

**Aus dem Universitätsklinikum Würzburg
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Deckert**

**Die Rolle des Ile408Val-Polymorphismus im Orexin-/Hypocretin-
Rezeptor-1 (*HCRTR1*)-Gen bei Panikstörung und intermediären
Phänotypen von Angst**

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

Julia Mann

aus Uffing am Staffelsee

Würzburg, April 2019

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. J. Deckert

Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Katharina Domschke, M.A. (USA)

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.06.2020

Die Promovendin ist Ärztin.

Gewidmet
meinem Ehemann, Benedikt Mann
und meinem Vater, Klaus Mann

„Angst liegt nie in den Dingen selbst, sondern darin, wie man sie betrachtet.“

Anthony de Mello

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DAS KRANKHEITSBILD „PANIKSTÖRUNG“	1
1.1.1	Definition und Diagnostik der Panikstörung	1
1.1.1.1	Agoraphobie.....	3
1.1.1.2	Komorbidität.....	4
1.1.2	Differenzialdiagnostik der Panikstörung	4
1.1.3	Epidemiologie und Sozioökonomie	6
1.1.4	Therapie der Panikstörung	8
1.1.4.1	Leitliniengerechte Therapie.....	8
1.1.4.2	Therapieresistenz	12
1.1.5	Ätiologie der Panikstörung	13
1.1.6	Neurobiologie der Panikstörung	13
1.1.6.1	Physiologie und Pathophysiologie der Stressreaktion	13
1.1.6.2	Experimentelle Provokationstests.....	15
1.1.7	Genetik der Panikstörung.....	17
1.1.7.1	Familienstudien.....	17
1.1.7.2	Zwillingsstudien.....	17
1.1.7.3	Kopplungsstudien	17
1.1.7.4	Assoziationsstudien	18
1.2	UNTERSUCHUNGSGEGENSTAND: OREXIN UND OREXIN-REZEPTOR	20
1.2.1	Orexin	20
1.2.1.1	Struktur	20
1.2.1.2	Physiologische Funktion	21
1.2.2	Der Orexin-Rezeptor	22
1.2.2.1	Struktur und Funktion.....	22
1.2.2.2	Das <i>HCRTR1</i> -Gen als Kandidatengen bei Panikstörung	23
1.2.3	<i>HCRTR1</i> Isoleucin408Valin-Polymorphismus	25
1.2.4	<i>HCRTR1</i> SNPs bei affektiven Störungen und Angsterkrankungen.....	27
1.3	FRAGESTELLUNG	28
2.	<u>PROBEN, MATERIAL & METHODEN</u>	29
2.1	STICHPROBENBESCHREIBUNG	29

Inhaltsverzeichnis

2.2	EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNG	31
2.2.1	DNA-Extraktion	32
2.2.2	Verdünnung der Mikrotiterplatten	32
2.2.3	Herstellung des Agarosegels	32
2.2.4	Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	33
2.2.4.1	Primer-Konstruktion	33
2.2.4.2	Ablauf der PCR	34
2.2.4.3	Kontrolle der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese	35
2.2.4.4	Prinzip und Ablauf der Restriktion	35
2.2.5	Die Gelelektrophorese	37
2.2.6	Dokumentation	38
2.3	STATISTISCHE METHODEN	39
2.4	MATERIAL	40
2.4.1	Primer	40
2.4.2	Enzyme	40
2.4.3	Reagenzien und Puffer	40
2.4.4	Verbrauchsmaterialien	41
2.4.5	Zusammensetzung und Vorbereitung der Reagenzien	42
2.4.6	Geräte	44
2.4.7	Software	45
3.	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>46</u>
3.1	„DISCOVERY SAMPLE“	46
3.1.1	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	46
3.1.2	Assoziationsanalyse	46
3.1.3	Unabhängigkeit der Assoziation von der Komorbidität Depression	48
3.1.4	Geschlechtsspezifische Analysen	49
3.2	„REPLICATION SAMPLE“	50
3.2.1	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	50
3.2.2	Assoziationsanalyse	50
3.2.3	Geschlechtsspezifische Analysen	53
4.	<u>DISKUSSION</u>	<u>57</u>
4.1	ASSOZIATION DES <i>HCRTR1</i> ILE408VAL-POLYMORPHISMUS MIT PANIKSTÖRUNG	57

Inhaltsverzeichnis

4.2	FRAUENSPEZIFISCHE ASSOZIATION DES <i>HCRT1</i> ILE408VAL-POLYMORPHISMUS MIT PANIKSTÖRUNG.....	59
4.3	LIMITATIONEN DER ARBEIT.....	61
4.4	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK.....	62
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	65
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	67

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Lokalisation des humanen <i>HCRT1</i> auf Chromosom 1	23
Abb. 1.2:	Genomische Struktur des humanen <i>HCRT1</i> und Lokalisation des Ile408Val-Polymorphismus an Position 31626924	25
Abb. 2.1:	Steckbrief und Zielsequenz der Restriktions-Endonuklease BsmBI	36
Abb. 2.2:	Sequenzausschnitt aus dem <i>HCRT1</i> -Gen (Amplikon) (5'-3'-Richtung).....	37
Abb. 2.3:	Elektrophoresekammer mit Gel	38
Abb. 2.4:	Optische Darstellung der Ergebnisse einer Restriktion für den <i>HCRT1</i> Ile408Val-Polymorphismus.....	39
Abb. 3.1:	Verteilung der Genotypen unter Annahme eines dominanten Effekts des T-Allels (CC vs. CT/TT) im Discovery Sample	47
Abb. 3.2:	Verteilung der Genotypen unter Annahme eines rezessiven Effekts des T-Allels (CC/CT vs. TT) im Discovery Sample	48
Abb. 3.3:	Verteilung der Allele im Replication Sample	52
Abb. 3.4:	Verteilung der Genotypen unter Annahme eines rezessiven Effekts des T-Allels (CC/CT vs. TT) im Replication Sample	52
Abb. 3.5:	Verteilung der Genotypen unter Annahme eines dominanten Effekts des T-Allels (CC vs. CT/TT) im Replication Sample	53
Abb. 3.6:	Verteilung der Genotypen der Männer im Replication Sample unter Annahme eines rezessiven Effekts des T-Allels (CC/CT vs. TT).....	55
Abb. 3.7:	Verteilung der Genotypen der Frauen im Replication Sample unter Annahme eines rezessiven Effekts des T-Allels (CC/CT vs. TT).....	56

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	Symptome somatischer und psychischer Angst im Rahmen einer Panikattacke	2
Tab. 1.2:	Diagnosekriterien der Panikstörung	3
Tab. 1.3:	Therapie der Panikstörung	10
Tab. 1.4:	Genomische Organisation des humanen <i>HCRT1</i> -Gens	24
Tab. 2.1:	Demographische Daten des „Discovery Samples“	29
Tab. 2.2:	Demographische Daten des „Replication Samples“	30
Tab. 2.3:	Diagnoseschlüssel innerhalb des Patientenkollektivs	30
Tab. 2.4:	Für die Untersuchung des <i>HCRT1</i> -Gens verwendete Primer	33
Tab. 2.5:	Zusammensetzung des PCR-Mastermix	34
Tab. 2.6:	Restriktion zur Untersuchung des <i>HCRT1</i> - rs2271933 - Polymorphismus	36
Tab. 2.7:	Zur DNA-Extraktion verwendete Puffer und ihre Herstellung	42
Tab. 2.8:	Sonstige zur DNA-Extraktion verwendete Reagenzien	43
Tab. 2.9:	Vorbereitung der Primer gemäß Herstellerangaben	43
Tab. 2.10:	Zusammensetzung des PCR-Puffer Goldstar 10x	43
Tab. 2.11:	Zusammensetzung des TAE-Puffers (TRIS-Acetat-EDTA -Puffer) zur Herstellung der Gele und Füllung der Elektrophorese-Kammer	44
Tab. 3.1:	<i>HCRT1</i> -Ile408Val-Genotypenverteilung im „Discovery Sample“	47
Tab. 3.2:	Komorbidität Depression im „Discovery Sample“ in Abhängigkeit des <i>HCRT1</i> -Polymorphismus	49
Tab. 3.3:	Geschlechtsspezifische Analysen des „Discovery Samples“	50
Tab. 3.4:	<i>HCRT1</i> -Ile408Val-Genotypen- und Allelverteilung im „Replication Sample“	51
Tab. 3.5:	Geschlechtsspezifische Analysen des „Replication Samples“	54

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APA	American Psychiatric Association
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CO ₂	Kohlendioxid
CRH	Corticotropin-Releasing-Hormon
DHEA	Dihydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMH	Dorsomedialer Hypothalamus
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders
EPM	Elevated-plus-maze-Test
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
h	Stunde
HCRT	Hypocretin (=Orexin)
HCRTR	Hypocretinrezeptor
HPA	Hypothalamus-Hypophysen- Nebennierenrinden-Achse (Hypothalamic-pituitary-adrenocortical- axis)
5HT	Serotonin
ICD-10	International Classification of Diseases
Ile	Isoleucin
KKP	Expertenkonsens/Klinischer Konsenspunkt
KVT	kognitive Verhaltenstherapie

LOD	logarithm of odds
min	Minute
NCS-R	National Comorbidity Survey Replication
o.g.	oben genannt
PD-AG	Panikstörung mit Agoraphobie (Panic disorder with Agoraphobia)
PEF	Perifornikaler Hypothalamus
PCR	Polymerase-chain-reaction
RFLP	Restriction fragment length-polymorphism
s	Sekunde
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SKID-1	Strukturierte klinische Interviews
SNA	Sympathikus-Nebennierenmark-Achse
SNP	Single nucleotide polymorphism
SNRI	Selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
sog.	sogenannt/sogenannte
SPSS	Statistical package for the social sciences
SSRI	selektive Serotonin-Wiederaufnahme Hemmer
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
u.a.	unter anderem
U/Min	Umdrehungen pro Minute
Val	Valin
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Angst ist eine natürliche Reaktion des Menschen auf potentielle Gefahren. Sie gewährleistet unter physiologischen Bedingungen eine schnellstmögliche Reaktion, um den betroffenen Organismus in Sicherheit zu bringen und die Überlebenschancen zu maximieren.

Patienten, die an einer Angststörung erkrankt sind, leiden im Gegensatz zu einer physiologischen Reaktion unter extremen, unrealistischen Ängsten. Die Angst überkommt sie ganz plötzlich mit einer Heftigkeit, die sie unkontrollierbar übermannt und für die Situation unangemessen ist. Typische körperliche Symptome während einer Attacke sind Schwächegefühl, Schwindel, Übelkeit, die Entwicklung einer Tachykardie, Atemnot und innere Unruhe. Dies gilt insbesondere für die Panikstörung.

1.1 Das Krankheitsbild „Panikstörung“

1.1.1 Definition und Diagnostik der Panikstörung

Laut der „International Classification of Diseases“ (ICD-10) der Weltgesundheitsorganisation (WHO) ist die Panikstörung (F41.0) charakterisiert als episodisch paroxysmale Angst mit

wiederkehrende[n] schwere[n] Angstattacken (Panik), die sich nicht auf eine spezifische Situation oder auf besondere Umstände beschränken und deshalb auch nicht vorhersehbar sind. Wie bei anderen Angsterkrankungen zählen zu den wesentlichen Symptomen plötzlich auftretendes Herzklopfen, Brustschmerz, Erstickungsgefühle, Schwindel und Entfremdungsgefühle (Depersonalisation oder Derealisation). Oft entsteht sekundär auch die Furcht zu sterben, vor Kontrollverlust, oder die Angst wahnsinnig zu werden. Die Panikstörung soll nicht als Hauptdiagnose verwendet werden, wenn der Betroffene bei Beginn der Panikattacken an einer depressiven Störung leidet. Unter diesen Umständen sind die Panikattacken wahrscheinlich sekundäre Folge der Depression (Weltgesundheitsorganisation (WHO), 2018).

Das amerikanische DSM-5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) definiert eine Panikattacke als einen kurzen Zeitabschnitt intensiver Angst, der mit einer spezifischen Symptomatik einhergeht, die abrupt auftritt und ihr Maximum innerhalb von etwa 10 Minuten erreicht. Um eine Panikstörung zu diagnostizieren,

Einleitung

müssen entweder wiederkehrende Attacken auftreten oder es muss nach einer aufgetretenen Attacke die Erwartungsangst vor einer erneuten Panikattacke für mindestens einen Monat bestehen bleiben (siehe Tab. 1.2) (American Psychiatric Association (APA), 2013).

Der Patient, der unter plötzlichen Panikattacken leidet, zeigt mindestens 4 von 13 Symptomen somatischer und psychischer Angst, die im Folgenden aufgelistet werden (siehe Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Symptome somatischer und psychischer Angst im Rahmen einer Panikattacke
Modifiziert nach der deutschen Version des DSM-5 (Falkai und Wittchen, 2015)

1. Herzklopfen, Palpitationen
2. Brustschmerz, Engegefühl
3. Zittern, Beben
4. Erstickungsgefühle
5. Atemnot, Kurzatmigkeit
6. Schwindel, Unsicherheit, Benommenheit
7. Entfremdungsgefühle, Derealisation oder Depersonalisation
8. Furcht zu sterben
9. Angst vor Kontrollverlust, Angst verrückt zu werden
10. Parästhesien (Taubheits- und Kribbelgefühle)
11. Hitzewallungen oder Kälteschauer
12. Übelkeit, Magen-Darm-Beschwerden
13. Crescendo der Angst

Körperliche Symptome, die im Rahmen von Angst wahrgenommen werden, werden von den Betroffenen als Gefahr gedeutet. Es kommt also zu einer kognitiven Fehlattri-bution. Die Angst vor der Angst wird von den Patienten oft quälender als die eigentliche Panikattacke empfunden.

Eine Panikstörung lässt sich mit Hilfe des „Strukturierten Klinischen Interviews für DSM-IV (SKID-1)“ (First et al., 1996) auf Achse 1 für psychische Störungen gemäß den Kriterien des DSM-IV oder der ICD-10 diagnostizieren (Weltgesundheitsorganisation (WHO), 2018).

Tab. 1.2: Diagnosekriterien der Panikstörung

Modifiziert nach DSM-5 (American Psychiatric Association (APA), 2013)

Diagnosekriterien einer Panikstörung
➤ Wiederkehrende, unerwartete Panikattacken
➤ Klar abgrenzbare Episoden intensiver Angst mit dem Höhepunkt innerhalb von Minuten
➤ Keine organischen Ursachen
➤ Anhaltende Besorgnis über das Auftreten weiterer Panikattacken für mindestens einen Monat
➤ Verhaltensänderungen, um die Attacken zu vermeiden, für mindestens einen Monat
➤ Die Panikattacken werden nicht durch eine andere psychische Störung besser erklärt, wie z.B. soziale Phobie, spezifische Phobie, Zwangsstörung, posttraumatische Belastungsstörung oder Störung mit Trennungsangst

1.1.1.1 Agoraphobie

Laut ICD-10 gehört die Agoraphobie (F40.0) zu einer

relativ gut definierten Gruppe von Phobien, mit Befürchtungen, das Haus zu verlassen, Geschäfte zu betreten, in Menschenmengen und auf öffentlichen Plätzen zu sein, alleine mit Bahn, Bus oder Flugzeug zu reisen (Weltgesundheitsorganisation (WHO), 2018).

Die Betroffenen befürchten in diesen Situationen in Panik zu geraten, bei anderen bedrohlichen Zuständen nicht schnell genug entkommen zu können oder keine Hilfe zur Verfügung zu haben. Typisch für die Agoraphobie ist auch die Angst unter einer schweren, organischen Krankheit zu leiden.

Eine Panikstörung kommt als häufiges Merkmal bei gegenwärtigen oder zurückliegenden Episoden vor. Depressive und zwanghafte Symptome, sowie soziale Phobien sind als zusätzliche Merkmale gleichfalls häufig vorhanden. Die Vermeidung der phobischen Situation steht oft im Vordergrund und einige Agoraphobiker erleben nur wenig Angst, da sie die phobischen Situationen meiden können (Weltgesundheitsorganisation (WHO), 2018).

Nach den Kriterien des DSM-5 wurde die Agoraphobie als eigenständige Diagnose etabliert. Die Unterscheidung zwischen reiner Panikstörung (DSM-5: 300.01), Agoraphobie (DSM-5: 300.22) und Agoraphobie mit Panikstörung (DSM-5: 300.21) entfällt. Fortan können Panikstörung, Agoraphobie und ihre Überlappung als komorbide Doppeldiagnose ausgewiesen werden (Wittchen et al., 2014).

Ein signifikanter Zusammenhang wurde auch zur Depression gefunden, was möglicherweise auf gemeinsame genetische und neurobiologische Grundlagen zurückzuführen ist (Lecrubier, 1998), sowie zu Substanzabhängigkeit und der Zwangserkrankung.

1.1.1.2 Komorbidität

Häufig leiden Patienten mit einer Panikstörung an weiteren psychischen Erkrankungen. In einer großen Studie mit 9282 Patienten zeigten 93,6% der Patienten mit Panikstörung und Agoraphobie (PD-AG) zusätzlich eine andere Angststörung. Bei Patienten mit PD-AG war die am häufigsten vertretene Komorbidität die spezifische Phobie mit 75,2%. Außerdem litten 66,5% der Patienten mit PD-AG an einer sozialen Phobie, 39,6% an einer posttraumatischen Belastungsstörung und 37,3% an unterschiedlichen Formen des Substanzmissbrauchs (Kessler et al., 2006).

Das Auftreten von Komorbiditäten führt sowohl zu einer Verstärkung der Angst und der depressiven Symptomatik als auch zu einer erhöhten Rate an Selbstmordversuchen. Außerdem sprechen multimorbide Patienten schlechter auf Therapien an als Patienten, die nur an der Panikstörung leiden (Lecrubier, 1998).

Die reine Panikstörung ist von depressiven Störungen abzugrenzen, in deren Rahmen auch Panikattacken auftreten können. Treten Panikattacken ausschließlich im Rahmen einer depressiven Episode auf, würde die Diagnose einer „Depression (mit Panikattacken)“ gestellt werden und keine „Panikstörung“. Auch Panikattacken, die im Zusammenhang mit einer Agoraphobie stehen, sind zu differenzieren (Wittchen und Hoyer, 2011).

1.1.2 Differenzialdiagnostik der Panikstörung

Organische Angstsymptome im Rahmen somatischer Erkrankungen sind unbedingt abzuklären (Bowen, 1983, Mackenzie und Popkin, 1983, Bandelow, 2001). Zu den häufigen somatischen Differenzialdiagnosen der Panikstörung gehören endokrine

Einleitung

Störungen (Bandelow, 2001). Hierzu zählen rezidivierende Hypoglykämien durch das sehr selten auftretende Insulinom, aber auch reaktive Hypoglykämien. Bei der Hyperthyreose steht der M. Basedow im Vordergrund und nur ausnahmsweise die funktionelle Schilddrüsenautonomie (Mackenzie und Popkin, 1983). Beobachtet wurden Paniksymptome auch beim Hypoparathyreoidismus mit Hypokalziämie, die tetanische Symptome auslöst. Sehr selten gibt es in diesem Zusammenhang neuroendokrine Tumore und schwere Elektrolytentgleisungen (Hyperkaliämie) sowie Stoffwechselerkrankungen (akute intermittierende Porphyrrie) (Bandelow, 2001). Auslöser für Paniksymptome sind nicht selten akute Herz-Kreislaufkrankungen (Angina pectoris, Myokardinfarkt, Synkopen, Arrhythmien) (Bandelow, 2001). Weiter bedacht werden müssen Lungenerkrankungen (Asthma bronchiale, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung) und neurologische Erkrankungen (Epilepsie, Migräne, Migraine accompagnée, Multiple Sklerose und Hirntumore) (Sareen et al., 2006). Diese sind verpflichtend laborchemisch und bildgebend auszuschließen. Entsprechend der S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (Bandelow, 2001) umfasst die Basisdiagnostik bei Patienten mit Angstsymptomen die ausführliche Anamnese, eine körperliche, insbesondere neurologische Untersuchung, ein Blutbild und klinisch chemische Parameter wie Elektrolytbestimmung, Nüchternblutzucker, Leberwerte und die Schilddrüsenparameter (TSH-basal, freies T3, freies T4, TSH-Rezeptorantikörper). Zum Beleg oder Ausschluss einer reaktiven Hypoglykämie ist ein oraler Glucosetoleranztest über drei Stunden erforderlich, zur Diagnostik eines organischen Hyperinsulinismus (Insulinom) dient der Hungerversuch unter stationären Bedingungen. Technische Untersuchungen schließen Elektrokardiogramm mit Rhythmusstreifen, Belastungs-EKG, ggf. ein Langzeit-EKG, eine Lungenfunktionsprüfung, ein Elektroenzephalogramm und eine kraniale Bildgebung ein (Bandelow et al., 2014). Auch müssen Angststörungen von anderen psychischen Erkrankungen wie Depression, Alkoholabhängigkeit, Medikamenten- oder Drogenentzug oder Psychosen abgegrenzt werden (Bandelow, 2001).

Die Panikstörung nimmt eine einzigartige Stellung unter den Angststörungen ein, da Paniksymptome primär körperlicher Natur sind und somit häufig fehlinterpretiert werden (Meuret et al., 2017). Panikpatienten stellen sich anfangs oft mit respiratorischen oder kardiologischen Symptomen in der Notaufnahme vor. Die

Erkennungsrate von Paniksymptomen durch die Ärzte in der Notaufnahme ist aber gering, sodass Paniksymptome oder eine Panikstörung oft unerkant bleiben (Sung et al., 2018).

Es muss außerdem bedacht werden, dass eine somatische Erkrankung und eine Angststörung durchaus bei demselben Patienten koexistieren können.

1.1.3 Epidemiologie und Sozioökonomie

Da viele Studien unterschiedliche Diagnosegruppen festlegen und weil DSM und ICD unterschiedliche diagnostische Hierarchien beinhalten, ist es schwierig, eine eindeutige Angabe über die Prävalenz der Panikstörung zu machen (Lang et al., 2012).

Nach einer Analyse der Daten der National Comorbidity Survey Replication (NCS-R) basierend auf einer bevölkerungsrepräsentativen Stichprobe liegt die Lebenszeitprävalenz von Panikattacken bei 22,7%, die Diagnose einer reinen Panikstörung ohne Agoraphobie bei 3,7% und die einer PD-AG bei 1,1 % (Kessler et al., 2006). Das durchschnittliche Erstmanifestationsalter von Patienten mit Panikstörung liegt bei 24 Jahren, für die Agoraphobie ohne Panikstörung bei 20 Jahren (Kessler et al., 2005, Bandelow und Michaelis, 2015) und die 12-Monatsprävalenz ist bei der Panikstörung am höchsten bei den 35- bis 49-Jährigen (Bandelow und Michaelis, 2015). Die durchschnittliche 12-Monatsprävalenz der Panikstörung mit und ohne Agoraphobie liegt bei Männern und Frauen zusammen bei 2,0%. Frauen sind mit einer Prävalenz von 2,8% deutlich häufiger als Männer mit 1,2% betroffen. Diese Prävalenzen beziehen sich auf Erwachsene in Deutschland (Jacobi et al., 2016). Die Agoraphobie tritt bei Männern und Frauen mit einer 12-Monatsprävalenz von 4,0% auf. Auch hier sind die Frauen mit 5,6% deutlich häufiger betroffen als die Männer mit 2,3% (Jacobi et al., 2016). In der Altersgruppe von 50- bis 64-Jährigen sinkt die Prävalenz der Panikstörung laut Bandelow und Michaelis wieder, und bei den 65- bis 79-Jährigen ist die Prävalenz am geringsten. Die Datenlage bezüglich der älteren Bevölkerung ist allerdings bislang recht eingeschränkt und es scheint, dass die Stichprobenszusammensetzung und methodische Probleme, wie Unterschiede in der Falldefinition, die Ursachen für die teilweise beträchtlichen Unterschiede bezüglich der Prävalenzen sind (Bandelow und Michaelis, 2015).

Einleitung

Eine große Studie, die Studiendaten aller EU-Mitgliedsstaaten, der Schweiz, Islands und Norwegens berücksichtigt, zeigt, dass 38,2% dieser Population jedes Jahr an einer psychischen Erkrankung leiden. Die Erkrankungsrate hat sich seit 2005 (Wittchen und Jacobi, 2005) um 10,8% erhöht, was auf den Einschluss von 14 neuen Diagnosen und neu hinzugekommenen EU-Mitgliedsstaaten zurück zu führen ist (Wittchen et al., 2011). Die Angststörungen sind mit 14,0% die häufigsten psychischen Krankheitsbilder (Wittchen et al., 2011).

Sozioökonomisch gesehen ist die Panikstörung im Vergleich zu anderen psychischen Erkrankungen eine „teure Erkrankung“ (Wittchen et al., 2011). Angststörungen werden im Vergleich zu anderen psychiatrischen Syndromen aber am wenigsten erkannt und obwohl diese Gruppe von Erkrankungen bereits vor mehr als 20 Jahren in der „Epidemiologic Catchment Area Survey“ (Bourdon et al., 1992) bekannt wurde, bleibt sie unzulänglich verstanden und behandelt. Da diese Erkrankungen entscheidend mitverantwortlich sind für eine Minderung der Arbeitsproduktivität, Steigerung der Morbidität und Mortalität sowie des Alkohol- und Drogenmissbrauchs einer großen Population belastet sie die Gesellschaft erheblich (Bystritsky, 2006). Dies lässt sich auch in ökonomischen Kosten beziffern (Batelaan et al., 2007). Die Panikstörung zählt zu den teuersten psychischen Erkrankungen und verursacht durchschnittliche jährliche pro Kopf-Kosten von 13.894 € (Batelaan et al., 2007). Der Vergleich medizinischer Kosten und Produktionsverluste vor und nach der Behandlung der Panikstörung zeigt, dass die Behandlung die gesamtgesellschaftlichen Kosten im Zusammenhang mit einer Panikstörung reduziert und gleichzeitig die Lebensqualität erheblich verbessert (Salvador-Carulla et al., 1995). Olesen et al. zeigten, dass Störungen des Gehirns insgesamt viel teurer sind, als bisher angenommen und eine wichtige gesundheitsökonomische Herausforderung für Europa darstellen. Die Gesamtkosten für neuropsychiatrische Erkrankungen in 30 europäischen Ländern, Island, Norwegen und der Schweiz mit einer Gesamtbevölkerung von 514 Millionen beliefen sich im Jahr 2010 auf 798 Billionen Euro. Die Jahreskosten für Angststörungen betragen 74,4 Billionen Euro. In Europa lagen die durchschnittlichen Kosten pro Einwohner bei 5.550 €. Angststörungen waren zusammen mit Kopfschmerzen am häufigsten vertreten, verursachten jedoch die geringsten Kosten pro Patient. 69,1 Millionen Menschen litten unter einer Angststörung, hiervon waren 7,9 Millionen von der Panikstörung betroffen. Die Gesamtkosten pro Patient mit

Angststörung betragen 1077 €, die Gesamtkosten pro Patient mit Panikstörung 1505 €. Die Studie zeigt eindrücklich, dass neuropsychiatrische Erkrankungen erhebliche Kosten verursachen und suggeriert darüber hinaus, dass Prävalenz und Kosten dieser Erkrankungen aufgrund der steigenden Lebenserwartung weiter zunehmen werden (Olesen et al., 2012).

1.1.4 Therapie der Panikstörung

1.1.4.1 Leitliniengerechte Therapie

Nach der S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Psychiatrie, Psychotherapie und Nervenheilkunde (Bandelow et al., 2014) hat sich für die Behandlung der Panikstörung eine Kombination aus verhaltenstherapeutischen und psychopharmakologischen Interventionen als wirksamstes Konzept herausgestellt (Cochrane-Review von (Furukawa et al., 2007)).

Als Indikation für eine Behandlung gelten

das gesicherte Bestehen einer Panikstörung nach ICD-10, ein mittlerer bis schwerer Leidensdruck des Patienten, psychosoziale Einschränkungen oder mögliche Komplikationen einer Angsterkrankung (wie Suchterkrankungen u.a.) (Bandelow et al., 2014).

Die „Präferenz des informierten Patienten muss unbedingt berücksichtigt“ werden (Bandelow et al., 2014). Grundlage für die Erstellung eines konkreten Behandlungsplans ist die Beurteilung individueller und sozialer Faktoren wie der Schweregrad der Erkrankung, Komorbidität, Suizidrisiko und ökonomische Faktoren. Wirkeintritt, Nachhaltigkeit, unerwünschte Wirkungen und Verfügbarkeit müssen mit dem Patienten besprochen werden (Bandelow et al., 2017). Die kognitive Verhaltenstherapie (KVT) von Panikattacken schließt die Vermittlung eines individuellen Erklärungsmodells mit ein, die Konfrontation mit Angst-auslösenden Situationen (bei Patienten, die ein agoraphobisches Vermeidungsverhalten zeigen), die Reattribution psychischer und körperlicher Symptome, sowie die Rückfallprophylaxe („Teufelskreismodell“) (Lang et al., 2012). KVT gehört mit einer Ansprechrate von 60 - 90% zur Erstlinientherapie der Angststörungen (Barlow et al., 2000).

Einleitung

Evidenzbasierte Aussagen zur notwendigen Dauer der Therapie können angesichts der gegenwärtigen Studienlage nicht gemacht werden (Expertenkonsens/Klinischer Konsenspunkt „KKP“). Bei Patienten mit einer Panikstörung/Agoraphobie sollte die Therapiedauer deshalb entsprechend der Krankheitsschwere, Komorbidität und der psychosozialen Rahmenbedingungen individuell geplant werden (KKP) (Bandelow et al., 2014).

Bei Komorbidität mit Depression soll eine leitliniengerechte antidepressive Therapie erfolgen (Expertenkonsens/KKP). Patienten mit Panikstörung, bei denen sich eine KVT nicht als wirksam erwiesen hat, nicht verfügbar ist oder wenn eine diesbezügliche Präferenz des informierten Patienten besteht, sollte eine psychodynamische Psychotherapie angeboten werden, (Evidenzkategorie IIa/ Empfehlungsgrad B, KKP). Die psychodynamische Psychotherapie soll sich an empirisch fundierten Manualen orientieren (KKP) (Bandelow et al., 2014).

Bei der psychopharmakologischen Behandlung der Panikstörung kommen vor allem selektive Serotonin-Wiederaufnahme Hemmer (SSRI) und selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmememmer (SNRI) zum Einsatz (Bandelow et al., 2014). SSRIs wie Paroxetin und Citalopram sind den Trizyklika wegen des günstigeren Nebenwirkungsprofils in der Behandlung der Panikstörung vorzuziehen und gelten zusammen mit Venlafaxin (SNRI) als Mittel der ersten Wahl für diese Indikation (Katzman, 2004). In der anxiolytischen Soforttherapie hat sich der Einsatz von Benzodiazepinen bewährt (über 70% Ansprechrates) (Klein, 2002), wobei eine langfristige Anwendung von mehr als zwei bis vier Wochen wegen des Abhängigkeitspotenzials nicht zu empfehlen ist (Benitez et al., 2008) und laut S3-Leitlinie – außer in Notfällen und bei Kontraindikationen für SSRI/SNRI – explizit zu vermeiden ist (Bandelow et al., 2014). Einige SSRIs und SNRIs sind besonders anfällig für pharmakokinetische Wechselwirkungen durch die Hemmung von Enzymen im Cytochrom P450-System (Muscatello et al., 2012). Werden Arzneimittel mit sedierenden Eigenschaften (wie zum Beispiel Benzodiazepine oder Pregabalin) kombiniert, kann es zu einer ZNS-Depression mit Sedierung, Schläfrigkeit oder einer erhöhten Reaktionszeit kommen (Bandelow et al., 2017). Eine Übersicht der leitliniengerechten medikamentösen Therapie der Panikstörung zeigt Tab. 1.3.

Einleitung

Tab. 1.3: Therapie der Panikstörung

Modifiziert nach S3-Leitlinie DGPPN (Bandelow et al., 2014)

Substanz- klasse	Medikament	Zulassung in Deutschland für Panikstörung/ Agoraphobie	Tagesdosis	Nebenwirkungen	
SSRIs	Citalopram	✓	20 - 40 mg	QTc-Intervall- Verlängerung	Unruhe, Übelkeit,
	Escitalopram	✓	10 – 20 mg		
	Fluoxetin	-	20 – 40 mg	gastrointestinale Beschwerden wie Durchfall, Verstopfungen, Kopfschmerzen, Veränderungen des Appetits und des Gewichts, Schwitzen, trockener Mund, Zittern, Alpträume, Manieauslösung, sexuelle Störungen	
	Fluvoxamin	-	100 – 300 mg		
	Sertralin	-	50 – 150 mg		
	Paroxetin	✓	20 - 50 mg		
SNRI	Venlafaxin	✓	75 – 225 mg	Unter anderem Herzrasen, Blutdruckanstieg oder Blutdruckabfall, Unruhe, Schlafstörungen, Übelkeit, Appetitlosigkeit, gastrointestinale Beschwerden wie Verstopfung, Schwitzen, trockener Mund, Schwindel, Zittern, Alpträume, Manieauslösung, sexuelle Störungen, Störungen beim Wasserlassen, Sehstörungen, Verwirrtheit, Ohrgeräusche	

Einleitung

Substanz- klasse	Medikament	Zulassung in Deutschland für Panikstörung/ Agoraphobie	Tagesdosis	Nebenwirkungen
Trizyklische Anti- depressiva	Clomipramin	✓	75 – 250 mg	Müdigkeit, trockener Mund, Kopfschmerzen, Schwindel, Zittern, Schwitzen, Appetitsteigerung, Gewichtszunahme, Störungen beim Wasserlassen, Sehstörungen, Verwirrtheit
	Imipramin	-	75 – 250 mg	
Benzo- diazepine	Alprazolam	Spannungs-, Erregungs- und Angstzustände	1,5 – 8 mg	Unter anderem Müdigkeit, Schwindel, Verlängerung der Reaktionszeit, Sehstörungen, unsicherer Gang, verwaschene Sprache, Gedächtnisstörungen, Vergesslichkeit, Verwirrtheit, Atmungshemmung, paradoxe Unruhe, Muskelschwäche, Gewichtsänderung, Sturzgefahr bei älteren Patienten. Bei längerem Gebrauch: Abhängigkeit. Entzugssyndrome nach abruptem Absetzen
	Diazepam		5 – 20 mg	
	Lorazepam		2 – 8 mg	
	Clonazepam		4 – 8 mg	

In Rückfallpräventionsstudien und basierend auf klinischen Erfahrungen zeigte sich, dass die medikamentöse Behandlung über zwölf Monate oder länger nach der Remission fortgesetzt werden sollte (Bandelow et al., 2017).

Unbehandelt verläuft die Panikstörung meist chronisch. Eine vollständige Spontanremission, ohne jegliche Therapie, ist eher selten (Jacobi et al., 2004). Selbst nach vollständiger Remission ist die Rückfallrate hoch, bei Patienten mit gleichzeitiger Agoraphobie ist die Prognose meist noch schlechter. Bei Frauen mit Panikstörung liegt die kumulierte Rückfallrate mit 64% signifikant höher, als die der Männer mit 21% ($df = 1$ und $p = 0,009$) (Yonkers et al., 2003).

Um den Schweregrad der Panikstörung zu bestimmen und den Behandlungsfortschritt zu überwachen, werden Bewertungsskalen wie die Panik- und Agoraphobie-Skala (PAS) für Panikstörung bzw. Agoraphobie verwendet (Bandelow et al., 2000a).

1.1.4.2 Therapieresistenz

Bei 43,3% der Patienten mit Panikstörung trat innerhalb eines Behandlungsjahrs keine Remission auf und auch nach zwei Jahren Behandlung litten mehr als ein Drittel der Patienten an Paniksymptomen (Batelaan et al., 2010).

Freire et al. zeigten, dass nur maximal 61% der Patienten, die mit der Erstlinientherapie, bestehend aus SSRI und kognitiver Verhaltenstherapie behandelt wurden, auf die Therapie ansprachen (Freire et al., 2011). Es besteht allerdings bisher kein Konsens über die Definition einer behandlungsresistenten Panikstörung und derzeit gibt es auch keine festgesetzten Kriterien für die Klassifizierung der therapieresistenten Patienten (Freire et al., 2016).

Anders als bei anderen schweren psychischen Störungen ist es bei Patienten mit Angststörungen schwerer, ihren Produktivitätsverlust und ihre verminderte Lebensqualität zu messen. Trotzdem zeigt eine Studie, dass die Produktivität und Lebensqualität von therapieresistenten Angstpatienten ähnlich beeinträchtigt ist wie von Patienten mit Schizophrenie (Lochner et al., 2003). Patienten mit Panikstörung fällt es schwerer auf frei verkäufliche Medikamente zu verzichten. Die Lebensqualität ist von der Schwere der Symptomatik und von der Komorbidität Depression abhängig (Lochner et al., 2003).

Als Gründe für die Therapieresistenz werden u.a. mögliche Pathologien wie Infektionen, Umweltfaktoren wie Kindheitstraumata, sowie medizinische Komorbiditäten und mangelnde Compliance genannt (Bystritsky, 2006). Es gab erste

Nachweise, dass die Monotherapie mit Reboxetin und Olanzapin bei behandlungsresistenter Panikstörung wirksam ist. Eine Dosisescalation führte nach anfänglich gänzlich fehlender Reaktion allenfalls zu einer geringen Verbesserung der Symptomatik (Freire et al., 2016).

1.1.5 Ätiologie der Panikstörung

Heute geht man davon aus, dass die Panikstörung durch das Zusammenspiel einer genetisch bedingten Vulnerabilität, damit assoziierten neurobiologischen Veränderungen im Gehirn, sowie belastenden Lebenssituationen entsteht und somit multifaktoriell bedingt ist (Förstl et al., 2006b). Die Pathogenese der Panikstörung mit ihren unterschiedlichen Einflussfaktoren und deren Interaktionen ist komplex und bisher nur in einem begrenzten Rahmen verstanden.

Neben der Untersuchung neurobiologischer Ursachen, psychosozialer Faktoren, Rollenerwartungen und organischen Prädispositionen, liegt ein Schwerpunkt des wissenschaftlichen Interesses auf der Erforschung des hereditären Aspektes der Ursachen und Transmission der Panikstörung.

1.1.6 Neurobiologie der Panikstörung

1.1.6.1 Physiologie und Pathophysiologie der Stressreaktion

Physiologisch wird Stress über zwei „Stressachsen“ vermittelt: eine schnelle und eine langsame Achse.

Die Sympathikus-Nebennierenmark-Achse (SNA) führt durch Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin aus dem Nebennierenmark sofort zur sogenannten „Fight or Flight Reaction“ als körperliche Antwort auf einen angstausslösenden Stimulus (Cannon, 1929). Es kommt zu physiologischen Reaktionen wie Bronchodilatation, Herzfrequenzanstieg, Verlangsamung der Darmperistaltik und Vasokonstriktion in den Hautgefäßen. Inzwischen geht man davon aus, dass die Stressreaktionen bei Männern und Frauen differieren. Frauen zeigen Verhaltensweisen, die über die „Fight or Flight Reaction“ hinausgehen und von Fürsorge und Unterstützung zum Schutz des Nachwuchses geprägt sind (Taylor et al., 2000). Die kortisolbetonte Stressantwort über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (Hypothalamic-pituitary-adrenocortical-axis = HPA-Achse) hat eine besondere Bedeutung bei Dauerstress

(Busse et al., 2005).

Das Signalpeptid Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) wird aus dem Hypothalamus ausgeschüttet, wenn Kortex und limbisches System eine Wahrnehmung als beängstigend einstufen und diese Information über serotonerge und cholinerge Fasern an den Hypothalamus übermitteln. CRH aktiviert dann die SNA. Außerdem spielt CRH als Neurotransmitter auch in Hippocampus und Amygdala bei der Vermittlung von Stress- und Angstreaktionen eine Rolle (Rensing et al., 2006). So konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass eine Vernachlässigung durch die Mutter in der Kindheit nicht nur zu einer erhöhten Ängstlichkeit im Erwachsenenalter führt, sondern auch dauerhaft erhöhte CRH-Werte im Liquor resultieren (Coplan et al., 1996). Bei Patienten mit Panikstörung konnten während einer Panikattacke signifikant erhöhte Spiegel von freiem Kortisol im Speichel gemessen werden (Bandelow et al., 2000b).

Aus neurobiologischer Sicht spielt das sogenannte „Angstnetzwerk“ von Gorman et al., bestehend aus miteinander verknüpften Hirnregionen, eine entscheidende Rolle in der Regulation von Panik. Die Amygdala ist darin mit ihren zentralen und basolateralen Kerngebieten das zentrale Kontrollorgan, welches mit Hippocampus, präfrontalem und orbitofrontalem Kortex, Thalamus, Hypothalamus, Locus coeruleus und periaquäduktalem Grau verschaltet ist (Gorman et al., 2000). In diesem „Angstnetzwerk“ vermutet man eine Fehlregulation oder Überempfindlichkeit bei Patienten mit Angststörungen, die möglicherweise durch ein Ungleichgewicht im Neurotransmitterhaushalt ausgelöst wird (Gorman et al., 2000, Zwanzger und Deckert, 2007).

Funktionsstörungen im Noradrenalin- (Charney et al., 1992), Serotonin- (5HT-) (Maron und Shlik, 2006), GABA (gamma-Aminobuttersäure)- (Marowsky et al., 2005), (Likhtik et al., 2008) und im Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System (Welt et al., 2006) stehen im Fokus der aktuellen, neurobiologischen Hypothesen eine Panikstörung auszulösen.

Außerdem scheinen unterschiedliche Neuropeptide fehlreguliert zu sein. Eine zentrale Rolle in der Neurobiologie der Panikstörung wurde Norepinephrin, Orexin, Neuropeptid S und Adenosin im Rahmen des „multilevel model of arousal, attention and anxiety“ zugeschrieben (Geiger et al., 2014). Orexin ist ein Peptid mit 33 Aminosäuren das mit dem Orexin-1-Rezeptor und Orexin-2-Rezeptor interagiert (Sakurai et al., 1998). Die detaillierte Beschreibung von Struktur und Funktion des

Orexinsystems erfolgt unter Abschnitt 1.2.1. Die Funktionen Aufmerksamkeit und Arousal haben eine große Relevanz für die Panikstörung wie sich im „Multilevel-Modell der Erregung, Aufmerksamkeit und Angst“ zeigt.

Geiger et al. argumentieren, dass bei einer Panikstörung Veränderungen der Neurotransmittersysteme, die die physiologische Erregung moderat beeinflussen, sowohl zu einer gestörten bottom-up-Alarmierung zwischen Locus coeruleus, rechtem Parietallappen und rechtem Prefrontalkortex als auch zu veränderten top-down-Aufmerksamkeitskontrollprozessen zwischen anteriorem cingulärem Kortex und lateralem präfrontalem Kortex führen können (Geiger et al., 2014).

1.1.6.2 Experimentelle Provokationstests

In diversen experimentellen Untersuchungen wurden Angst- und Panikattacken artifiziell ausgelöst, u.a. durch intravenöse Verabreichung von Natriumlaktat-Infusionen (Liebowitz et al., 1985) sowie durch Kohlendioxid- (CO₂-) Inhalation (Papp et al., 1993). Man geht davon aus, dass die Natriumlaktat-Infusion eine metabolische Alkalose induziert, die durch Hypoventilation kompensiert wird und dadurch zur Anreicherung des Kohlendioxids führt. Es kommt zur zentralen Hyperkapnie, die durch Stimulation des Locus coeruleus zur vermehrten Noradrenalinfreisetzung führt und so eine Panikattacke auslösen kann (Elam et al., 1981). Die Beobachtung von CO₂-induzierten Panikattacken bei Patienten mit Panikstörung führte zu der sogenannten „false suffocation alarm theory“ (Klein, 1993). Diese Theorie geht von einem hypersensitiven zentralen CO₂-Rezeptorensystem bei Panikpatienten aus. Spontanentladungen von zentralen CO₂-Chemorezeptoren mit erniedrigter Reizschwelle bewirken sowohl eine Hyperventilation als auch eine Dyspnoe. Im Verlauf entwickeln die Patienten dann einen Adaptationsmechanismus in Form einer chronischen Hyperventilation (Papp et al., 1993). Eine im Jahr 2013 durchgeführte Untersuchung an Patienten mit Urbach-Wiethe-Syndrom, welche bilaterale Läsionen im Bereich der Amygdala aufwiesen, zeigte CO₂-induzierte Panikattacken der Patienten. Dieses Ergebnis widerlegt die Annahme, dass eine Überempfindlichkeit der Amygdala Voraussetzung für Angst und Panik ist (Feinstein et al., 2013). Wenn es zu Änderungen in der CO₂- und Laktatkonzentration im Hirnstamm kommt, steigert Orexin die neuronale Feuerrate, was ebenfalls zu Angst und Panik führt (Williams et al., 2007, Johnson et al., 2010).

Einleitung

Für eine entscheidende Rolle des noradrenergen Systems in der Genese von Panikattacken sprechen positive Resultate in experimentellen Provokationen mit noradrenerg wirkenden Substanzen wie Yohimbin, einem α_2 -Adrenorezeptor-Antagonisten (Charney et al., 1984, Charney et al., 1987) und Isoprenalin, einem nicht-selektiven Betasympathomimetikum (Pohl et al., 1988, Balon et al., 1988). Clonidin wirkt als α_2 -Adrenorezeptor-Agonist dementsprechend anxiolytisch, wobei es wegen seiner Nebenwirkungen, die aufgrund der anticholinergen Wirkung zustande kommen nicht als Therapeutikum der Panikstörung eingesetzt wird. Depressive Verstimmungen, Hypotonie, Bradykardie und damit verbundene Benommenheit, Schwindel, Libido- und Potenzstörungen, sowie Mundtrockenheit und Obstipation sind typische unerwünschte Nebenwirkungen (Chiu und Campbell, 2018). Ein Großteil des im ZNS nachweisbaren Noradrenalins wird im Locus coeruleus produziert, sodass er als eine noradrenerge Schaltstelle im Angst-Panik-System verstanden wird (Sullivan et al., 1999). Die Aktivität des Locus coeruleus wird unter anderem durch α_2 -Adrenorezeptoren moduliert (Bourin et al., 1998). Die Stimulation dieser Autorezeptoren senkt die Feuerrate der noradrenergen Neurone und vermindert so die Freisetzung von Noradrenalin. Bei Patienten mit einer Panikstörung konnte wiederholt eine verminderte α_2 -Rezeptoren-Dichte gefunden werden, die als kompensatorische „down regulation“ einer Hyperaktivität des noradrenergen Systems diskutiert wurde (Cameron et al., 1990). Die verminderte Rezeptordichte könnte auf die erhöhte Aktivität des sympathischen Nervensystems in dieser Patientengruppe zurückzuführen sein. In einer Tierstudie von Szabo et al. wurde die Aktivität im Locus coeruleus nach SSRI Gabe gemessen und gezeigt, dass der Hauptwirkungsmechanismus der SSRIs bei der Panikstörung auf einer Abschwächung der noradrenergen Impulsrate im Bereich des Locus coeruleus basiert (Szabo et al., 2000). Auch vor dem Hintergrund der Wirksamkeit der SSRIs bei der Panikstörung lässt sich eine noradrenerge Genese vermuten.

Ein therapeutischer Aspekt, der in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht im Vordergrund steht, ist die Akuttherapie der Panikstörung mit Benzodiazepinen. Als gamma-Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptor-Agonist werden sie erfolgreich in der Therapie der Panikstörung eingesetzt. Dies zeigt, dass dem GABAergen System in der Genese der Panikstörung ebenfalls eine Rolle zukommt. Es gilt als gesichert, dass die GABAerge Transmission in Thalamus und Amygdala an der Angstentstehung

beteiligt ist (Marowsky et al., 2005, Likhtik et al., 2008). So wurde in Provokationsstudien gezeigt, dass Panikattacken durch den Benzodiazepin-/GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Flumazenil ausgelöst werden können (Nutt et al., 1990, Woods et al., 1991).

1.1.7 Genetik der Panikstörung

1.1.7.1 Familienstudien

In Familienstudien zeigen Verwandte ersten Grades eines Patienten mit Panikstörung ein dreifach erhöhtes Risiko an einer Panikstörung zu erkranken als gesunde Kontrollpersonen (Maier et al., 1993, Brown, 1994). Das Risiko für die Nachkommen war am höchsten, wenn die Eltern sowohl unter Panikstörung wie auch Agoraphobie litten (Nocon et al., 2008). Genetisch ist die Ausprägung der Panikstörung nicht eindeutig determiniert. Mit hoher Wahrscheinlichkeit sind Hunderte von Genen verantwortlich, die mit inkompletter Penetranz assoziiert sind und mit Umweltfaktoren interagieren (Vieland et al., 1996).

1.1.7.2 Zwillingsstudien

In Zwillingsstudien wurde eine zwei- bis dreifach höhere Konkordanzrate für das Auftreten einer Panikstörung bei monozygoten Zwillingen festgestellt als bei dizygoten Zwillingen der Kontrollstichprobe (Skre et al., 1993, Perna et al., 1997).

Aufgrund von Daten aus fünf Familien- und drei Zwillingsstudien konnte für die Panikstörung eine Heritabilität von 48% (Hettinga et al., 2001) und für die Agoraphobie eine Heritabilität von 67% (Domschke und Deckert, 2007, Hettinga et al., 2001) errechnet werden. Diese Studienergebnisse legen einen signifikanten Einfluss genetischer Faktoren in der Ätiologie der Panikstörung nahe.

1.1.7.3 Kopplungsstudien

Mit Hilfe von Kopplungsstudien kann überprüft werden, ob die gehäufte Vererbung eines polymorphen genetischen Markers, dessen chromosomale Lokalisation bekannt ist, innerhalb einer mehrfach betroffenen Familie überzufällig häufig gleichzeitig mit einer Erkrankung verbunden ist (Förstl et al., 2006a). Bei Patienten zeigen sich auf chromosomaler Ebene Risikoloci, die häufiger vorkommen als bei gesunden Kontrollen. Dadurch können chromosomale Regionen eingegrenzt werden, in denen

sich mit hoher Wahrscheinlichkeit Kandidatengene befinden. Der LOD- (logarithm of odds) Wert gibt das Maß der Kopplung als Effektgröße für krankheitsassoziierte Areale an. Eine Kopplung kann angenommen werden, wenn der LOD-Wert > 3 ist, also eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 1:1000 vorliegt, dass die entsprechende Region nicht mit dem analysierten Merkmal verbunden ist. Für die Panikstörung wurden auf den Chromosomen 1p, 4q, 7p, 9q, 11p, 15q und 20p potenzielle Risikoloci gefunden (Gelernter et al., 2001). Die Größe der bisher beschriebenen Genloci ist allerdings mit einer Vielzahl von Genen aktuell noch sehr groß. Insgesamt werden die klinisch-genetischen Untersuchungen aber durch die bisher vorliegenden Kopplungsuntersuchungen in der Annahme bestätigt, dass bei der Entstehung der Angststörungen zahlreiche Gene zusammenwirken (Domschke, 2014).

1.1.7.4 Assoziationsstudien

Assoziationsstudien dienen dazu, den Zusammenhang von Allelen eines Kandidatengens und den damit verbundenen Erkrankungen und Phänotypen zu beschreiben und einen möglichen Zusammenhang genauer zu überprüfen. Es gibt bereits einige genetische Assoziationsstudien, in denen Vulnerabilitätsgene für Angststörungen identifiziert wurden. Die aussagekräftigsten Nachweise gibt es für die Gene des Serotoninrezeptors (*5-HT1A*) (Rothe et al., 2004), des Serotonintransporters (*5-HTT*) (Samochowiec et al., 2004), des mitochondrialen Enzyms Monoaminoxidase-A (*MAO-A*) (Deckert et al., 1999), der Catechol-O-Methyltransferase (*COMT*) (Domschke et al., 2004), des Cholecystokinin B Rezeptors (*CCK-B*) (Hosing et al., 2004, Kennedy et al., 1999), des Adenosin A2A Rezeptors (*ADORA2A*) (Deckert et al., 1998, Hamilton et al., 2004), des Corticotropin-releasing hormone Rezeptors 1 (*CRHR1*), des FK506 bindenden Proteins 5 (*FKBP5*), des Angiotensin konvertierenden Enzyms (*ACE*), des Regulator of G-protein signaling 2 (*RGS2/7*) (Smoller et al., 2008) und des Neuropeptid S Rezeptors (*NPSR1*) (Domschke et al., 2011). *MAO-A*, *NPSR1* und *COMT* spielen besonders bei weiblichen Patienten eine Rolle (Gottschalk und Domschke, 2016).

Eine groß angelegte Übersichtsarbeit von Howe et al. zeigt, dass für die meisten Genvarianten keine stringenten Zusammenhänge beobachtet werden konnten. Nur *COMT*, *NPSR1* und *TMEM132D* zeigten Assoziationen mit der Panikstörung, die auch

Einleitung

in multiplen Untersuchungen repliziert werden konnten und einer konservativen post-hoc Korrektur widerstanden (Howe et al., 2016).

Die zunehmende Erforschung genetischer Risikofaktoren in der Pathogenese von Angststörungen und die Identifizierung neuer Vulnerabilitätsgene könnte die Entwicklung innovativer pharmakotherapeutischer Substanzen in der Behandlung von Angststörungen vorantreiben (Domschke und Deckert, 2012). Das Endocannabinoid- und das Neuropeptid S-System könnten zum Beispiel als Angriffspunkte solcher Behandlungen fungieren (Domschke und Zwanzger, 2008).

Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass für alle Assoziationsbefunde bei Angsterkrankungen auch Berichte über Nicht-Replikation oder die Assoziation zu den gegensätzlichen Allelen gefunden wurden, sodass die meisten Ergebnisse mit einer größeren, besser definierten Probenanzahl neu evaluiert werden sollten (Howe et al., 2016, Maron et al., 2010).

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS), die das komplette Genom unter Verwendung eines hypothesenfreien Ansatzes auf Assoziationen überprüfen, sind eine weitere Möglichkeit, Vulnerabilitätsgene für komplex-genetische Erkrankungen zu identifizieren (Domschke und Deckert, 2012).

So identifizierten Erhardt et al. in einer solchen GWAS das Transmembran-Protein *TMEM132D* als Suszeptibilitätsgen für die Panikstörung. Diese Assoziation wurde durch experimentelle Daten an Mäusen unterstützt, die ebenfalls gezeigt haben, dass Angst-bezogenes Verhalten mit dieser *TMEM132D* Genvariante in Zusammenhang steht. Dies veranlasste Erhardt et al. zu der Annahme, dass hier ein übergeordnetes, evolutionär konserviertes Prinzip vorliegt, da das Suszeptibilitätsgen unabhängig von der Spezies für das phänotypische Verhalten von Angst eine Bedeutung zu haben scheint (Erhardt et al., 2011).

Weitere GWAS-Daten zu Angststörungen, insbesondere der Panikstörung, stammen von Otawa et al., die in ihrer jüngsten Publikation (2016) eine Metaanalyse mit Daten von über 18.000 Probanden, die in neun internationalen Kohorten rekrutiert wurden, vergleichend untersucht haben und Assoziationen mit u.a. dem *CAMKMT* Gen identifizieren konnten (Otowa et al., 2016).

1.2 Untersuchungsgegenstand: Orexin und Orexin-Rezeptor

1.2.1 Orexin

1.2.1.1 Struktur

Orexin (Hypocretin) wurde 1998 fast zeitgleich von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen entdeckt. De Lecea et al. fanden im Januar 1998 ein neues Präprohormon, das sie aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit mit dem gastrointestinalen Peptidhormon „Sekretin“ und seinem Entstehungsort im Hypothalamus Präprohypocretin nannten und die aus ihm entstehenden Neuropeptide als Hypocretin 1 und 2 bezeichneten (de Lecea et al., 1998). Sakurai et al. identifizierten Orexin A und B kurz später als Liganden für G-Protein gekoppelte Rezeptoren in Rattengehirnextrakt und gaben ihnen den Namen Orexin A und B nach dem griechischen Wort Orexis (=Hunger), da die intraventrikuläre Applikation dieser Neuropeptide appetitsteigernd auf Ratten wirkte (Sakurai et al., 1998). In der Literatur gibt es deshalb seither zwei verschiedene Namen für die Neuropeptide Orexin A (Hypocretin 1) und Orexin B (Hypocretin 2).

Das Orexin-Gen, das synonym Hypocretin (HCRT)-Gen genannt wird, liegt auf dem Chromosom 17q21-22 und kodiert für das gemeinsame Vorläufer-Polypeptid der Orexine namens Präproorexin, das aus 131 Aminosäuren besteht. Durch proteolytische Spaltung dessen entstehen daraus Orexin A und B (Sakurai et al., 1998).

Orexin A ist ein 33 Aminosäuren langes Peptid mit zwei Paaren von Disulfidbrückenbindungen. Es hat einen Pyroglutamyl-Rest am N-Terminus und eine Amidierung am C-Terminus (Sakurai et al., 1998). Dem letzten Aminosäure-Rest des reifen Peptids folgt die Aminosäure Glycin 66, die wahrscheinlich als NH₂ Donor für die C-terminale Amidierung wirkt. Dies erfolgt durch die sequenzielle Aktivierung einer Peptidylglycinmonooxygenase sowie einer Peptidylamidoglycolatlyase. Die Primärstruktur des Orexin A zeigt eine Übereinstimmung zwischen Menschen und verschiedenen Tierarten wie Rind, Maus und Ratte. Auch bei Orexin B gibt es einen hohen Grad der Sequenzhomologie zwischen den Arten. Auch hier finden sich beachtenswerte, artenspezifische Varianten. Da Orexin A und Orexin B bei der

Regulation des Appetits bedeutsam sind, sind diese beiden Peptide wahrscheinlich entwicklungsbiologisch hoch konserviert verankert (Sakurai et al., 1998, Shibahara et al., 1999, Alvarez und Sutcliffe, 2002).

1.2.1.2 Physiologische Funktion

Das Orexin-System wird inzwischen mit vielen verschiedenen neurophysiologischen Prozessen assoziiert. Neben ihrer Kontrollfunktion von Schlaf und Erregung, wurden die Orexine zunächst als Regulatoren der Nahrungsaufnahme und des Energiehaushaltes verstanden. Sowohl CRH als auch Neuropeptid Y sind am Effekt des Orexins auf die Nahrungsaufnahme in Ratten beteiligt (Ida et al., 2000). Neurone einer erwachsenen Ratte, die Orexin im lateralen Hypothalamus enthalten, werden durch eine Insulin induzierte Hypoglykämie aktiviert, wie mit Hilfe von c-Fos-Immunreaktivität nachgewiesen werden konnte (Moriguchi et al., 1999).

Neuere Studien zeigen, dass Orexin unter anderem in Emotionen, in die Stressantwort und in das Belohnungssystem involviert ist. Es fördert Wachsamkeit und Erregung (Sakurai, 2007, Sakurai, 2014), womit das orexinerge System auch in adaptiven und pathologischen Angst-Stress-Reaktionen von Bedeutung sein könnte (Suzuki et al., 2005). Einige Studien legen nahe, dass Orexin-Neuronen während des Angsterlebens oder als Reaktion auf Gefahren aktiviert werden (Sakurai, 2014, Sakurai, 2007).

Unterschiedliche Versuche mit Mäusen, bei denen Alterationen im Orexin-System vorlagen, zeigten, dass Orexin für angemessene Erregungslevel bei der Durchführung von zielgerichtetem Verhalten, die einen Überlebensvorteil darstellen, verantwortlich ist (Yamanaka et al., 2003, Akiyama et al., 2004, Mieda et al., 2004). Ein defizientes Orexin-System wurde außerdem als eine Ursache der Narkolepsie entdeckt (Chemelli et al., 1999, Lin et al., 1999, Nishino et al., 2000, Peyron et al., 2000). Narkolepsie ist eine durch ausgeprägte Tagesmüdigkeit, Kataplexie und extrem kurze REM-Schlafphasen gekennzeichnete Störung der Schlaf-Wach-Regulation bei der ein Orexin-Mangel ursächlich mitverantwortlich ist (Mignot, 2001). Hieraus lässt sich ableiten, dass das Orexin-System eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Aufmerksamkeit, Wachheit und Reaktionsbereitschaft spielt und somit auch Grundcharakteristika einer Panikstörung determiniert.

Es zeigte sich im Tiermodell, dass eine Blockierung des Hypocretin-Rezeptor-1 (*HCRTR1*) oder die Stilllegung der Orexin-Synthese zu einer Abschwächung der

Laktat-induzierten Panik führt (Kayaba et al., 2003, Johnson et al., 2010). In einer weiterführenden Studie wurde deshalb gezielt untersucht, ob Panikreaktionen durch Orexin moduliert werden und ob zwei verschiedene Panik-induzierende Substanzen bestimmte Gehirnregionen aktivieren (Johnson et al., 2012). Durch systemische Injektionen der anxiogenen Substanz Beta-Carbolin FG-7142, einem inversen Agonist an der Benzodiazepin-Bindungsstelle des GABA-A-Rezeptors, und Koffein, einem nicht-selektiven, kompetitiven Adenosin-Rezeptor-Antagonist zeigte sich eine Steigerung der c-Fos Induktion im dorsomedialen und perifornikalen Hypothalamus (DMH/PEF), nicht aber im lateralen Hypothalamus. Wurden die Ratten mit dem Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten SB334867 (30mg/kg) vorbehandelt, kam es zu einer Abschwächung der FG-7142-induzierten Angst (Johnson et al., 2012). Insgesamt deutet diese Untersuchung darauf hin, dass in der Region DMH/PEF koordinierte Panikreaktionen durch orexinerge Projektionen ausgelöst werden können und dass Orexin-Rezeptor-1-Antagonisten potentiell eine neue Behandlungsstrategie für die Panikstörung und andere Angststörungen darstellen könnten (Bonaventure et al., 2015). Darüber hinaus zeigen die Daten von Johnson et al., dass die Orexin-Spiegel im Liquor von Patienten mit Panikattacken deutlich höher sind als bei depressiven Vergleichsprobanden ohne Paniksymptomatik (Johnson et al., 2010).

Das Orexin-System scheint schließlich einen sexuellen Dimorphismus aufzuweisen. So ist die Orexin-Konzentration im Hypothalamus geschlechtsspezifisch unterschiedlich hoch: weibliche Ratten zeigen im Vergleich zu ihren männlichen Artgenossen erhöhte Orexin-Konzentrationen (Taheri et al., 1999). Da sich zwar nach einer Gonadektomie bei weiblichen und männlichen Ratten die Expression der Orexin-Rezeptor-mRNA verändert, nicht aber die von Präproorexin, scheint die Bildung von Präproorexin nicht unter direkter Kontrolle der Sexualhormone zu stehen (Johren et al., 2003). Durch sehr hohe Östrogenspiegel kann die Orexin-Freisetzung allerdings herunterreguliert werden. Die Sexualhormone haben offensichtlich einen Einfluss auf die Orexin Sekretion (Russell et al., 2001).

1.2.2 Der Orexin-Rezeptor

1.2.2.1 Struktur und Funktion

Die zellulären Effekte der Orexine werden über zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, den Orexin-1-Rezeptor/Hypocretin-Rezeptor-1 (OX1R, HCRTR1) und

den Orexin-2-Rezeptor/Hypocretin-Rezeptor-2 (OX2R, HCRTR2) vermittelt. HCRTR1 ist ein selektiver Rezeptor für Orexin A, HCRTR2 dagegen ein nicht-selektiver Rezeptor sowohl für Orexin A wie auch für Orexin B (Sakurai et al., 1998). HCRTR1 ist ausschließlich an die G-Protein Subklasse Gq gekoppelt, während HCRTR2 Gi oder Gq gekoppelt sein kann (Zhu et al., 2003). Der Orexin-Rezeptor besitzt sieben transmembranäre Domänen. Die Aminosäure-Sequenzen des HCRTR1 und HCRTR2 stimmen zu 64% überein (Sakurai et al., 1998).

Innerhalb der Klasse von G-Protein gekoppelten Rezeptoren hat HCRTR1 eine ausgeprägte strukturelle Homologie zu bestimmten Neuropeptidrezeptoren, insbesondere Neuropeptidrezeptor Y2 (NPY) (26% Homologie), gefolgt vom Thyreotropin Releasing Hormon-(TRH) Rezeptor (25% Homologie) (Sakurai et al., 1998).

Der für diese Arbeit relevante HCRTR1 ist Gq gekoppelt mit dem Ergebnis einer Aktivierung der Phospholipase C (PLC) mit anschließender Auslösung der Phosphatidylinositol-Kaskade. HCRTR1 stimuliert auch die cAMP-Synthese in einer Zellkultur primärer Rattenastrozyten (Woldan-Tambor et al., 2011).

1.2.2.2 Das HCRTR1-Gen als Kandidatengen bei Panikstörung

Das humane *HCRTR1* ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 in der Region p35.2 lokalisiert (siehe Abb. 1.1).

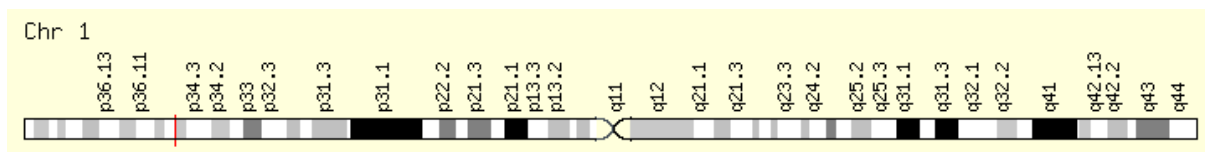


Abb. 1.1: Lokalisation des humanen *HCRTR1* auf Chromosom 1

Bildquelle: Gene Cards (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HCRTR1&keywords=hcrtr1>)

Zusammenfassend stellt sich die genomische Organisation des humanen *HCRTR1* entsprechend Tab. 1.4 dar. Das Startcodon (ATG) beginnt bei Basenpaar-Position 1.508 in Exon 3.

Einleitung

Tab. 1.4: Genomische Organisation des humanen *HCRTR1*-Gens

Genomsequenz nach NC_000001.11 Chromosom 1 Reference GRCh38.p7 Primary Assembly

Die genomische Struktur des humanen *HCRTR1* wurde mit Hilfe der Sequenzdatenbank des National Center for Biotechnology Information NCBI bestimmt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=3061>)

Exons und Introns	Nukleotid-Nummern (GenBank Acc.NC_000001.11)	Länge (bp)
<i>HCRTR1 Exon 1</i>	31617701-31617882	181
<i>HCRTR1 Intron 1</i>	31617883-31618756	873
<i>HCRTR1 Exon 2</i>	31618757-31618817	60
<i>HCRTR1 Intron 2</i>	31618818-31619051	233
<i>HCRTR1 Exon 3</i>	31619052-31619392	340
<i>HCRTR1 Intron 3</i>	31619393-31619532	139
<i>HCRTR1 Exon 4</i>	31619533-31619711	178
<i>HCRTR1 Intron 4</i>	31619712-31620843	1131
<i>HCRTR1 Exon 5</i>	31620844-31621087	243
<i>HCRTR1 Intron 5</i>	31621088-31621477	389
<i>HCRTR1 Exon 6</i>	31621478-31621593	115
<i>HCRTR1 Intron 6</i>	31621594-31623523	1929
<i>HCRTR1 Exon 7</i>	31623524-31623750	226
<i>HCRTR1 Intron 7</i>	31623751-31624997	1246
<i>HCRTR1 Exon 8</i>	31624998-31625119	121
<i>HCRTR1 Intron 8</i>	31625120-31626790	1670
<i>HCRTR1 Exon 9</i>	31626791-31627319	528

1.2.3 **HCRTR1 Isoleucin408Valin-Polymorphismus**

Der Isoleucin408Valin-Polymorphismus (Ile408Val-Polymorphismus) ist ein Einzelnukleotid-Polymorphismus („single nucleotide polymorphism“ (SNP)) mit der SNP-ID rs2271933 an Position 31626924 (Primary Assembly: NC_000001.11 Chromosom 1 reference GRCh38) im Exon 9 des *HCRTR1*-Gens, bei dem eine Cytosinbase durch eine Thyminbase ersetzt ist und der zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin (Ile) zu Valin (Val) führt.

Abb. 1.2 zeigt die genomische Struktur des humanen *HCRTR1* und die Lokalisation des Ile408Val-Polymorphismus.

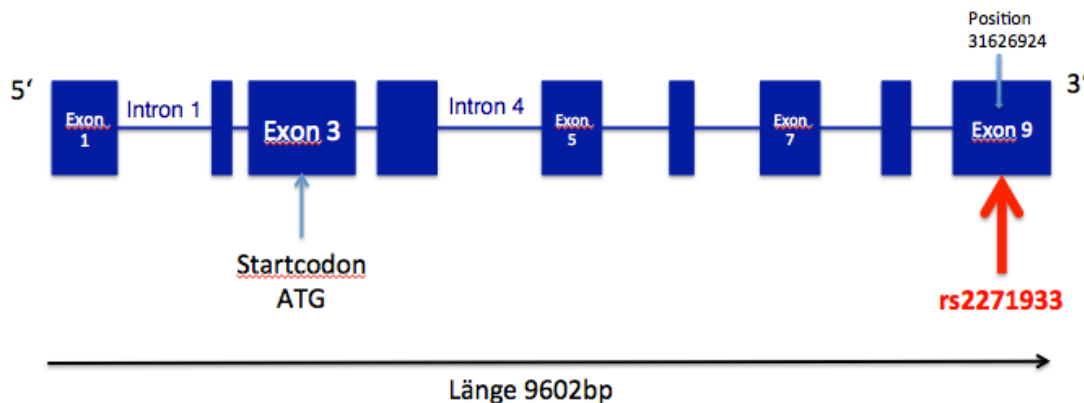


Abb. 1.2: Genomische Struktur des humanen *HCRTR1* und Lokalisation des Ile408Val-Polymorphismus an Position 31626924

Die Abbildung ist nicht maßstabgetreu

Der Polymorphismus wurde erstmals 2005 von Meerabux et al. in einer Kohorte von 83 männlichen und 85 weiblichen schizophrenen Patienten ohne Polydipsie, einer Kohorte von 59 männlichen und 23 weiblichen Patienten mit Polydipsie und Hyponatriämie sowie einer Kontrollgruppe mit 90 gesunden japanischen Probanden im Rahmen einer Assoziationsstudie beschrieben. Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem 408Val-Allel des *HCRTR1*-Gens und der Polydipsie-Hyponatriämie bei japanischen Schizophreniepatienten gefunden (Meerabux et al., 2005). In einer Fall-Kontroll-Studie konnte dieses Ergebnis zwei Jahre später repliziert werden (Fukunaka et al., 2007). Des Weiteren wurde eine Korrelation des Ile408Val-Polymorphismus mit Depression und Migräne ohne Aura festgestellt (Rainero et al., 2011a, Rainero et al.,

2011b). Das Tragen des A-Allels war in beiden Studien mit einem signifikant erhöhten Krankheitsrisiko verbunden.

Durch die Lokalisation des Ile408Val-Polymorphismus am C-terminalen Ende des *HCRTR1-Gens*, an dem im Verhältnis zu den transmembranären Anteilen des Rezeptors eine höhere Variabilität der Schleife gegeben ist, entfaltet der Rezeptor möglicherweise funktionell eine geringere Wirkung (Thompson et al., 2014). Selbst dann, wenn eine Aminosäure außerhalb der Bindungsgrube des Moleküls im C-terminalen Ende liegt, kann dies offensichtlich die Affinität der Bindung des Agonisten beeinflussen (Thompson et al., 2014).

Bei G-Protein gekoppelten Rezeptoren sind nicht nur die primäre Proteinstruktur und Faltung für die Wirkung entscheidend, sondern auch andere Besonderheiten wie zum Beispiel die Glykosylierung oder die Neigung zur Dimerisierung. Im experimentellen Expressionsmodell kam es bei Thompson et al. zu Mono- oder Oligodimerisierungsprozessen. Diese sind jedoch in nativen Zellen bisher nicht gesichert. Thompson et al. beschreiben, dass auch beim HCRTR1 möglicherweise eine Dimerisierung entstehen kann, was wiederum die Halbwertszeit des Rezeptors beeinflussen würde und so zur Veränderung der biologischen Wirkungen führen könnte (Thompson et al., 2014).

Auch die Spezifität des Rezeptors ist eingeschränkt. Dies zeigt sich darin, dass der HCRTR1 auch andere Proteine, wie β -Arrestin und Dynein-Leichtketten-Tctex-Typ 1 binden kann. Die Affinität anderer Agonisten als Orexin A entfalten wahrscheinlich als Partialagonisten eigene, in vivo noch nicht geklärte funktionelle Wirkungen (Milasta et al., 2005).

Röntgen-Struktur-Analysen zur Feststellung der dreidimensionalen Kristallstruktur des HCRTR1 liegen derzeit noch nicht vor, sodass spezifischere Untersuchungen der sterischen Interaktionen von Orexin A und HCRTR1 aktuell noch nicht möglich sind. Für den HCRTR2 wurde 2015 die Kristallstruktur mittels Röntgen-Struktur-Analyse aufgeklärt (Yin et al., 2015), sodass diese molekulare Charakterisierung von Liganden und dem Rezeptor möglicherweise bald zu erwarten ist.

1.2.4 HCRTR1 SNPs bei affektiven Störungen und Angsterkrankungen

Es konnte gezeigt werden, dass der *HCRTR1* Ile408Val-Polymorphismus eine Rolle in der Neurobiologie von affektiven Störungen wie der Depression beim Menschen spielt. Das Auftreten des T-Allels an Stelle eines G-Allels war mit einem signifikant erhöhten Erkrankungsrisiko verbunden (Rainero et al., 2011a). In der Übersichtsarbeit von Nollet und Leman wird allerdings hypothetisiert, dass sowohl die Hypoaktivität als auch die Hyperaktivität der Orexin-Signalwege mit Depressionen in Verbindung gebracht werden (Nollet und Leman, 2013).

Da die Panikstörung durch eine erhöhte physiologische Erregungsbereitschaft charakterisiert ist, ist ein Einfluss des Orexin-Systems auf die Entwicklung der Panikstörung naheliegend. Bisher konnte in diesem Zusammenhang in der einzigen vorliegenden Studie gezeigt werden, dass der *HCRTR2* Valin308Isoleucin-(Val308Iso) Polymorphismus bei Patienten mit Panikstörung signifikant häufiger vorkommt als in der Kontrollgruppe (Annerbrink et al., 2011). Untersucht wurden 211 Patienten, von denen 66% weiblich waren, und 452 Kontrollen, von denen 56% weiblich waren. 83% der Patienten litten an Panikstörung mit und 17% an einer Panikstörung ohne Agoraphobie. 47% hatten außerdem eine andere, nicht spezifizierte, psychiatrische Komorbidität. Das C-Allel war in der Gruppe der Panikpatienten überrepräsentiert (Allelhäufigkeiten gesamt: $p = 0,004$; Genotyphäufigkeiten gesamt: $p = 0,005$). In der geschlechterspezifischen Analyse zeigte sich der signifikante Zusammenhang zwischen dem Iso-Allel des Val308Iso-Polymorphismus und der Panikstörung nur bei den weiblichen Patienten (Allelhäufigkeiten für Patientinnen: $p = 0,002$ und für Patienten: $p = 0,9$; Genotyphäufigkeiten für Patientinnen: $p = 0,0005$ und für Patienten: $p = 0,9$).

Für den Ile408Val-Polymorphismus im *HCRTR1*-Gen konnte in derselben Stichprobe allerdings keine Assoziation mit Panikstörung festgestellt werden (Allelhäufigkeiten: $p = 1,0$; Genotyphäufigkeiten: $p = 1,0$). Eine von den Autoren selbst aufgeführte, wesentliche Limitation dieser Studie besteht allerdings darin, dass innerhalb der Kontrollen die Diagnose einer Panikstörung nicht ausgeschlossen wurde (Annerbrink et al., 2011).

1.3 Fragestellung

Nachdem wie oben (siehe 1.2.1.2) dargestellt dem *HCRTR1* eine Rolle in der Pathophysiologie von Panik zukommen könnte und bislang nur eine molekulargenetische Studie an einer kleinen Stichprobe von Patienten mit Panikstörung vorliegt, deren negativer Assoziationsbefund durchaus auf mangelnde statistische Power zurückzuführen sein kann (Annerbrink et al., 2011), soll in der vorliegenden Dissertation eine mögliche Assoziation des *HCRTR1* Ile408Val-Polymorphismus mit der Diagnose Panikstörung in größeren, gut charakterisierten Stichproben mit Panikstörung erneut untersucht werden. Angesichts der engen Verbindung des Orexin-Systems zu Sexualhormonen und der höheren Prävalenz der Panikstörung bei Frauen wird in der vorliegenden Arbeit besonderes Augenmerk auf einen möglicherweise geschlechtsspezifischen Assoziationsbefund gelegt.

2. Proben, Material & Methoden

2.1 Stichprobenbeschreibung

Das „Discovery Sample“ umfasste 131, an der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie (Dir.: Univ.-Prof. Dr. V. Arolt), Universitätsklinikum Münster, rekrutierte, kaukasische Patienten mit nach DSM-IV (Wittchen et al., 1997) diagnostizierter Panikstörung und setzte sich aus 85 weiblichen und 46 männlichen Probanden zusammen. Die Kontrollgruppe bestand aus 131 hinsichtlich des Geschlechts (Exakter Test nach Fisher $p = 1,000$) und Alters (Student`s-t-Test $p = 0,996$) gematchten, anonymen deutschen Blutspendern. Für eine Übersicht der demographischen Daten siehe Tab. 2.1.

Tab. 2.1: Demographische Daten des „Discovery Samples“

	Männlich (n)	Weiblich (n)	Gesamt (n)	Altersdurchschnitt in Jahren
Kontrollen	46	85	131	35,8 +/- 10,9
Patienten	46	85	131	35,8 +/- 11,1

Patienten mit einer Entwicklungsverzögerung oder neurologischen bzw. neurodegenerativen Erkrankungen, die die Ergebnisse der Studie beeinflussen könnten, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Eine Medikation mit Antidepressiva wurde bei 53/121 (40,5%) Patienten des „Discovery Samples“ eingesetzt. Fehlende Angaben lagen bei 10/121 (7,6%) Patienten vor.

Das „Replication Sample“ aus dem multizentrischen BMBF-geförderten Paniknetz-Projekt „Improving the Treatment of Panic Disorder“ (Gloster et al., 2011) umfasste 292 Patienten deutscher Abstammung mit diagnostizierter Panikstörung. Es setzte sich aus 216 weiblichen und 76 männlichen Probanden zusammen. Es bestanden keine verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den einzelnen Patienten. Patienten und 292 Kontrollen wurden hinsichtlich des Geschlechts (Exakter Test nach Fisher $p = 1,000$) gematcht, während die Patientengruppe signifikant älter war als die Kontrollen ($T = 0,000$, $p < 0,05$). Für eine Übersicht der demographischen Daten siehe Tab. 2.2.

Tab. 2.2: Demographische Daten des „Replication Samples“

	Männlich (n)	Weiblich (n)	Gesamt (n)	Altersdurchschnitt in Jahren
Kontrollen	76	216	292	28,8 +/- 7,4
Patienten	76	216	292	36,0 +/- 10,8

Auch in dieser Stichprobe wurden Patienten mit einer Entwicklungsverzögerung oder neurologischen bzw. neurodegenerativen Erkrankungen von der Studie ausgeschlossen. Die Patienten des „Replication Samples“ erhielten keine Medikation mit Antidepressiva.

Bei allen in dieser Untersuchung eingeschlossenen Patienten wurde die Diagnose von erfahrenen Psychiatern oder Psychologen anhand von Patientenakten und strukturierten klinischen Interviews (SKID-I) gemäß DSM-IV (Wittchen et al., 1997) gestellt. Bei einem Teil der Patienten lagen zusätzliche Komorbiditäten in Form einer Depression oder einer Agoraphobie vor. Die prozentualen Anteile der Komorbiditäten innerhalb des Patientenkollektivs sind in Tab. 2.3 aufgeführt.

Tab. 2.3: Diagnoseschlüssel innerhalb des Patientenkollektivs

Diagnose (DSM-IV-R)	Patienten		
	„Discovery Sample“ (n)		„Replication Sample“ (n)
300.21 (Panikstörung mit Agoraphobie)	Ja	91 (69,5%)	Nicht bekannt
	Nein	40 (30,5%)	
	Fehlend	0	
296.20 (Einzelne depressive Episode, die nicht genauer spezifiziert ist) ODER 296.30 (Rezidivierende Major Depression, die nicht genauer spezifiziert ist)	Ja	47 (43,9%)	Nicht bekannt
	Nein	60 (56,1%)	
	Fehlend	24 von 131	

Von allen Studienteilnehmern wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Die Untersuchung wurde von den Ethikkommissionen der Universitätskliniken Münster und Würzburg geprüft, bewilligt und gemäß den Prinzipien der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Der aktuellen Dissertation standen die epidemiologischen und klinischen Daten der o.g. Stichproben in Form einer SPSS-Datenbank zur Verfügung.

2.2 Experimentelle Untersuchung

Um die Assoziation des *HCRTR1* Ile408Val-Polymorphismus (SNP-ID: rs2271933) mit der Panikstörung zu untersuchen, wurden von der Doktorandin im Labor für Funktionelle Genomik (Ltg.: Univ.-Prof. Dr. Dr. K. Domschke), Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie (Dir.: Univ.-Prof. Dr. J. Deckert), Universitätsklinikum Würzburg, molekulargenetische Methoden angewendet. Nach einem kurzen Überblick über den Ablauf werden in den folgenden Abschnitten die Untersuchungsabläufe detailliert beschrieben (Gottschalk et al., 2019). Die verwendeten Materialien und Geräte finden sich in Kapitel 2.4.

Die DNA lag für die aktuelle Dissertation bereits aus EDTA-Blut extrahiert vor. Ein DNA-Abschnitt (Amplikon) innerhalb von *HCRTR1*, der den zu untersuchenden SNP enthält, wurde durch Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-chain-reaction, PCR) unter Verwendung von Oligonukleotid-Primern, die sich komplementär an einen der beiden DNA-Stränge anlagern, vervielfältigt. Die Primer dienen der Eingrenzung der beidseitig an den Polymorphismus angrenzenden Bereiche und definieren daher die Länge des Amplikons. Anschließend wurde eine Restriktionsanalyse des Polymorphismus mit einer geeigneten Endonuklease durchgeführt (restriction fragment length polymorphism, RFLP). Die durch PCR vervielfachten Kopien der DNA-Sequenz wurden hierbei abhängig von dem jeweils vorliegenden *HCRTR1* rs2271933 Allel in Fragmente unterschiedlicher Länge geschnitten. Die geschnittenen RFLP-Produkte wurden zur optischen Auswertung auf Agarose-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend dokumentiert. Abschließend wurden die ermittelten Ergebnisse statistisch ausgewertet.

2.2.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus Vollblut basiert auf dem Prinzip der Kältehämolysen der Erythrozyten und anschließender Salzfällung der DNA aus Leukozyten (Miller et al., 1988).

Die Erythrozyten waren durch hypotonische Behandlung lysiert und die Leukozyten durch Zentrifugation abgetrennt worden. Die Lyse der kernhaltigen Zellen war durch Behandlung mit einem Detergens (Natriumdodecylsulfat, engl: sodium dodecyl sulfate = SDS) erfolgt. Für die Proteindegradation wurde eine Protease Mixtur angewendet (Pronase E). Peptide und andere Zellbestandteile wurden durch Erhöhung der Salzkonzentration ausgefällt und abzentrifugiert. Die DNA wurde aus dem wässrigen Überstand mit Isopropanol präzipitiert.

2.2.2 Verdünnung der Mikrotiterplatten

Die extrahierte DNA wurde zur Vorbereitung der PCR in 500 µl TE- Puffer resuspendiert, dann 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt und in 96-Well-Mikrotiterplatten, sogenannte Mutterplatten, verteilt. Um die Mutterplatten im Laufe der Experimente nicht zu verunreinigen, wurden aus diesen Mutterplatten 100 µl DNA für die Tochterplatten entnommen und in einem Verhältnis von 1:10 mit 900 µl destilliertem Wasser verdünnt. Die Tochterplatten wurden mit Klebefolie Microseal® verschlossen und bis zur Verwendung im Rahmen der PCR im Kühlschrank aufbewahrt. Für jede PCR- Platte wurden insg. 100 µl (96 µl + 4 µl als Ausgleich für mögliche Pipettierfehler) also 1 µl Lösung der Tochterplatte pro Well verwendet.

2.2.3 Herstellung des Agarosegels

Für die Herstellung eines 4% Agarosegels wurden 2 g Agarosepulver mit 50 ml TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer vermischt und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Abkühlung auf ca. 50°C auf der Rührplatte, wurde unter ständigem Rühren 1 Tropfen Ethidiumbromid/50 ml Gel hinzugegeben. Anschließend wurde die Lösung in eine Gelkammer gegossen, in der Kunststoffkämme für die Bildung von Taschen sorgen. Nach Aushärtung des Gels wurden die Kämme entfernt und das Gel wurde entweder im Kühlschrank bei 4°C gelagert oder sofort verwendet (siehe 2.2.4.3 und 2.2.5).

2.2.4 Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine Technik, mit der eine bestimmte genomische Sequenz, die sich zwischen zwei Oligonukleotid-Primern befindet, mit Hilfe einer DNA-Polymerase *in vitro* amplifiziert werden kann (Saiki et al., 1988). Unter Zugabe von spezifischen Oligonukleotid-Primern, Desoxyribonukleotiden (dNTP), Puffer und DNA-Polymerase wird die DNA-Matrize in einer Primerverlängerungsreaktion von 35 Zyklen amplifiziert. Bei jeder PCR werden zwei verschiedene Primer verwendet, ein *forward*- und ein *reverse*-Primer, um das Ablesen beider DNA-Stränge zu gewährleisten.

2.2.4.1 Primer-Konstruktion

Primer grenzen die zu vervielfältigende DNA-Region von beiden Seiten ein und stellen freie 3'-OH-Gruppen zur Verfügung, die von der DNA-Polymerase für die DNA-Synthese (in 5'-3'-Richtung) benötigt werden. Um eine möglichst hohe Spezifität der Primer sicher zu stellen, muss auf deren Länge, Schmelztemperatur (T_m -Wert), Beschaffenheit der 3'-Enden, Primer-/Primer-Wechselwirkungen und insbesondere die Nukleotidzusammensetzung bzw. -verteilung geachtet werden. Ein Primer sollte weder stabile Sekundärstrukturen noch Dimere bilden können. Daher sollten Komplementaritäten innerhalb eines Primers und zwischen den Primern vermieden werden (Schmidt und Rothhämel, 2012).

Die Primer (siehe Tab. 2.4) wurden mit Hilfe des im Internet frei zur Verfügung stehenden Computer-assistierte Primersuchprogramm NCBI/Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ausgewählt, kommerziell synthetisiert (Metabion international AG, Planegg, Deutschland) und für die Verwendung in der Polymerase-Ketten-Reaktion mit H₂O auf eine Konzentration von 10 pmol/μl verdünnt.

Tab. 2.4: Für die Untersuchung des *HCRTR1*-Gens verwendete Primer

Primerpaar	Primersequenz (5`-3`)	Basenpaarlänge
<i>Primer F</i> (forward)	CCA GAG TCA CAC AGG CAG AAA	21
<i>Primer R</i> (reverse)	CCT GCT GCA TCT GTC TCC TTA T	22

Es erfolgte der Ansatz eines sog. Mastermixes aus Primern, Oligonukleotiden, geeigneten Puffern und eisgekühlter Taq-Polymerase in der 100fachen Menge, welcher in Portionen von je 24 μl auf eine neue 96-Well-Mikrotiterplatte mit je 1 μl DNA verteilt wurde (siehe Tab. 2.5).

Tab. 2.5: Zusammensetzung des PCR-Mastermix

Reagenzien des PCR-Mastermixes	Menge (Konzentration)
H ₂ O	17,2 µl
10x Puffer Goldstar	2,5 µl (Bestehend aus: - 750 µl Tris-HCl (pH 9) - 200 µl (NH ₄) ₂ SO ₄ - 10 µl TWEEN 20 - 40 µl H ₂ O)
MgCl ₂	1 µl (25 mM)
<i>Primer F</i> (1:10) <i>Primer R</i> (1:10)	1 µl (10 pmol) 1 µl (10 pmol)
dNTP	1 µl (2,5 mM)
HouseTaq	0,3 µl
Gesamtmenge	24,0 µl (+1µl DNA in SE Puffer für einen kompletten PCR-Ansatz von 25,0 µl)

2.2.4.2 Ablauf der PCR

Mit Hilfe eines Thermocyclers wurden mehrere automatisierte Arbeitsschritte nacheinander ausgeführt:

1. **Denaturierung:** Durch Erhitzung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) auf 95°C für 5 Minuten entstehen zwei Einzelstränge.
2. **Primerhybridisierung:** In 35 Zyklen a 45 Sekunden bei jeweils 95°C wird die Helix weiter aufgetrennt.
3. An das 3'-Ende der nun einzelsträngig vorliegenden DNA werden bei optimaler Anlagerungstemperatur (60,2°C) in 35 Zyklen a 45 Sekunden passend gewählte synthetische Oligonukleotid-Primer angelagert.
4. **Polymerase-Bindung und DNA-Synthese:** Anschließend wird die Temperatur

auf 72°C erhöht. Die Taq-Polymerase lagert bei weiteren 35 Zyklen a 45 Sekunden dNTPs ausgehend von den Primern in 5'-3'-Richtung passend an den komplementären Strang an. In weiteren 3 Minuten wird der Doppelstrang bei 72°C abschließend ergänzt. Die verwendeten hitzestabilen Polymerasen stammen aus Mikroorganismen, deren natürlicher Lebensraum sich in heißen Quellen befindet. Die häufig verwendete Taq-Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, ist bis zu 94°C hitzestabil und hat eine optimale Arbeitstemperatur bei 80°C (Strachan und Read, 2011).

5. **Kühlung bis zur Weiterverwendung** bei 10°C.
6. **Erneute Denaturierung:** Werden diese beiden neu gewonnenen Doppelstränge wieder bei 95°C denaturiert, sodass nachfolgend die Primer erneut an die aufgetrennten Einzelstränge binden können (siehe Schritt 2), beginnt ein neuer Zyklus. Mit fortlaufender Zyklenanzahl können gewünschte DNA-Fragmente exponentiell vermehrt werden, da jeder weitere Zyklus die vorliegende Menge an Kopien verdoppelt. Am Ende aller PCR-Zyklen liegt der durch die Primer eingegrenzte genomische DNA-Abschnitt in millionenfacher Kopie vor.

2.2.4.3 Kontrolle der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese

Die Überprüfung einer PCR-Reaktion auf erfolgreiche Amplifikation bzw. der Ausschluss von Verunreinigung mit Fremd-DNA geschieht durch eine Gelelektrophorese. Eine detaillierte Erklärung dieser Methode findet sich unter 2.2.5.

TAE diene als Laufpuffer für die Elektrophorese. Die Agarosekonzentration im Gel von 4% wurde entsprechend der erwarteten Fragmentgrößen gewählt. Je kleiner die aufzutrennenden Fragmente sind, desto höher sollte die Agarosekonzentration sein, da dann die Poren im Gel entsprechend kleiner sind.

2.2.4.4 Prinzip und Ablauf der Restriktion

Das Restriktionsenzym BsmBI (siehe Steckbrief unter Abb. 2.1) und der mitgelieferte Puffer (NEBuffer™ 3.1, bestehend aus 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCL, 10 mM MgCl₂, 100 µl/ml BSA; pH 7,9 bei 25°C) wurden zusammen in Mikrotiterplatten inkubiert und mit destilliertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Zu den 10 µl des Restriktionsendonuklease-Mastermix wurden jeweils 7 µl des PCR-Produktes

pipettiert. Anschließend wurde die Platte für 2 h bei 55°C im Brutschrank inkubiert. Die entstandenen Restriktionsfragmente konnten dann mit Hilfe der Gelelektrophorese identifiziert werden. Dazu wurden 7 µl eines Gemisches aus 15 µl des inkubierten Restriktionsansatzes und 6 µl des Bromphenolblau-Ladepuffer auf einem 4% Agarosegel (Herstellung siehe 2.2.3) bei 120 V über 30 min in gleicher Weise wie bei der Durchführung der PCR-Gelelektrophorese (siehe 2.2.5) aufgetrennt (Laufpuffer: TAE und 100 bp Leiter).

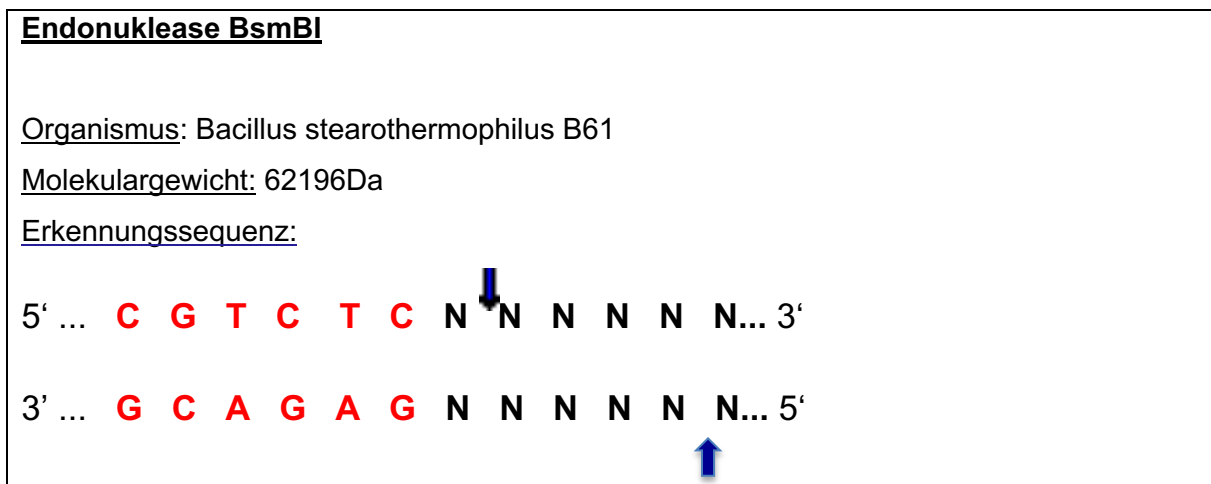


Abb. 2.1: Steckbrief und Zielsequenz der Restriktions-Endonuklease BsmBI
Standardabkürzungen des Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB) um zu zeigen, dass N jedes Nukleotid repräsentieren kann (Roberts und Macelis, 2011, Roberts et al., 2015)

Tab. 2.6: Restriktion zur Untersuchung des *HCRTR1*- rs2271933 -Polymorphismus

Reagenzien	Menge
BsmBI	0,3 µl
NEBuffer 3.1	2,0 µl
H ₂ O	10,7 µl
Gesamtmenge Enzym-Mix	13,0 µl
Gesamtmenge Enzym-Mix einschließlich 7,0 µl PCR-Produkt	20,0 µl

Das Enzym BsmBI wurde so gewählt, dass der untersuchte exonische *HCRTR1* rs2271933 Polymorphismus in der Erkennungssequenz des Restriktionsenzymes liegt (siehe Abb. 2.2).

```
CCAGAGTCACACAGGCAGAAA CCCAGGACTGAAGCCACAGCCTTTCACCCACATCCAGCTGTCT
TTCCATGAGGGGTAGGGGCAGATCCCCCGAGCCGGAGCCTCCAGGGCAGCCCTCGCTCAGG
GCAGCACTGTGGTGACGCTGGTGAGCACCACATGCTCAGAGATTTTG GAGA[C/T]G GAGCATC
GGCTCTGCAAGGACAAGGACTTGTGGCTGGCAGAGGAGCGGGGACTAGGGGCCTTCAGAGA
GCCGCAGGGACCCAGGCCAGGCAGGCAGCAGGAGAAGGCAGCCTTAAACTGCTCCCGGAAT
TTGCCTTGTTGGGAGACAAAAGACACAGCCATAAGGAGACAGATGCAGCAGG
```

Abb. 2.2: Sequenzausschnitt aus dem *HCRTR1*-Gen (Amplikon) (5'-3'-Richtung)

Gelbe Markierung = Primer F/R

Rote Markierung = Erkennungssequenz von BsmBI

[C/T] = Y: Ile408Val-Polymorphismus (nach IUPAC Nomenclature)

Länge des PCR-Produktes ungeschnitten: 359 bp; Größe der Einzelfragmente nach Restriktion: C/C = 359 bp und T/T = 195 bp + 164 bp und C/T = 359 bp + 195 bp + 164 bp

Modifiziert nach Acc.No: NC_000001.11 Chromosom 1 Reference
GRCh38.p7 Primary Assembly

2.2.5 Die Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist die Methode der Wahl, um die durch PCR amplifizierten und anschließend durch BsmBI geschnittenen DNA-Abschnitte optisch darzustellen (siehe Abb. 2.3).

Die Auftrennung der DNA-Fragmente gemäß ihrer Größe erfolgte mit Hilfe eines elektrischen Feldes. Da DNA negativ geladen ist, wandern die Moleküle von der Kathode zur Anode, wobei die zurückgelegte Laufstrecke umgekehrt proportional zur Molekülgröße des Amplikons ist (Aaij und Borst, 1972). Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und ermöglicht so die Detektion der Fragmente mit UV-Licht und die Darstellung spezifischer Banden oder möglicher Verunreinigungen (Sharp et al., 1973). Um die Größe des Amplikons festzustellen, wurde parallel zu den Proben ein

100-Basenpaarleiter als Größenmarker auf das Gel aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 120 V angelegt und eine Laufdauer von 30 min gewählt.

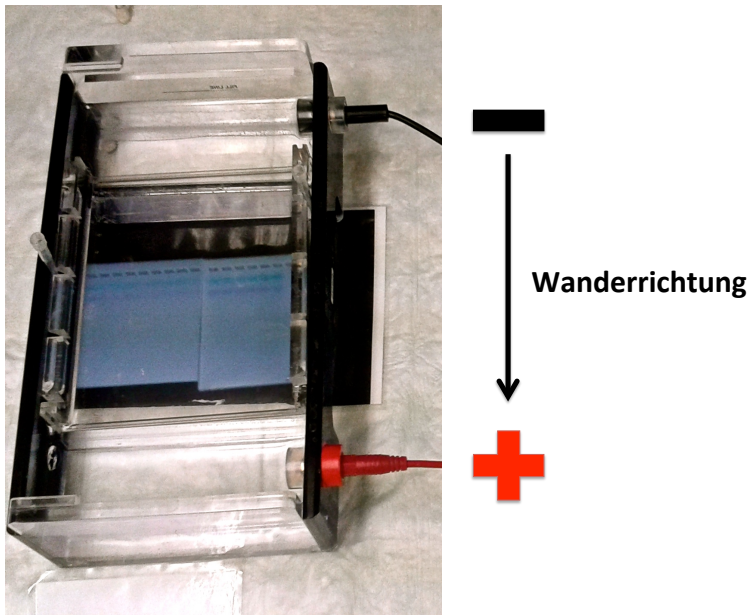


Abb. 2.3: Elektrophoresekammer mit Gel

2.2.6 Dokumentation

Unmittelbar nach erfolgter Gelelektrophorese wurde das mit Ethidiumbromid versetzte Gel in dem molekularen Bildwandler „ChemiDoc XRS“ von Bio-Rad platziert. Die Banden leuchten unter UV-Licht deutlich sichtbar auf, wobei die parallel mitgelaufene DNA-Leiter (100 bp-Marker) das Ablesen der Fragmentgrößen ermöglicht.

Abb. 2.4 stellt die Ergebnisse der Restriktion optisch dar: Homozygotie für das T-Allel (TT-Genotyp) (Stelle 3, 4) bei 195 bp + 164 bp, Homozygotie für das C-Allel (CC-Genotyp) (Stelle 7) bei 359 bp, heterozygoter C/T Genotyp (Stelle 1, 2, 5, 6, 8 und 9) sowie ein 100 bp-Marker.

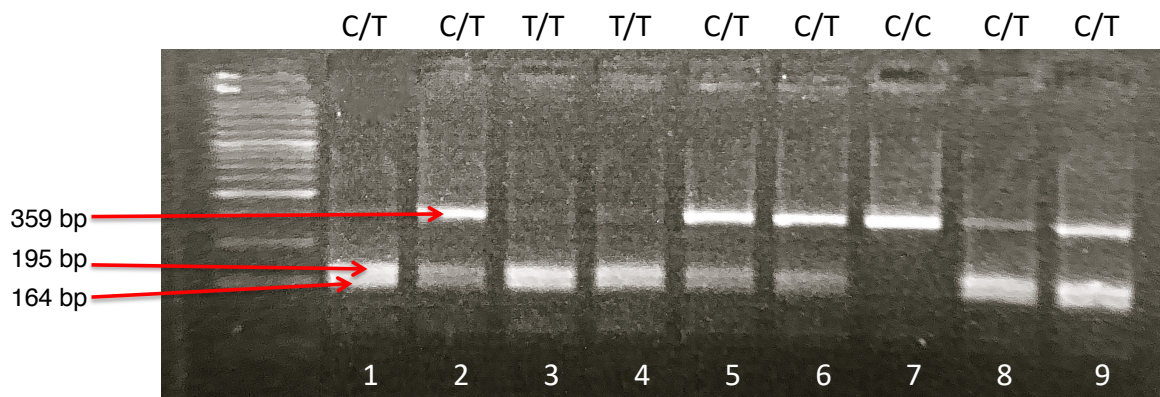


Abb. 2.4: Optische Darstellung der Ergebnisse einer Restriktion für den *HCRTR1* Ile408Val-Polymorphismus

2.3 Statistische Methoden

Zum Beleg, dass die Genotyp-Verteilung in den untersuchten Stichproben nicht von der erwarteten Verteilung in der Gesamtpopulation abweicht, wurde zunächst das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht der Genotyp-Verteilung in Patienten- und Kontrollstichprobe mit Hilfe des im Internet frei verfügbaren Programms „DeFinetti“ (<https://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) geprüft.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Chi-Quadrat-Tests und des exakten Tests nach Fischer unter Verwendung von SPSS-System 23.0 (Statistical Package for the Social Sciences, IBM, New York). Es wurden die jeweiligen Genotyp- und Allelfrequenzen des Patientenkollektivs mit den Daten der Kontrollgruppe in Kontingenztafeln verglichen und auf Homogenität überprüft. Ein p -Wert von unter 0,05 wurde als signifikant angesehen.

2.4 Material

2.4.1 Primer

Oligonukleotid Bezeichnung	Hersteller
<i>HCRTTR1-F</i>	Metabion international AG, Planegg, Deutschland
<i>HCRTTR1-R</i>	Metabion international AG

2.4.2 Enzyme

Enzym Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Taq</i> -Polymerase „House“	Eigenes Labor
BsmBI	New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland

2.4.3 Reagenzien und Puffer

Bezeichnung	Hersteller
TE-Puffer 1x pH 8,0	Applichem, Darmstadt, Deutschland
NEBuffer 3.1:	New England BioLabs
<ul style="list-style-type: none">• 100 mM NaCl• 50 mM Tris-HCl• 10 mM MgCl₂• 100 µg/ml BSA• pH 7.9, 25°C	
100 bp-Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bromphenolblau-Xylene Cyanole	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol	Applichem, Darmstadt, Deutschland
NaCl	Applichem
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem

Proben, Material & Methoden

Agarosepulver pecGold Universal	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ethidiumbromid	Appllichem
Dimethylsulfoxid (DSMO)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
dNTP	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Ammoniumchlorid (NH ₄ CL)	Appllichem
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Appllichem
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Appllichem
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Appllichem
Tris HCL (Trizma [®] hydrochloride)	Sigma Aldrich
TWEEN 20	Sigma Aldrich
Sodiumdodicylsulfat (SDS)	Appllichem
2-Propanol (= Isopropylalkohol oder Isopropanol)	Appllichem
H ₂ O doppelt destilliert	Li Chrosolv [®] Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	J.T. Baker [®] , Deventer, Niederlande
Pronase E	Appllichem
MgCl ₂	Quiagen, Niederlande
Glycerol	Appllichem

2.4.4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Mikrotiterplatten	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Verschlussfolie Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Adhesive PCR Film	Thermo Fisher Scientific
Aluminium Sealing Film Platemax [®] , PCR-AS-600	Axygen, Union City, CA, USA
Pipettenspitzen mit Filter (0,5 – 20 µl, 20 – 100 µl, 100 -1200 µl): Safeseals-Tips [®] professional	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Proben, Material & Methoden

Pipettenspitzen mit Filter (0,5 - 20 µl, 20 - 100 µl, 100 -1200 µl)	Sarstedt
Reaktionstube Safe-Lock Tube (1,5 ml; 2 ml, 5 ml)	Sarstedt
Cellstar Tubes, 50 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Handschuhe Sensicare Care Ice®	MEDLINE International GmbH, Deutschland

2.4.5 Zusammensetzung und Vorbereitung der Reagenzien

Tab. 2.7: Zur DNA-Extraktion verwendete Puffer und ihre Herstellung

Zur DNA-Extraktion verwendete Puffer	Konzentration der Reagenzien	Menge der verwendeten Reagenzien
Lysispuffer	155 mM NH ₄ Cl	155 ml von 1 M
	10 mM KHCO ₃	10 ml von 1 M (4°C Lagerung)
	0,1 mM EDTA	200 µl von 0,5 M (pH 8,0) mit dest. H ₂ O auf 1000 ml auffüllen Bei Bedarf pH-Einstellung mit 15% HCl
SE-Puffer	NaCl	4,383 g (5x = 21,92 g)
	0,5 M EDTA-Lösung	50 ml pH 8,0
	dest. H ₂ O	Auf 1000 ml auffüllen

Proben, Material & Methoden

Tab. 2.8: Sonstige zur DNA-Extraktion verwendete Reagenzien

Sonstige zur DNA-Extraktion verwendete Reagenzien	Konzentration der Reagenzien	Menge der verwendeten Reagenzien
EDTA-Lsg. pH 8,0	0,5 M	500 ml
Sodiumdodocylsulfat (SDS)	20%	250 µl
2-Propanol	99,5%	7,5 ml
Ethanol	70%	4 ml

Tab. 2.9: Vorbereitung der Primer gemäß Herstellerangaben

Vorbereitung der Primer (entsprechend Herstellerangaben)	
Primer-Verdünnung 1:10	100 µl <i>stock</i> -Lösung mit 900 µl ddH ₂ O versetzen, Lösung wird im Kühlschrank bei 4°C gelagert

Tab. 2.10: Zusammensetzung des PCR-Puffer Goldstar 10x

Reagenz	Menge
Tris-HCl (pH 9)	750 µl
(NH ₄) ₂ SO ₄	200 µl
TWEEN 20	10 µl
H ₂ O	40 µl

Tab. 2.11: Zusammensetzung des TAE-Puffers (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer) zur Herstellung der Gele und Füllung der Elektrophorese-Kammer

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

2.4.6 Geräte

Bezeichnung	Modell-Spezifikation	Hersteller
Thermocycler	T Professional Basis 0700-000	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	Kleine Zentrifuge	Labnet International Inc., Korea
	Rotanta 460R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
	Centrifuge 5430	Eppendorf GmbH
Magnetrührfisch		A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Vortex-Mixer	Microspin FV-2400	Lab4you, Schmidt Laborgeräte und Umweltsimulationen, Wien, Österreich
Pipetten	Research plus 1 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl	Eppendorf GmbH
Multistepper	Multipipette plus	Eppendorf GmbH

Proben, Material & Methoden

Mikrowelle	R-239	Sharp
Gelelektrophorese-Kammer	Model 40-1214	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Präzisionswaage	PM 300	Mettler, Columbus, Ohio, USA
Brutschrank	Thermo Scientific	Hareus, Hanau, Deutschland
Multipipette	Finnpipette	Thermo Fisher Scientific
Reagenzgläser	100 ml, 250 ml, 500 ml,	Schott, Mainz, Deutschland
Digitalkamera	Lumix Leica	Panasonic, Kadoma, Japan

2.4.7 Software

Bezeichnung	Hersteller
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation®, Redmond, Washington, WA, USA
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation®
EndNote X7	Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA
ChemiDoc XRS System	Bio-Rad, München, Deutschland
Software Quantity One 4.6.9	Bio-Rad
SPSS Statistics Version 23	IBM, New York, USA

3. ERGEBNISSE

3.1 „Discovery Sample“

3.1.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts für die Genotypenverteilung des *HCRTR1* Ile408Val-Polymorphismus im „Discovery Sample“ ergab, dass die *p*-Werte weder für die Patienten- ($p = 0,826$) noch für die Kontrollgruppe ($p = 0,220$) signifikant waren. Die Stichproben waren damit für eine nachfolgende Assoziationsanalyse geeignet.

3.1.2 Assoziationsanalyse

Es wurden insgesamt 262 Proben untersucht, von denen eine aufgrund von technischen Schwierigkeiten ausfiel (Drop-Out = 0,48%). Die Genotypenverteilung in der Patienten- bzw. Kontrollgruppe ist Tab. 3.1 zu entnehmen. Der Chi-Quadrat-Test über alle drei Genotypen ergab mit einem $p = 0,070$ einen Trend für eine ungleiche Verteilung zwischen beiden Gruppen. Eine gruppierte Betrachtung für einen dominanten Effekt des T-Allels (CC vs. CT/TT) zeigte eine signifikante Assoziation ($p = 0,021$) der CT und TT Genotypen mit Panikstörung. Eine gruppierte Betrachtung für einen rezessiven Effekt des T-Allels (CC/CT vs. TT) zeigte keine Assoziation ($p = 0,330$) (Tab. 3.1. und Abb. 3.2).

ERGEBNISSE

Tab. 3.1: *HCRT1*-Ile408Val-Genotypenverteilung im „Discovery Sample“

df = degree of freedom; drop-out = Zahl der Studienabbrecher, die vorzeitig aus der Studie ausgeschieden sind

„Discovery Sample“	C/C	C/T	T/T	Gesamt (n)	Drop out	Chi-Quadrat Test-Statistik und p-Werte
Kontrollen	54 (41,2%)	55 (41,9%)	22 (16,7%)	131	0%	CC vs. CT vs. TT: $\chi^2 = 5,316$; $p = 0,070$; $df = 2$
Panikpatienten	36 (27,6%)	66 (50,3%)	28 (21,5%)	130	0,8%	CC vs. CT/TT $\chi^2 = 5,286$; $p = 0,021$; $df = 1$
Total	90	121	50	261	0,4%	CC/CT vs. TT $\chi^2 = 0,948$; $p = 0,330$; $df = 1$

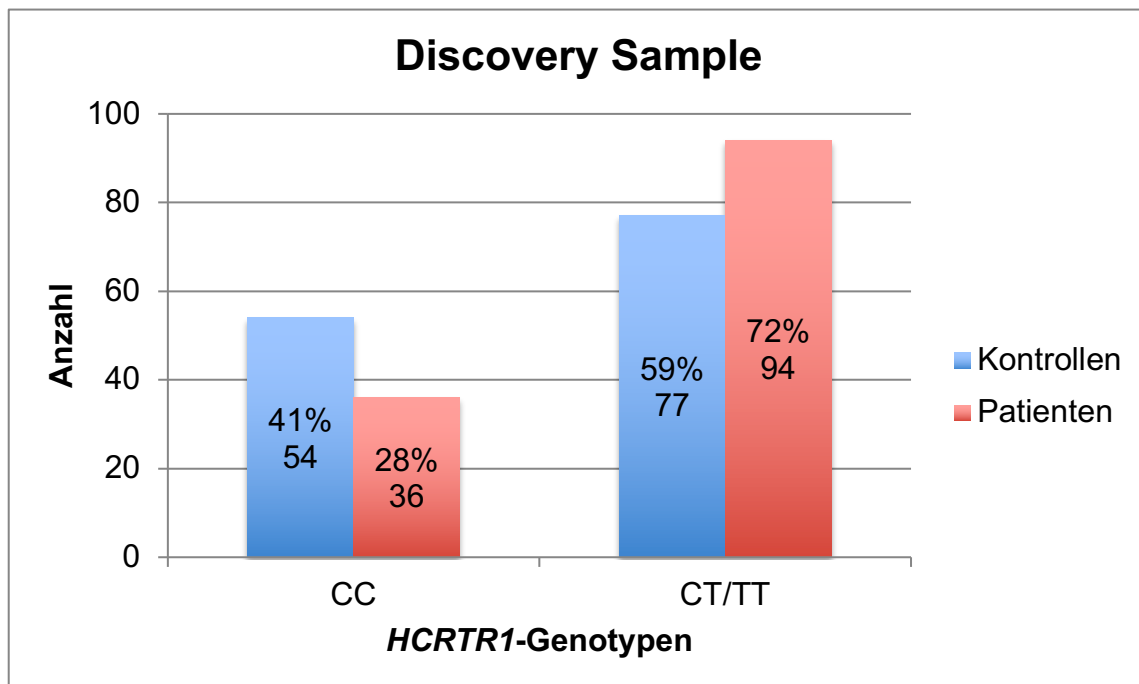


Abb. 3.1: Verteilung der Genotypen unter Annahme eines dominanten Effekts des T-Allels (CC vs. CT/TT) im Discovery Sample

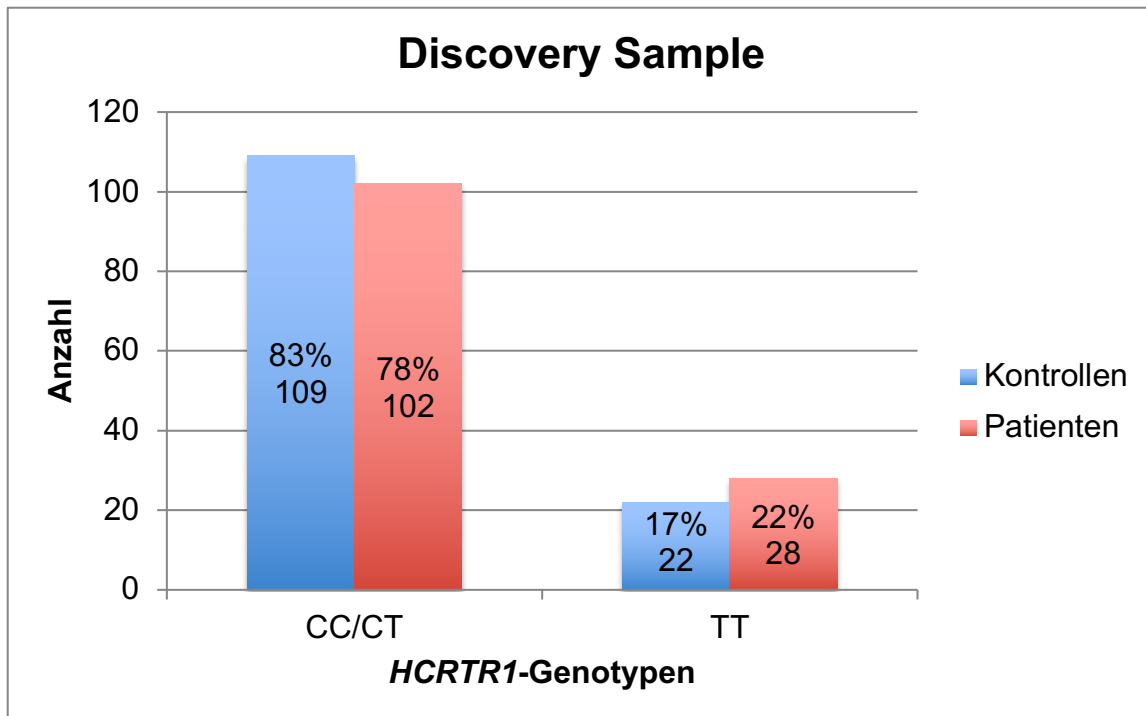


Abb. 3.2: Verteilung der Genotypen unter Annahme eines rezessiven Effekts des T-Allels (CC/CT vs. TT) im Discovery Sample

Bei der vergleichenden statistischen Analyse der Allelverteilung (Patienten: C-Allel: 138, T-Allel: 122; Kontrolle: C-Allel: 163, T-Allel: 99) zeigte sich ebenfalls eine signifikante Überrepräsentation des T-Allels bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen ($X^2 = 5,286$; $p = 0,021$, $df = 1$).

3.1.3 Unabhängigkeit der Assoziation von der Komorbidität Depression

Es wurde zusätzlich überprüft, ob das vermehrte Auftreten des T-Allels bei den Panikpatienten unabhängig von einer komorbiden Depressionsdiagnose war. Es wurden insgesamt 131 Fälle untersucht, von denen 25 Fälle aufgrund von fehlenden Daten nicht berücksichtigt werden konnten (Drop-Out = 19,1%).

Der Chi-Quadrat-Test zeigte keine Signifikanz ($X^2 = 0,107$; $p = 0,744$; $df = 1$), es konnte somit bestätigt werden, dass der Effekt unabhängig von der Komorbidität Depression ist (Tab. 3.2).

ERGEBNISSE

Tab. 3.2: Komorbidität Depression im „Discovery Sample“ in Abhängigkeit des *HCRT1*-Polymorphismus

Komorbidität Depression		Depression		Gesamt (n)	Chi-Quadrat Test- Statistik und <i>p</i> -Werte
		nein	ja		
<i>HCRT1</i> CC vs. CT/TT	CC	14 (53,8%)	12 (46,1%)	26	$\chi^2 = 0,107$ $p = 0,744$ $df = 1$
	CT/TT	46 (57,5%)	34 (42,5%)	80	
Total		60	46	106	

3.1.4 Geschlechtsspezifische Analysen

Es wurden 92 Männer des „Discovery Samples“ untersucht (Drop-Out = 0%). Der Unterschied in der gruppierten Genotypenverteilung zwischen den männlichen Patienten ($n = 46$) und männlichen Kontrollen ($n = 46$) war nicht signifikant ($\chi^2 = 1,643$; $p = 0,200$; $df = 1$).

Bei den Frauen des „Discovery Samples“ wurden insgesamt 169 Frauen (Patientinnen $n = 84$; Kontrollen $n = 85$) untersucht, ein Fall (Patientin) fiel aus (Drop-Out = 0,6%). Es zeigte sich ein Trend zu einem Unterschied in der Verteilung der Genotypen zwischen Patientinnen und Kontrollen unter Annahme eines dominanten Effekts des T-Allels ($\chi^2 = 3,713$; $p = 0,054$; $df = 1$). Die Panikpatientinnen zeigten tendenziell mehr CT- und TT-Genotypen als die Kontrollen (Tab. 3.3).

ERGEBNISSE

Tab. 3.3: Geschlechtsspezifische Analysen des „Discovery Samples“

Männer des „Discovery Samples“	C/C	C/T	T/T	Gesamt (n)	Drop out	Chi-Quadrat Test-Statistik und p -Werte
Kontrollen	21 (45,7%)	25 (54,3%)		46	0%	CC vs. CT/TT: $\chi^2 = 1,643$ $p = 0,200$ $df = 1$
Patienten	15 (32,6%)	31 (67,4%)		46	0%	
Total	36	56		92	0%	
Frauen des „Discovery Samples“	C/C	C/T	T/T	Gesamt (n)	Drop out	Chi-Quadrat Test-Statistik und p -Werte
Kontrollen	33 (38,8%)	52 (61,2%)		85	0%	CC vs. CT/TT: $\chi^2 = 3,713$ $p = 0,054$ $df = 1$
Patienten	21 (25,0%)	63 (75,0%)		84	1,2%	
Total	54	115		169	0,6%	

Auch in der vergleichenden statistischen Analyse der Allelverteilung war ein Trend für eine Überrepräsentanz des T-Allels in der Subgruppe der Frauen des „Discovery Samples“ zu beobachten ($p = 0,054$; $df = 1$).

3.2 „Replication Sample“

3.2.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Berechnung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts für die Genotypenverteilung des *HCRTR1* Ile408Val-Polymorphismus ergab keine signifikanten p -Werte, weder für die Patienten- ($p = 0,078$) noch für die Kontrollgruppe ($p = 0,400$), sodass keine Verletzung des Hardy-Weinberg-Gleichgewichtes vorlag.

3.2.2 Assoziationsanalyse

Aufgrund von fehlendem Material für die DNA-Analyse konnten von der ursprünglichen Stichprobe mit 292 Patienten und 292 Kontrollen 4 Kontrollen und 54 Patienten nicht

ERGEBNISSE

berücksichtigt werden. Es wurden insgesamt 526 Fälle untersucht, von denen wiederum ein Patient ausfiel (Drop-Out insgesamt = 10,1%). Der Vergleich der Genotypen- und Allelverteilungen im „Replication Sample“ zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe (Tab. 3.4) (Genotypenverteilung: $X^2 = 8,178$; $p = 0,017$; $df = 2$ und Allelverteilung: $X^2 = 8,337$; $p = 0,005$; $df = 1$).

Tab. 3.4: *HCRTR1*-Ile408Val-Genotypen- und Allelverteilung im “Replication Sample”

„Replication Sample“	C/C	C/T	T/T	Ge-samt (n)	Drop out	Chi-Quadrat Test-Statistik und p -Werte
Kontrollen	114 (39,6%)	129 (44,8%)	45 (15,6%)	288	1,4%	CC vs. CT vs. TT: $X^2 = 8,178$; $p = 0,017$; $df = 2$
Panikpatienten	74 (31,1%)	105 (44,1%)	59 (24,8%)	238	18,5%	CC/CT vs. TT: $X^2 = 6,900$; $p = 0,009$; $df = 1$
Total	188	234	104	526	10,1%	CC vs. CT/TT: $X^2 = 4,091$; $p = 0,043$; $df = 1$

Der Anteil der homozygoten CC-Allel-Träger war in der Kontrollgruppe mit 40% signifikant höher als in der Patientengruppe mit 31% (Annahme eines dominanten Effekts des T-Allels, CC/CT vs. TT: $X^2 = 4,091$; $p = 0,043$; $df = 1$). Homozygote TT-Allel-Träger kamen in der Patientengruppe mit 25% signifikant häufiger vor als in der Kontrollgruppe mit 16% (Annahme eines rezessiven Effekts des T-Allels: CC/CT vs. TT: $X^2 = 6,900$; $p = 0,009$; $df = 1$).

Der Unterschied in der Verteilung des C- und T-Allels war bei den Patienten (C-Allel: 75,2% und T-Allel: 68,9%) und Kontrollen C-Allel: 84,4% und T-Allel: 60,4%) des „Replication Samples“ signifikant ($X^2 = 8,337$; $p = 0,004$; $df = 1$).

ERGEBNISSE

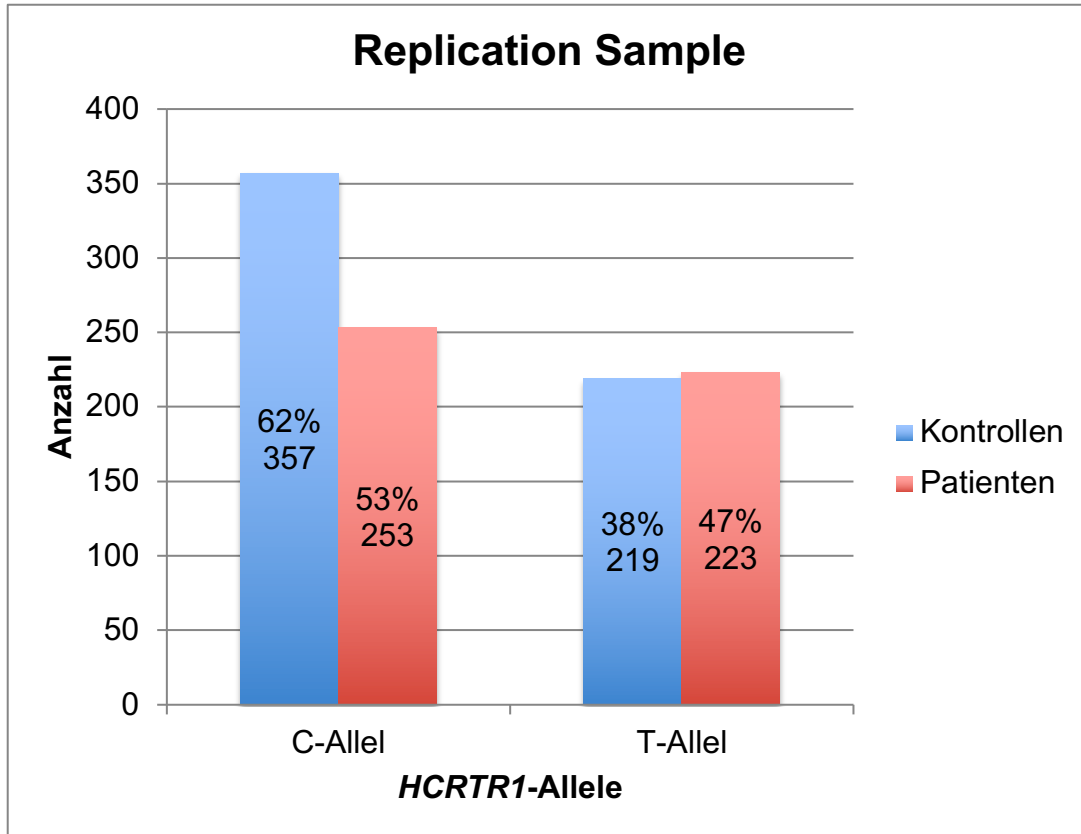


Abb. 3.3: Verteilung der Allele im Replication Sample

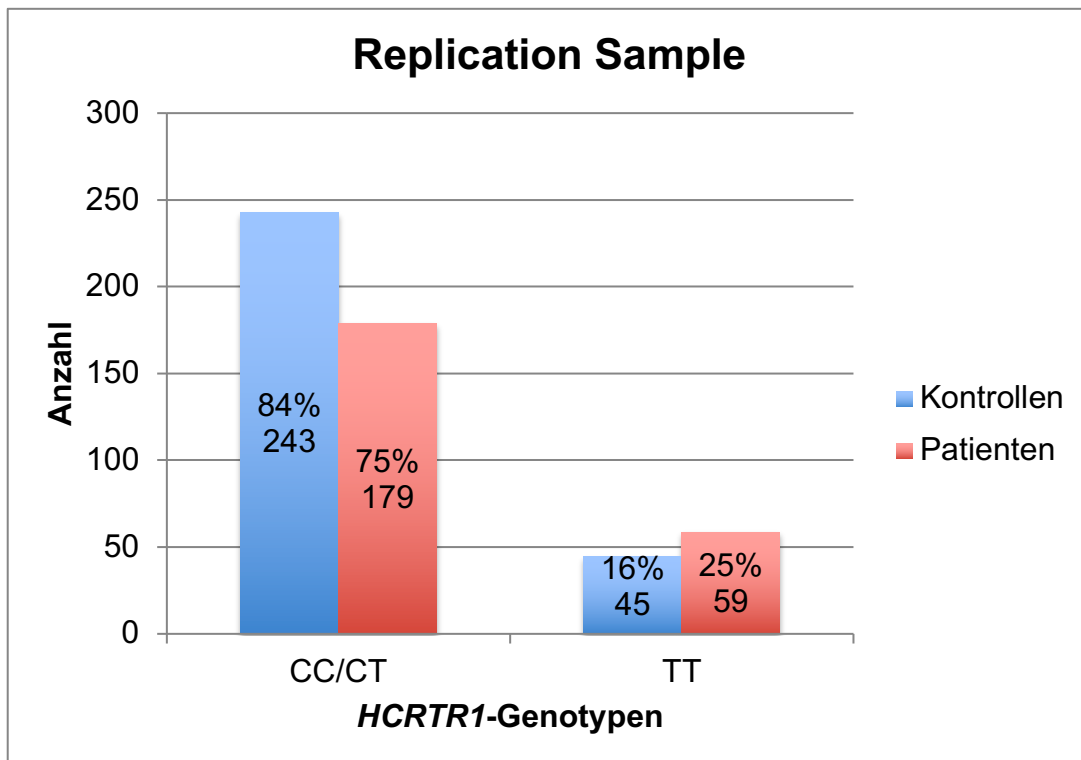


Abb. 3.4: Verteilung der Genotypen unter Annahme eines rezessiven Effekts des T-Allels (CC/CT vs. TT) im Replication Sample

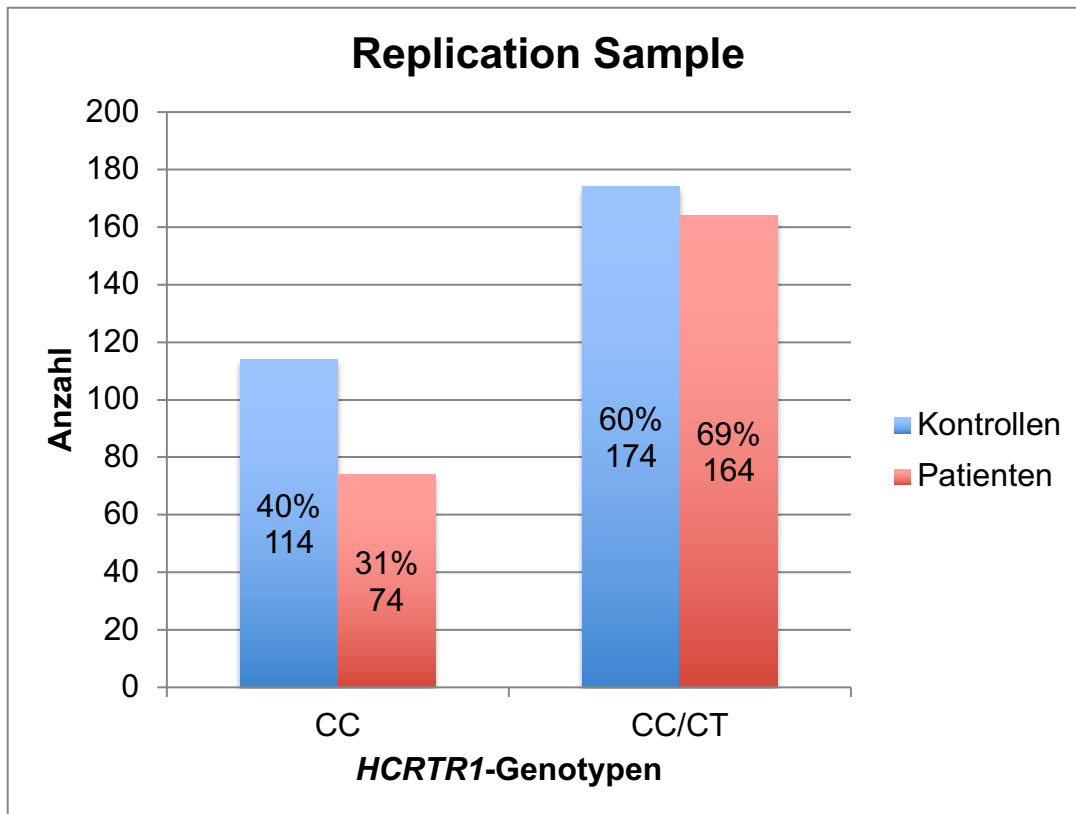


Abb. 3.5: Verteilung der Genotypen unter Annahme eines dominanten Effekts des T-Allels (CC vs. CT/TT) im Replication Sample

3.2.3 Geschlechtsspezifische Analysen

Es wurden 139 Männer des „Replication Samples“ untersucht (Drop-Out = 0%). Die Verteilung der Allele unterschied sich nicht signifikant zwischen der männlichen Patienten- (n = 62) und männlichen Kontrollgruppe (n = 77) ($X^2 = 0,005$; $p = 0,944$; $df = 1$).

Bei den Frauen des „Replication Samples“ wurden insgesamt 387 Personen untersucht (Drop-Out = 0%). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Genotypen zwischen Patientinnen (n = 176) und Kontrollen (n = 211) unter Annahme eines rezessiven Effekts des T-Allels (CC/CT vs. TT: $X^2 = 9,483$; $p = 0,002$; $df = 1$). Die Panikpatientinnen zeigten 12,3% weniger CC und CT als die Kontrollen. Die Panikpatientinnen zeigten mit 25,6% fast doppelt so viele TT wie die gesunden Kontrollen mit 13,3%.

ERGEBNISSE

Tab. 3.5: Geschlechtsspezifische Analysen des "Replication Samples"

Männer des „Replication Samples“	C/C	C/T	T/T	Gesamt (n)	Drop out	Chi-Quadrat Test-Statistik und p-Werte
Kontrollen	60 (78,0%)		17 (22,0%)	77	0%	CC/CT vs. TT: $X^2 = 0,005$ $p = 0,944$ $df = 1$
Patienten	48 (77,4%)		14 (22,6%)	62	0%	
Total	108		31	139	0%	
Frauen des „Replication Samples“	C/C	C/T	T/T	Gesamt (n)	Drop out	Chi-Quadrat Test-Statistik und p-Werte
Kontrollen	183 (86,7%)		28 (13,3%)	211	0%	CC/CT vs. TT: $X^2 = 9,483$; $p = 0,002$ $df = 1$
Patienten	131 (74,4%)		45 (25,6%)	176	0%	
Total	314		73	387	0%	

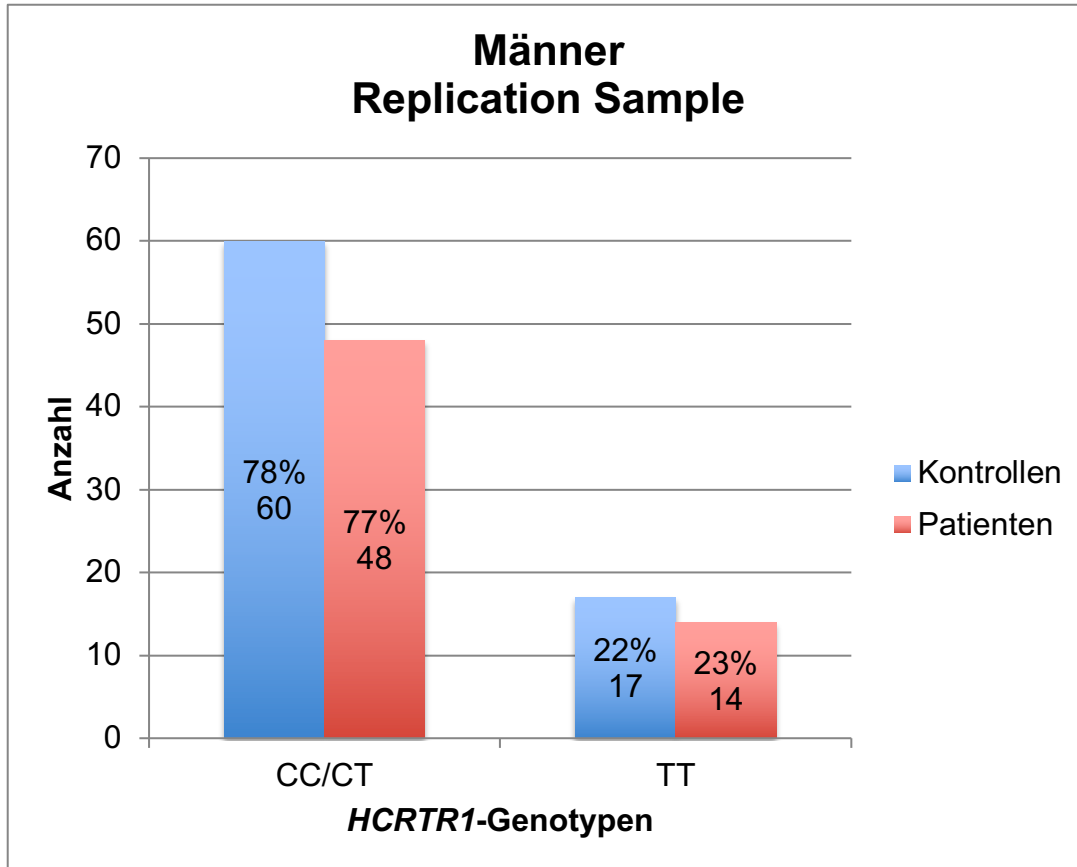


Abb. 3.6: Verteilung der Genotypen der Männer im Replication Sample unter Annahme eines rezessiven Effekts des T-Allels (CC/CT vs. TT)

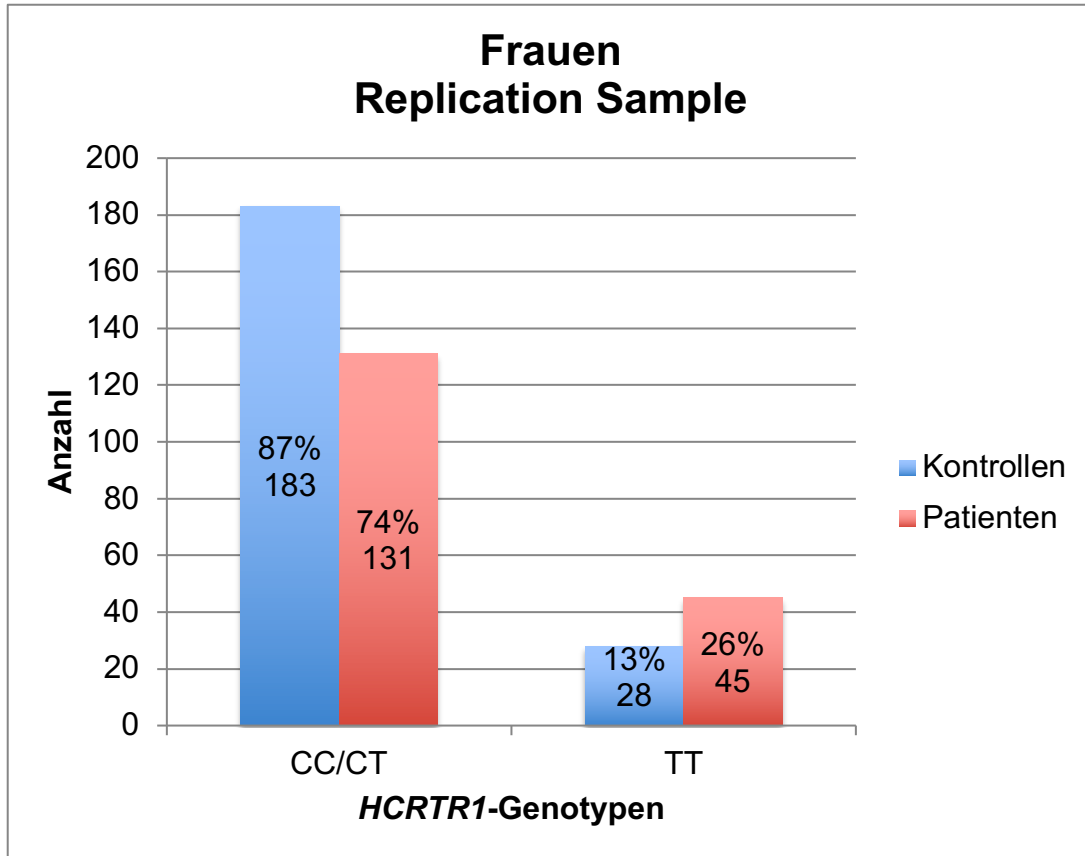


Abb. 3.7: Verteilung der Genotypen der Frauen im Replication Sample unter Annahme eines rezessiven Effekts des T-Allels (CC/CT vs. TT)

4. DISKUSSION

Seit ihrer Entdeckung 1998 wurde die Rolle der Neuropeptide Hypocretin A/Orexin A und B und ihrer G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, HCRTR1/OX1 und HCRTR2/OX2 in vielen durch das Zentralnervensystem vermittelten Funktionen wie Schlaf und Wachheit, Appetit und Metabolismus, Sucht, Analgesie und Stressreaktionen untersucht (Kukkonen, 2013).

Wie in der Einleitung bereits geschildert, liegen zudem aus tierexperimentellen wie auch humanen Studien vielfache Hinweise auf eine mögliche Rolle des Orexin-Systems bei der Anxiogenese vor. Daher wurde in der aktuellen Studie die Hypothese einer Schlüsselrolle des *HCRTR1*-Gens bei der Panikstörung in zwei unabhängigen Stichproben von gut charakterisierten Patienten mit Panikstörung überprüft.

4.1 Assoziation des *HCRTR1* Ile408Val-Polymorphismus mit Panikstörung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass das Orexin-System an der Pathophysiologie der Panikstörung beteiligt sein könnte. In der aktuellen Untersuchung wurde gezeigt, dass sich Patienten mit Panikstörung von Kontrollen hinsichtlich der Verteilung der Allele des Ile408Val-Polymorphismus in *HCRTR1* signifikant unterscheiden. Im Patientenkollektiv des „Discovery Samples“ wurde das T-Allel des Ile408Val-Polymorphismus signifikant überrepräsentiert im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden. Ferner konnte in einer zweiten, unabhängigen Stichprobe (dem „Replication Sample“) eine erhöhte Prävalenz des T-Allels bei Patienten bzw. des C-Allels bei den gesunden Kontrollen identifiziert werden. Neben der unabhängigen Bestätigung des T-Allels als Risikoallel für Panikstörung könnte das C-Allel damit als Resilienzfaktor definiert werden.

Die Hauptfragestellung konnte dahingehend beantwortet werden, dass eine Assoziation zwischen dem *HCRTR1* Ile408Val-Polymorphismus und der Diagnose Panikstörung vorliegt. Die gefundene Assoziation eines *HCRTR1* Polymorphismus mit Panikstörung passt zu der bestehenden Literatur: So haben experimentelle Befunde an Nagetieren gezeigt, dass Orexin eine anxiogene Wirkung entfalten kann (Suzuki et al., 2005). Dabei wurde bei Wistar-Ratten die Lokomotion unter Einfluss von intracerebroventrikulärer Injektion von Orexin A beobachtet. Angewandt wurden dabei der „Hell-Dunkel-Explorations-Test“ und der „Elevated-plus-maze-Test“ (EPM). Orexin

DISKUSSION

A führte sowohl zu einer längeren Verweildauer der Tiere im Dunklen als auch im geschlossenen Arm im EPM Test (Suzuki et al., 2005).

Überzeugende Belege für die Rolle des Orexin-Systems in Bezug auf Panik ergaben sich auch an einem Tiermodell mit Ratten, bei dem durch die Verabreichung von Natriumlaktat, einer nachgewiesenen panikogenen Substanz, selektiv Orexin-positive Neurone, insbesondere jene im dorsomedialen Hypothalamus, aktiviert wurden. Die Aktivierung der Orexin-positiven Neurone korrelierte mit einem Anstieg des angstbezogenen Verhaltens (Johnson et al., 2010). Ferner wurde in der gleichen Studie gezeigt, dass Natriumlaktat-induzierte Panikreaktionen von der Translation des *HCRTR* abhängig sind. Dazu wurde panikanfälligen Ratten 48 Stunden vor der Natriumlaktat-Infusion interferierende (si)RNA in den dorsomedialen Hypothalamus injiziert. Das Resultat war eine deutlich abgeschwächte Reaktion auf das Natriumlaktat, welche auf die Reduktion der lokalen Prepro-Orexin-mRNA zurückgeführt wurde. Die Kontroll-Ratten, die keine interferierende RNA erhalten hatten, zeigten auf Natriumlaktat eine Panikreaktion, die durch kardioexzitatorische Symptome und ängstliches Verhalten gekennzeichnet war. Durch systemische Vorbehandlung mit dem selektiven *HCRTR1*-Antagonist SB334867 konnte durch Natriumlaktat-induzierte Panik bei panikanfälligen Ratten und das damit verbundene ängstliche Verhalten (gemessen an der sozialen Interaktion und im Open-Field-Test) gedämpft werden (Johnson et al., 2010).

Bei 53 Patienten, die akut suizidal gefährdet waren und die keine Medikation einnahmen, konnten im Liquor cerebrospinalis erhöhte Orexin-A-Spiegel gemessen werden, was einen klinischen Hinweis auf die Rolle des Orexins in der Pathogenese der Panikstörung auch beim Menschen gibt (Johnson et al., 2010).

Darüber hinaus zeigten Panikpatienten, die keine Depression als Komorbidität aufwiesen, signifikant höhere Orexin-A-Spiegel als Patienten mit Panikstörung und komorbider Depression (Johnson et al., 2010). Diese Ergebnisse stimmen mit einem früheren Bericht überein, in dem gezeigt wurde, dass die Behandlung mit dem SSRI Sertralin den Orexin-A-Spiegel im Liquor um 14% senkt, während Bupropion, ein Antidepressivum mit geringerer Wirksamkeit bei der Behandlung von Panik keinen Einfluss auf den Orexin-Spiegel im Liquor hat (Salomon et al., 2003).

Nachdem die Funktionalität des hier untersuchten *HCRTR1* Ile408Val-Polymorphismus jedoch noch nicht bekannt ist, kann keinerlei Aussage über die Auswirkung der Assoziation des T-Allels mit Panikstörung auf das Orexin-System

getroffen werden. Aus der oben dargelegten Literatur wäre eine höhere Expression oder Bindungsaffinität des Orexin-1-Rezeptors bei Vorliegen des T-Allels anzunehmen.

Wie in der Einleitung bereits geschildert, liegt zum Einfluss des *HCRTR1* Ile408Val-Polymorphismus auf die Pathogenese der Panikstörung bislang nur eine einzige Untersuchung vor (Annerbrink et al., 2011). In dieser Studie konnte kein Zusammenhang zwischen dem Ile408Val-Polymorphismus im *HCRTR1*-Gen und der Panikstörung festgestellt werden, wohl aber ein auf Frauen beschränkter Zusammenhang zwischen dem Val308Iso-Polymorphismus im *HCRTR2*-Gen und der Panikstörung (Annerbrink et al., 2011). Nachdem das Patientenkollektiv der Studie von Annerbrink et al. mit 215 Patienten relativ klein war und für den Ile408Val-Polymorphismus 11 Patienten (7,8%) nicht ausgewertet werden konnten, wurde möglicherweise keine ausreichende statistische Power erreicht. Auch wurden die Kontrollpatienten nicht auf eine Panikstörung gescreent, was u.a. für die differierenden Ergebnisse der aktuellen Studie und der Vorstudie von Annerbrink et al. mit verantwortlich sein könnte. Auch war in der Studie von Annerbrink et al. das Durchschnittsalter mit 43,3 Jahren höher als in der vorliegenden Studie, weiterhin war die Komorbidität mit Agoraphobie (85%) deutlich höher als in der aktuellen Studie (65%). Im Vergleich zum Kollektiv von Annerbrink et al. mit 66,0% lag im „Replication Sample“ der aktuellen Studie ein mit 74,0% höherer Frauenanteil vor. Das „Discovery Sample“ zeigte mit 65,0% allerdings einen praktisch identischen Frauenanteil wie bei Annerbrink et al..

4.2 Frauenspezifische Assoziation des *HCRTR1* Ile408Val-Polymorphismus mit Panikstörung

Eine weitere Frage bestand darin, ob geschlechtsspezifische Unterschiede in Bezug auf den untersuchten Polymorphismus vorliegen. In beiden Stichproben konnte eine frauenspezifische Assoziation des *HCRTR1* Ile408Val-Polymorphismus mit der Panikstörung identifiziert werden.

Während im „Discovery Sample“ eine grenzwertige Signifikanz für einen Unterschied in der Verteilung der gruppierten Genotypen zwischen Patientinnen und Kontrollen bei der Frauensubgruppe beobachtet wurde ($X^2 = 3,713$; $p = 0,054$; $df = 1$), die möglicherweise durch die mit 84 Patientinnen und 85 Kontrollen relativ kleine

DISKUSSION

Stichprobengröße und damit einen Mangel an statistischer Power erklärt werden kann, zeigte sich im „Replication Sample“ mit einer deutlich größeren Frauensubgruppe von 176 Patientinnen und 211 Kontrollen ein hoch signifikanter Unterschied in der Verteilung der Allelfrequenzen zwischen Patientinnen und weiblichen Kontrollen ($X^2 = 9,483$; $p = 0,002$; $df = 1$).

Angsterkrankungen, insbesondere die Panikstörung, treten bei Frauen circa doppelt so häufig auf wie bei Männern (Eaton et al., 1994, Andrade et al., 1996, Lydiard, 1996, Yonkers et al., 1998). Der Geschlechtsunterschied zwischen Männern und Frauen in der Prävalenz einer Panikstörung legt eine geschlechtsspezifische Vulnerabilität in Bezug auf die Ätiologie und Aufrechterhaltung dieser Störung nahe (Nillni et al., 2011). In einer großen nationalen Stichprobe der „National Comorbidity Survey“ zeigte sich, dass die Panikstörung nicht nur häufiger bei Frauen als bei Männern auftritt, sondern, dass der Geschlechterunterschied mit zunehmendem Alter zunimmt (Kessler et al., 1994). Auch der Erkrankungsbeginn scheint zwischen den Geschlechtern zu differieren (Barzega et al., 2001). Darüber hinaus leiden Frauen häufiger als Männer an schweren und chronischen Formen der Panikstörung (Yonkers et al., 1998).

Dies ist vermutlich auf biologische und psychosoziale Faktoren zurückzuführen (Weissman et al., 1997, Gater et al., 1998).

Im aktuellen Kontext dieser Arbeit, die einen frauenspezifischen genetischen Effekt durch eine *HCRTR1* Genvariante nahelegt, sind experimentelle Befunde an Tiermodellen von Interesse. Wie sich an Ratten zeigt, scheint die Orexin-Transmission im Gehirn einen sexuellen Dimorphismus aufzuweisen (Johren et al., 2001, Johren et al., 2002), der unter dem Einfluss von Sexualhormonen steht (Johren et al., 2003, Porkka-Heiskanen et al., 2004, Mo et al., 2009, Silveyra et al., 2009). Hierzu gibt es detaillierte experimentelle präklinische Daten in Bezug auf die HCRTR1 Rezeptor Expression. Bei Mäusen moduliert das Orexinsystem die Entwicklung und Expression des Angstgedächtnisses über noradrenerge Neurone im Lokus coeruleus, der HCRTR1 exprimiert (Soya et al., 2013).

Im Hypothalamus weiblicher Ratten fanden sich signifikant höhere Prepro-Orexin (PPO)-mRNA-Konzentrationen als bei männlichen Ratten. Eine geschlechtsabhängige Regulation der hypothalamischen PPO-Expression wird vermutet (Johren et al., 2002). Außerdem fand sich die höchste Orexin-A-

DISKUSSION

Immunoreaktivität bei weiblichen Ratten im Hypothalamus, insbesondere an der Vierhügelplatte und dem Hirnstamm. Im Hypothalamus reichert sich Orexin-A besonders lateral und posterior an. In diesen hypothalamischen Regionen waren die Orexin-A-Spiegel wiederum bei weiblichen Ratten deutlich höher als bei männlichen (Taheri et al., 1999).

Darüber hinaus interagiert Orexin-A mit der hypothalamisch-hypophysären-gonadalen Achse bei in vitro- und in vivo- Experimenten. Bei hypothalamischen Explantaten männlicher Ratten stimulierte Orexin-A die Freisetzung von LH-Releasing-Hormon (LHRH) um 133%. Eine besonders starke Stimulation von 233% fand sich dabei bei weiblichen Ratten allerdings nur in der Proestrus-Phase. Die spezifische Wirkung von Orexin-A konnte dadurch belegt werden, dass Orexin-A dosisabhängig das LHRH stimulierte und das LH in Hypophysenpräparaten nur bei Tieren in der Proestrus-Phase blockierte. Ein selektiver Neuropeptid-Y1-Rezeptor Antagonist hebt in vitro die Freisetzung von LHRH durch Orexin-A auf (Russell et al., 2001).

Die Orexin-A-Freisetzung wurde auch bei Explantaten männlicher Ratten durch Östradiol stimuliert (Russell et al., 2001). Bei weiblichen Schweinen fanden sich übereinstimmend hohe Orexin-A und -B-Spiegel im Hypothalamus, wobei diese ebenfalls vom Hormonstatus des Zyklus abhängig waren. Die Orexine interagieren demnach auf hypothalamischer Ebene auch bei Säugetieren (Maleszka et al., 2013). Bei Menschen gibt es zur Beeinflussung der gonadalen Achse durch Orexin—A keine klinischen und experimentellen Beobachtungen.

Erwähnt werden sollte zusätzlich, dass die Steroidhormone Dihydroepiandrosteron (DHEA) und Dihydrotestosteron (DHT) im Hypothalamus von Ratten signifikant die Genexpression von Orexin stimulieren. Immunhistologisch wurde das Vorläufermolekül PPO unter den genannten experimentellen Bedingungen an gleicher Lokalisation wie die Orexin-Neurone nachgewiesen (Mo et al., 2009).

4.3 Limitationen der Arbeit

Nachdem Assoziationsstudien wie die hier vorgenommene gerade bei relativ geringen Fallzahlen eine hohe Sensitivität und geringe Spezifität aufweisen, ist einschränkend die Wahrscheinlichkeit für falsch positive Ergebnisse höher als bei Kopplungsstudien

DISKUSSION

(Förstl et al., 2006a). Nur im „Discovery Sample“ waren die Komorbiditäten Depression und Agoraphobie bekannt und dokumentiert. Dadurch konnte nur in dieser Stichprobe die Beziehung zwischen dem Polymorphismus und der Panikstörung selektiv überprüft werden.

Da das Alter keinen entscheidenden Einfluss auf die genetische Variabilität hat, werden die Studienergebnisse nicht durch den jüngeren Altersdurchschnitt der Kontrollen im Replication Sample im Vergleich zu den Patienten beeinflusst. Das jüngere Lebensalter der Kontrollen stellt allerdings eine Limitation des „Replication Samples“ dar, da sich eine Panikstörung möglicherweise in höherem Lebensalter manifestieren hätte können. Diese Kontrollen könnten daher nur eingeschränkt als genetisch gesunde Kontrollen herangezogen werden.

Die vorliegende Studie bezieht sich ausschließlich auf kaukasische Probanden, was die Beurteilung einer Allgemeingültigkeit über verschiedene Populationen hinweg einschränkt.

Schließlich ist die Funktionalität des untersuchten Polymorphismus nicht bekannt, so dass keine Aussagen über die Rolle des mit Panikstörung assoziiert gefundenen T-Allels im Orexin-System getroffen werden können.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der *HCRTR1*-Ile408Val Polymorphismus (rs2271933) in der Pathogenese der Panikstörung eine Rolle spielen könnte. Die dieser Arbeit zugrundeliegende Leithypothese hat sich somit bestätigt. Die multifaktorielle Genese der Panikstörung muss allerdings berücksichtigt werden, so dass in zukünftigen Studien die komplexe Interaktion des Ile408Val-Polymorphismus im *HCRTR1*-Gen mit weiteren, bereits mit der Panikstörung assoziiert gefundenen Polymorphismen (siehe (Howe et al., 2016)) sowie Umweltfaktoren in genügend großen Stichproben untersucht werden müssen.

Zudem muss die funktionelle Auswirkung des untersuchten Polymorphismus in *in vitro* Modellen sowie in Tiermodellen untersucht werden. Ein langfristiges Ziel in diesem Zusammenhang könnte die Entwicklung von innovativen Medikamenten in der

DISKUSSION

Behandlung der Panikstörung sein, die spezifisch das Orexin-System modulieren können (Thompson et al., 2014).

Zudem erscheint zunehmend der klassische kategoriale Zugang zu psychiatrischen Fragestellungen, bei dem Kohorten in "Fälle" und "Kontrollen" aufgeteilt werden, nicht mehr zeitgemäß. Deshalb schlagen u.a. Smoller et al. vor, mit mehrdimensionalen Ansätzen der Psychopathologie eine präzisere Charakterisierung von Studienkohorten und deren Analyse zu ermöglichen (Smoller, 2014). Ein möglicher Ansatz in diesem Zusammenhang ist die Untersuchung von intermediären Phänotypen, auch Endophänotypen genannt (Zobel und Maier, 2004). Zur weiteren Bewertung der hier identifizierten frauenspezifischen genetischen Assoziation mit einem Polymorphismus im *HCRTR1*-Gen könnte als intermediärer Phänotyp in zukünftigen Studien z.B. die Angstsensitivität herangezogen werden. Sie ist ein Prädiktor für die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer Angststörung (Schmidt et al., 2006), insbesondere der Panikstörung (McNally, 2002). Es handelt sich dabei um ein Persönlichkeitsmerkmal, das von der spezifischen Angst vor den eigenen Angstsymptomen und den daraus resultierenden, negativen Konsequenzen gekennzeichnet ist (McNally, 2002, Reiss et al., 1986). Versuche der Quantifizierung der Angstsensitivität weisen auf einen Unterschied zwischen gesunden Frauen und Männern hin, der sich im Falle einer Panikstörung noch eindeutiger zeigt. Im Manual des Angstsensitivitätsindex (ASI) liegt der durchschnittliche ASI-Wert gesunder Frauen mit (19,8) signifikant über dem der Männer (17,6) (Peterson und Reiss, 1992). Der ASI-Wert scheint vornehmlich bei Frauen relevant für die Pathogenese der Panikstörung zu sein. Er ist bei Frauen zu 37,0 – 48,0% (Median 44,5%) hereditär, während die Angstsensitivität bei Männern ausschließlich von Umweltfaktoren beeinflusst wird (Jang et al., 1999).

Ein langfristiges Ziel könnten individualisierte Therapieansätze auf Basis z.B. genetischer Informationen sein. Erste personalisierte Therapieerfolge stammen aus der hämatologischen und onkologischen Grundlagenforschung. Weiterentwicklungen innerhalb dieses Fachbereichs haben bereits zu hochspezifischen Inhibitoren von Kinasen und anderen Transmittersubstanzen geführt. Ein überzeugendes Beispiel hierfür ist die Diagnose des metastasierenden, malignen Melanoms, bei dem früher eine Vollremission nicht erzielbar war und durch zielgerichtete Therapie ein entscheidender Durchbruch erreicht werden konnte (Agianian und Gavathiotis, 2018, Sosman et al., 2012). Ob die personalisierte Medizin im Bereich neuropsychiatrischer

DISKUSSION

Erkrankungen und speziell der Panikstörung die Therapie grundlegend revolutionieren wird, wird sich aus der rasch entwickelnden Forschung ergeben (Domschke et al., 2015).

5. Zusammenfassung

Orexine sind im Hypothalamus gebildete Neuropeptide, die Vigilanz fördern und eine entscheidende Rolle in der Energie-Homöostase und der Aufrechterhaltung von Schlaf-Wach-Rhythmen spielen.

Das Orexin-System dient dazu, Signale wie Stress oder Hunger aus den afferenten Gehirnregionen in Verhaltensweisen wie erhöhte Wachsamkeit, Nahrungsaufnahme oder einen erhöhten sympathischen Tonus umzusetzen.

Da die Panikstörung durch eine erhöhte Erregungsbereitschaft charakterisiert ist, ist ein Einfluss des Orexin-Systems auf die Entwicklung der Panikstörung denkbar. Zudem legen (insbesondere präklinische) Studien eine Rolle des Orexin-Systems, insbesondere des Orexin-Rezeptor-1 in der Pathophysiologie von Panik-ähnlicher Angst nahe. Vor diesem Hintergrund wurde die Leithypothese untersucht, ob die Panikstörung mit dem Ile408Val-Polymorphismus (rs2271933) in dem für den Orexin-Rezeptor-1 kodierenden *HCRTR1*-Gen assoziiert sein könnte.

In der vorliegenden Studie wurden zwei unabhängige Stichproben mit 131 Panikpatienten und 131 Alters- und Geschlechts-gematchten Kontrollen („Discovery Sample“) sowie 292 Panikpatienten und 292 gematchten Kontrollen („Replication Sample“) für den *HCRTR1* Ile408Val-Polymorphismus mittels eines Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)-Assays genotypisiert.

Die experimentelle Untersuchung umfasste im Detail die Amplifikation des den Polymorphismus umgebenden Genabschnittes durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in der aus EDTA-Blut extrahierten DNA, einen Restriktionsverdau mit dem Enzym BsmBI und anschließend die optische Darstellung und Auswertung der entstandenen Fragmente mittels Gelelektrophorese. Die Genotyp- und Allelverteilung wurde zwischen Patienten und Kontrollen sowie in der Subgruppe der weiblichen Patienten/Kontrollen mittels des Chi-Quadrat Tests vergleichend analysiert.

Im „Discovery Sample“ trat das T-Allel bei den Patienten signifikant häufiger als bei den Kontrollen auf ($p = 0,027$). Im „Replication Sample“ konnte die Assoziation des T-Alles bei Patienten mit Panikstörung bestätigt werden ($p = 0,005$). Diese Assoziation war spezifisch für die weibliche Subgruppe ($p = 0,002$).

Die vorliegenden Ergebnisse legen eine Assoziation der Panikstörung mit dem Ile408Val-Polymorphismus im *HCRTR1*-Gen nahe, wobei das T-Allel in zwei unabhängigen Stichproben als möglicherweise frauenspezifisches Risikoallel

Zusammenfassung

identifiziert wurde. Diese Ergebnisse könnten - eine weitere Replikation in großen Stichproben und die funktionelle Charakterisierung dieses Polymorphismus vorausgesetzt - dazu führen, innovative Therapien in Form von Orexin-1-Rezeptor Antagonisten zu entwickeln und diese auf Basis genetischer *HCRTR1*-Risikoallelkonstellationen in Zukunft ggf. auch in einem personalisierten Ansatz anzuwenden.

6. Literaturverzeichnis

- AAIJ, C. & BORST, P. 1972. The gel electrophoresis of DNA. *Biochim Biophys Acta.*, 269, 192-200.
- AGIANIAN, B. & GAVATHIOTIS, E. 2018. Current insights of BRAF inhibitors in cancer. *J Med Chem.*
- AKIYAMA, M., YUASA, T., HAYASAKA, N., HORIKAWA, K., SAKURAI, T. & SHIBATA, S. 2004. Reduced food anticipatory activity in genetically orexin (hypocretin) neuron-ablated mice. *Eur J Neurosci*, 20, 3054-62.
- ALVAREZ, C. E. & SUTCLIFFE, J. G. 2002. Hypocretin is an early member of the incretin gene family. *Neurosci Lett*, 324, 169-72.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION (APA) 2013. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*, Arlington, VA.
- ANDRADE, L., EATON, W. W. & CHILCOAT, H. D. 1996. Lifetime co-morbidity of panic attacks and major depression in a population-based study: age of onset. *Psychol Med.*, 26, 991-6.
- ANNERBRINK, K., WESTBERG, L., OLSSON, M., ANDERSCH, S., SJODIN, I., HOLM, G., ALLGULANDER, C. & ERIKSSON, E. 2011. Panic disorder is associated with the Val308Ile polymorphism in the hypocretin receptor gene. *Psychiatr Genet*, 21, 85-9.
- BALON, R., POHL, R., YERAGANI, V. K., RAINEY, J. M. & WEINBERG, P. 1988. Lactate- and isoproterenol-induced panic attacks in panic disorder patients and controls. *Psychiatry Res*, 23, 153-60.
- BANDELOW, B. 2001. *Panik und Agoraphobie. Ursachen, Diagnose und Behandlung*, Wien, Springer.
- BANDELOW, B., BROOCKS, A., PEKRUN, G., GEORGE, A., MEYER, T., PRALLE, L., BARTMANN, U., HILLMER-VOGEL, U. & RUTHER, E. 2000a. The use of the Panic and Agoraphobia Scale (P & A) in a controlled clinical trial. *Pharmacopsychiatry*, 33, 174-81.
- BANDELOW, B. & MICHAELIS, S. 2015. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. *Dialogues Clin Neurosci*, 17, 327-35.
- BANDELOW, B., MICHAELIS, S. & WEDEKIND, D. 2017. Treatment of anxiety disorders. *Dialogues Clin Neurosci*, 19, 93-107.
- BANDELOW, B., WEDEKIND, D., PAULS, J., BROOCKS, A., HAJAK, G. & RUTHER, E. 2000b. Salivary cortisol in panic attacks. *Am J Psychiatry*, 157, 454-6.
- BANDELOW, B., WILTINK, J., ALPERS, G. W., BENECKE, C., DECKERT, J., ECKHARDT-HENN, A., EHRIG, C., ENGEL, E., FALKAI, P., GEISER, F., GERLACH, A. L., HARFST, T., HAU, S., JORASCHKY, P., KELLNER, M., KÖLLNER, V., KOPP, I., LANGS, G., LICHTER, T., LIEBECK, H., MATZAT, J., REITT, M., RÜDDEL, H. P., RUDOLF, S., SCHICK, G., SCHWEIGER, U., SIMON, R., SPRINGER, A., STAATS, H., STRÖHLE, A., STRÖHM, W., WALDHERR, B., WATZKE, B., WEDEKIND, D., ZOTTL, C., ZWANZGER, P. & BEUTEL, M. E. 2014. *Deutsche S3-Leitlinie Behandlung von Angststörungen* [Online]. Available: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/051-028.html> [Accessed 21.02.2018].
- BARLOW, D. H., GORMAN, J. M., SHEAR, M. K. & WOODS, S. W. 2000. Cognitive-behavioral therapy, imipramine, or their combination for panic disorder: A randomized controlled trial. *JAMA*, 283, 2529-36.

- BARZEGA, G., MAINA, G., VENTURELLO, S. & BOGETTO, F. 2001. Gender-related differences in the onset of panic disorder. *Acta Psychiatr Scand.*, 103, 189-95.
- BATELAAN, N., SMIT, F., DE GRAAF, R., VAN BALKOM, A., VOLLEBERGH, W. & BEEKMAN, A. 2007. Economic costs of full-blown and subthreshold panic disorder. *J Affect Disord*, 104, 127-36.
- BATELAAN, N. M., DE GRAAF, R., PENNINX, B. W., VAN BALKOM, A. J., VOLLEBERGH, W. A. & BEEKMAN, A. T. 2010. The 2-year prognosis of panic episodes in the general population. *Psychol Med*, 40, 147-57.
- BENITEZ, C. I., SMITH, K., VASILE, R. G., RENDE, R., EDELEN, M. O. & KELLER, M. B. 2008. Use of benzodiazepines and selective serotonin reuptake inhibitors in middle-aged and older adults with anxiety disorders: a longitudinal and prospective study. *Am J Geriatr Psychiatry*, 16, 5-13.
- BONAVENTURE, P., YUN, S., JOHNSON, P. L., SHEKHAR, A., FITZ, S. D., SHIREMAN, B. T., LEBOLD, T. P., NEPOMUCENO, D., LORD, B., WENNERHOLM, M., SHELTON, J., CARRUTHERS, N., LOVENBERG, T. & DUGOVIC, C. 2015. A selective orexin-1 receptor antagonist attenuates stress-induced hyperarousal without hypnotic effects. *J Pharmacol Exp Ther.*, 352, 590-601. doi: 10.1124/jpet.114.220392. Epub 2015 Jan 12.
- BOURDON, K. H., RAE, D. S., LOCKE, B. Z., NARROW, W. E. & REGIER, D. A. 1992. Estimating the prevalence of mental disorders in U.S. adults from the Epidemiologic Catchment Area Survey. *Public Health Rep*, 107, 663-8.
- BOURIN, M., BAKER, G. B. & BRADWEJN, J. 1998. Neurobiology of panic disorder. *J Psychosom Res*, 44, 163-80.
- BOWEN, R. C. 1983. Differential diagnosis of anxiety disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 7, 605-9.
- BROWN, T. A. 1994. Familial aggregation of panic in nonclinical panickers. *Behav Res Ther.*, 32, 233-5.
- BUSSE, A., PLAUMANN, M. & WALTER, U. 2005. Stresstheoretische Modelle. In: KRANKENKASSE, K. K. (ed.) *Stress? Ursachen, Erklärungsmodelle und präventive Ansätze*. Berlin, Heidelberg: Springer.
- BYSTRITSKY, A. 2006. Treatment-resistant anxiety disorders. *Mol Psychiatry*, 11, 805-14.
- CAMERON, O. G., SMITH, C. B., LEE, M. A., HOLLINGSWORTH, P. J., HILL, E. M. & CURTIS, G. C. 1990. Adrenergic status in anxiety disorders: platelet alpha 2-adrenergic receptor binding, blood pressure, pulse, and plasma catecholamines in panic and generalized anxiety disorder patients and in normal subjects. *Biol Psychiatry*, 28, 3-20.
- CANNON, W. B. 1929. PHARMACOLOGICAL INJECTIONS AND PHYSIOLOGICAL INFERENCES. *Science*, 70, 500-1.
- CHARNEY, D. S., HENINGER, G. R. & BREIER, A. 1984. Noradrenergic function in panic anxiety. Effects of yohimbine in healthy subjects and patients with agoraphobia and panic disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 41, 751-63.
- CHARNEY, D. S., WOODS, S. W., GOODMAN, W. K. & HENINGER, G. R. 1987. Neurobiological mechanisms of panic anxiety: biochemical and behavioral correlates of yohimbine-induced panic attacks. *Am J Psychiatry*, 144, 1030-6.
- CHARNEY, D. S., WOODS, S. W., KRYSTAL, J. H., NAGY, L. M. & HENINGER, G. R. 1992. Noradrenergic neuronal dysregulation in panic disorder: the effects of intravenous yohimbine and clonidine in panic disorder patients. *Acta Psychiatr Scand*, 86, 273-82.
- CHEMELLI, R. M., WILLIE, J. T., SINTON, C. M., ELMQUIST, J. K., SCAMMELL, T., LEE, C., RICHARDSON, J. A., WILLIAMS, S. C., XIONG, Y., KISANUKI, Y.,

- FITCH, T. E., NAKAZATO, M., HAMMER, R. E., SAPER, C. B. & YANAGISAWA, M. 1999. Narcolepsy in orexin knockout mice: molecular genetics of sleep regulation. *Cell.*, 98, 437-51.
- CHIU, S. & CAMPBELL, K. 2018. *Clonidine for the Treatment of Psychiatric Conditions and Symptoms: A Review of Clinical Effectiveness, Safety, and Guidelines*. Ottawa (ON).
- COPLAN, J. D., ANDREWS, M. W., ROSENBLUM, L. A., OWENS, M. J., FRIEDMAN, S., GORMAN, J. M. & NEMEROFF, C. B. 1996. Persistent elevations of cerebrospinal fluid concentrations of corticotropin-releasing factor in adult nonhuman primates exposed to early-life stressors: implications for the pathophysiology of mood and anxiety disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 1619-23.
- DE LECEA, L., KILDUFF, T. S., PEYRON, C., GAO, X., FOYE, P. E., DANIELSON, P. E., FUKUHARA, C., BATTENBERG, E. L., GAUTVIK, V. T., BARTLETT, F. S., 2ND, FRANKEL, W. N., VAN DEN POL, A. N., BLOOM, F. E., GAUTVIK, K. M. & SUTCLIFFE, J. G. 1998. The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95, 322-7.
- DECKERT, J., CATALANO, M., SYAGAILO, Y. V., BOSI, M., OKLADNOVA, O., DI BELLA, D., NOTHEN, M. M., MAFFEI, P., FRANKE, P., FRITZE, J., MAIER, W., PROPPING, P., BECKMANN, H., BELLODI, L. & LESCH, K. P. 1999. Excess of high activity monoamine oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet*, 8, 621-4.
- DECKERT, J., NOTHEN, M. M., FRANKE, P., DELMO, C., FRITZE, J., KNAPP, M., MAIER, W., BECKMANN, H. & PROPPING, P. 1998. Systematic mutation screening and association study of the A1 and A2a adenosine receptor genes in panic disorder suggest a contribution of the A2a gene to the development of disease. *Mol Psychiatry.*, 3, 81-5.
- DOMSCHKE, K. 2014. Praktische Bedeutung der Genetik bei Angststörung. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 2014; 15 (2), 90-95, 15 (2), 90-95.
- DOMSCHKE, K. & DECKERT, J. 2007. [Genetics of anxiety disorders. Current clinical and molecular research]. *Nervenarzt.*, 78, 825-33; quiz 834-5. doi: 10.1007/s00115-007-2315-z.
- DOMSCHKE, K. & DECKERT, J. 2012. Genetics of anxiety disorders - status quo and quo vadis. *Curr Pharm Des*, 18, 5691-8.
- DOMSCHKE, K., FREITAG, C. M., KUHLENBAUMER, G., SCHIRMACHER, A., SAND, P., NYHUIS, P., JACOB, C., FRITZE, J., FRANKE, P., RIETSCHEL, M., GARRITSEN, H. S., FIMMERS, R., NOTHEN, M. M., LESCH, K. P., STOGBAUER, F. & DECKERT, J. 2004. Association of the functional V158M catechol-O-methyl-transferase polymorphism with panic disorder in women. *Int J Neuropsychopharmacol*, 7, 183-8.
- DOMSCHKE, K., MULLER, D. J. & SERRETTI, A. 2015. Personalized therapies in psychiatry: promises, pitfalls and perspectives. *J Neural Transm (Vienna)*, 122, 1-3.
- DOMSCHKE, K., REIF, A., WEBER, H., RICHTER, J., HOHOFF, C., OHRMANN, P., PEDERSEN, A., BAUER, J., SUSLOW, T., KUGEL, H., HEINDEL, W., BAUMANN, C., KLAUKE, B., JACOB, C., MAIER, W., FRITZE, J., BANDELOW, B., KRAKOWITZKY, P., ROTHERMUNDT, M., ERHARDT, A., BINDER, E. B., HOLSBOER, F., GERLACH, A. L., KIRCHER, T., LANG, T., ALPERS, G. W., STROHLE, A., FEHM, L., GLOSTER, A. T., WITTCHEN, H. U., AROLT, V.,

- PAULI, P., HAMM, A. & DECKERT, J. 2011. Neuropeptide S receptor gene -- converging evidence for a role in panic disorder. *Mol Psychiatry*, 16, 938-48.
- DOMSCHKE, K. & ZWANZGER, P. 2008. GABAergic and endocannabinoid dysfunction in anxiety - future therapeutic targets? *Curr Pharm Des*, 14, 3508-17.
- EATON, W. W., KESSLER, R. C., WITTCHEN, H. U. & MAGEE, W. J. 1994. Panic and panic disorder in the United States. *Am J Psychiatry*, 151, 413-20. doi: 10.1176/ajp.151.3.413.
- ELAM, M., YAO, T., THOREN, P. & SVENSSON, T. H. 1981. Hypercapnia and hypoxia: chemoreceptor-mediated control of locus coeruleus neurons and splanchnic, sympathetic nerves. *Brain Res*, 222, 373-81.
- ERHARDT, A., CZIBERE, L., ROESKE, D., LUCAE, S., UNSCHULD, P. G., RIPKE, S., SPECHT, M., KOHLI, M. A., KLOIBER, S., ISING, M., HECK, A., PFISTER, H., ZIMMERMANN, P., LIEB, R., PUTZ, B., UHR, M., WEBER, P., DEUSSING, J. M., GONIK, M., BUNCK, M., KEBLER, M. S., FRANK, E., HOHOFF, C., DOMSCHKE, K., KRAKOWITZKY, P., MAIER, W., BANDELOW, B., JACOB, C., DECKERT, J., SCHREIBER, S., STROHMAIER, J., NOTHEN, M., CICHON, S., RIETSCHEL, M., BETTECKEN, T., KECK, M. E., LANDGRAF, R., MULLER-MYHSOK, B., HOLSBOER, F. & BINDER, E. B. 2011. TMEM132D, a new candidate for anxiety phenotypes: evidence from human and mouse studies. *Mol Psychiatry*, 16, 647-63.
- FALKAI, P. & WITTCHEN, H.-U. 2015. *Diagnostisches und Statistisches Manual Psychischer Störungen DSM-5*, Göttingen, Hogrefe.
- FEINSTEIN, J. S., BUZZA, C., HURLEMANN, R., FOLLMER, R. L., DAHDALEH, N. S., CORYELL, W. H., WELSH, M. J., TRANEL, D. & WEMMIE, J. A. 2013. Fear and panic in humans with bilateral amygdala damage. *Nat Neurosci*, 16, 270-2.
- FIRST, M., SPITZER, R., GIBBON, M. & WILLIAMS, J. 1996. *Structured Clinical Interview for DSM-IV Axis I Disorders, Clinician Version (SCID-CV)*, Washington, DC.
- FÖRSTL, H., HAUTZINGER, M. & ROTH, G. 2006a. *Neurobiologie psychischer Störungen Heidelberg*: Springer.
- FÖRSTL, H., HAUTZINGER, M. & ROTH, G. 2006b. *Neurobiologie psychischer Störungen*, Heidelberg, Springer.
- FREIRE, R. C., HALLAK, J. E., CRIPPA, J. A. & NARDI, A. E. 2011. New treatment options for panic disorder: clinical trials from 2000 to 2010. *Expert Opin Pharmacother*, 12, 1419-28.
- FREIRE, R. C., ZUGLIANI, M. M., GARCIA, R. F. & NARDI, A. E. 2016. Treatment-resistant panic disorder: a systematic review. *Expert Opin Pharmacother*, 17, 159-68.
- FUKUNAKA, Y., SHINKAI, T., HWANG, R., HORI, H., UTSUNOMIYA, K., SAKATA, S., NAOE, Y., SHIMIZU, K., MATSUMOTO, C., OHMORI, O. & NAKAMURA, J. 2007. The orexin 1 receptor (HCRTR1) gene as a susceptibility gene contributing to polydipsia-hyponatremia in schizophrenia. *Neuromolecular Med*, 9, 292-7.
- FURUKAWA, T. A., WATANABE, N. & CHURCHILL, R. 2007. Combined psychotherapy plus antidepressants for panic disorder with or without agoraphobia. *Cochrane Database Syst Rev*, Cd004364.
- GATER, R., TANSELLA, M., KORTEN, A., TIEMENS, B. G., MAVREAS, V. G. & OLATAWURA, M. O. 1998. Sex differences in the prevalence and detection of depressive and anxiety disorders in general health care settings: report from the

- World Health Organization Collaborative Study on Psychological Problems in General Health Care. *Arch Gen Psychiatry*, 55, 405-13.
- GEIGER, M. J., NEUFANG, S., STEIN, D. J. & DOMSCHKE, K. 2014. Arousal and the attentional network in panic disorder. *Hum Psychopharmacol*, 29, 599-603.
- GELERNTER, J., BONVICINI, K., PAGE, G., WOODS, S. W., GODDARD, A. W., KRUGER, S., PAULS, D. L. & GOODSON, S. 2001. Linkage genome scan for loci predisposing to panic disorder or agoraphobia. *Am J Med Genet*, 105, 548-57.
- GLOSTER, A. T., WITTCHEN, H. U., EINSLE, F., LANG, T., HELBIG-LANG, S., FYDRICH, T., FEHM, L., HAMM, A. O., RICHTER, J., ALPERS, G. W., GERLACH, A. L., STROHLE, A., KIRCHER, T., DECKERT, J., ZWANZGER, P., HOFLE, M. & AROLT, V. 2011. Psychological treatment for panic disorder with agoraphobia: a randomized controlled trial to examine the role of therapist-guided exposure in situ in CBT. *J Consult Clin Psychol.*, 79, 406-20. doi: 10.1037/a0023584.
- GORMAN, J. M., KENT, J. M., SULLIVAN, G. M. & COPLAN, J. D. 2000. Neuroanatomical hypothesis of panic disorder, revised. *Am J Psychiatry*, 157, 493-505.
- GOTTSCHALK, M. G. & DOMSCHKE, K. 2016. Novel developments in genetic and epigenetic mechanisms of anxiety. *Curr Opin Psychiatry*, 29, 32-8.
- GOTTSCHALK, M. G., RICHTER, J., ZIEGLER, C., SCHIELE, M. A., MANN, J., GEIGER, M. J., SCHATNER, C., HOMOLA, G. A., ALPERS, G. W., BUCHEL, C., FEHM, L., FYDRICH, T., GERLACH, A. L., GLOSTER, A. T., HELBIG-LANG, S., KALISCH, R., KIRCHER, T., LANG, T., LONSDORF, T. B., PANEFARRE, C. A., STROHLE, A., WEBER, H., ZWANZGER, P., AROLT, V., ROMANOS, M., WITTCHEN, H. U., HAMM, A., PAULI, P., REIF, A., DECKERT, J., NEUFANG, S., HOFLE, M. & DOMSCHKE, K. 2019. Orexin in the anxiety spectrum: association of a HCRTR1 polymorphism with panic disorder/agoraphobia, CBT treatment response and fear-related intermediate phenotypes. *Transl Psychiatry*, 9, 75.
- HAMILTON, S. P., SLAGER, S. L., DE LEON, A. B., HEIMAN, G. A., KLEIN, D. F., HODGE, S. E., WEISSMAN, M. M., FYER, A. J. & KNOWLES, J. A. 2004. Evidence for genetic linkage between a polymorphism in the adenosine 2A receptor and panic disorder. *Neuropsychopharmacology.*, 29, 558-65. doi: 10.1038/sj.npp.1300311.
- HETTEMA, J. M., NEALE, M. C. & KENDLER, K. S. 2001. A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am J Psychiatry*, 158, 1568-78.
- HOSING, V. G., SCHIRMACHER, A., KUHLENBAUMER, G., FREITAG, C., SAND, P., SCHLESIGER, C., JACOB, C., FRITZE, J., FRANKE, P., RIETSCHER, M., GARRITSEN, H., NOTHEN, M. M., FIMMERS, R., STOGBAUER, F. & DECKERT, J. 2004. Cholecystokinin- and cholecystokinin-B-receptor gene polymorphisms in panic disorder. *J Neural Transm Suppl*, 147-56.
- HOWE, A. S., BUTTENSCHON, H. N., BANI-FATEMI, A., MARON, E., OTOWA, T., ERHARDT, A., BINDER, E. B., GREGERSEN, N. O., MORS, O., WOLDBYE, D. P., DOMSCHKE, K., REIF, A., SHLIK, J., KOKS, S., KAWAMURA, Y., MIYASHITA, A., KUWANO, R., TOKUNAGA, K., TANII, H., SMOLLER, J. W., SASAKI, T., KOSZYCKI, D. & DE LUCA, V. 2016. Candidate genes in panic disorder: meta-analyses of 23 common variants in major anxiogenic pathways. *Mol Psychiatry.*, 21, 665-79. doi: 10.1038/mp.2015.138. Epub 2015 Sep 22.

- IDA, T., NAKAHARA, K., KUROIWA, T., FUKUI, K., NAKAZATO, M., MURAKAMI, T. & MURAKAMI, N. 2000. Both corticotropin releasing factor and neuropeptide Y are involved in the effect of orexin (hypocretin) on the food intake in rats. *Neurosci Lett*, 293, 119-22.
- JACOBI, F., HOFER, M., STREHLE, J., MACK, S., GERSCHLER, A., SCHOLL, L., BUSCH, M. A., MASKE, U., HAPKE, U., GAEBEL, W., MAIER, W., WAGNER, M., ZIELASEK, J. & WITTCHEN, H. U. 2016. [Erratum to: Mental disorders in the general population. Study on the health of adults in Germany and the additional module mental health (DEGS1-MH)]. *Nervenarzt*, 87, 88-90.
- JACOBI, F., WITTCHEN, H. U., HOLTING, C., HOFER, M., PFISTER, H., MULLER, N. & LIEB, R. 2004. Prevalence, co-morbidity and correlates of mental disorders in the general population: results from the German Health Interview and Examination Survey (GHS). *Psychol Med*, 34, 597-611.
- JANG, K. L., STEIN, M. B., TAYLOR, S. & LIVESLEY, W. J. 1999. Gender differences in the etiology of anxiety sensitivity: a twin study. *J Genet Specif Med.*, 2, 39-44.
- JOHNSON, P. L., SAMUELS, B. C., FITZ, S. D., FEDERICI, L. M., HAMMES, N., EARLY, M. C., TRUITT, W., LOWRY, C. A. & SHEKHAR, A. 2012. Orexin 1 receptors are a novel target to modulate panic responses and the panic brain network. *Physiol Behav*, 107, 733-42.
- JOHNSON, P. L., TRUITT, W., FITZ, S. D., MINICK, P. E., DIETRICH, A., SANGHANI, S., TRASKMAN-BENDZ, L., GODDARD, A. W., BRUNDIN, L. & SHEKHAR, A. 2010. A key role for orexin in panic anxiety. *Nat Med*, 16, 111-5.
- JOHREN, O., BRUGGEMANN, N., DENDORFER, A. & DOMINIAK, P. 2003. Gonadal steroids differentially regulate the messenger ribonucleic acid expression of pituitary orexin type 1 receptors and adrenal orexin type 2 receptors. *Endocrinology.*, 144, 1219-25. doi: 10.1210/en.2002-0030.
- JOHREN, O., NEIDERT, S. J., KUMMER, M., DENDORFER, A. & DOMINIAK, P. 2001. Prepro-orexin and orexin receptor mRNAs are differentially expressed in peripheral tissues of male and female rats. *Endocrinology.*, 142, 3324-31. doi: 10.1210/endo.142.8.8299.
- JOHREN, O., NEIDERT, S. J., KUMMER, M. & DOMINIAK, P. 2002. Sexually dimorphic expression of prepro-orexin mRNA in the rat hypothalamus. *Peptides.*, 23, 1177-80.
- KATZMAN, M. 2004. Venlafaxine in the treatment of anxiety disorders. *Expert Rev Neurother*, 4, 371-81.
- KAYABA, Y., NAKAMURA, A., KASUYA, Y., OHUCHI, T., YANAGISAWA, M., KOMURO, I., FUKUDA, Y. & KUWAKI, T. 2003. Attenuated defense response and low basal blood pressure in orexin knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 285, R581-93. doi: 10.1152/ajpregu.00671.2002. Epub 2003 May 15.
- KENNEDY, J. L., BRADWEJN, J., KOSZYCKI, D., KING, N., CROWE, R., VINCENT, J. & FOURIE, O. 1999. Investigation of cholecystokinin system genes in panic disorder. *Mol Psychiatry*, 4, 284-5.
- KESSLER, R., MCGONAGLE, K., ZHAO, S., NELSON, C., HUGHES, M., ESHLEMAN, S., WITTCHEN, H.-U. & KENDLER, K. 1994. Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States: results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry* 51, 8-19.
- KESSLER, R. C., BERGLUND, P., DEMLER, O., JIN, R., MERIKANGAS, K. R. & WALTERS, E. E. 2005. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, 62, 593-602.

- KESSLER, R. C., CHIU, W. T., JIN, R., RUSCIO, A. M., SHEAR, K. & WALTERS, E. E. 2006. The epidemiology of panic attacks, panic disorder, and agoraphobia in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, 63, 415-24.
- KLEIN, D. F. 1993. False suffocation alarms, spontaneous panics, and related conditions. An integrative hypothesis. *Arch Gen Psychiatry*, 50, 306-17.
- KLEIN, E. 2002. The role of extended-release benzodiazepines in the treatment of anxiety: a risk-benefit evaluation with a focus on extended-release alprazolam. *J Clin Psychiatry*, 63 Suppl 14, 27-33.
- KUKKONEN, J. P. 2013. Physiology of the orexinergic/hypocretinergic system: a revisit in 2012. *Am J Physiol Cell Physiol*, 304, C2-32.
- LANG, T., HELBIG-LANG, S., WESTPHAL, D., GLOSTER, A. T. & WITTCHEN, H.-U. 2012. *Expositionsbasierte Therapie der Panikstörung mit Agoraphobie*, Göttingen, Hogrefe.
- LECRUBIER, Y. 1998. The impact of comorbidity on the treatment of panic disorder. *J Clin Psychiatry*, 59 Suppl 8, 11-4; discussion 15-6.
- LIEBOWITZ, M. R., GORMAN, J. M., FYER, A. J., LEVITT, M., DILLON, D., LEVY, G., APPLEBY, I. L., ANDERSON, S., PALIJ, M., DAVIES, S. O. & ET AL. 1985. Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. *Arch Gen Psychiatry*, 42, 709-19.
- LIKHTIK, E., POPA, D., APERGIS-SCHOUTE, J., FIDACARO, G. A. & PARE, D. 2008. Amygdala intercalated neurons are required for expression of fear extinction. *Nature*, 454, 642-5.
- LIN, L., FARACO, J., LI, R., KADOTANI, H., ROGERS, W., LIN, X., QIU, X., DE JONG, P. J., NISHINO, S. & MIGNOT, E. 1999. The sleep disorder canine narcolepsy is caused by a mutation in the hypocretin (orexin) receptor 2 gene. *Cell*, 98, 365-76.
- LOCHNER, C., MOGOTSI, M., DU TOIT, P. L., KAMINER, D., NIEHAUS, D. J. & STEIN, D. J. 2003. Quality of life in anxiety disorders: a comparison of obsessive-compulsive disorder, social anxiety disorder, and panic disorder. *Psychopathology*, 36, 255-62.
- LYDIARD, R. B. 1996. Panic disorder and social phobia: possible implications of comorbid depression for drug therapy. *Anxiety*, 2, 61-70.
- MACKENZIE, T. B. & POPKIN, M. K. 1983. Organic anxiety syndrome. *Am J Psychiatry*, 140, 342-4.
- MAIER, W., LICHTERMANN, D., MINGES, J., OEHRLEIN, A. & FRANKE, P. 1993. A controlled family study in panic disorder. *J Psychiatr Res*, 27 Suppl 1, 79-87.
- MALESZKA, A., SMOLINSKA, N., NITKIEWICZ, A., KIEZUN, M., CHOJNOWSKA, K., DOBRZYN, K., JAZOWSKA, J. & KAMINSKI, T. 2013. Expression of orexin A and B in the porcine hypothalamus during the oestrous cycle. *J Physiol Pharmacol.*, 64, 55-63.
- MARON, E., HETTEMA, J. M. & SHLIK, J. 2010. Advances in molecular genetics of panic disorder. *Mol Psychiatry*, 15, 681-701. doi: 10.1038/mp.2009.145. Epub 2010 Jan 5.
- MARON, E. & SHLIK, J. 2006. Serotonin function in panic disorder: important, but why? *Neuropsychopharmacology*, 31, 1-11.
- MAROWSKY, A., YANAGAWA, Y., OBATA, K. & VOGT, K. E. 2005. A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron*, 48, 1025-37.
- MCNALLY, R. J. 2002. Anxiety sensitivity and panic disorder. *Biol Psychiatry*, 52, 938-46.

- MEERABUX, J., IWAYAMA, Y., SAKURAI, T., OHBA, H., TOYOTA, T., YAMADA, K., NAGATA, R., IRUKAYAMA-TOMOBE, Y., SHIMIZU, H., YOSHITSUGU, K., OHTA, K. & YOSHIKAWA, T. 2005. Association of an orexin 1 receptor 408Val variant with polydipsia-hyponatremia in schizophrenic subjects. *Biol Psychiatry*, 58, 401-7.
- MEURET, A. E., KROLL, J. & RITZ, T. 2017. Panic Disorder Comorbidity with Medical Conditions and Treatment Implications. *Annu Rev Clin Psychol*, 13, 209-240.
- MIEDA, M., WILLIAMS, S. C., SINTON, C. M., RICHARDSON, J. A., SAKURAI, T. & YANAGISAWA, M. 2004. Orexin neurons function in an efferent pathway of a food-entrainable circadian oscillator in eliciting food-anticipatory activity and wakefulness. *J Neurosci*, 24, 10493-501.
- MIGNOT, E. 2001. A commentary on the neurobiology of the hypocretin/orexin system. *Neuropsychopharmacology*, 25, S5-13.
- MILASTA, S., EVANS, N. A., ORMISTON, L., WILSON, S., LEFKOWITZ, R. J. & MILLIGAN, G. 2005. The sustainability of interactions between the orexin-1 receptor and beta-arrestin-2 is defined by a single C-terminal cluster of hydroxy amino acids and modulates the kinetics of ERK MAPK regulation. *Biochem J*, 387, 573-84.
- MILLER, S. A., DYKES, D. D. & POLESKY, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16, 1215.
- MO, Q., LU, S., GARIPPA, C., BROWNSTEIN, M. J. & SIMON, N. G. 2009. Genome-wide analysis of DHEA- and DHT-induced gene expression in mouse hypothalamus and hippocampus. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 114, 135-43. doi: 10.1016/j.jsbmb.2009.01.015. Epub 2009 Feb 3.
- MORIGUCHI, T., SAKURAI, T., NAMBU, T., YANAGISAWA, M. & GOTO, K. 1999. Neurons containing orexin in the lateral hypothalamic area of the adult rat brain are activated by insulin-induced acute hypoglycemia. *Neurosci Lett*, 264, 101-4.
- MUSCATELLO, M. R., SPINA, E., BANDELOW, B. & BALDWIN, D. S. 2012. Clinically relevant drug interactions in anxiety disorders. *Hum Psychopharmacol*, 27, 239-53.
- NILLNI, Y. I., TOUFEXIS, D. J. & ROHAN, K. J. 2011. Anxiety sensitivity, the menstrual cycle, and panic disorder: a putative neuroendocrine and psychological interaction. *Clin Psychol Rev.*, 31, 1183-91. doi: 10.1016/j.cpr.2011.07.006. Epub 2011 Jul 26.
- NISHINO, S., RIPLEY, B., OVEREEM, S., LAMMERS, G. J. & MIGNOT, E. 2000. Hypocretin (orexin) deficiency in human narcolepsy. *Lancet*, 355, 39-40.
- NOCON, A., WITTCHEN, H. U., BEESDO, K., BRUCKL, T., HOFER, M., PFISTER, H., ZIMMERMANN, P. & LIEB, R. 2008. Differential familial liability of panic disorder and agoraphobia. *Depress Anxiety*, 25, 422-34.
- NOLLET, M. & LEMAN, S. 2013. Role of orexin in the pathophysiology of depression: potential for pharmacological intervention. *CNS Drugs*, 27, 411-22.
- NUTT, D. J., GLUE, P., LAWSON, C. & WILSON, S. 1990. Flumazenil provocation of panic attacks. Evidence for altered benzodiazepine receptor sensitivity in panic disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 47, 917-25.
- OLESEN, J., GUSTAVSSON, A., SVENSSON, M., WITTCHEN, H. U. & JONSSON, B. 2012. The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur J Neurol*, 19, 155-62.
- OTOWA, T., HEK, K., LEE, M., BYRNE, E. M., MIRZA, S. S., NIVARD, M. G., BIGDELI, T., AGGEN, S. H., ADKINS, D., WOLEN, A., FANOUS, A., KELLER, M. C., CASTELAO, E., KUTALIK, Z., DER AUWERA, S. V., HOMUTH, G.,

- NAUCK, M., TEUMER, A., MILANESCHI, Y., HOTTENGA, J. J., DIREK, N., HOFMAN, A., UITTERLINDEN, A., MULDER, C. L., HENDERS, A. K., MEDLAND, S. E., GORDON, S., HEATH, A. C., MADDEN, P. A., PERGADIA, M. L., VAN DER MOST, P. J., NOLTE, I. M., VAN OORT, F. V., HARTMAN, C. A., OLDEHINKEL, A. J., PREISIG, M., GRABE, H. J., MIDDELDORP, C. M., PENNINX, B. W., BOOMSMA, D., MARTIN, N. G., MONTGOMERY, G., MAHER, B. S., VAN DEN OORD, E. J., WRAY, N. R., TIEMEIER, H. & HETTEMA, J. M. 2016. Meta-analysis of genome-wide association studies of anxiety disorders. *Mol Psychiatry*, 21, 1485.
- PAPP, L. A., KLEIN, D. F. & GORMAN, J. M. 1993. Carbon dioxide hypersensitivity, hyperventilation, and panic disorder. *Am J Psychiatry.*, 150, 1149-57. doi: 10.1176/ajp.150.8.1149.
- PERNA, G., CALDIROLA, D., ARANCIO, C. & BELLODI, L. 1997. Panic attacks: a twin study. *Psychiatry Res*, 66, 69-71.
- PETERSON, R. A. & REISS, S. 1992. *Anxiety Sensitivity Index Manual (2nd ed.)*, Worthington, International Diagnostic Systems.
- PEYRON, C., FARACO, J., ROGERS, W., RIPLEY, B., OVEREEM, S., CHARNAY, Y., NEVSIMALOVA, S., ALDRICH, M., REYNOLDS, D., ALBIN, R., LI, R., HUNGS, M., PEDRAZZOLI, M., PADIGARU, M., KUCHERLAPATI, M., FAN, J., MAKI, R., LAMMERS, G. J., BOURAS, C., KUCHERLAPATI, R., NISHINO, S. & MIGNOT, E. 2000. A mutation in a case of early onset narcolepsy and a generalized absence of hypocretin peptides in human narcoleptic brains. *Nat Med*, 6, 991-7.
- POHL, R., YERAGANI, V. K., BALON, R., RAINEY, J. M., LYCAKI, H., ORTIZ, A., BERCHOU, R. & WEINBERG, P. 1988. Isoproterenol-induced panic attacks. *Biol Psychiatry*, 24, 891-902.
- PORKKA-HEISKANEN, T., KALINCHUK, A., ALANKO, L., HUHTANIEMI, I. & STENBERG, D. 2004. Orexin A and B levels in the hypothalamus of female rats: the effects of the estrous cycle and age. *Eur J Endocrinol.*, 150, 737-42.
- RAINERO, I., OSTACOLI, L., RUBINO, E., GALLONE, S., PICCI, L. R., FENOGLIO, P., NEGRO, E., ROSSO, C., DE MARTINO, P., DE MARCHI, M., FURLAN, P. M. & PINESSI, L. 2011a. Association between major mood disorders and the hypocretin receptor 1 gene. *J Affect Disord.*, 130, 487-91. doi: 10.1016/j.jad.2010.10.033. Epub 2010 Nov 10.
- RAINERO, I., RUBINO, E., GALLONE, S., FENOGLIO, P., PICCI, L. R., GIOBBE, L., OSTACOLI, L. & PINESSI, L. 2011b. Evidence for an association between migraine and the hypocretin receptor 1 gene. *J Headache Pain.*, 12, 193-9. doi: 10.1007/s10194-011-0314-8. Epub 2011 Feb 23.
- REISS, S., PETERSON, R. A., GURSKY, D. M. & MCNALLY, R. J. 1986. Anxiety sensitivity, anxiety frequency and the prediction of fearfulness. *Behav Res Ther*, 24, 1-8.
- RENSING, L., KOCH, M., RIPPE, B. & RIPPE, V. 2006. *Mensch im Stress. Psyche, Körper, Moleküle*, Heidelberg, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag.
- ROBERTS, R. J. & MACELIS, D. 2011. *REBASE* [Online]. Available: <http://rebase.neb.com/rebase/enz/BsmBI.html> [Accessed 22.02.2018].
- ROBERTS, R. J., VINCZE, T., POSFAI, J. & MACELIS, D. 2015. REBASE--a database for DNA restriction and modification: enzymes, genes and genomes. *Nucleic Acids Res.*, 43, D298-9. doi: 10.1093/nar/gku1046. Epub 2014 Nov 5.
- ROTHE, C., GUTKNECHT, L., FREITAG, C., TAUBER, R., MOSSNER, R., FRANKE, P., FRITZE, J., WAGNER, G., PEIKERT, G., WENDA, B., SAND, P., JACOB, C., RIETSCHEL, M., NOTHEN, M. M., GARRITSEN, H., FIMMERS, R.,

- DECKERT, J. & LESCH, K. P. 2004. Association of a functional 1019C>G 5-HT1A receptor gene polymorphism with panic disorder with agoraphobia. *Int J Neuropsychopharmacol*, 7, 189-92.
- RUSSELL, S. H., SMALL, C. J., KENNEDY, A. R., STANLEY, S. A., SETH, A., MURPHY, K. G., TAHERI, S., GHATEI, M. A. & BLOOM, S. R. 2001. Orexin A interactions in the hypothalamo-pituitary gonadal axis. *Endocrinology*, 142, 5294-302.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-91.
- SAKURAI, T. 2007. The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nat Rev Neurosci*, 8, 171-81.
- SAKURAI, T. 2014. The role of orexin in motivated behaviours. *Nat Rev Neurosci*, 15, 719-31.
- SAKURAI, T., AMEMIYA, A., ISHII, M., MATSUZAKI, I., CHEMELLI, R. M., TANAKA, H., WILLIAMS, S. C., RICHARDSON, J. A., KOZLOWSKI, G. P., WILSON, S., ARCH, J. R., BUCKINGHAM, R. E., HAYNES, A. C., CARR, S. A., ANNAN, R. S., MCNULTY, D. E., LIU, W. S., TERRETT, J. A., ELSHOURBAGY, N. A., BERGSMA, D. J. & YANAGISAWA, M. 1998. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92, 573-85.
- SALOMON, R. M., RIPLEY, B., KENNEDY, J. S., JOHNSON, B., SCHMIDT, D., ZEITZER, J. M., NISHINO, S. & MIGNOT, E. 2003. Diurnal variation of cerebrospinal fluid hypocretin-1 (Orexin-A) levels in control and depressed subjects. *Biol Psychiatry*, 54, 96-104.
- SALVADOR-CARULLA, L., SEGUI, J., FERNANDEZ-CANO, P. & CANET, J. 1995. Costs and offset effect in panic disorders. *Br J Psychiatry Suppl*, 23-8.
- SAMOCHOWIEC, J., HAJDUK, A., SAMOCHOWIEC, A., HORODNICKI, J., STEPIEN, G., GRZYWACZ, A. & KUCHARSKA-MAZUR, J. 2004. Association studies of MAO-A, COMT, and 5-HTT genes polymorphisms in patients with anxiety disorders of the phobic spectrum. *Psychiatry Res*, 128, 21-6.
- SAREEN, J., JACOBI, F., COX, B. J., BELIK, S. L., CLARA, I. & STEIN, M. B. 2006. Disability and poor quality of life associated with comorbid anxiety disorders and physical conditions. *Arch Intern Med*, 166, 2109-16.
- SCHMIDT, H. & ROTHHÄMEL, S. 2012. In: JANSOHN, M. & ROTHHÄMEL, S. (eds.) *Gentechnische Methoden-Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Heidelberg: Springer Spektrum.
- SCHMIDT, N. B., ZVOLENSKY, M. J. & MANER, J. K. 2006. Anxiety sensitivity: prospective prediction of panic attacks and Axis I pathology. *J Psychiatr Res*, 40, 691-9. doi: 10.1016/j.jpsychires.2006.07.009. Epub 2006 Sep 7.
- SHARP, P. A., SUGDEN, B. & SAMBROOK, J. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, 12, 3055-63.
- SHIBAHARA, M., SAKURAI, T., NAMBU, T., TAKENOUCHE, T., IWAASA, H., EGASHIRA, S. I., IHARA, M. & GOTO, K. 1999. Structure, tissue distribution, and pharmacological characterization of *Xenopus* orexins. *Peptides*, 20, 1169-76.
- SILVEYRA, P., CATALDI, N. I., LUX-LANTOS, V. & LIBERTUN, C. 2009. Gonadal steroids modulated hypocretin/orexin type-1 receptor expression in a brain

- region, sex and daytime specific manner. *Regul Pept.*, 158, 121-6. doi: 10.1016/j.regpep.2009.08.002. Epub 2009 Aug 21.
- SKRE, I., ONSTAD, S., TORGENSEN, S., LYGREN, S. & KRINGLEN, E. 1993. A twin study of DSM-III-R anxiety disorders. *Acta Psychiatr Scand*, 88, 85-92.
- SMOLLER, J. W. 2014. Psychiatric genetics and the future of personalized treatment. *Depress Anxiety.*, 31, 893-8. doi: 10.1002/da.22322.
- SMOLLER, J. W., PAULUS, M. P., FAGERNESS, J. A., PURCELL, S., YAMAKI, L. H., HIRSHFELD-BECKER, D., BIEDERMAN, J., ROSENBAUM, J. F., GELENTER, J. & STEIN, M. B. 2008. Influence of RGS2 on anxiety-related temperament, personality, and brain function. *Arch Gen Psychiatry*, 65, 298-308.
- SOSMAN, J. A., KIM, K. B., SCHUCHTER, L., GONZALEZ, R., PAVLICK, A. C., WEBER, J. S., MCARTHUR, G. A., HUTSON, T. E., MOSCHOS, S. J., FLAHERTY, K. T., HERSEY, P., KEFFORD, R., LAWRENCE, D., PUZANOV, I., LEWIS, K. D., AMARAVADI, R. K., CHMIELOWSKI, B., LAWRENCE, H. J., SHYR, Y., YE, F., LI, J., NOLOP, K. B., LEE, R. J., JOE, A. K. & RIBAS, A. 2012. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med.*, 366, 707-14. doi: 10.1056/NEJMoa1112302.
- SOYA, S., SHOJI, H., HASEGAWA, E., HONDO, M., MIYAKAWA, T., YANAGISAWA, M., MIEDA, M. & SAKURAI, T. 2013. Orexin receptor-1 in the locus coeruleus plays an important role in cue-dependent fear memory consolidation. *J Neurosci*, 33, 14549-57.
- STRACHAN, T. & READ, A. 2011. *Human Molecular Genetics, Fourth Edition*, New York, USA, Garland Science.
- SULLIVAN, G. M., COPLAN, J. D., KENT, J. M. & GORMAN, J. M. 1999. The noradrenergic system in pathological anxiety: a focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. *Biol Psychiatry*, 46, 1205-18.
- SUNG, S. C., RUSH, A. J., EARNEST, A., LIM, L. E. C., PEK, M. P. P., CHOI, J. M. F., NG, M. P. K. & ONG, M. E. H. 2018. A Brief Interview to Detect Panic Attacks and Panic Disorder in Emergency Department Patients with Cardiopulmonary Complaints. *J Psychiatr Pract*, 24, 32-44.
- SUZUKI, M., BEUCKMANN, C. T., SHIKATA, K., OGURA, H. & SAWAI, T. 2005. Orexin-A (hypocretin-1) is possibly involved in generation of anxiety-like behavior. *Brain Res.*, 1044, 116-21. doi: 10.1016/j.brainres.2005.03.002. Epub 2005 Apr 12.
- SZABO, S. T., DE MONTIGNY, C. & BLIER, P. 2000. Progressive attenuation of the firing activity of locus coeruleus noradrenergic neurons by sustained administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *Int J Neuropsychopharmacol*, 3, 1-11.
- TAHERI, S., MAHMOODI, M., OPACKA-JUFFRY, J., GHATEI, M. A. & BLOOM, S. R. 1999. Distribution and quantification of immunoreactive orexin A in rat tissues. *FEBS Lett.*, 457, 157-61.
- TAYLOR, S. E., KLEIN, L. C., LEWIS, B. P., GRUENEWALD, T. L., GURUNG, R. A. & UPDEGRAFF, J. A. 2000. Biobehavioral responses to stress in females: tend-and-befriend, not fight-or-flight. *Psychol Rev.*, 107, 411-29.
- THOMPSON, M. D., XHAARD, H., SAKURAI, T., RAINERO, I. & KUKKONEN, J. P. 2014. OX1 and OX2 orexin/hypocretin receptor pharmacogenetics. *Front Neurosci*, 8, 57.
- VIELAND, V. J., GOODMAN, D. W., CHAPMAN, T. & FYER, A. J. 1996. New segregation analysis of panic disorder. *Am J Med Genet.*, 67, 147-53. doi: 10.1002/(SICI)1096-8628(19960409)67:2<147::AID-AJMG4>3.0.CO;2-P.

- WEISSMAN, M. M., BLAND, R. C., CANINO, G. J., FARAVELLI, C., GREENWALD, S., HWU, H. G., JOYCE, P. R., KARAM, E. G., LEE, C. K., LELLOUCH, J., LEPINE, J. P., NEWMAN, S. C., OAKLEY-BROWNE, M. A., RUBIO-STIPEC, M., WELLS, J. E., WICKRAMARATNE, P. J., WITTCHEN, H. U. & YEH, E. K. 1997. The cross-national epidemiology of panic disorder. *Arch Gen Psychiatry.*, 54, 305-9.
- WELT, T., ENGELMANN, M., RENNER, U., ERHARDT, A., MULLER, M. B., LANDGRAF, R., HOLSBOER, F. & KECK, M. E. 2006. Temazepam triggers the release of vasopressin into the rat hypothalamic paraventricular nucleus: novel insight into benzodiazepine action on hypothalamic-pituitary-adrenocortical system activity during stress. *Neuropsychopharmacology*, 31, 2573-9.
- WELTGESUNDHEITSORGANISATION (WHO) 2018. Deutsche Fassung des International Classification of Diseases (ICD-10)
- WILLIAMS, R. H., JENSEN, L. T., VERKHRATSKY, A., FUGGER, L. & BURDAKOV, D. 2007. Control of hypothalamic orexin neurons by acid and CO₂. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 10685-90.
- WITTCHEN, H.-U. & HOYER, J. 2011. *Klinische Psychologie & Psychotherapie*, Berlin Heidelberg, Springer.
- WITTCHEN, H.-U., ZAUDIG, M. & FYDRICH, T. 1997. *Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV*, Göttingen, Hogrefe.
- WITTCHEN, H. U., HEINIG, I. & BEESDO-BAUM, K. 2014. [Anxiety disorders in DSM-5: an overview on changes in structure and content]. *Nervenarzt*, 85, 548-52.
- WITTCHEN, H. U. & JACOBI, F. 2005. Size and burden of mental disorders in Europe--a critical review and appraisal of 27 studies. *Eur Neuropsychopharmacol*, 15, 357-76.
- WITTCHEN, H. U., JACOBI, F., REHM, J., GUSTAVSSON, A., SVENSSON, M., JONSSON, B., OLESEN, J., ALLGULANDER, C., ALONSO, J., FARAVELLI, C., FRATIGLIONI, L., JENNUM, P., LIEB, R., MAERCKER, A., VAN OS, J., PREISIG, M., SALVADOR-CARULLA, L., SIMON, R. & STEINHAUSEN, H. C. 2011. The size and burden of mental disorders and other disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol*, 21, 655-79.
- WOLDAN-TAMBOR, A., BIEGANSKA, K., WIKTOROWSKA-OWCZAREK, A. & ZAWILSKA, J. B. 2011. Activation of orexin/hypocretin type 1 receptors stimulates cAMP synthesis in primary cultures of rat astrocytes. *Pharmacol Rep*, 63, 717-23.
- WOODS, S. W., CHARNEY, D. S., SILVER, J. M., KRYSTAL, J. H. & HENINGER, G. R. 1991. Behavioral, biochemical, and cardiovascular responses to the benzodiazepine receptor antagonist flumazenil in panic disorder. *Psychiatry Res*, 36, 115-27.
- YAMANAKA, A., BEUCKMANN, C. T., WILLIE, J. T., HARA, J., TSUJINO, N., MIEDA, M., TOMINAGA, M., YAGAMI, K., SUGIYAMA, F., GOTO, K., YANAGISAWA, M. & SAKURAI, T. 2003. Hypothalamic orexin neurons regulate arousal according to energy balance in mice. *Neuron*, 38, 701-13.
- YIN, J., MOBAREC, J. C., KOLB, P. & ROSENBAUM, D. M. 2015. Crystal structure of the human OX2 orexin receptor bound to the insomnia drug suvorexant. *Nature.*, 519, 247-50. doi: 10.1038/nature14035. Epub 2014 Dec 22.
- YONKERS, K., ZLOTNICK, C., ALLSWORTH, J., WARSHAW, M., SHEA, T. & KELLER, M. 1998. Is the course of panic disorder the same in women and men? *Am J Psychiatry*, 155, 596-602.
- YONKERS, K. A., BRUCE, S. E., DYCK, I. R. & KELLER, M. B. 2003. Chronicity, relapse, and illness--course of panic disorder, social phobia, and generalized

Literaturverzeichnis

- anxiety disorder: findings in men and women from 8 years of follow-up. *Depress Anxiety*, 17, 173-9.
- ZHU, Y., MIWA, Y., YAMANAKA, A., YADA, T., SHIBAHARA, M., ABE, Y., SAKURAI, T. & GOTO, K. 2003. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J Pharmacol Sci.*, 92, 259-66.
- ZOBEL, A. & MAIER, W. 2004. [Endophenotype--a new concept for biological characterization of psychiatric disorders]. *Nervenarzt*, 75, 205-14.
- ZWANZGER, P. & DECKERT, J. 2007. [Anxiety disorders. Causes, clinical picture and treatment]. *Nervenarzt*, 78, 349-59; quiz 360.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. J. Deckert für die freundliche Überlassung des Themas.

Frau Prof. Dr. Dr. med. K. Domschke M.A. (USA) für die hervorragende Betreuung der Arbeit und zahlreiche lehrreiche Diskussionen.

Frau Dr. C. Ziegler und Herrn Dr. M. Gottschalk für die intensive und persönliche Betreuung sowie die ausgezeichnete fachliche Anleitung, Unterstützung und Förderung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau Dr. C. Ziegler und Frau C. Gagel für die geduldige und freundschaftliche Anleitung und Betreuung im Labor.

allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie des Universitätsklinikums Würzburgs für die unkomplizierte Zusammenarbeit und das harmonische Arbeitsklima.

meiner Familie für die liebevolle Unterstützung in jeder Lebenslage.

Die Studie wurde als Teil des deutschen Forschungsnetzwerks "PANIC-NET" im Rahmen einer Förderung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) ermöglicht.