationstudien konnten Mundo *et al.* (2000, 2002) bei zunächst 67 und schließlich insgesamt 121 Familien-Trios (unter Einschluß der 67 Trios der Voruntersuchung) eine signifikante Assoziation zwischen dem G-Allel dieses biallelischen Polymorphismus G861C (rs6296) und Zwangsstörungen bei erwachsenen Patienten finden (zunächst $p > 0,006$ und abschließend $p = 0,02$). Der *single-nucleotid*-Polymorphismus G861C wirkt sich nicht funktionell auf die Transkription aus (siehe Kapitel 5.2).

2.5 Forschungsstand pharmakologischer und molekulargenetischer Befunde zum Serotonintransporter

Nach erfolgtem Reiz zur Ausschüttung von Serotonin in den synaptischen Spalt bewirkt der präsynaptische Serotonintransporter eine Reizbeendigung durch schnelle Wiederaufnahme des Transmitters in das serotonerge Neuron. Das aufgenommene Serotonin wird zum Großteil zur erneuten Ausschüttung wieder in den terminalen Vesikeln gespeichert und zu einem geringeren Teil durch zwei nicht serotoninspezifische Enzyme abgebaut.

Selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (*SSRI*) blockieren den Serotonintransporter, wodurch das ausgeschüttete Serotonin im synaptischen Spalt länger verfügbar bleibt (Lüllmann *et al.*, 1999). Zudem zeigte sich, dass klassische Antidepressiva die Zwangssymptomatik nicht beeinflussen können, wenn sie keinen Angriffspunkt am Serotonintransporter haben (Wewetzer, 2004).

Das Gen des Serotonintransporters wurde auf dem Chromosomenabschnitt 17q11.1-12 lokalisiert (Lesch *et al.*, 1994; Gelernter *et al.*, 1995). In einer molekulargenetischen Untersuchung wurde ein in der Regulatorregion des Gens liegender Polymorphismus (5-HTTLPR) im Gen des SLC6A4 gefunden: In dieser die Transkription regulierenden Promotor-Region des Gens kommt es je nach vorliegendem Allel zu einer Insertion

bzw. Deletion eines 44bp-*repeats* (Wiederholungen eines Genabschnittes), wodurch die Gesamtlänge der bei der Transkription abgelesenen *mRNA* je nach vorliegender genetischer Variante länger oder kürzer ist (Siehe Abbildung 4 und Tabelle C3 im Anhang). Bei Vorliegen des häufigeren, langen Allels (*long* - l) hatte sich im Vergleich zum kürzeren (*short* - s) eine verstärkte Transkription gezeigt, die sich *in vitro* auf eine erhöhte Serotonin-Wiederaufnahme auswirkte (Heils *et al.* 1996).

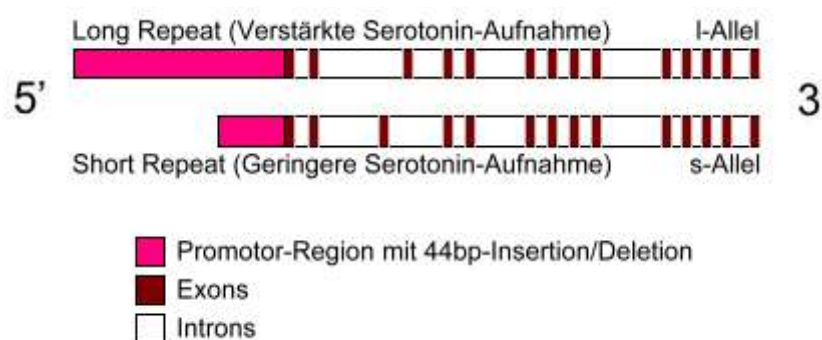


Abbildung 4: Long- und Short-Allel des Serotonintransporter-Gens und der jeweilige *in-vitro*-Einfluß auf die Aktivität des Serotonintransporters. (Modifiziert nach Ohara *et al.*, 1998 und www.bio.davidson.edu)

Es konnte für diesen Polymorphismus, untersucht bei Patienten mit Angstneurosen bzw. Panikstörungen gezeigt werden, dass das s-Allel eine geringere Expression des Gens und damit eine reduzierte Serotoninaufnahme auslöst (Lesch *et al.*, 1996).

In einer Assoziationsstudie mit 34 Trios zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,03$) von Zwangsstörungen und dem l-Allel bei erwachsenen Patienten (McDougle *et al.*, 1998). Das positive Ergebnis konnte in einer Fall-Kontroll-Studie mit 75 Patienten mit Zwangsstörungen und 397 Kontroll-Probanden gleicher ethnischer Herkunft bestätigt werden ($p=0,023$). Es bestand eine Assoziation mit Zwangsstörungen, wenn bei den untersuchten Patienten das l-Allel homozygot auftrat (Bengel *et al.*, 1999).

In der folgenden Tabelle sind die Allelfrequenzen der untersuchten Polymorphismen in den jeweiligen Kontrollgruppen angegeben (Tabelle 2.1).

Marker (Allele)	Allelfrequenzen	Gesunde Population	Autoren
TPHI A-Allel C-Allel	A(=U): 0,4 / C(=L): 0,6; n=72 A: 0,54 / C: 0,46; n=224 A: 0,37 / C: 0,63; n=120 A: 0,43 / C: 0,57; n=174, davon: weibl.: A: 0,45 / C: 0,55; n=46 männl.:A: 0,37 / C: 0,63; n=128	Nicht verwandte Kaukasier Ashkenazi Nicht-Ashkenazi Europäisch (Deutschland)	Nielsen <i>et al.</i> , 1992 Frisch <i>et al.</i> , 2000 Frisch <i>et al.</i> , 2000 Fehr <i>et al.</i> , 2001
HTR1B G-Allel C-Allel	G: 0,7 / C: 0,3; n=40 G: 0,72 / C: 0,28; n= 81	Nicht verwandte Kaukasier Nicht verwandte Kaukasier	Sidenberg <i>et al.</i> , 1993 Lappalainen <i>et al.</i> , 1995
5-HTTLPR l-Allel s-Allel	l: 0,57 / s: 0,43 l: 0,61 / s: 0,39	Europäisch (Deutschland) Europäisch (Deutschland)	Heils <i>et al.</i> , 1996 Lesch <i>et al.</i> , 1996

Tabelle 2.1: Bisher gefundene Allelfrequenzen der untersuchten Polymorphismen (Gesunde Kontrollgruppen)

In der folgenden Tabelle 2.2 sind Ergebnisse von Fall-Kontrollstudien (bei erwachsenen Patienten und Kontrollen) und familienbasierten Studien (bei erwachsenen Patienten) dargestellt.

<i>Marker (Allel)</i>	<i>Patienten</i>	<i>Kontrollen</i>	<i>TDT- Ergebnis</i>	<i>Autoren</i>
<i>TPH1</i> (A/C-Allel)	75	172	p>0,05	Frisch <i>et al.</i> (2000)
<i>HTR1B</i> (G-Allel)	67 Trios		p< 0,006	Mundo <i>et al.</i> (2000)
	121 Trios		p= 0,02	Mundo <i>et al.</i> (2002)
	79 Trios		p= 0,13	DiBella <i>et al.</i> (2002)
	71	129	p= 0,62	Hemmings <i>et al.</i> (2003)
<i>5-HTTLPR</i> (l-Allel)	75		p= 0,023	Bengel <i>et al.</i> (1999)
	34 Trios		p= 0,03	McDougle <i>et al.</i> (1999)
	115 43 Trios	136	p>0,05	Camarena <i>et al.</i> (2001)

Tabelle 2.2: Bisherige Assoziationsstudien und deren Ergebnisse bei erwachsenen Patienten und Kontrollen bzw. bei Trios. Signifikante Ergebnisse sind hervorgehoben.

2.6 Zusammenfassung der molekulargenetischen Befunde

Formalgenetische Untersuchungen konnten zeigen, dass bei Zwangsstörungen die Erbllichkeit eine wichtige Rolle spielt. Die Erkrankung zeigt zwei Altersgipfel. Einen ersten, als *early-onset* bezeichneten, vor dem 18. Lebensjahr und einen zweiten, als *late-onset* bezeichneten, nach dem 18. Lebensjahr. Dabei erscheint die genetische Komponente bei *early-onset-OCD* im Gegensatz zu dem späteren Altersgipfel besonders ausgeprägt zu sein (Rasmussen *et al.*, 1986; Pauls *et al.*, 1995, Nestadt *et al.*, 2000).

Das serotonerge System gilt aufgrund des positiven Effektes selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmern, sowie trizyklischer Antidepressiva mit serotonerger

Einfluss als wichtiger Faktor in der multifaktoriellen Pathogenese von Zwangsstörungen (Zohar *et al.*, 2000; Wewetzer *et al.*, 2006). In einigen pharmakologischen Untersuchungen ergaben sich z.T. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen dem serotonerge System und Zwangsstörungen (Zohar *et al.*, 2000; Koran *et al.*, 2001), in anderen konnte kein solcher Zusammenhang bestätigt werden (Boshuisen *et al.*, 2000).

Mit Hilfe von Assoziationsstudien kann auf molekulargenetischer Ebene ein Zusammenhang ausgewählter serotonerger Komponenten mit dem Auftreten von Zwangsstörungen untersucht werden.

Für Allele einiger Polymorphismen in den Genen von Proteinen, die am Serotonin-Stoffwechsel beteiligt sind, konnten Assoziationen mit Zwangsstörungen gefunden werden. Dies betrifft unter anderem den *single-nucleotide*-Polymorphismen rs6296 (früher G861C) des Serotonin-1B-Rezeptor-Gens sowie den bisher als 5HTTLPR bezeichneten Polymorphismus im Gen des Serotonintransporters (Nielsen *et al.*, 1992; 1994; Mundo *et al.*, 2000; 2002; McDougle *et al.*, 1998; Bengel *et al.*, 1999). Der *SNP* rs1800532 (früher A218C) des Tryptophanhydroxylase-1-Gens erschien ebenfalls pathophysiologisch relevant, da die TPH1 aus den oben beschriebenen Gründen eine zentrale Stellung im Serotonin-Stoffwechsel einnimmt.

Während diese Ergebnisse für eine Assoziation mit Zwangsstörungen sprechen, gibt es andererseits auch Ergebnisse, die gegen eine solche Assoziation sprechen (Siehe Tabelle 2.2), insgesamt wurden die in Frage kommenden Gene jedoch bisher noch nicht an Stichproben mit betroffenen Kindern und Jugendlichen untersucht.

2.7 Fragestellung und Hypothesen

Bei der vorliegenden Arbeit stellte sich die Frage, ob die genannten Polymorphismen aufgrund der besonders ausgeprägten erblichen Komponente bei Zwangsstörungen im Kindes- und Jugendalter mit einem *early-onset-OCD* assoziiert sind. Hierzu wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

1. Es besteht ein Zusammenhang zwischen Zwangsstörungen im Kindes- und

Jugendalter und Varianten im *TPHI*-Gen.

2. Es besteht eine Assoziation zwischen den Allelen des 5HTTLPR-Polymorphismus im Gen des Serotonintransporters und Zwangsstörungen bei Kindern und Jugendlichen.
3. Es ist eine signifikant gehäufte Transmission des G-Allels (rs6296) im Gen des Serotonin-1B-Autorezeptors bei Kindern und Jugendlichen mit Zwangsstörungen zu erwarten.

Jeweils als Nullhypothese wurde bei den drei untersuchten Polymorphismen formuliert, dass keine Assoziation zwischen Zwangsstörungen und Allelen der untersuchten Polymorphismen besteht. Als Alternativhypothesen sollte der Zusammenhang von Zwangsstörungen und Varianten von Kandidatengenen überprüft werden: Laut dieser Hypothese besteht eine Assoziation zwischen diesen Allelen und Zwangsstörungen. Da sowohl für den Serotonin-1B-Rezeptor als auch für den Serotonintransporter in der Literatur zwar Ergebnisse vorlagen, die eine Aussage über das erwartete häufiger transmittierte Allel zuließen, jedoch, wie im Kapitel „Diskussion“ dargelegt, auch Assoziationsstudien mit negativen Befunde vorlagen, wurden diese Hypothesen zweiseitig überprüft (Siehe Tabelle 2.3).

Untersucher Marker	Nullhypothese in Bezug auf <i>early-onset-OCD</i>	Alternativhypothese in Bezug auf <i>early-onset-OCD</i>
<i>HTR1B</i> rs6296	Keine Assoziation	Assoziation mit dem G-Allel
<i>TPHI</i> rs1800532	Keine Assoziation	Assoziation mit dem A-Allel
<i>SLC6A4</i> 5HTTLPR	Keine Assoziation	Assoziation mit dem l-Allel

Tabelle 2.3: Hypothesen in Bezug auf die untersuchten Polymorphismen.

Ebenfalls zweiseitig geprüft wurde die Hypothese einer Assoziation von Zwangsstörungen und Varianten im Tryptophanhydroxylase-1-Gen, da hierzu bislang nur eine Studie vorlag und anhand der Literatur im Vorfeld keine bevorzugte

2.7 Fragestellung und Hypothesen

Transmission eines der beiden Allele vorherzusehen war. Die von Frisch *et al.* (2000) durchgeführte Studie, bei der keine Assoziation des untersuchten Polymorphismus mit Zwangsstörungen bei Erwachsenen gefunden werden konnte, wies methodische Schwächen im Hinblick auf ethnische Unterschiede in den Studiengruppen auf.

3 Stichprobe und Methoden

3.1 Stichprobe

3.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterium waren Zwangsstörungen nach DSM-IV bei Kindern und Jugendlichen. Ausgeschlossen waren Patienten mit psychotischen Störungen in der Vorgeschichte oder dem akuten Krankheitsbild, sowie Patienten mit einem Tourette-Syndrom, einem IQ < 70 und Personen mit Substanzmittelabusus.

3.1.2 Diagnostik, Untersuchungsinventare

Die halbstrukturierte *Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale (Y-BOCS)* (Goodman *et al.*, 1989), für die auch eine Version speziell für Kinder entwickelt wurde, gilt durch eine qualitative wie auch quantitative Analyse der Zwangssymptomatik als gutes und sicheres Diagnoseverfahren für die Einschätzung des Schweregrades der Zwangsstörungen. Das Vorliegen einer manifesten Zwangsstörung wurde anhand der DSM-IV-Kriterien bestimmt.

Neben diesem wurde für die Diagnose der für die vorliegende Arbeit rekrutierten Patienten und ihrer Eltern auch das Diagnostische Interview bei psychischen Störungen (DIPS) angewendet, welches ebenfalls in einer Version für Kinder und Erwachsene vorliegt (Unnewehr *et al.*, 1995).

3.1.3 Probandengruppe

Für die Durchführung der Untersuchung lag ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Würzburg vor. Die Patienten wurden in Zusammenarbeit mit den Kliniken für Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universitäten Marburg, Würzburg, Aachen und Freiburg rekrutiert. Alle Patienten und deren Eltern waren mit der Untersuchung nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung einverstanden.

3.1.4 Merkmale der Ausgangsstichprobe

Von 64 jungen Patienten und ihren leiblichen Eltern konnte DNS gewonnen werden. 36 der Patienten waren männlich, 28 weiblich. Das mittlere Alter der Patienten lag zum Zeitpunkt der Untersuchung bei 13 Jahren (Standardabweichung 2,7), das mittlere Alter bei Erstmanifestation der Erkrankung lag bei 11,6 Jahren (Standardabweichung 3).

Von den 64 Patienten hatten gemäß der DIPS 22 jeweils eine der folgenden komorbiden Störungen bzw. Begleitstörungen:

- Aufmerksamkeitsdefizit-und Hyperaktivitäts-Störung (n=6),
- Verschiedene Angststörungen (n=6),
- Verhaltensstörungen (n=3),
- Dysthyme Störungen (n=2),
- Eßstörungen (n=2),
- Dyslexie (n=1) und
- Komplex-motorische Tic-Störungen (n=1).

Bei sieben weiteren Patienten waren im Verlauf ihres Lebens vorübergehende Tic-Störungen aufgetreten.

Der durchschnittliche Schweregrad der Zwangssymptome lag gemäß *Y-BOCS* bei 22,04 (Standardabweichung 8,33), was klinisch einem mittleren Schweregrad entspricht (Woody *et al.*, 1995). Mit 50,7% zeigten die meisten Patienten sowohl Zwangshandlungen als auch Zwangsgedanken, 23,9% wiesen dagegen nur Zwangsgedanken auf, 25,4% nur Zwangshandlungen.

3.1.5 Durchführung der Untersuchung

Mittels molekulargenetischer Methoden wurde eine Assoziation zwischen Zwangsstörungen und den gewählten Polymorphismen untersucht. Das Probenmaterial wurde hierzu von Trios, bestehend aus einem jungen Patienten und seinen leiblichen Eltern gewonnen. Aus dem Vollblut wurde mit einem Extraktionsverfahren die DNS gewonnen. Die zu untersuchenden DNS-Abschnitte wurden mittels Polymerase-

Kettenreaktion (*Polymerase-chain-reaction, PCR*) amplifiziert. Anschließend wurde bei zweien (*HTR1B*- und *TPHI*-Gen) der drei untersuchten Polymorphismen mit geeigneten Endonukleasen eine Restriktion durchgeführt, wodurch die per *PCR* vervielfachten Kopien der DNS-Sequenz abhängig von dem jeweils vorliegenden Allel an der Stelle des Polymorphismus geschnitten wurde. Das geschnittene *PCR*-Produkt wurde zur optischen Auswertung auf Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend ausgewertet und dokumentiert. Die gefundenen Ergebnisse wurden abschließend statistisch ausgewertet.

Der untersuchte Polymorphismus im Gen des Serotonintransporters entsteht durch unterschiedlich lange Wiederholungen (repeats) von Basenabfolgen, die durch Insertion in den betreffenden Gen-Abschnitt bzw. Deletion aus diesem verursacht werden, wodurch das Gen abhängig von der verliegenden Genvariante unterschiedlich groß ist. Die Notwendigkeit einer Restriktion entfällt dadurch.

3.1.6 Versuchsplan

Die gereinigte DNS wird unter Verwendung von *Primern*, kurzen synthetischen DNS-Stücken, die sich an einen der beiden DNS-Stränge komplementär anlagern, mittels *PCR (Polymerase-chain-reaction)* amplifiziert. Die *Primer* dienen dabei der Eingrenzung der beidseitig an den Polymorphismus grenzenden Bereiche, sodass ausschließlich der gewünschte kurze Bereich des untersuchten Genabschnittes so stark vervielfältigt wird, dass er in auswertbaren Mengen vorliegt. Anschließend folgten bei zwei der drei Polymorphismen die Restriktion, und im Anschluß an die Elektrophorese die Dokumentation.

In den folgenden Kapiteln werden zunächst die vorgenommenen Untersuchungsabläufe beschrieben. Für Abläufe, die für alle drei Polymorphismen gleichermaßen gelten, wie DNS-Extraktion, Gel-Elektrophorese und Dokumentation ist bereits hier das genaue Vorgehen dargestellt, während die für die untersuchten Polymorphismen vorgenommenen, unterschiedlichen Abläufe der zuvor beschriebenen *PCR* und Restriktion im Anschluß daran dargestellt sind (Kapitel 3.3.6 bis 3.3.8). Die verwendeten Materialien und Geräte sind in tabellarischer Form jeweils auch im

Anhang zu finden (Tabellen A1 bis A6).

3.2.1 DNS-Extraktion

Für die Extraktion des Erbgutes wurde bei den, zur Verhinderung einer Koagulation, mit EDTA versetzten Blutproben die Aussalzungsmethode nach Miller *et al.* (1988) angewendet (Siehe Kasten 3.1).

DNS-Extraktion - Prozedere

10 ml des frischen EDTA-Blutes wurden mit 30 ml Lysispuffer versetzt, um die inneren Zellkomponenten freizulegen. Hierzu ist eine 15-minütige Inkubationszeit bei 4°C nötig. Um vor allem die Zellkerne und die DNS-haltigen Mitochondrien im Sediment zu konzentrieren, wird unter den selben Bedingungen bei 1500 *rpm* zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend verworfen und das Pellet (Sediment) mit 10 ml Kernlysispuffer versetzt, um die DNS freizulegen. Dazu werden 660 µl 10% SDS (Sodiumdodocylsulfat) gegeben, das sich als amphiphatisches Detergenz an die DNS anlagert und sie unter Bildung von Micellen umgibt. Zuletzt werden noch 500 µl Pronase E mit einer Konzentration von 20mg/ml beigegeben. Die Lösung wird über Nacht in einem 37°C warmen Schüttelwasserbad durchmischt. Die Pronase E kann in dieser Zeit noch im Gemisch gelöste Proteine abbauen. Alle hier genannten Puffer und deren Herstellung sind im Anhang aufgelistet (Tabelle B1).

Zu dieser Lösung werden am nächsten Tag 3,4 ml gesättigte 6M NaCl-Lösung gegeben, die Lösung wird sofort kräftig durchmischt und anschließend bei Raumtemperatur 20 min lang bei 4000 *rpm* zentrifugiert. Auf diese Weise setzen sich die durch die Salzlösung ausgefällten restlichen Proteine im diesmal zu verwerfenden Sediment ab. Der Überstand wird in einem neuen Falcon-Röhrchen mit 7,5 ml 2-Propranolol versetzt, welches die DNS an der Gemischoberfläche kondensieren läßt. So kann die ausgefallene DNS mit einer Pipettenspitze „gefischt“, in einem Rollröhrchen 10 min getrocknet und anschließend in 400 µl TE-Puffer in Lösung gebracht werden. Diese DNS-haltige Lösung wird über Nacht im Kühlraum auf einem Vibrations-Tisch nochmals durchmischt. Die verwendeten Materialien finden sich in tabellarischer Form im Anhang (Tabellen A3 bis A6).

Kasten 3.1 - Prozedere zur DNS-Extraktion

3.2.2 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die *PCR* wurde für alle drei untersuchten Polymorphismen gemäß Orita *et al.* (1989) durchgeführt:

Mit dieser Methode können die zu untersuchenden Bereiche der DNS innerhalb kurzer

Zeit *in vitro* so stark vervielfältigt werden, dass sie in einer Menge vorliegen, die weitere Untersuchungen wie z.B. eine der Auswertung dienende Gelelektrophorese erst möglich machen (Kasten D1 und D3 im Anhang).

Vor der ersten Durchführung einer *PCR* werden initial die in kristalliner Form vorliegenden *Primer* gemäß Herstellerangaben in zweifach destilliertem Wasser gelöst. Es werden immer zwei verschiedene *Primer* verwendet, als *forward-* und *reverse-Primer* bezeichnet, um das Ablesen beider Stränge zu gewährleisten (Siehe Abb. 5).

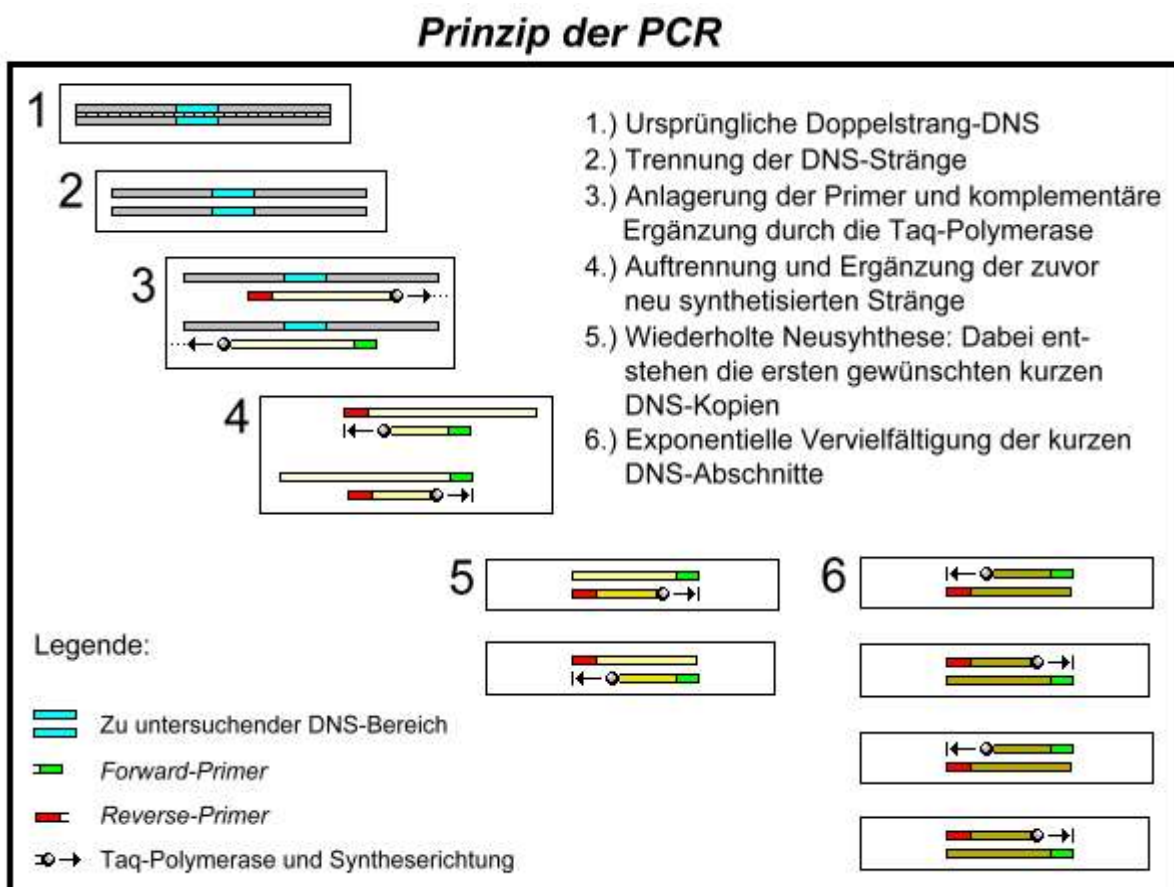


Abbildung 5: Prinzip der DNS-Amplifizierung durch die *PCR* (modifiziert nach Löffler und Petrides, 1998)

Zur Optimierung des Ergebnisses stehen verschiedene Möglichkeiten wie z.B. die Veränderung der Zyklenzahl zur Verfügung. Eine erhöhte Zyklenzahl kann schwache Banden durch verstärkte Amplifizierung des *PCR*-Produktes deutlicher sichtbar machen, erhöht aber auch die Wahrscheinlichkeit der Amplifizierung zufälliger und

unerwünschter Nebenprodukte. Die Temperatur zur *Primer*-Anlagerung kann für die verwendeten *Primer* entsprechend ihres Basengehaltes ebenfalls optimiert werden. Eine weitere Optimierungsmöglichkeit bietet die Konzentration an zugefügtem Magnesium und EDTA: Sowohl Desoxynukleotidtriphosphate als auch EDTA binden zweiwertige Ionen wie z.B. Magnesiumionen. Da die *Taq*-Polymerase sehr empfindlich auf die Magnesiumchlorid-Konzentration reagiert, kann mit diesen Komponenten eine Feinabstimmung erfolgen: Hohe Konzentrationen an Mg^{2+} -Ionen erhöhen die Bildung unerwünschter Nebenprodukte, niedrige Konzentrationen können aber wiederum die *Taq*-Polymerase inaktivieren. Weitere Möglichkeiten stellen Konzentration und pH-Wert des verwendeten Puffers dar.

Der genaue Versuchsablauf der *PCR* für die untersuchten Polymorphismen ist in den Abschnitten 3.3.6 bis 3.3.8 dargestellt.

3.2.3 Restriktion

Zum Schutz vor fremder, z.B. viraler DNS, die an der fehlenden Methylierung erkannt wird, besitzen Bakterien Restriktionsendonukleasen (lat.: *restringere* = festbinden), von denen jede eine für sie charakteristische Basensequenz erkennen und schneiden kann. Diese Eigenschaft kann man sich bei der Untersuchung von biallelischen Polymorphismen zunutze machen: Wird ein *PCR*-Produkt mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease inkubiert, so wird diese Sequenz bei Vorhandensein eines der beiden Allele geschnitten, während das andere Allel von dem Restriktionsenzym nicht erkannt wird und die DNS-Sequenz unverändert bleibt (Kasten D2 im Anhang).

Der genaue Versuchsablauf der Restriktion für die untersuchten Polymorphismen ist in den Abschnitten 3.3.6 und 3.3.7 jeweils gesondert dargestellt, das Prinzip der Restriktion ist im Anhang beschrieben.

3.2.4 Die Gel-Elektrophorese

Die Gel-Elektrophorese ist die Methode der Wahl, um die per *PCR* amplifizierten und

bei Bedarf anschließend restringierten DNS-Abschnitte optisch darzustellen (Kasten D3 im Anhang).

3.2.5 Dokumentation

Das zuvor mit Ethidiumbromid versetzte Gel wird unmittelbar nach erfolgter Elektrophorese auf einen UV-Schirm gelegt und das Ergebnis dokumentiert: Unter UV-Licht leuchten die Banden deutlich sichtbar auf, wobei eine parallel mitgelaufene DNS-Leiter (100bp-Marker) deren Fragmentgrößen anzeigt (Abb. 6).

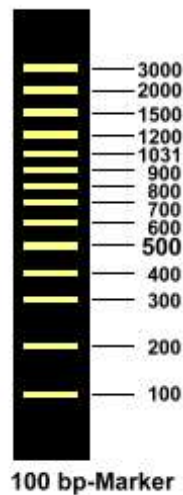


Abbildung 6: Der 100bp-Marker als Indikator für Fragmentlängen

Abbildungen solcher Photodokumentationen zu den jeweiligen untersuchten Polymorphismen finden sich in den folgenden Kapiteln.

3.2.6 TPH 1: PCR und Restriktion zum Tryptophanhydroxylase-1-Gen

Die *Primer* (TPHF und TPHR) wurden gemäß Nielsen *et al.* (1997) ausgewählt und in einer Konzentration von je 10 pmol verwendet (Tabelle 3.1). Der verwendete Reaktions-Mix sowie das *PCR*-Programm sind in den Tabellen 3.2 und 3.3 dargestellt.

<i>Primer F</i> (forward) TPHF-Niel97	5`- TTC CAT CCG TCC TGT GGC TGG TTA – 3`
<i>Primer R</i> (reverse) TPHR-Niel97	5`- TTT GAA CAG CCT CCT CTG AAG CGC – 3`

Tabelle 3.1: Für die Untersuchung des *TPHI*-Gens verwendete *Primer* gemäß Nielsen *et al.* (1997)

Reagenzien des Reaktionsmixes (TPH1)	Menge (Konzentration)
DNS	2,0 µl
H ₂ O	15,5 µl
10x Puffer Goldstar	2,5 µl
MgCl ₂	1,0 µl (25mM)
<i>Primer F</i>	1,0 µl (10 pmol)
<i>Primer R</i>	1,0 µl (10 pmol)
dNTP	1,0 µl (2,5 mM)
HouseTaq	1,0 µl
Gesamtmenge	25,0 µl

Tabelle 3.2: Für die Untersuchung des *TPHI*-Gens verwendeter Reaktionsmix

Dauer, Zyklenanzahl	Temperatur	Vorgang im Thermocycler
3 min	95,0 °C	Initiale Auftrennung der DNS-Doppelhelix
30 sec \	95,0 °C	(I.) Wiederholte Auftrennung zu Beginn des Zyklus
60 sec } 31x	58,0 °C	(II.) Anlagerung der <i>Primer</i>
30 sec /	72,0 °C	(III.) Ergänzung des Einzelstrangs durch dNTP
5 min	72,0 °C	Abschließende Komplementierung
Warteschleife	4,0 °C	Kühlung bis zur Weiterverwendung

Tabelle 3.3: Für die Untersuchung des *TPHI*-Gens verwendete Thermocycler-Einstellungen

Die Restriktion erfolgte durch das Enzym Nhe I, der untersuchte Polymorphismus A218C liegt dabei genau in der Erkennungssequenz dieses Enzyms (Tabelle C1 im Anhang). Eine Restriktion erfolgt dadurch nur bei Vorliegen des C-Allels. Hierfür

wurden 15µl *PCR*-Produkt mit 5 µl Enzym-Mix inkubiert (Tabelle 3.4). Die Inkubationsdauer im Brutschrank bei 37 °C betrug 1h.

Reagenzien	Menge
NhE I	1,0 µl
BSA 1:10	2,0 µl
Puffer2	2,0 µl
Enzym-Mix Gesamtmenge	5,0 µl
Gesamtmenge einschließlich 15,0 µl <i>PCR</i> -Produkt	20,0 µl

Tabelle 3.4: Restriktion mittels Nhe I an der Stelle des Polymorphismus A218C (bei Vorliegen des C-Allels) zur Untersuchung des *TPH1*-Gens

In der folgenden Abbildung (Abbildung 7) sind die Ergebnisse der Restriktion optisch dargestellt: Homozygotes A-Allel (Stelle 6, 9), homozygotes C-Allel (Stelle 2,3,4,9), heterozygote Allele (Stelle 1 und 5, aus abbildungstechnischen Gründen ist das kurze Fragment des C-Allels mit 251bp bei den heterozygoten Proben jeweils schlecht zu erkennen), Leerprobe (Stelle 7), sowie zwei 100bp-Marker.

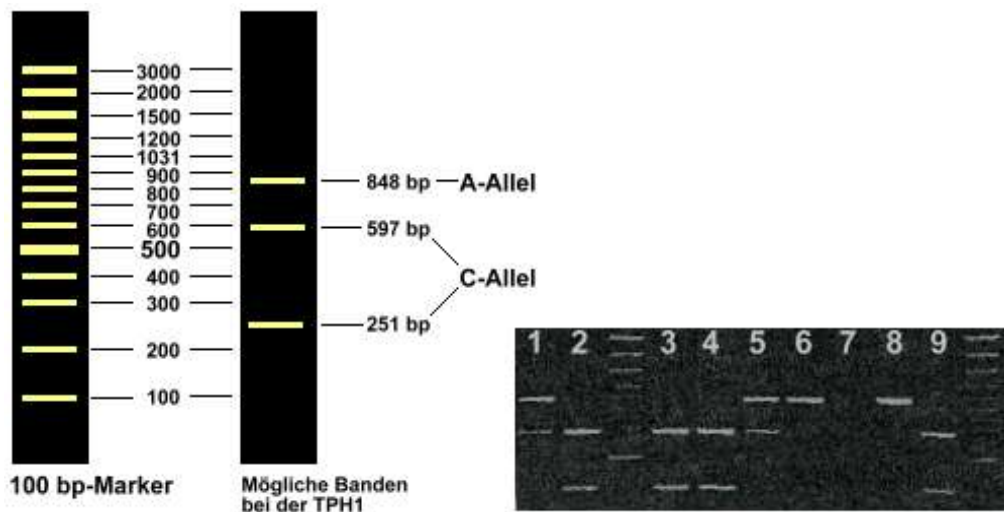


Abbildung 7: Auswertung der *TPH1*-Restriktion anhand des 100bp-Markers.

3.2.7 HTR1B: PCR und Restriktion zum Serotonin-1B-Rezeptor-Gen

Die *Primer* (Tabelle 3.5) wurden gemäß Lappalainen *et al.* (1995) ausgewählt und in einer Konzentration von je 10 pmol verwendet. Der verwendete Reaktions-Mix sowie das *PCR*-Programm sind in den Tabellen 3.6 und 3.7 dargestellt.

<i>Primer F</i> (forward) 5HT1B5	5`- GAA ACA GAC GCC CAA CAG GAC - 3`
<i>Primer R</i> (reverse) 5HT1B6	5`- CCA GAA ACC GCG AAA GAA GAT - 3`

Tabelle 3.5: Für die Untersuchung des *HTR1B*-Gens verwendete *Primer*

Reagenzien des Reaktionsmixes (HTR1B)	Menge (Konzentration)
DNS	2,0 µl
H ₂ O	15,5 µl
10x Puffer Goldstar	2,5 µl
MgCl ₂	1,0 µl (25 mM)
<i>Primer F</i>	1,0 µl (10 pmol)
<i>Primer R</i>	1,0 µl (10 pmol)
dNTP	1,0 µl (2,5 mM)
HouseTaq	1,0 µl
Gesamtmenge	25,0 µl

Tabelle 3.6: Für die Untersuchung des *HTR1B*-Gens verwendeter Reaktionsmix

3 Stichprobe und Methoden

Dauer, Zyklenanzahl	Temperatur	Vorgang im Thermocycler
3 min	95,0 °C	Initiale Auftrennung der DNS-Doppelhelix
30 sec \	95,0 °C	(I.) Wiederholte Auftrennung zu Beginn des Zyklus
30 sec } 30x	57,0 °C	(II.) Anlagerung der <i>Primer</i>
30 sec /	72,0 °C	(III.) Ergänzung des Einzelstrangs durch dNTP
7 min	72,0 °C	Abschließende Komplementierung
Warteschleife	4,0 °C	Kühlung bis zur Weiterverwendung

Tabelle 3.7: Für die Untersuchung des *HTR1B*-Gens verwendete Thermocycler-Einstellungen

Das Enzym *HinC II* wurde so gewählt, daß der untersuchte, intronische Polymorphismus G861C in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzymes liegt (Tabelle C2 im Anhang). Jeweils 15µl *PCR*-Produkt wurden mit 5 µl Enzym-Mix inkubiert (Tabelle 3.8). Die Inkubationsdauer im Brutschrank bei 37 °C betrug 2h.

Reagenzien	Menge
<i>HinC II</i>	1,0 µl
BSA 1:10	2,0 µl
Puffer 3	2,0 µl
Enzym-Mix Gesamtmenge	5,0 µl
Gesamtmenge einschließlich 15,0 µl <i>PCR</i> -Produkt	20,0 µl

Tabelle 3.8: Restriktion zur Untersuchung des *HTR1B* mittels *HinC II* an der Stelle des untersuchten Polymorphismus G861C.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Restriktion optisch dargestellt.

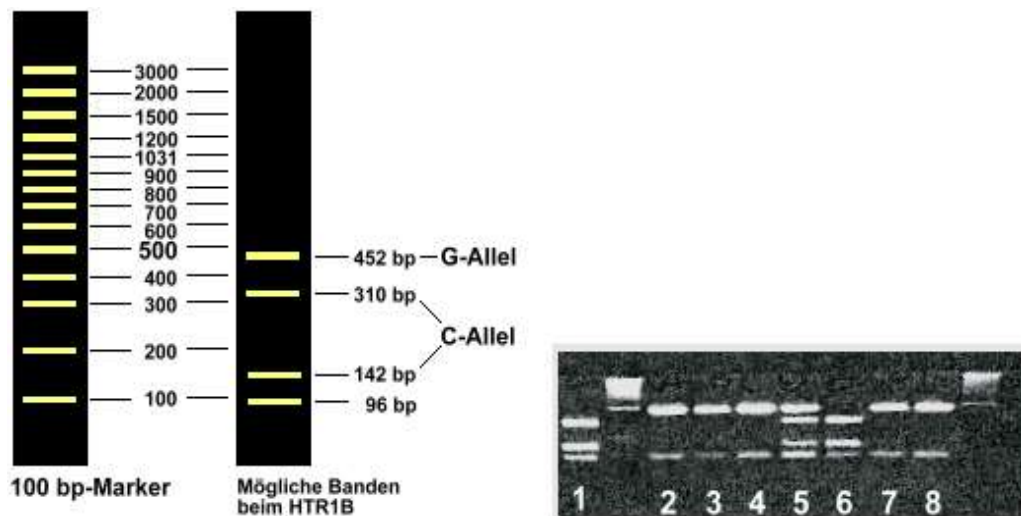


Abbildung 8: Auswertung der *HTR1B*-Restriktion anhand des 100bp-Markers. Homozygotes G-Allel (Stelle 2,3,4,7,8), homozygotes C-Allel (Stelle 1,6), heterozygote Allele (Stelle 5), sowie zwei 100bp-Marker. Eine Leerprobe ist nicht mit abgebildet. Das 96bp-Segment wird aufgrund einer weiteren, immer vorhandenen Erkennungssequenz in jedem Fall durch *HinC II* geschnitten.

3.2.8 *SLC6A4*: PCR zum Serotonintransporter

Die *Primer* (Tabelle 3.9) wurden gemäß Heils *et al.* (1996) ausgewählt und in einer Konzentration von je 10 pmol verwendet. Der verwendete Reaktions-Mix sowie das *PCR*-Programm sind in den Tabellen 3.10 und 3.11, die Ergebnisse der *PCR* in Abbildung 9 dargestellt.

<p><i>Primer F</i> (forward) 5HTT-F 5`- GGC GTT GCC GCT CTG AAT GC – 3`</p> <p><i>Primer R</i> (reverse) 5HTT-R 5`- GAG GGA CTG AGC TGG ACA TGG ACA ACC AC – 3`</p>

Tabelle 3.9: Für die Untersuchung des *SLC6A4*-Gens verwendete *Primer*

3 Stichprobe und Methoden

Reagenzien des Reaktionsmixes (SLC6A4)	Menge (Konzentration)
DNS	1 μ l
H ₂ O	16,5 μ l
10x Puffer Goldstar	2,5 μ l
MgCl ₂	1 μ l (25mM)
<i>Primer F</i>	1 μ l (10 pmol)
<i>Primer R</i>	1 μ l (10 pmol)
dNTP	1 μ l (2,5 mM)
HouseTaq	1 μ l
Gesamtmenge	25,0 μ l

Tabelle 3.10: Für die Untersuchung des *SLC6A4* verwendeter Reaktionsmix

Dauer, Zyklenanzahl	Temperatur	Vorgang im Thermocycler
3 min	95,0 °C	Initiale Auftrennung der DNS-Doppelhelix
45 sec \	95,0 °C	(I.) Wiederholte Auftrennung zu Beginn des Zyklus
45 sec } 35x	61,2 °C	(II.) Anlagerung der <i>Primer</i>
45 sec /	72,0 °C	(III.) Ergänzung des Einzelstrangs durch dNTP
5 min	72,0 °C	Abschließende Komplementierung
Warteschleife	10,0 °C	Kühlung bis zur Weiterverwendung

Tabelle 3.11: Für die Untersuchung des *SLC6A4*-Gens verwendete Thermocycler-Einstellungen

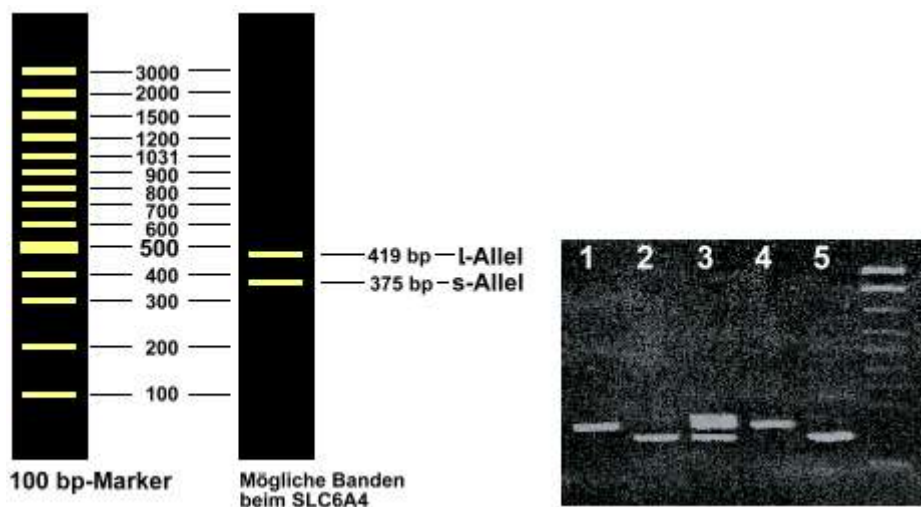


Abbildung 9: Auswertung der *SLC6A4*-PCR anhand des 100bp-Markers: Homozygotes l-Allel (Stelle 1 und 4), homozygotes s-Allel (Stelle 2 und 5), heterozygote Allele (Stelle 3), sowie ein 100bp-Marker.

Eine Restriktion war im Falle des *SLC6A4*-Gens, wie oben beschrieben, nicht nötig, da es sich um keinen *SNP*, sondern einen Polymorphismus handelt, der sich je nach Allel aus seiner unterschiedlichen Länge ergibt. Zur Veranschaulichung ist die Gen-Sequenz des *SLC6A4* in der Tabelle C3 im Anhang dargestellt.

3.4 Statistische Auswertung

Jeder Mensch besitzt einen doppelten Chromosomensatz, wodurch sich an jedem Genort ein mütterliches und ein väterliches Allel befindet. Zur statistischen Auswertung werden nur diejenigen Trios herangezogen, bei denen beide Eltern in Bezug auf den jeweils untersuchten Polymorphismus heterozygot sind, d.h. zwei verschiedene Allele besitzen. Auf diese Weise wird isoliert untersucht, ob eines der beiden Allele bei heterozygoten Elternpaaren häufiger auf das an Zwangsstörungen erkrankte Kind übertragen worden ist. Ethnisch bedingte Stratifikationseffekte, wie sie bei Fall-Kontroll-Untersuchungen auftreten können, werden durch Heranziehen der Allele der biologischen Eltern als interne Kontrolle vermieden.

3.4.1 TDT-Test

Die Verteilung der vorgefundenen Allele der untersuchten Trios wurde zunächst auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht geprüft. Nach Ermittlung der einzelnen Ergebnisse zu den drei untersuchten Variationen wurde aufgrund der multiplen Untersuchung dreier Polymorphismen eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

Um das Vorliegen einer Kopplung zu untersuchen, sowie ein dadurch mögliches Kopplungsungleichgewicht, d.h. den Zusammenhang des untersuchten Polymorphismus mit dem Auftreten eines bestimmten Phänotyps, wurde die gefundene Allelverteilung mit Hilfe des *Transmission-Disequilibrium-Testes (TDT)* ausgewertet (Spielman *et al.*, 1993). Der *TDT* vergleicht dabei transmittierte und nicht-transmittierte Allele anhand einer Vier-Felder-Tafel, deren Auswertung mittels des χ^2 -Tests erfolgt.

Das einfache Signifikanzniveau wurde im Vorfeld auf $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht war für alle untersuchten Varianten erfüllt, die Allelfrequenzen der untersuchten Polymorphismen zeigten sich in der vorliegenden Arbeit abgesehen von denen des HTR1B in Bezug auf Zwangsstörungen vergleichbar mit denen entsprechender früherer Veröffentlichungen.

4.1 Die Tryptophanhydroxylase 1 (TPH1)

Bei Kindern und Jugendlichen zeigte sich kein Transmissionsungleichgewicht für die untersuchte Variation im *TPH1*-Gen. Der zweiseitige χ^2 -Test ergab bei 59 heterozygoten Elternpaaren (und damit auswertbaren Trios) einen Wert von $p=0,52$ und entspricht damit nicht den Kriterien eines signifikanten Ergebnisses (Siehe Tabelle 4.1).

4.2 Der Serotonin-Rezeptor Serotonin-1B-Rezeptor (HTR1B)

Die nach der Literatur zu erwartende gehäufte Transmission des G-Allels des Polymorphismus rs6296 bei Kindern und Jugendlichen mit Zwangsstörungen konnte bei einem auf $p<0,05$ festgelegten Signifikanzniveaus mit einem zweiseitig ermittelten TDT-Wert von 0,19 nicht bestätigt werden (Siehe Tabelle 4.1). Das C-Allel zeigte in der vorliegenden Stichprobe eine erhöhte Transmission.

4.3 Der Serotonintransporter (SLC6A4)

In der untersuchten Stichprobe zeigte sich keine signifikante Assoziation zwischen dem l-Allel des 5HTTLPR-Polymorphismus und Zwangsstörungen bei Kindern und Jugendlichen. Trotz einer erkennbaren Tendenz, dass das l-Allel bei kindlichen Zwangsstörungen häufiger transmittiert wird, ergab sich bei Festlegung des Signifikanzniveaus auf $p < 0,05$ nach statistischer Auswertung bei einem zweiseitigem p-Wert von 0,17 jedoch kein signifikanter Zusammenhang.

Die Ergebnisse aller drei Untersuchungen sind in der Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Gen (*Accession-No.)	Marker (Allel)	Informative Trios ($n_{\text{ges}}=64$)	Transm.	Nicht transm.	Doppelseitiger p-Wert (TDT)
<i>Tryptophanhydroxylase 1</i> (*191060)	Rs1800532 (früher A218C)	59	27	32	0.52
<i>Serotonintransporter</i> (*182138)	5HTTLPR	63	37	26	0.17
<i>Serotonin-1B-Rezeptor</i> (*182131)	Rs6296 (früher G861C)	38	15	23	0.19

Tabelle 4.1: *Transmission disequilibrium test (TDT)* bei 64 Trios bestehend aus jungen Patienten mit Zwangsstörungen und deren leiblichen Eltern. Untersucht wurden folgende Polymorphismen: rs1800532 im Tryptophanhydroxylase-Gen, 5HTTLPR im Serotonintransporter-Gen und rs6296 im Gen des 5-HT-1B-Rezeptors.

5 Diskussion

Aufgrund der multifaktoriellen Genese von Zwangsstörungen (wie auch allgemein der meisten psychiatrischen Störungen), ist von einem summatorischen Effekt mehrerer Einzelkomponenten auszugehen, die sich zuletzt in der Auslösung von Zwangsstörungen manifestieren. Dabei sind bisher weder die auslösenden Faktoren im Einzelnen bekannt, noch deren Einfluß auf den Phänotyp der Erkrankung. Die meisten molekulargenetischen Studien sind dabei Assoziationsstudien, die dem multifaktoriellen Charakter der Erkrankung am ehesten gerecht werden (Baron, 2001). Die meisten dieser Assoziationsstudien widmen sich dabei der Untersuchung bekannter Polymorphismen in bekannten Genen. Prinzipiell ist dabei die Untersuchung anhand von Trios durch die Vermeidung von Verfälschungen durch ethnisch-beeinflusste Allelfrequenzen empfehlenswert.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob und in wieweit Varianten in serotonergen Kandidatengenen an der Pathogenese von Zwangsstörungen bei Kindern und Jugendlichen beteiligt sind bzw. mit Zwangsstörungen mit frühem Beginn assoziiert sind.

In mehreren Studien konnte der bei *early-onset-OCD* (vor dem 18. Lebensjahr) im Gegensatz zu *late-onset-OCD* stärkere genetische Einfluß auf die Erkrankung gezeigt werden (Pauls *et al.*, 1995; Nestadt *et al.*, 2000; Hanna *et al.*, 2005). Der Anteil an Verwandten ersten Grades, die ebenfalls an Zwangsstörungen leiden, wird bei *early-onset-OCD* mit 10,3% bis 11,7% (Pauls *et al.*, 1995; Nestadt *et al.*, 2000) bzw. mit bis zu 22,5% angegeben (Hanna *et al.*, 2005), gegenüber 2,0% bis 2,7% bei Verwandten ersten Grades von Vergleichspersonen (Nestadt *et al.*, 2000; Hettrema *et al.*, 2001; Hanna *et al.*, 2005). Das gleichzeitige Auftreten von Zwangsstörungen wird bei den Verwandten von jungen Patienten mit Zwangsstörungen insgesamt als fast doppelt so häufig angegeben wie das entsprechende Auftreten bei Verwandten erwachsener Patienten mit Zwangsstörungen (Pauls *et al.*, 1995).

Besonders bei Zwangsstörungen zeigte sich, daß tricyclische Antidepressiva, welche anders als z.B. Clomipramin keine Wirkung am Serotonintransporter haben, auch die

Zwangssymptomatik nicht beeinflussen können (Wewetzer, 2004). Aufgrund der Wirksamkeit von selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern in der Pharmakotherapie von jungen Patienten mit Zwangsstörungen, richtete sich der Fokus jüngerer Erklärungsmodelle v.a. auf neuroanatomische Dysfunktionen des serotonergen Systems und die Ebene der Neurotransmitter.

Aus diesem Grund sollte in dieser Untersuchung eine Assoziation von Zwangsstörungen und einzelnen ausgewählten Polymorphismen in den Genen der Tryptophanhydroxylase (TPH1), des Serotonin-1B-Rezeptors (HTR1B) und des Serotonintransporters (SLC6A4) untersucht werden.

Aufgrund der multifaktoriellen Pathogenese muß mit einer Vielzahl auf die Erkrankung Einfluss nehmender Gene gerechnet werden, die sich im Sinne eines Schwelleneffekts addieren, wahrscheinlich aber nicht selbständig krankheitsauslösend sondern nur prädisponierend sind. Gene, die nur einen schwachen Effekt auf eine Erkrankung ausüben, sind dabei mit Hilfe von Assoziationsstudien besser identifizierbar als z.B. durch Kopplungsanalysen (Baron, 2001). Einzelne Polymorphismen in diesen Genen können ihrerseits je nach Lokalisation auf dem Gen unterschiedlich starke Auswirkungen auf den Phänotyp der Erkrankung haben.

Bisherige Forschungsergebnisse, die zum Zeitpunkt der Untersuchung ausschließlich bei erwachsenen Patienten eine Assoziation zwischen Polymorphismen serotonerger Gene und Zwangsstörungen gezeigt hatten, sollten in der vorliegenden Arbeit bei Kindern und jugendlichen Patienten untersucht werden.

Hierzu wurden die genannten Genvarianten bei 64 Trios, bestehend aus einem jungen Patienten und seinen leiblichen Eltern, mittels molekulargenetischer Methoden untersucht. Nach Stand der Forschung war dies die erste familienbasierte molekulargenetische Assoziationsstudie von Patienten mit Zwangsstörungen im Kindes- und Jugendalter.

5.1 Das Tryptophanhydroxylase-1-Gen (*TPH1*)

Ausgewählt wurde der Polymorphismus rs1800532 (A218C) aufgrund der exponierten Stellung der TPH als geschwindigkeitsbestimmendes anaboles Enzym im Serotonin-Stoffwechsel. Entsprechend stellten Nielsen *et al.* (1992; 1994) die Hypothese auf, daß Veränderungen im Gen der TPH1 die Verfügbarkeit von Serotonin und damit dessen Wirkung auf das menschliche Verhalten beeinflussen könnten. In ihren Untersuchungen konnten die Autoren bei Vorliegen des C-Allels des von Ihnen entdeckten biallelischen *SNP* rs1800532 (vormals A218C) eine Assoziation zwischen einer niedrigen Konzentration des Serotonin-Metaboliten 5-Hydroxy-Indolacetat (5-HIAA) im Liquor und suizidalem Verhalten in einer Gruppe von finnischen alkoholabhängigen Patienten mit aggressivem Verhalten beschreiben (Nielsen *et al.*, 1994).

Einen Zusammenhang zwischen dem rs1800532 und niedrigem 5-HIAA-Spiegel im Liquor konnten Jonsson *et al.* (1997) dabei auch bei gesunden männlichen Probanden finden. Eine Assoziation mit dem homozygoten Vorliegen des C-Allels des o.g. Polymorphismus mit impulsivem, aggressivem Verhalten konnten New *et al.* (1998) bestätigen.

Andererseits konnte eine Assoziation zwischen dem homozygoten Vorliegen des A-Allels dieses *SNP* und suizidalem Verhalten in zwei weiteren Untersuchungen gefunden werden, wobei kein Zusammenhang mit Alkoholismus bestand (Mann *et al.*, 1997; Arango *et al.*, 2003).

In den genannten Studien zur Untersuchung des Polymorphismus konnte somit ein biochemisches Korrelat bzw. ein das Verhalten beeinflussender Effekt gefunden werden. Obwohl es sich bei dem in diesen Studien untersuchten *SNP* (rs1800532) um einen „stillen“ Polymorphismus, das heißt einen nicht die Basenkodierung beeinflussenden Nukleotidtausch handelt, sprechen die gesehenen Veränderungen im Serotoninmetabolismus für einen Einfluß auf das Verhalten; eine Assoziation auch mit anderen psychiatrischen Erkrankungen erscheint dadurch möglich.

Dies betrifft umso mehr Zwangsstörungen, als hier die therapeutische Wirksamkeit der *SSRIs* mit der durch sie bewirkten Erhöhung von Serotonin im synaptischen Spalt ebenfalls einen für die Pathogenese mitverantwortlichen niedrigen Serotoninspiegel

vermuten lassen.

In einer Untersuchung von 39 erwachsenen Patienten mit Zwangsstörungen ohne Medikation konnte eine mögliche Assoziation zwischen Zwangsstörungen und niedrigem 5-HIAA-Spiegel im Liquor allerdings nicht bestätigt werden (Leckman *et al.*, 1995), die Autoren fanden stattdessen eine signifikant erniedrigte Tyrosin-Konzentration im Liquor der untersuchten Patienten mit Zwangsstörungen ($p < 0,05$). Tyrosin wird aus der essentiellen Aminosäure Phenylalanin synthetisiert, ein unmittelbarer Zusammenhang dieser beiden Aminosäuren mit dem Tryptophan-Stoffwechsel, aus dem wiederum Serotonin synthetisiert wird, besteht jedoch nicht.

Nur eine Arbeit untersuchte bislang den Zusammenhang zwischen *TPH1* und Zwangsstörungen bei Erwachsenen (Frisch *et al.*, 2000). Sowohl in der Gruppe der Patienten als auch in der der Kontrollprobanden fanden sich Personen unterschiedlicher ethnischer Herkunft (Ashkenazi vs. Nicht-Ashkenazi), die sich in ihrer Allelverteilung unterschieden. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Patienten und der Gruppe der gesunden Kontrollen fand sich nicht.

Da es nur eine Untersuchung gab, das Gen aber relevanter Kandidat ist, wurde trotz dieses negativen Ergebnisses der Zusammenhang anhand der vorliegenden Stichprobe junger Patienten mit Zwangsstörungen untersucht.

Die Hypothese einer Assoziation der Allele des *single-nucleotide*-Polymorphismus (*SNP*) rs1800532 im Gen der *TPH1* bei Patienten mit der Diagnose „Zwangsstörungen mit frühem Krankheitsbeginn“ wurde in der vorliegenden Untersuchung bei nicht-signifikantem Ergebnis abgelehnt. Die Allelverteilungen stellten sich dabei als annähernd ausgewogen dar, sodaß in dieser Untersuchung auch keine tendenziell gehäufte Transmission zu erkennen ist.

Interessanterweise konnte in einer jüngeren Studie nach Abschluß der vorliegenden Arbeit anhand eines „RNase-*Protection-essay*“ eine zweite *TPH*-Isoform gefunden werden (Walther *et al.*, 2003). Diese als *TPH2* bezeichnete Isoform zeigte eine ausgeprägte und ausschließliche Expression im Gehirn von Mäusen, während sie

5.1 Das Tryptophanhydroxylase-1-Gen (TPH1)

peripher (Duodenum, Niere, Lunge) nicht nachgewiesen werden konnte. Umgekehrt wurde die bisher bekannte *TPH1* bei Mäusen fast ausschließlich im Intestinum nachgewiesen, während ihre Expression im Gehirn eng umschrieben auf das *Corpus pineale* begrenzt war, einer u.a. für den Tag-Nacht-Rhythmus verantwortlichen Hirnanhangsdrüse. Dabei zeigte sich eine entsprechend stark erhöhte nächtliche Expression der TPH1 im *Corpus pineale* von Ratten (Sugden, 2003), die TPH2 hingegen zeigte in diesem Bereich eine wesentlich geringere Konzentration als die TPH1.

Zhang et al. (2004) beschrieben kurz darauf, ebenfalls bei Mäusen, einen funktionellen Polymorphismus im Gen der neu entdeckten *TPH2* mit Einfluß auf einen geringeren Serotoninumsatz.

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit konnten Zill et al. (2005) auch beim Menschen in einer *post-mortem*-Untersuchung bei acht erwachsenen Individuen v.a. im Bereich der Raphe-Kerne eine deutlich höhere Expression von *TPH2-mRNA* gegenüber der *TPH1-mRNA* zeigen. Untersucht wurden dabei verschiedene zentrale Hirnregionen (Cortex, Thalamus, Hypothalamus, Hippocampus, Amygdala, Kleinhirn und die Raphe-Kerne). Eine Expression von *TPH1-mRNA* konnte, wenn auch in deutlich geringerer Ausprägung, in allen untersuchten Hirnregionen ebenfalls gefunden werden.

Aufgrund dieser im zentralen Nervensystem deutlich höheren Expression der TPH2 untersuchten Mössner et al. (2005) 71 Trios mit Indexpatienten im Kindes- und Jugendalter auf eine Assoziation zwischen Zwangsstörungen und Polymorphismen im Gen der *TPH2*. Dabei fanden die Autoren eine signifikante Assoziation zwischen dem *single-nucleotide*-Polymorphismen rs4570625 und Zwangsstörungen bei Kindern und Jugendlichen, sodaß die weitere Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen Varianten der *TPH2* und der Pathogenese der Zwangsstörungen im Kindes- und Jugendalter besonders interessant erscheint.

Eine Beteiligung der hier untersuchten *TPH1* an der Pathogenese psychiatrischer Erkrankungen wie der Zwangsstörungen ist damit zwar theoretisch weiterhin denkbar, erscheint jedoch unwahrscheinlich. Die bisherigen negativen Befunde zu Zwangsstörungen und Polymorphismen der *TPH1* wie auch der negative Befund der

vorliegenden Untersuchung erscheinen somit, insbesondere nach den oben genannten Befunden von Walther *et al.* (2003), plausibel.

5.2 Das Serotonin-Rezeptor-1B-Gen (*HTR1B*)

Aufgrund seiner Funktion als regulierendes Element der Serotonin-Ausschüttung nimmt der präsynaptische Serotonin-Autorezeptor 1B (*HTR1B*) eine besondere Stellung unter den Serotonin-Rezeptoren ein.

In einer pharmakologischen Studie konnten Koran *et al.* (2001) bei fünf Patienten eine signifikante Verstärkung der Zwangssymptomatik unter Verabreichung von Sumatriptan, einem Agonisten des Autorzeptors, aufzeigen.

In einer neueren Veröffentlichung konnte bei 10 erwachsenen Patienten mit Zwangsstörungen ohne Medikation erneut eine Symptomverstärkung durch Sumatriptan sowie durch den sowohl für den *HTR1B* wie auch für den *HTR2C* spezifischen Liganden m-Chlorophenylpiperazin (m-CPP) gesehen werden (Gross-Isseroff *et al.*, 2004).

Aufgrund des bisherigen Mangels nur für den *HTR1B* hochselektiver Agonisten sind bisherige Befunde pharmakologischer Studien in ihrer Aussagekraft jedoch eingeschränkt.

Polymorphismen des *HTR1B* bleiben aufgrund des Einflusses auf die Verfügbarkeit von Serotonin im synaptischen Spalt interessante Kandidatengene für Zwangsstörungen.

In zwei familienbasierten Assoziationstudien konnten Mundo *et al.* (2000, 2002) eine signifikante Assoziation zwischen dem G-Allel des biallelischen Polymorphismus G861C (rs6296) und Zwangsstörungen bei erwachsenen Patienten beschreiben.

Dieses Ergebnis konnten DiBella *et al.* (2002) bei einer Untersuchung von 48 informativen Trios zwar nicht signifikant replizieren, jedoch wurde auch hier das G-Allel bei Patienten mit Zwangsstörungen tendenziell häufiger transmittiert ($p=0,13$). Das mittlere Alter der Patienten in der genannten Studie lag dabei jedoch bei 30 Jahren, wobei die Erstmanifestation der Symptome mit durchschnittlich 16 Jahren beschrieben wurde. Damit ist unklar, bei wievielen Patienten von einem tatsächlich frühen

Krankheitsbeginn ausgegangen werden kann. Auch Camarena *et al.* (2004) fanden bei erwachsenen Patienten mit Zwangsstörungen mexikanischer Herkunft (Alter bei Erkrankungsbeginn 19,1 ± 6,4 Jahre) bei einer Untersuchung von 47 Trios nur ein tendenziell gehäuftes Auftreten des G-Allels.

Im Gegensatz dazu konnten Hemmings *et al.* (2003) bei 71 erwachsenen Patienten und 129 Kontrollen keine Assoziation dieses Markers beschreiben, die Befunde dieser Untersuchung sind jedoch eingeschränkt zu werten, da es sich um eine heterogene südafrikanische Population holländischen, deutschen und französischen Ursprungs handelte.

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Patienten mit einem frühen Erkrankungsbeginn die von Mundo *et al.* (2000, 2002) bei erwachsenen Patienten gefundene Assoziation nicht.

Die Hypothese einer positiven Assoziation des G-Allels des HTR1B-Polymorphismus G861C (rs6296) mit Zwangsstörungen konnte bei Kindern und Jugendlichen demnach nicht bestätigt werden.

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich auch keine tendenziell erhöhte Transmission für das G-Allel. Zum einen kann dies auf die unterschiedlichen Stichproben (Erwachsene bei Mundo *et al.* (2000, 2002), Kinder bzw. Jugendliche in dieser Arbeit), bzw. die unterschiedliche Pathogenese bei beiden Patientengruppen zurückzuführen sein, zum anderen besteht die Möglichkeit eines falsch positiven Ergebnisses in der Untersuchung von Mundo *et al.* (2002) bzw. eines falsch negativen Ergebnisses in der vorliegenden Untersuchung. Beides könnte durch die möglicherweise zu kleinen Studiengruppen erklärbar sein.

5.3 Das Serotonintransporter-Gen (*SLC6A4*)

Eine Dysfunktion des Serotonintransporters bzw. eine erhöhte Aktivität oder verstärkte Expression könnte entsprechend eine höhere Konzentration und verlängerte Präsenz von Serotonin im synaptischen Spalt bewirken.

Bei der Pharmakotherapie von Zwangsstörungen haben sich die den Serotonintransporter blockierenden Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (*SSRI*), die funktionell eine solche Dysfunktion bewirken, als Therapie der ersten Wahl etabliert (Zohar *et al.*, 2000; Wewetzer, 2004). Entsprechend kann hypothetisch ein relativer Serotoninmangel im synaptischen Spalt als mögliche, eine Zwangsstörung begünstigende oder auslösende, Komponente angenommen werden.

Auf neuroanatomischer Ebene konnte bei erwachsenen Patienten mit Zwangsstörungen anhand einer SPECT-Untersuchung (*single photon emission computed tomography*) eine verringerte *in-vivo*-Dichte des Serotonintransporters in den höheren Arealen des Hirnstammes, in denen sich auch die serotonergen Raphe-Kerne befinden, gefunden werden (Stengler-Wentzke *et al.*, 2004). Dies könnte den Autoren zufolge durch eine verringerte Anzahl an serotonergen Neuronen in diesem Bereich bedingt sein.

Heils *et al.* (1996) konnten im Gen des Serotonintransporters einen in der Promotor-Region liegenden, in zwei unterschiedlich langen Varianten auftretenden Polymorphismus finden, dessen häufigeres Allel (*long* - l) im Vergleich zum kürzeren (*short* - s) sich auf eine verstärkte Expression und gleichzeitig *in vitro* auf eine erhöhte Aktivität des Serotonintransporters und damit auf eine verstärkte Serotonin-Wiederaufnahme auswirkte (Siehe Abb. 2.4, Kapitel 2.5).

Aufgrund dieses Befundes bot sich das Serotonintransporter-Gen als Kandidatengen für eine entsprechende Assoziationsstudie bei Patienten mit Zwangsstörungen an.

Signifikante Zusammenhänge von Zwangsstörungen und dem l-Allel bei erwachsenen Patienten wurden beschrieben (McDougle *et al.*, 1998; Bengel *et al.*, 1999), wobei in der Untersuchung von Bengel *et al.* ein gehäuftes homozygotes Auftreten des l-Allels bei den Patienten beobachtet wurde.

Frisch *et al.*, (2000) konnten dagegen keine Assoziation mit dem l-Allel finden. Bei Patienten und Kontrollprobanden stellte sich kein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung dar. Es kann davon ausgegangen werden, daß ethnische Stratifizierungseffekte das Ergebnis dabei möglicherweise deutlich beeinflusst haben.

Ebenfalls negativ in Bezug auf eine Assoziation des l-Allels mit Zwangsstörungen bei

5.3 Das Serotonintransporter-Gen (SLC6A4)

Erwachsenen war die Untersuchung von Camarena *et al.* (2001) sowohl bei 115 Patienten mit Zwangsstörungen und 136 gesunden Probanden als auch bei 43 Trios.

Zum selben Ergebnis kamen in einer jüngeren Veröffentlichung auch Meira-Lima *et al.* (2004), die bei 79 Patienten mit Zwangsstörungen und 202 gesunden Probanden keine Assoziation zwischen dem 5-HTTLPR-Polymorphismus und Zwangsstörungen bei Erwachsenen finden konnten.

Ebenfalls nach Abschluß der vorliegenden Arbeit replizierte eine französisch-deutsche Forschergruppe (Chabane *et al.*, 2004) dieses Ergebnis: Bei einer Fall-Kontroll-Untersuchung (106 französische Patienten mit Zwangsstörungen und 171 Kontrollprobanden) wichen die Allelfrequenzen des l-Allels bei den Patienten nur minimal von denen der Kontrollen ab. Bei einer hierbei gleichzeitig durchgeführten Familienstudie (116 Trios mit 73 französischen Patienten aus der selben Gruppe wie bei der Fall-Kontroll-Untersuchung und 43 deutschen Patienten) konnte keine signifikante Assoziation zwischen dem 5-HTTLPR-Polymorphismus und Zwangsstörungen gefunden werden. Das retrospektiv erfaßte mittlere Alter bei Erkrankungsbeginn der französischen Patienten lag bei 12,7 +/- 6,2 Jahren und entsprach damit weitgehend einem *early-onset-OCD*, das mittlere Alter bei Erkrankungsbeginn der deutschen Patienten lag mit 22,7 +/- 8,9 Jahren dagegen deutlich höher. Da sich bei der Trio-Untersuchung die Allelfrequenzen des l-Allels bei den Patienten beider Herkunftsländer nur geringfügig unterschieden, wurden sie zusammen ausgewertet (Chabane *et al.*, 2004).

Aufgrund der großen Zahl der untersuchten Trios ist die Aussagekraft dieser Untersuchung als hoch einzuschätzen, das z.T. stark unterschiedliche Alter der untersuchten Patienten bei Beginn der Erkrankung läßt dennoch für die Patienten mit frühem Erkrankungsbeginn nur bedingt Rückschlüsse auf die Häufigkeit des l-Allels zu.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die funktionelle Variante des *5HTTLPR* bei Kindern und Jugendlichen mit Zwangsstörungen untersucht werden.

Die Hypothese der Assoziation des l-Allels des *SLC6A4*-Polymorphismus und *early-onset-OCD* bestätigte sich dabei nicht.

Das Fehlen einer Assoziation zum l-Allel des *5HTTLPR* könnte durch die

Stichprobengröße bedingt sein, dabei stellte es sich als methodisch problematisch dar, daß nur heterozygote Träger herangezogen werden können, was die untersuchbare Fallzahl weiter einschränkt. Es zeigte sich jedoch zumindest ein tendenzieller Befund in die ursprünglich erwartete Richtung. Andererseits besteht eine Übereinstimmung mit den Befunden von Chabane *et al.* (2004), die später ebenfalls Patienten mit frühem Erkrankungsbeginn untersuchten.

In Bezug auf alle drei oben beschriebenen Polymorphismen in den Genen der Tryptophanhydroxylase, des HTR1B, sowie des Serotonintransporters, hatte das Studiendesign der vorliegenden Arbeit seine Stärke in der Untersuchung von Trios, wodurch ethnische Stratifizierungseffekte vermieden werden konnten. Die Erstmanifestation konnte durch den geringen zeitlichen Abstand von Anamnese und Untersuchung genauer erfragt werden, als dies bei erwachsenen Patienten und u.U. lange zurückliegender Erstmanifestation möglich ist. Dadurch ist die Stichprobe für Patienten, die im Kindes- und Jugendalter an Zwangsstörungen erkranken, repräsentativer, als dies bei bisherigen Studien der Fall war.

Obwohl zwei der drei Polymorphismen sogenannte „stille“ Polymorphismen sind, die, wie im Kapitel 3.4 bereits erläutert, keine unmittelbar veränderte Transkription bewirken, ist ein möglicher Einfluß auf den Phänotyp durch ein *linkage-disequilibrium* (Kopplungsungleichgewicht im Rahmen eines Basenaustausches) des untersuchten Polymorphismus mit einem anderen, in der Nähe liegenden Polymorphismus durchaus möglich.

Überlegungen, daß die als Einschlußkriterium akzeptierten komorbiden Störungen (Kapitel 3.1.1) in Kombination mit Zwangsstörungen möglicherweise als eigenständige Subgruppen innerhalb der Zwangsstörungen zu verstehen sind, gibt es vor allem für Tic-Störungen: So fanden unter anderem Pauls *et al.* (1995) und Peterson *et al.* (2001) einen signifikanten Zusammenhang zwischen Tics und Zwangsstörungen bei Kindern und Jugendlichen. Zudem konnte gezeigt werden, daß in der Kindheit auftretende Tics ein gehäuftes Vorkommen von Zwangssymptomen im späteren Verlauf anzeigen können (Peterson *et al.*, 2001). Gleiches galt in dieser Studie für die

5.3 Das Serotonintransporter-Gen (SLC6A4)

Aufmerksamkeitsdefizit- und Hyperaktivitäts-Störung, die am häufigsten vorliegende komorbide Störung, auch hier war eine wechselseitige Vorhersage durch die jeweiligen Störungen möglich (Peterson *et al.*, 2001).

Demgegenüber wenden jedoch Geller *et al.* (2002) ein, daß es sich hierbei vermutlich dennoch um eine unabhängige Komorbidität handelt, da sich die Störung unabhängig von einem alleinigen Auftreten oder einer Kombination mit Zwangsstörungen phänotypisch sowie von der Häufigkeit des Auftretens her gleichartig präsentiert.

Möglicherweise stellen sich in Zukunft jedoch unterschiedliche klinische Manifestationen der Zwangsstörungen als genetisch heterogen bedingt heraus: So zeigte sich z.B. bei Patienten mit Ordnungszwängen eine signifikant höhere Lebenszeitprävalenz der Zwangsstörungen unter deren Verwandten ersten Grades als bei Verwandten von Patienten ohne solche Ordnungszwänge (Hanna *et al.*, 2005). Eine eindeutige phänotypische Einteilung erscheint jedoch schwierig, da viele Zwangspatienten unter multiplen Zwängen leiden (Hanna *et al.*, 1995).

6 Ausblick

Im Vergleich zu Untersuchungen von Zwangsstörungen bei erwachsenen Patienten gibt es im Bereich der Kinder- und Jugendpsychiatrie nach wie vor kaum Veröffentlichungen, die sich auf die molekulargenetischen Grundlagen der Pathogenese von Zwangsstörungen speziell bei jungen Patienten beziehen. Gerade in Anbetracht der beobachteten stärker ausgeprägten genetischen Komponente bei Patienten mit frühem Krankheitsbeginn und der daraus geschlossenen unterschiedlichen Pathogenese je nach Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns erscheinen weitere Untersuchungen speziell für dieses Alter von besonderer Bedeutung.

Es zeichnet sich auch ab, daß gerade bei den psychiatrischen Krankheitsbildern eine Subgruppenbildung in Geschlecht, Alter und Erkrankungsbeginn und vor allem auch eine genaue klinische Unterscheidung möglicher Subtypen unter Berücksichtigung assoziierter Störungen im Vorfeld der eigentlichen Untersuchung wichtig ist. Dabei ist von einer Vielzahl solcher Subtypen psychiatrischer Erkrankungen auszugehen, denen auch entsprechend unterschiedliche molekulargenetische Mechanismen zugrunde liegen.

Zur Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen genetischen Varianten und dem Phänotyp einer Erkrankung erscheinen Assoziationsstudien, insbesondere die Untersuchung von Trios, bei denen Stratifikationseffekte ausgeschlossen werden können, sinnvoll. Solche Untersuchungen mit noch größeren Studiengruppen und damit größerer Aussagekraft wären wünschenswert. Die Entdeckung neuer Polymorphismen auf Genen bereits bekannter Proteine, welche mittels solcher Assoziationsstudien untersucht werden können, ist zu erwarten.

Auch die Entdeckung neuer Proteine bzw. zugrundeliegender Gene bietet erfolgsversprechende neue Möglichkeiten in der Erforschung der Pathogenese der Zwangsstörungen. Alleine bei den bisher bekannten Proteinen sind Expression und Verteilung, aber auch die genauen intrazellulären Mechanismen und die Funktion der Proteine oft noch weitgehend unverstanden. Weitere molekulargenetische und pharmakologische Untersuchungen, welche letztendlich therapeutische Optionen hervorbringen, wären daher von großem Interesse.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten mit molekulargenetischen Methoden untersucht werden, ob ausgewählte Polymorphismen in den Genen der Tryptophanhydroxylase, des Serotonin-1B-Autorezeptors und des Serotonintransporters an der multifaktoriellen Pathogenese juveniler Zwangsstörungen beteiligt sind. Hierzu wurde bei 64 Trios, bestehend aus einem jungen Patienten mit Zwangsstörungen und seinen beiden Eltern, eine Assoziation zwischen Zwangsstörungen und Polymorphismen, die aufgrund ihrer pathophysiologischen Bedeutung im serotonergen System als Kandidatengene relevant erscheinen, untersucht.

Keine der drei Varianten zeigte sich mit Zwangsstörungen im Kindes- und Jugendalter assoziiert. Die Untersuchungen des Serotonintransporters entsprachen, wenn auch nicht signifikant, so doch tendenziell bisherigen positiven Ergebnissen, sodass bei weiteren Untersuchungen dieser Polymorphismen anhand einer größeren Anzahl an Indexpatienten die Bestätigung einer Assoziation mit Zwangsstörungen bei Kindern und Jugendlichen durchaus denkbar wäre. Assoziationen zu Polymorphismen des Tryptophanhydroxylase-Gens und des Serotoninrezeptor-1B-Gens fanden sich nicht. Die untersuchten Varianten dieser Gene scheinen demnach für die vorliegende Stichprobe keinen relevanten Einfluß auf die Erkrankung auszuüben. Die Stichprobe erscheint jedoch aufgrund ihrer guten Phänotypisierung durchaus repräsentativ.

Der große Vorteil der vorgenommenen familienbasierten Assoziationsstudie anhand von Trios lag darin, daß die bei den sonst häufig angewendeten Fall-Kontroll-Untersuchungen auftretenden Verzerrungen durch unterschiedliche, ethnisch bedingte Allelfrequenzen vermieden werden konnten.

Insgesamt handelte es sich bei der vorliegenden Arbeit nach aktuellem Kenntnisstand um die erste familienbasierte Untersuchung der Pathogenese von Zwangsstörungen bei Kindern und Jugendlichen.

Angesichts der Tatsache, dass bei dem im Alter zwischen dem 5. und dem 9. Lebensjahr auftretenden und hier untersuchten *early-onset-OCD* eine im Gegensatz zum *late-onset-OCD* (etwa 20.-22. Lebensjahr) stärkere genetische Komponente gezeigt werden konnte, und dementsprechend eine unterscheidbare Pathogenese vermutet werden kann, bieten

sich auch in Zukunft weiterführende Untersuchungen zum Verständnis der Erkrankung gerade im Rahmen der Kinder- und Jugendpsychiatrie an.

8 Literaturverzeichnis

- **Arango V**, Huang YY, Underwood MD, Mann JJ.: Genetics of the serotonergic system in suicidal behavior. *J Psychiatr Res.* 2003 Sep-Oct;37(5):375-86. Review.
- **Baron M**: The search for complex disease genes: fault by linkage or fault by association?. *Mol Psychiatry.* 2001 Mar;6(2):143-9.
- **Bengel D**, Greenberg BD, Cora-Locatelli G, Altemus M, Heils A, Li Q, Murphy DL.: Association of the serotonin transporter promoter regulatory region polymorphism and obsessive-compulsive disorder. *Mol Psychiatry.* 1999 Sep; 4(5): 463-6.
- **Boshuizen ML**, den Boer JA: Zolmitriptan (a 5-HT_{1B/1D} receptor agonist with central action) does not increase symptoms in obsessive compulsive disorder. *Psychopharmacology (Berl).* 2000 Sep; 152(1): 74-9.
- **Camarena B**, Rinetti G, Cruz C, Hernandez S, de la Fuente JR, Nicolini H.: Association study of the serotonin transporter gene polymorphism in obsessive-compulsive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2001 Sep;4(3):269-72.
- **Camarena B**, Aguilar A, Loyzaga C, Nicolini H.: A family-based association study of the 5-HT-1Dbeta receptor gene in obsessive-compulsive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2004 Mar;7(1):49-53. Epub 2004 Jan 20.
- **Chabane N**, Millet B, Delorme R, Lichtermann D, Mathieu F, Laplanche JL, Roy I, Mouren MC, Hankard R, Maier W, Launay JM, Leboyer M: Lack of evidence for association between serotonin transporter gene (5-HTTLPR) and obsessive-compulsive disorder by case control and family association study in humans. *Neurosci Lett.* 2004 Jun 10;363(2):154-6.
- **Di Bella D**, Cavallini MC, Bellodi L: No association between obsessive-compulsive disorder and the 5-HT(1Dbeta) receptor gene. *Am J Psychiatry.* 2002 Oct;159(10): 1783-5.
- **Duus P**: Neurologisch-topische Diagnostik; 7.Aufl.; Thieme Verlag; Stuttgart, New York; 2001
- **Fehr C**, Grintschuk N, Szegedi A, Angheliescu I, Klawe C, Singer P, Hiemke C,

Dahmen N: The HTR1B 861G>C receptor polymorphism among patients suffering from alcoholism, major depression, anxiety disorders and narcolepsy. *Psychiatry Res.* 2000 Dec 4;97(1):1-10.

- **Forth W**: Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie; 7.Aufl.; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg;1996
- **Frisch A**, Michaelovsky E, Rockah R, Amir I, Hermesh H, Laor N, Fuchs C, Zohar J, Lerer B, Buniak SF, Landa S, Poyurovsky M, Shapira B, Weizman R.: Association between obsessive-compulsive disorder and polymorphisms of genes encoding components of the serotonergic and dopaminergic pathways. *Eur Neuropsychopharmacol* 2000 May;10(3):205-9
- **Gelernter J**; Pakstis AJ; Kidd KK : Linkage mapping of serotonin transporter protein gene SLC6A4 on chromosome 17. *Hum. Genet.* 95: 677-680, 1995.
- **Geller DA**, Biederman J, Faraone SV, Craddock K, Hagermoser L, Zaman N, Frazier JA, Coffey BJ, Spencer TJ: Attention-deficit/hyperactivity disorder in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder: fact or artifact?. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2002 Jan;41(1):52-8.
- **Goodman WK**, Price LH, Rasmussen SA, Mazure C, Fleischmann RL, Hill CL, Heninger GR, Charney DS.: The Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale. I. Development, use, and reliability. *Arch Gen Psychiatry.* 1989 Nov;46(11):1006-11.
- **Goodman WK**, Price LH, Rasmussen SA, Mazure C, Delgado P, Heninger GR, Charney DS.: The Yale-Brown Obsessive Compulsive Scale. II. Validity. *Arch Gen Psychiatry.* 1989 Nov;46(11):1012-6.
- **Gross-Isseroff R**, Cohen R, Sasson Y, Voet H, Zohar J.: Serotonergic dissection of obsessive compulsive symptoms: a challenge study with m-chlorophenylpiperazine and sumatriptan. *Neuropsychobiology.* 2004;50(3):200-5.
- **Hamblin MW**, Metcalf MA, McGuffin RW, Karpells S.: Molecular cloning and functional characterization of a human 5-HT1B serotonin receptor: a homologue of the rat 5-HT1B receptor with 5-HT1D-like pharmacological specificity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Apr 30;184(2):752-9.
- **Hall D**, Dhillia A, Charalambous A, Gogos JA, Karayiorgou M: Sequence variants of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene are strongly associated with

- obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet.* 2003 Aug;73(2):370-6. Epub 2003 Jun 27.
- **Hanna GL**, Yuwiler A, Coates JK.: Whole blood serotonin and disruptive behaviors in juvenile obsessive-compulsive disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 1995 Jan;34(1):28-35.
 - **Hanna GL**, Himle JA, Curtis GC, Gillespie BW: A family study of obsessive-compulsive disorder with pediatric probands. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005 Jan 5
 - **Heils, A.**; Teufel, A.; Petri, S.; Stober, G.; Riederer, P.; Bengel, D.; Lesch, K. P. : Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J. Neurochem.* 66: 2621-2624, 1996.
 - **Hemmings SM**, Kinnear CJ, Niehaus DJ, Moolman-Smook JC, Lochner C, Knowles JA, Corfield VA, Stein DJ: Investigating the role of dopaminergic and serotonergic candidate genes in obsessive-compulsive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2003 Mar;13(2):93-8.
 - **Hettema JM**, Neale MC, Kendler KS: A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am J Psychiatry.* 2001 Oct;158(10):1568-78.
 - **Jin H.**; Oksenberg, D.; Ashkenazi, A.; Peroutka, S. J.; Duncan, A. M. V.; Rozmahel, R.; Yang, Y.; Mengod, G.; Palacios, J. M.; O'Dowd, B. F. : Characterization of the human 5-hydroxytryptamine(1B) receptor. *J. Biol. Chem.* 267: 5735-5738, 1992.
 - **Jonsson EG**, Goldman D, Spurlock G, Gustavsson JP, Nielsen DA, Linnoila M, Owen MJ, Sedvall GC.: Tryptophan hydroxylase and catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms: relationships to monoamine metabolite concentrations in CSF of healthy volunteers. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1997;247(6):297-302.
 - **Karow T**, Lang R - Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Eigener Vertrieb, Pulheim; 2002
 - **Koolman J**, Röhm KH - Taschenatlas der Biochemie, 2. Aufl., Thieme, Stuttgart, New York, 1998
 - **Koran LM**, Pallanti S, Quercioli L.: Sumatriptan, 5-HT(1D) receptors and obsessive-compulsive disorder. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2001 Apr;11(2):169-72.
 - **Lappalainen J**, Dean M, Charbonneau L, Virkkunen M, Linnoila M, Goldman D:

- Mapping of the serotonin 5-HT_{1D} beta autoreceptor gene on chromosome 6 and direct analysis for sequence variants. *Am J Med Genet* 1995 Apr 24;60(2):157-61
- **Leckman JF**, Goodman WK, Anderson GM, Riddle MA, Chappell PB, McSwiggan-Hardin MT, McDougle CJ, Scahill LD, Ort SI, Pauls DL, et al.: Cerebrospinal fluid biogenic amines in obsessive compulsive disorder, Tourette's syndrome, and healthy controls. *Neuropsychopharmacology*. 1995 Feb;12(1):73-86.
 - **Lesch KP.**; Balling U.; Gross J.; Strauss K.; Wolozin B. L.; Murphy D. L. : Organisation of the human serotonin transporter gene. *J. Neural Trans.* 95: 157-162, 1994.
 - **Lesch KP**, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL: Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996 Nov 29;274(5292):1527-31
 - **Löffler G**, Petrides P: *Biochemie und Pathobiochemie*; 6.Aufl.; Springer, Berlin; 1998
 - **Lüllmann H**, Mohr K - *Pharmakologie und Toxikologie*; 14.Aufl.; Thieme, Stuttgart, New York; 1999
 - **Mann JJ**, Malone KM, Nielsen DA, Goldman D, Erdos J, Gelernter J.: Possible association of a polymorphism of the tryptophan hydroxylase gene with suicidal behavior in depressed patients. *Am J Psychiatry*. 1997 Oct;154(10):1451-3.
 - **McDougle CJ**, Epperson CN, Price LH, Gelernter J.: Evidence for linkage disequilibrium between serotonin transporter protein gene (SLC6A4) and obsessive compulsive disorder. *Mol Psychiatry*. 1998 May; 3(3): 270-3.
 - **Meira-Lima I**, Shavitt RG, Miguita K, Ikenaga E, Miguel EC, Vallada H: Association analysis of the catechol-o-methyltransferase (COMT), serotonin transporter (5-HTT) and serotonin 2A receptor (5HT2A) gene polymorphisms with obsessive-compulsive disorder. *Genes Brain Behav.* 2004 Apr;3(2):75-9.
 - **Miller SA**, Dykes DD, Polesky HF.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
 - **Mossner R**, Walitza S, Geller F, Scherag A, Gutknecht L, Jacob C, Bogusch L, Remschmidt H, Simons M, Herpertz-Dahlmann B, Fleischhaker C, Schulz E,

- Warnke A, Hinney A, Wewetzer C, Lesch KP: Transmission disequilibrium of polymorphic variants in the tryptophan hydroxylase-2 gene in children and adolescents with obsessive-compulsive disorder. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2006 Aug;9(4):437-42. Epub 2005 Sep 7.
- **Mundo E**, Richter MA, Sam F, Macciardi F, Kennedy JL: Is the 5-HT(1Dbeta) receptor gene implicated in the pathogenesis of obsessive-compulsive disorder? *Am J Psychiatry.* 2000 Jul;157(7):1160-1
 - **Mundo E**, Richter MA, Zai G, Sam F, McBride J, Macciardi F, Kennedy JL: 5HT1Dbeta Receptor gene implicated in the pathogenesis of Obsessive-Compulsive Disorder: further evidence from a family-based association study. *Mol Psychiatry* 2002;7(7):805-9
 - **Nestadt G**, Samuels J, Riddle M, Bienvenu OJ 3rd, Liang KY, LaBuda M, Walkup J, Grados M, Hoehn-Saric R: A family study of obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 2000 Apr;57(4):358-63.
 - **New AS**, Gelernter J, Yovell Y, Trestman RL, Nielsen DA, Silverman J, Mitropoulou V, Siever LJ.: Tryptophan hydroxylase genotype is associated with impulsive-aggression measures: a preliminary study. *Am J Med Genet.* 1998 Feb 7;81(1):13-7.
 - **Nielsen DA**, Dean M, Goldman D: Genetic mapping of the human tryptophan hydroxylase gene on chromosome 11, using an intronic conformational polymorphism. *Am J Hum Genet* 1992 Dec;51(6):1366-71
 - **Nielsen DA**, Goldman D, Virkkunen M, Tokola R, Rawlings R, Linnoila M: Suicidality and 5-hydroxyindoleacetic acid concentration associated with a tryptophan hydroxylase polymorphism. *Arch Gen Psychiatry* 1994 Jan;51(1):34-8
 - **Nielsen DA**, Jenkins GL, Stefanisko KM, Jefferson KK, Goldman D.: Sequence, splice site and population frequency distribution analyses of the polymorphic human tryptophan hydroxylase intron 7. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997 Apr;45(1):145-8.
 - **Orita M**, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNS polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics.* 1989 Nov;5(4):874-9.
 - **Ozaki N**, Goldman D, Kaye WH, Plotnicov K, Greenberg BD, Lappalainen J,

- Rudnick G, Murphy DL: Serotonin transporter missense mutation associated with a complex neuropsychiatric phenotype. *Mol Psychiatry*. 2003 Nov;8(11):895, 933-6.
- **Peterson BS**, Pine DS, Cohen P, Brook JS: Prospective, longitudinal study of tic, obsessive-compulsive, and attention-deficit/hyperactivity disorders in an epidemiological sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2001 Jun;40(6):685-95.
 - **Pauls DL**, Raymond CL, Stevenson JM, Leckman JF.: A family study of Gilles de la Tourette syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 48: 154-163, 1991.
 - **Pauls DL**, Alsobrook JP 2nd, Goodman W, Rasmussen S, Leckman JF: A Family Study of Obsessive-Compulsive Disorder. *Am J Psychiatry* 1995; 152: 76-84
 - **Pigott TA**, Pato MT, Bernstein SE, Grover GN, Hill JL, Tolliver TJ, Murphy DL.: Controlled comparisons of clomipramine and fluoxetine in the treatment of obsessive-compulsive disorder. Behavioral and biological results. *Arch Gen Psychiatry*. 1990 Oct;47(10):926-32.
 - **PubMed/OMIM**: 5-Hydroxytryptamine Receptor (HTR1B); Acc.No.:*182131 (2004)
 - **Rasmussen SA** et Tsuang MT: The epidemiology of obsessive compulsive disorder. *J Clin Psychiatry*. 1984 Nov;45(11):450-7. Review.
 - **Rasmussen SA** et Tsuang MT: Clinical Characteristics and Family History in DSM-III Obsessive-Compulsive Disorder. *Am J Psychiatry* 143:317-322, 1986
 - **Sidenberg DG**, Bassett AS, Demchyshyn L, Niznik HB, Macciardi F, Kamble AB, Honer WG, Kennedy JL.: New polymorphism for the human serotonin 1D receptor variant (5-HT1D beta) not linked to schizophrenia in five Canadian pedigrees. *Hum Hered.* 1993 Sep-Oct;43(5):315-8.
 - **Spielman RS**, McGinnis RE, Ewens WJ.: Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet.* 1993 Mar;52(3):506-16.
 - **Steinhausen HC**: Psychische Störungen bei Kindern und Jugendlichen; 5.Aufl.; U&F, München; 2002
 - **Stengler-Wenzke K**, Muller U, Angermeyer MC, Sabri O, Hesse S: Reduced serotonin transporter-availability in obsessive-compulsive disorder (OCD). *Eur Arch*

- Psychiatry Clin Neurosci. 2004 Aug;254(4):252-5.
- **Sugden D.**: Comparison of circadian expression of tryptophan hydroxylase isoform mRNAs in the rat pineal gland using real-time PCR. J Neurochem. 2003 Sep;86(5): 1308-11.
 - **Süllwold**, Herrlich, Volk – Zwangskrankheiten (Psychobiologie, Verhaltenstherapie, Pharmakotherapie); 2. Aufl.; Kohlhammer, Stuttgart, 2001
 - **Unnewehr S**, Schneider S, Margraf J: Kinder-DIPS – Diagnostisches Interview bei psychischen Störungen im Kindes- und Jugendalter; Springer; 1995.
 - **Willour V. L.**; Shugart Y. Y.; Samuels J.; Grados M.; Cullen B.; Bienvenu O. J., III; Wang Y.; Liang K.-Y.; Valle D.; Hoehn-Saric R.; Riddle M.; Nestadt G: Replication study supports evidence for linkage to 9p24 in obsessive-compulsive disorder. Am. J. Hum. Genet. 75: 508-513, 2004.
 - **Walitza S**, Wewetzer C, Warnke A, Gerlach M, Geller F, Gerber G, Gorg T, Herpertz-Dahlmann B, Schulz E, Remschmidt H, Hebebrand J, Hinney A.: 5-HT2A promoter polymorphism -1438G/A in children and adolescents with obsessive-compulsive disorders. Mol Psychiatry. 2002;7(10):1054-7.
 - **Walther DJ**, Bader M.: A unique central tryptophan hydroxylase isoform. Biochem Pharmacol. 2003 Nov 1;66(9):1673-80.
 - **Wewetzer C**, Mehler-Wex C, Warnke A.: [Pharmacotherapy of compulsive disorders in childhood and adolescence]. Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother. 2003 Aug;31(3):223-30. Review. German.
 - **Wewetzer C**: Zwänge bei Kindern und Jugendlichen, Hogrefe-Verlag Göttingen (2004)
 - **Wewetzer C**, Walitza S: [Combination treatment in children and adolescent with obsessive compulsive disorders]. MMW Fortschr Med. 2005 Dec 1;147(48):36, 38-40.
 - **Woody SR**, Steketee G, Chambless DL: Reliability and validity of the Yale-Brown Obsessive-Compulsive Scale. Behav Res Ther. 1995 Jun;33(5):597-605.
 - **Zhang X**, Beaulieu JM, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Caron MG: Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis. Science. 2004 Jul 9;305(5681):217.
 - **Zill P**, Buttner A, Eisenmenger W, Moller HJ, Ackenheil M, Bondy B.: Analysis of

tryptophan hydroxylase I and II mRNA expression in the human brain: A post-mortem study. *J Psychiatr Res.* 2005 Jul 13

- **Zohar J**, Chopra M, Sasson Y, Amiaz R, Amital D.: Obsessive compulsive disorder: serotonin and beyond. *World J Biol Psychiatry.* 2000 Apr;1(2):92-100. Review.

Anhang

A Verwendete Materialien

Enzyme	Bezugsquelle
<i>Taq</i> -Polymerase „House“	Eigenes Labor
<i>HinC</i> II	MBI Fermentas
<i>Nhe</i> I	New England BioLabs

Tabelle A1: Enzyme und deren Bezugsquelle.

Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	Hersteller
5HT1B5	MWG Biotech
5HT1B6	MWG Biotech
TPHF-Niel97	MWG Biotech
TPHR-Niel97	MWG Biotech
5HTT-F	MWG Biotech
5HTT-R	MWG Biotech

Tabelle A2: Oligonukleotide („*Primer*“) und deren Hersteller.

Chemikalien	Hersteller
DNS-Polymerisationsmix (dNTP)	MBI Fermentas
Puffer 2	New England BioLabs
Puffer 3	MBI Fermentas
Puffer Goldstar	Eurogentec
100 bp –Marker	PeqLab
Blaumarker	PeqLab
Agarose NEE0	Roth
Albumin (BSA)	MBI Fermentas
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamin-Tetraaceticacid 2Na ₂ H ₂ O (EDTA)	Roth
Sodiumdodocylsulfat (SDS)	Merck

Tabelle A3: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller.

Anhang

Verwendete Geräte	Typenbezeichnung	Hersteller
Thermocycler	i-Cycler	BioRad
	Primus 96 Plus	MWG Biotech
Gradienten-Thermocycler	UNOII	Biometra
	T Gradient	Biometra
Zentrifugen	5417R	Eppendorf
	96RS	Rotanta
Magnetmixer	M32	GLW
Vortex-Mixer	L46	GLW
Gelelektrophorese-Kammer		Peqlab
Netzgerät	E 844	Consort
Waage	SAC 64	SAC
Präzisionswaage	PM300	Mettler
pH-Meter	Labor-pH-mV-Meter	WTW
Biophotometer	pH 525	Heraus
Wärmeschrank	8,5 mm	Tuttnauer Systec
Autoklav	3850 ELV	MWG Biotech
Transluminator	UVP Fluo-Link	
Kamera	EP H-7	Polaroid
Vibrations-Tisch-Mischer	VX 8	
Schüttelwasserbad	GFL	Jahnke und Kunkel
Sequenzierer	310 Genetic Analyzer	Abi Prism
Vakuumtrockner	Univapo 150 H	Uniequip
Pipetten	Reference 0,5-10	Eppendorf
	Reference 10-100	Eppendorf
	Reference 100-1000	Eppendorf

Tabelle A4: Verwendeten Geräte und deren Hersteller.

A Verwendete Materialien

Weitere verwendete Materialien	Hersteller
DNS-Aufreinigungs-Set	Quiagen QIAquick PCR Purifikation KIT
Photometrie-Küvetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Greiner BioOne, Hartenstein
Pipettenspitzen mit Filter	Peqlab, Hartenstein
Agarose-Gel-Pulver	Peqlab peqGOLD Universal Agarose
96-fach Mikrotiterplatten	Hartenstein
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner Labortechnik
Andere Reaktionsgefäße	Greiner Labortechnik
PCR-Reaktionsgefäße	Hartenstein 0,6 ml
Filmmaterial	Polaroid 667
Handschuhe	Sänger Alfatex Nitril, Safeskin Satin Plus
Zentrifugen-Röhrchen	Sarstedt 50ml
Nunc-Röhrchen	Nalgene 1ml
Meßgläser, Meßzylinder	Marienfeld Superior

Tabelle A5: Weitere verwendete Materialien.

Reagenzien und Lösungen	Hersteller
aqua ad injectabile (didest.)	Braun
2-Propranolol	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Salzsäure (HCl)	Merck
Ammoniumperoxidchlorid (NH ₄ Cl)	Merck
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck
TrisHCl	Merck

Tabelle A6: Reagenzien und Lösungen und deren Hersteller.

B Zusammensetzung und Vorbereitung der Reagenzien

Zur DNS-Extraktion verwendete Puffer	Konzentration der Reagenzien	Menge der verwendeten Reagenzien
Lysispuffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA	155 ml von 1M 10 ml von 1M (4°C Lagerung) 200 µl von 0,5M (pH7) Mit H ₂ O auf 1000 ml auffüllen Bei Bedarf pH-Einstellung mit 15% HCl auf pH 7,4
Kernlysispuffer	10 mM Tris-HCl pH8 400 mM NaCl 2 mM Na ₂ EDTA-Puffer (pH ~8,2)	10 ml von 1M 80 ml von 5M 4 ml von 0,5 M
TE ⁻⁴ Puffer	10 mM TrisHCl pH8 0,1 mM EDTA	10 ml von 1M 200 µl von 0,5M (pH7)

Tabelle B1: Zur DNS-Extraktion verwendete Puffer und ihre Herstellung

Zur DNS-Extraktion verwendete Enzyme	Verdünnung
Pronase E	1 g in 50 ml dH ₂ O (entspricht 20mg/ml)

Tabelle B2: Zur DNS-Extraktion verwendete Enzyme und ihre Verdünnung

B Zusammensetzung und Vorbereitung der Reagenzien

Vorbereitung der <i>Primer</i> (entsprechend Herstellerangaben)	
1. Schritt: <i>Primer</i> - stock-Lösung	43,9 µl H ₂ O zur kristallinen Form pipettieren (ergibt 1000 pmol/µl <i>stock</i> -Lösung), Lösung wird tiefgefroren gelagert
2. Schritt: <i>Primer</i> -Verdünnung 1:40	2,5 µl <i>stock</i> -Lösung mit 97,5 µl ddH ₂ O versetzen (ergibt 100 µl mit 25 pmol/µl), Lösung wird tiefgefroren gelagert

Tabelle B3: Vorbereitung der *Primer* gemäß Herstellerangaben.

Tris-HCl pH 8	EDTA
20 mM (1M in 0,2 ml)	250 nM (0,5M in 0,5 ml)

Tabelle B4: Zusammensetzung des Master-Mixes

Reagenz	Konzentration
EDTA	0,01 M
Tris-HCl	0,04 M
Eisessig	2,00%

Tabelle B5: Zusammensetzung des TAE-Puffers zur Herstellung der Gele und Füllung der Elektrophorese-Kammer

C Genomische Struktur der untersuchten Gene

Sequenzausschnitt aus dem Gen der TPH1 (3' ← 5'/Minus-Strang)	
	...gcg ggacatgacc taagagttca tggcaggtat C ctgaaaga
103261	gaggtacaag tttgtcacgc tgcagtgctt aacatacgtt tataatcaac cattcaatca
103321	aatcgaaatc caatatttta ttctaatagat cgggtgataa tacttttagta atggatcaca
103381	aaggacacta atcaaataaa gaaacaattt tgggtcaaaa ccttgccac tcagactcac
103441	acataataagt gcacatcaga tacctatgga catccacatg ccaactccaa aaccacaacc
103501	cccaacaccc aaccccacca catacacacc caaatcagat ctctgctcag atatcacctt
103561	ctcagcaagg ccttcctga tcaccctttt caaaacagca acacacacac acaactccac
103621	ccactacac tttcctocat cccctttct cagctttatt tttctccatg ggactcaaca
103681	ccactcgatg caacatttgc atacatttac ttgtttgttt attatctggt tccccactg
103741	gaatacaagc tttatgcagg cagaaatttg tgtctgattt ttttcagtgt tacattcct
103801	atgctcagaa tagcag C tag cacctaatag gttgtcaatt aataatcata atggctaaca
103861	catatagagc atggaacatg tatttcatgc caggtacat tctaaatgct tcacatgtgc
103921	taatttattt aatcctcgca caccaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaag aaccataag
103981	gtagatgcca ttattataaa taaccatttg atgaattcct ggctgaaata gaagtactta
104041	c g gctctggg gtatagaagg gatctgaact g tgctct...
Legende: Primer F und R ; Exon 5 und Exon 4 (3' ← 5') ; C : Polymorphismus „A218C“; gctagc : Erkennungssequenz von Nhe I	

Tabelle C1: Ausschnitt aus der Intron-Sequenz der TPH1 (Acc.No.: NM_004179: mRNA/Exons, AC005728: Complete sequence).

Darstellung der verwendeten *Primer* (Hier 3' ← 5'-Richtung), der Polymorphismusstelle und der Erkennungssequenz von Nhe I.

Fragment-Länge ungeschnitten: 848 bp; Größe der Einzelfragmente nach Restriktion: 251 bp und 597 bp (Im Falle des C-Allels).

Anmerkung: Die Exons 4 und 5 beim Menschen entsprechen den Exons 7 und 8 bei der Maus.

C Genomische Struktur der untersuchten Gene

Sequenzausschnitt aus dem Gen des HTR1B (5' → 3'/Plus-Strang)	
....	
1201	gaggtgtcgg aatgcgtggt gaacaccgac cacatcctct acacgggtcta ctccacgggtg
1261	ggtgctttct acttccccac cctgctctc atcgccctct atggccgcat ctacgtagaa
1321	gcccgtctcc ggatthttgaa acagacgccc aacaggaccg gcaagcgctt gacccgagcc
1381	cagctgataa ccgactcccc cgggtccacg tctcgggtca cctctattaa ctcgcggtt
1441	cccgacgtgc ccagcgaatc cggatctcct gtgtatgtGa accaagtcaa agtgcgagtc
1501	tccgacgccc tgctggaaaa gaagaaactc atggccgcta gggagcgcaa agccaccaag
1561	accctagga tcattttggg agcctttatt gtgtgttggc tacccttctt catcatctcc
1621	ctagtgatgc ctatctgcaa agatgcctgc tggttocacc tagccatctt tgacttcttc
1681	acatggctgg gctatctcaa ctccctcatc aaccataa tctataccat gtccaatgag
1741	gactttaaac aagcattcca taaactgata cgttttaagt gcacaa gttg acttgccgtt
1801	tgcagtgggg tcgcctaagc gaccttggg gaccaagttg tgtctggttc cacaggtagg
1861	tcgaatcttc tttcgcggtt tetgggtccc agcgaggctc tctctcctgg gcaagggcaa
1921	tggatcctga gaagccagaa tagtctgag agagagctc
Legende: Primer F und R ; G : Polymorphismus „G861C“; gtgaac : Erkennungssequenz von HinC II In Bezug auf den Beginn des Gens (nicht dargestellt) liegt der Polymorphismus an der Stelle 861 gaggtg: Das mRNA-Produkt des HTR1B ist schwarz dargestellt accaag: Bereiche die nicht mehr für mRNA kodieren sind grau dargestellt	

Tabelle C2: Ausschnitt aus der mRNA-Sequenz des HTR1B (Acc.No.: NM_000863: mRNA; M75128: *complete coding sequence*).

Darstellung der verwendeten *Primer*, der Polymorphismusstelle und der Erkennungssequenz von HinC II.

Fragment-Länge ungeschnitten: 548 bp; Größe der Einzelfragmente nach Restriktion: Im Falle des G-Allels 452bp und 96 bp, da an einer weiteren immer vorhandenen Restriktionsstelle auf jeden Fall geschnitten wird; Im Falle des C-Allels entstehen dagegen drei Fragmente: 142 bp, 310 bp und 96 bp.

Gesamte Sequenz des *SLC6A4*-Genes (3' ← 5'/Minus-Strang)

```

1  tctcccgcct ggcgttgccg ctctgaatgc cagcacctaa ccctaagt cctactgca
61  gcctcccag catccccct gcaacctccc agcaactccc tgtacccctc ctaggatgcc
121 tcttgcatcc cccattatcc ccccttcac cctcggggc atccccctg cccccccag
181 catccccct gcagcccc cagcatctcc cctgcacccc cagcatcccc cctgcagccc
241 ttccagcatc ccctgcacc tctcccagga tctcccctgc aacccccatt atccccctg
301 caccctcgc agtatcccc ctgcacccc cagcatcccc ccatgcaccc cggcatccc
361 cctgcacccc ctccagcatt ctcttgac cctaccagta ttccccgca tcccggctc
421 caagcctccc gccaccttg cgtccccgc cctggcgtct aggtggcacc agaatcccgc
481 gcgactcca ccgctggga gctgcctcg cttgccgtg gttgtccagc tcagtccctc
541 tagacgctca gcccaaccgg ccgcacagtt ttcaggggtc agttcctcca agtacaaggg
601 gcggtggctt ctctggagct gcaaacttgt cactgctatt tcctttcggg cttctacttc
661 ctatcgttcc tggcctcctc ttggggagag gtagagccct ctctttccg cctcagggac
721 aacccaaagc aagtactgca tgtgcccttt ttaaagtttt aaataatfff agcaaaaagg
781 atattaacat taaatcaatt tttaaacttt ttgaaaaat tatcaaaact acatgcacat
841 ggttcaaac aataggctcc tgcgtggccc tttcagataa ttcaaattgt caccagggtg
901 gagtgcagtg gttcgatcac ggctcactgc agcctogact cccgggctca gctgatcctc
961 cacctcagcc tcctgagtag ctgggaacac aagcgcgagc aaccacgccc ggctaattaa
1021 aaaaatffff tttctagaga tggggtcttg ctgtgttgcc caggctggtc ttgaattcct
1081 gggctcaagc aatcctccc cctcagcctc ccaaagcact gtgctccttt ttgacgcagc
1141 tttgaactgt agctggttaa caaatgaga accagttctt cattccttca ttgnggaagt
1201 ctttattgtg agactctggg gacggagagg aattagacaa gggcctctaa gctgagctca
1261 catcccagcc ggtcagtcag ataaacgcat gggatcagag tactgctagg tcccaggaag
1321 aaagagagag cagctttcgg gatggggacg atggggagggt gtccgaggtc aagagaaagc
1381 ggcacgagca gaccctgtg tgccgtcctg tgggcgctgg gcggcagggg aggcgcacac
1441 ctgctccttt gtgcagctc cccctcccg caaagttaa gagcaggaaa gtcaggattc
1501 ctgctcggc cctgccctgc cggctctcc gcgctccgct cctccctcgc agcgtgtgtg
1561 tgtgtcgggg gtcctcccc tcctggctct ggggtcgggc gcgcacccc ccccgtagcg
1621 cggccccctc ctggcgagcg caaccccatc cagcgggagc gcggagccgc gcccggggg
1681 aagcattaag tttattcgc tcaaagtgc gcaaaaattc ttcaagagct ctttggcggc
1741 ggctatctag agatcagacc atgtgagggc ccgcgggtac aaatacggcc gcgcggggc
1801 cctccgcac agccagcgc gccgggtgc tcgaggggc gaggccagc cgctgccca
1861 gcccgggacc agcctccscg cgcagcctgg cag----- Genende

```

Legende: Promotor-Region: 1 bis 1808; *Tandem-repeat*: 51 bis 401; *Primer F und R*;

mRNA/Exon: 1809 bis 1893; Gesamtlänge *long*-Allel: 419 bp; Gesamtlänge *short*-Allel: 375 bp

Tabelle C3: Ausschnitt aus Promotor-Region und mRNA-Sequenz des *SLC6A4* (Acc.No.: AF117826).

Darstellung der verwendeten *Primer* und der *Tandem-repeat*-Region.

Fragment-Längen: *long*-Allel: 419 bp, *short*-Allel: 375 bp

D Textkästen

Prozedere der PCR

Mit Hilfe eines *Thermocyclers* werden hierzu nach entsprechender Vorbereitung der DNS-Proben nacheinander mehrere automatisierte Arbeitsschritte ausgeführt: Zuerst (I.) wird die doppelsträngige DNS durch Erhitzung auf etwa 95°C in zwei Einzelstränge getrennt. An jeder dieser nun als Einzelstränge vorliegenden DNS-Ketten binden dann (II.) passend gewählte synthetische Oligonukleotide, *Primer*, von je etwa 20 bp Länge. Von diesen ausgehend setzt im Anschluß eine *Taq*-Polymerase, orientierend an den Einzelsträngen, die ihr angebotenen Nucleotide zu einem neuen komplementären Strang zusammen, der sich wiederum zu einem Doppelstrang zusammenlagert (III.). Werden diese beiden neu gewonnenen Doppelstränge nun ihrerseits wieder erhitzt, sodass die *Primer* erneut an die aufgetrennten Einzelstränge binden können, können mit fortlaufender Zyklusanzahl gewünschte DNS-Fragmente exponentiell vermehrt werden, da jeder weitere Zyklus die vorliegende Menge an Kopien verdoppelt. Am Schluß der Prozedur liegt genomische DNS in millionenfacher Kopie vor. Das Prinzip der *PCR* ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt.

Für die Vorbereitung der *PCR* wird zu je 2µl DNS zunächst ein für die *PCR* optimierter Reaktions-Mix, der u.a. aus *Primern*, Oligonukleotiden und geeigneten Puffern besteht, pipettiert. Dies geschieht in eisgekühlten Mikrotiterplatten, um zu verhindern, dass die *Taq*-Polymerase zu früh aktiviert wird.

Kasten D1 - Prozedere der PCR

Prinzip und Prozedere der Restriktion

Ein geeignetes Restriktions-Enzym wird anhand seiner charakteristischen Zielsequenz aus einer Vielzahl bekannter Restriktionsendonukleasen ausgewählt und kann für die Untersuchung bestellt werden. Die von diesen erkannten Stellen sind mindestens vier Basenpaare lang und besitzen, bedingt durch den doppelsträngig-komplementären Aufbau der DNS, immer eine pallindromische, d.h. spiegelbildliche Struktur.

Je nach Aktivität werden danach 0,1 bis 0,4 µl Restriktionsenzym und 2 bis 4 µl des mitgelieferten Puffers in Mikrotiterplatten zusammen inkubiert und mit destilliertem Wasser auf 15 µl aufgefüllt. Zu diesem Reaktionsmix werden im Anschluß 15 µl des *PCR*-Produktes gegeben. Die Restriktion ist in der Regel nach einer Stunde abgeschlossen, kann aber bei Bedarf auch länger erfolgen. Analog zur Durchführung der *PCR*-Gel-Elektrophorese wird das restringierte *PCR*-Produkt dann auf ein Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Kasten D2 - Prinzip und Prozedere der Restriktion

Gelelektrophorese - Prozedere

Unmittelbar vor Beginn der Gelelektrophorese wird Blaupuffer, der später die zurückgelegte Laufstrecke optisch anzeigt, in die entstandenen Taschen pipettiert. Mit jeweils einer frischen Pipettenspitze werden anschließend in jede Tasche je 10 µl des *PCR*-Produktes hinzugefügt. In zwei weitere, noch freie Taschen wird H₂O als Leerprobe, sowie für die spätere Abschätzung der Fragmentgrößen 1 µl eines definierten Markers gegeben. Dieser auch als DNS-Leiter bezeichnete Marker besteht aus einer definierten Mischung von DNS-Fragmenten bekannter Länge und „läuft“ während der Elektrophorese neben den *PCR*-Produkten mit, wodurch abschließend deren Länge bestimmt werden kann (Abbildung 3.2). Er wird als Lösung bestehend aus 10 µl 100 bp-Marker, 5 µl H₂O didest. und 5 µl Blaumarker verwendet.

Die mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer wird je nach gewünschter Laufgeschwindigkeit an eine Gleichspannung von 80 bis 120 Volt angeschlossen. DNS-Moleküle sind bei neutralem pH-Wert negativ geladen, da jedes Nucleotid eine negative Phosphatgruppe trägt, und werden daher im an das Gel angelegten elektrischen Feld zur Anode, dem positiven Pol, bewegt. Da die Gelmatrix eine zufällige Diffusion verhindert, bilden sich Banden jeweils gleicher DNS-Fragmente.

Nach ausreichender Laufzeit (ca. 1 h) wird die Gelplatte entnommen und zur Auswertung auf einen UV-Schirm gelegt.

Kasten D3 - Prozedere der Gel-Elektrophorese

E Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur von Serotonin (Kap. 2.2), eigener Entwurf

Abbildung 2: Der genetische Code (Kap. 2.2)

Abbildung 3: Serotonerge Synapse und Darstellung des serotonergen Stoffwechsels (Kap. 2.2), eigener Entwurf

Abbildung 4: *Long*- und *Short*-Allel des Serotonintransporter-Gens (Kap. 2.5)

Abbildung 5: Prinzip der DNS-Amplifizierung durch die *PCR* (Kap. 3.2.2)

Abbildung 6: Der 100bp-Marker als Indikator für Fragmentlängen (Kap. 3.2.5), eigener Entwurf

Abbildung 7: Auswertung der *TPH1*- Restriktion anhand des 100bp-Markers (Kap. 3.2.6)

Abbildung 8: Auswertung der *HTR1B*- Restriktion anhand des 100bp-Markers (Kap. 3.2.7)

Abbildung 9: Auswertung der *SLC6A4*- *PCR* anhand des 100bp-Markers (Kap. 3.2.8)

F Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Bisher gefundene Allelfrequenzen der untersuchten Polymorphismen

Tabelle 2.2: Bisherige Assoziationsstudien und deren Ergebnisse bei erwachsenen Patienten und Kontrollen bzw. bei Trios.

Tabelle 2.3: Hypothesen und initiale Festlegung des Signifikanzniveaus

Tabelle 3.1: Für die Untersuchung der *TPH* verwendete *Primer*

Tabelle 3.2: Für die Untersuchung der *TPH* verwendeter Reaktionsmix

Tabelle 3.3: Für die Untersuchung der *TPH* verwendete Thermocycler-Einstellungen

Tabelle 3.4: Restriktion zur Untersuchung der *TPH*

Tabelle 3.5: Für die Untersuchung des *HTR1B* verwendete *Primer*

Tabelle 3.6: Für die Untersuchung des *HTR1B* verwendeter Reaktionsmix

Tabelle 3.7: Für die Untersuchung des *HTR1B* verwendete Thermocycler-Einstellungen

Tabelle 3.8: Restriktion zur Untersuchung des *HTR1B*

Tabelle 3.9: Für die Untersuchung des *SLC6A4* verwendete *Primer*

Tabelle 3.10: Für die Untersuchung des *SLC6A4* verwendeter Reaktionsmix

Tabelle 3.11: Für die Untersuchung des *SLC6A4* verwendete Thermocycler-Einstellungen

Tabelle 4.1: *Transmission disequilibrium test (TDT)* bei 64 Trios

Im Anhang:

Tabelle A1: Enzyme und deren Bezugsquelle.

Tabelle A2: Oligonukleotide („*Primer*“) und deren Hersteller.

Tabelle A3: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller.

Tabelle A4: Verwendeten Geräte und deren Hersteller.

Tabelle A5: Weitere verwendete Materialien.

Tabelle A6: Reagenzien und Lösungen und deren Hersteller.

Tabelle B1: Zur DNS-Extraktion verwendete Puffer und ihre Herstellung

Tabelle B2: Zur DNS-Extraktion verwendete Enzyme und ihre Verdünnung

Tabelle B3: Vorbereitung der *Primer* gemäß Herstellerangaben.

Tabelle B4: Zusammensetzung des Master-Mixes

Tabelle B5: Zusammensetzung des TAE-Puffers zur Herstellung der Gele und Füllung

der Elektrophorese-Kammer

Tabelle C1: Ausschnitt aus der Intron-Sequenz der *TPH1*

Tabelle C2: Ausschnitt aus der mRNA-Sequenz des *HTR1B*

Tabelle C3: Ausschnitt aus Promotor-Region und *mRNA*-Sequenz des *SLC6A4*

G Textkastenverzeichnis

Kasten 3.1: DNS-Extraktion - Prozedere

Im Anhang:

Kasten D1: Prozedere der *PCR*

Kasten D2: Prinzip und Prozedere der Restriktion

Kasten D3: Prozedere der Gel-Elektrophorese

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Warnke, sowie Herrn Prof. Dr. Gerlach für die Überlassung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit im Labor der Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universität Würzburg.

Sehr herzlich danken möchte ich auch Frau Dr. Walitza für Ihre kritische, konstruktive und gute Betreuung; besonders hervorheben möchte ich hierbei die große Unterstützung bei der Durchführung des praktischen, sowie die anspruchsvolle und dennoch geduldige Korrektur des schriftlichen Teiles.

Ein großer Dank gilt auch der praktischen Hilfestellung sowie der Vermittlung von medizinisch-technischem Know-how durch G.Ortega (die dabei zudem in Ihrer guten Laune nie zu erschüttern war), sowie durch T.Elpel! Desweiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. J. Meyer bedanken für die anregenden Gespräche und die Erläuterung biologischer (und anderer komplexer) Hintergründe. Last but not least ein Dankeschön an Zoi für Ihre moralische Unterstützung und Anwesenheit.