

Aus dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchungen der tri-/quatroallelen
Serotonintransporter-Promoter-Region (5-HTTLPR)
auf Assoziation mit depressions-relevanten Phänotypen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kathrin Elke Helene Gels

aus Lingen (Ems)

Gutachter: 1. Prof. Dr. K. Sperling

2. Prof. Dr. med. K. P. Lesch

3. Prof. Dr. Th. G. Schulze

Datum der Promotion: 05.Juni 2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Einführung – Aktuelle Entwicklung der Molekulargenetik	1
1.2 Psychiatrische Genetik	2
1.2.1 Grundlagen von Persönlichkeitsmerkmalen und psychiatrischen Erkrankungen	3
1.2.1.1 Neurotizismus – ein Angst-assoziiertes Persönlichkeitsmerkmal	3
1.2.1.2 Affektive Störungen.....	4
1.2.1.3 Schizophrenie	5
1.2.1.4 Suchterkrankungen	6
1.3 Bedeutung des serotonergen Systems in der psychiatrischen Genetik	6
1.3.1 Serotonin	6
1.3.2 Der humane Serotonintransporter (SLC6A4, 5-HTT)	7
1.3.2.1 5-HTTLPR (Serotonin Transporter Linked Polymorphic Region)	8
1.3.2.1.1 Bedeutung von 5-HTTLPR	8
1.3.2.1.2 Allelfrequenzen in Populationen unterschiedlicher Ethnizität	10
1.3.2.1.3 5-HTTLPR und Persönlichkeitsmerkmale / psychiatrische Erkrankungen	10
1.3.2.2 rs 25531 – Funktionaler A→G SNP.....	12
1.2 Zielsetzung dieser Arbeit	14
2 Material und Methode	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien.....	16
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	16
2.1.3 Kits.....	17
2.1.4 Enzyme	17
2.1.5 Primer.....	17
2.1.6 Microarrays	17
2.1.7 Sonstige Materialien.....	18
2.1.8 Geräte	18
2.2 Methoden	19

2.2.1 Studiendesign	19
2.2.1.1 Michigan Longitudinal Studie	19
2.2.1.2 Tecumseh Blutdruck Programm	20
2.2.1.3 Bipolar Studie	21
2.2.1.4 Pritzker Projekt.....	22
2.2.1.5 Alkoholismus Studie	23
2.2.1.6 Studie zu Heroinabusus	23
2.2.2 Genotypisierung	24
2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA	24
2.2.2.2 Herstellung von DNA-Arbeitsplatten	24
2.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese I	25
2.2.2.5 RFLP (Restriktions Fragment Längenpolymorphismus)	26
2.2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese II.....	26
2.2.2.7 DNA Sequenzierung	26
2.2.3 Genexpressionsanalyse	27
2.2.4 Statistische Analyse	29
2.2.4.1 Überprüfung nach Mendelschen Regeln	29
2.2.4.2 Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE)	29
2.2.4.3 Frequenz- und Assoziationsanalyse	30
2.2.4.4 Kopplungsungleichgewicht (LD)	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Etablierung der Genotypisierungsmethode für 5-HTTLPR und rs25531 ...	32
3.2 Genotypisierungsergebnis	35
3.2.1 Tabellarische Übersicht der Genotypisierungsergebnisse	35
3.3 Populationsgenetische Analyse	38
3.3.1 Frequenzanalyse in unterschiedlichen Populationen	38
3.3.2 Kopplungsungleichgewicht	39
3.4 Assoziation zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und Persönlichkeitsmerkmalen	40
3.4.1 Michigan Longitudinal Studie	40
3.4.2 Tecumseh Studie	46

3.4.3 Gemeinsame Analyse von Michigan Longitudinal Studie und Tecumseh Studie	48
3.4.4 Alkoholismus Studie.....	49
3.5 Analyse der Genotypenfrequenz bei psychiatrischen Erkrankungen	51
3.5.1 Bipolar Studie.....	51
3.5.2 Pritzker Projekt.....	52
3.5.2 Studie zu Heroinabusus	53
3.6 Moderation des Einflusses stressvoller Lebensereignisse auf die Vulnerabilität für Depression durch 5-HTTLPR	54
3.7 Expressionsanalyse	60
3.7.1 5-HTT-Expression in Lymphoblastoidzelllinien	60
3.7.2 5-HTT-Expression in humanem post mortem Hirngewebe	62
4 Diskussion	67
4.1 Evaluierung der Genotypisierung.....	67
4.1.1 Allelhäufigkeiten in unterschiedlichen ethnischen Populationen	69
4.2 Genetische Assoziationsstudien	71
4.2.1 Assoziation zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und Persönlichkeitsmerkmalen.....	72
4.2.2 Assoziation zwischen Genotyp und psychiatrischen Erkrankungen..	75
4.2.3 Moderation des Einflusses stressvoller Lebensereignisse auf die Vulnerabilität für Depression durch 5-HTTLPR.....	76
4.3 Expressionsanalyse	77
4.3.1 5-HTT-Expression in Lymphoblastoidzelllinien	77
4.3.2 5-HTT-Expression in humanem post mortem Hirngewebe	78
4.4 Schlussfolgerungen	81
5 Zusammenfassung.....	83
6 Abkürzungen.....	85
7 Abbildungsverzeichnis	88
7.1 Abbildungen	88
7.2 Tabellen.....	89

8 Literaturverzeichnis	91
9 Anhang	102
9.1 Danksagung	102
9.2 Lebenslauf	103
9.3 Eidesstattliche Erklärung	104

1 Einleitung

1.1 Einführung - Aktuelle Entwicklung der Molekulargenetik

Die Molekulargenetik hat in den vergangenen Jahrzehnten eine nahezu beispiellose Entwicklung genommen. Zu Recht wird das 20. Jahrhundert daher als „Jahrhundert des Gens“ bezeichnet.¹ Um 1900 entdeckte man die Mendelschen Gesetze wieder. 1953 beschrieben James Watson und Francis Crick die Struktur des Erbgutes, der Desoxyribonukleinsäure (DNA). 50 Jahre später - im April 2003 wurde ein weiterer Meilenstein mit der Vollendung des Humangenomprojektes erreicht. Es handelt sich dabei um die Bestimmung der Abfolge der einzelnen Bausteine des Erbgutes und damit um die Erstellung einer genetischen Karte des Menschen mit der höchsten Auflösung überhaupt. Auch die Neuro- und Psychowissenschaften zeigen starke Präsenz im wissenschaftlichen und öffentlichen Diskurs, wobei die Verknüpfung der Ergebnisse aus Hirnforschung und Genetik eine der aktuellen Herausforderungen darstellt.

Obwohl zwei nicht verwandte Menschen rund 99.9% ihrer DNA Sequenzen gemeinsam haben, sind die verbleibenden 0.1% jene genetische Varianz, die von Bedeutung für individuelle Unterschiede im Krankheitsrisiko ist.

Bereiche der DNA-Sequenz, in denen Individuen sich in einer einzigen Base unterscheiden, bezeichnet man als Einzelnukleotidpolymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism; SNP), die möglichen Varianten, normalerweise zwei, als Allele. In menschlichen Populationen finden sich etwa 10 Millionen SNPs, wobei dem selteneren SNP-Allel definitionsgemäß eine Frequenz von mindestens 1% in wenigstens einer Population zukommt. Derartige Varianten der DNA-Sequenz können Einfluss auf die Genfunktion und -expression haben. Mehrere miteinander assoziierte SNPs in einer Chromosomenregion, die gemeinsam vererbt werden, werden als Haplotyp bezeichnet.

Als Kopplungsungleichgewicht (Linkage Disequilibrium; LD) wird in der Populationsgenetik die nicht zufällige Assoziation zweier Allele oder mehrerer Loci, die nicht notwendigerweise auf demselben Chromosom lokalisiert sind, beschrieben.

Genetisch (mit-) bedingte Krankheiten lassen sich generell in zwei Kategorien unterteilen: Mendelnde (monogene) und komplexe Krankheiten. Während mendelnde Krankheiten ein dominantes oder rezessives, autosomales oder X-chromosomales Vererbungsmuster zeigen, kann bei komplexen Krankheiten das Wiederholungsrisiko nur empirisch bestimmt werden, da es sich um ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Gene und verschiedenster Umweltfaktoren handelt, wobei auch stochastische Ereignisse (Zufall) durchaus zu berücksichtigen sind. Komplexe Krankheiten weisen eine hohe Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung auf und zeigen eine erhebliche Variabilität im Ausprägungsgrad der Erkrankung. Des Weiteren finden sich bei komplexen Krankheiten betroffene Individuen nicht selten sowohl in mütterlicher als auch in väterlicher Abstammungslinie.²

1.2 Psychiatrische Genetik

**„Vor allem muss man sich klar machen, daß diese alte Wahrheit von keiner Seite bezweifelt wurde: man streitet nicht über die Erbllichkeit selber, sondern nur über die Art und das Maß in welchem sie stattfindet.“
Sir Thomas Clouston,
Leiter der Edinburger Nervenheilanstalt, 1908¹**

Vergleichsstudien monozygoter und dizygoter Zwillinge sowie Adoptionsstudien haben zunächst im frühen 20. Jahrhundert die Grundlage für die Annahme einer genetischen Komponente psychiatrischer Krankheiten gelegt, die dann in den 50er und 60er Jahren durch große epidemiologische Studien erweitert wurde.

Bemerkenswert ist, dass trotz der erfolgreichen Entschlüsselung der Basensequenz des menschlichen Genoms bis 2002 außerhalb der HLA Genregion erst weniger als 10 Assoziationen zwischen SNPs und komplexen Krankheiten gefunden wurden.^{3,4} Dies hat sich erst im Zuge der Durchführung großer Studien geändert, bei denen zunächst mindestens 100 000 SNPs/Proband getestet wurden. Bis Anfang 2009 konnten auf diese Weise etwa 250 Loci postuliert werden, die aber längst nicht alle replizierbar waren.

¹ Clouston, T, „Die Gesundheitspflege des Geistes“, Ernst Reinhardt, Verlagsbuchhandlung München 1908, S.58

Derzeit liegt die Bedeutung dieser Untersuchungen aber weniger in dem (in der Regel sehr geringen) prädiktiven Wert der gefundenen Assoziation sondern in einem besseren Verständnis der Pathogenese komplexer Krankheiten.⁵ Offensichtlich ist, dass es komplexe Vererbungsmuster sind, die bei der Ausprägung von Charaktereigenschaften und psychiatrischen Krankheiten eine Rolle spielen.

1.2.1 Grundlagen von Persönlichkeitsmerkmalen und psychiatrischen Erkrankungen

Der Diagnose psychiatrischer Krankheiten liegt ein Internationales Klassifikationssystem in zehnter Edition (International Classification of Diseases; ICD-10) der Weltgesundheitsorganisation (WHO), sowie das ‚Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders‘ der ‚American Psychiatric Association‘ in vierter Auflage (DSM-IV) zugrunde, welches in der amerikanischen Psychiatrie verbindlich ist und sich auch in der internationalen wissenschaftlichen Literatur weitgehend durchgesetzt hat. Da diese Arbeit im US-amerikanischen Raum angefertigt worden ist, orientierte sich die Diagnosestellung vorwiegend an den DSM-IV Leitlinien. Als Instrumentarien zur numerischen Einschätzung von Merkmalsausprägung bzw. Krankheitsschwere wurden standardisierte Persönlichkeitstests und die Hamilton Depressionsskala eingesetzt.

1.2.1.1 Neurotizismus - ein Angst-assoziiertes Persönlichkeitsmerkmal

Der Begriff des Neurotizismus entstammt ursprünglich der Persönlichkeitspsychologie. Zusammen mit den Merkmalen Extroversion, Offenheit für Erfahrungen sowie Verträglichkeit und Gewissenhaftigkeit bildet er die sogenannten „Big Five“, die als die fünf Hauptdimensionen der menschlichen Persönlichkeit angesehen werden.⁶ Basierend auf diesem Fünf-Faktoren-Modell (Five Factor Model; FFM) sind Persönlichkeitstests wie der NEO-PI, NEO-PI-R und NEO-FFI entwickelt worden.

Der 181 Fragebogenelemente beinhaltende NEO-PI (NEO-Persönlichkeits-Inventar) untersucht die fünf Persönlichkeitsmerkmale und gibt Werte für die fünf Domänen Neurotizismus (N), Extroversion (E) Offenheit für Erfahrungen (O), Verträglichkeit (A von *agreeableness*) und Gewissenhaftigkeit (C von *conscientiousness*) an. Die Werte der drei NEO-Domänen werden durch Teilwerte von je sechs Facetten repräsentiert. Der NEO-PI-R

stellt eine überarbeitete, 240 Fragen beinhaltende Testversion dar, die auch für die Domänen Verträglichkeit und Gewissenhaftigkeit Facettenwerte errechnen lässt. Diese Testversion zeichnet sich durch eine hohe Validität, sowie interne Konsistenz und Retest Reliabilität aus.⁶ Der NEO-FFI (NEO-Fünf-Faktor-Inventar) stellt eine 60 Fragen umfassende und somit kürzere Testfassung dar, untersucht dieselben Variablen, erlaubt aber wegen der geringeren Anzahl an Fragen keine Unterteilung der Domänen in Facetten. Das Konstrukt des Neurotizismus spiegelt individuelle Unterschiede der emotionalen Stabilität wieder. Im Kern beschreibt die Dimension des Neurotizismus den Umgang mit und die Verarbeitung von Emotionen, insbesondere von negativen Emotionen. Hohe Neurotizismuswerte gehen dabei mit geringerer emotionaler Stabilität einher und sind oft assoziiert mit Angst, gedrückter Stimmung, Verletzlichkeit und Feindseligkeit.⁷ Neurotizismus gilt als quantitatives Merkmal, das starke Assoziationen zu Krankheiten des depressiven Formenkreises zeigt.⁸ Hohe Neurotizismuswerte gelten als Prädiktor für Major Depression bei Patienten ohne familiäre Häufung affektiver Störungen.⁹

Neurotizismus ist ein Persönlichkeitsmerkmal, das in der Verhaltensgenetik intensiv untersucht worden ist. Ebenfalls als Angst-assoziiertes Persönlichkeitsmerkmal gilt die ‚Harm Avoidance‘, die mittels der von Cloninger entwickelten Persönlichkeitsfragebögen des ‚Temperament and Character Inventory‘ (TCI) und des ‚Tridimensional Personality Questionnaire‘ (TPQ) ermittelt werden.^{10,11} Für die beiden Persönlichkeitsmerkmale ist eine Korrelation von 0.55 beschrieben.¹² Zwillingsstudien haben ergeben, dass individuellen Angst-assoziierten Persönlichkeitsmerkmalen eine erbliche Komponente von 40 – 60% zukommt.¹³

1.2.1.2 Affektive Störungen

Die Major Depression (MDD) und die Bipolare Störung (BP) zählen zu den affektiven Störungen, die durch pathologische Veränderungen der Stimmungslage gekennzeichnet sind. Die Lebensprävalenz für Major Depression liegt bei ungefähr 10 - 15%, die der selteneren Bipolaren Störung bei etwa 0.8 – 2.6%.

Die Major Depression ist klinisch oft gekennzeichnet durch einen unipolaren Symptomkomplex aus gedrückter Stimmung sowie Antriebs- und Interesselosigkeit. Die Symptomatik ist oft vielschichtig und interindividuell unterschiedlich.

Bei der Bipolaren Störung treten neben Episoden depressiver Verstimmung auch manische Phasen auf. Diese sind oftmals geprägt durch eine gehobene Stimmung mit gesteigertem Antrieb. Der Verlust normaler sozialer Hemmungen kann zu einem leichtsinnigen, rücksichtslosen oder in Bezug auf die Umstände unpassenden und persönlichkeitsfremden Verhalten führen. Manische Episoden können zudem mit psychotischen Symptomen, meist Wahnvorstellungen oder Halluzinationen, einhergehen. Bei Patienten mit affektiven Störungen finden sich vielfach erhöhte Suizidraten.¹⁴ Die in der klinischen Forschung überwiegend gebrauchte Skala zur Beurteilung der Schwere einer Depression ist die Hamilton-Skala (Hamilton rating scale for depression; HAM-D). Es handelt sich um eine Fremdbeurteilungsskala, deren Ergebnis einen Zahlenwert angibt. Ein Resultat von 15 bis 18 wird als milde bis mittelschwere Depression gewertet. Schwer depressive Patienten erreichen üblicherweise einen Wert von 25 oder mehr.¹⁵ Sullivan et al. beschreiben in einer im Jahre 2000 vorgenommenen Metaanalyse, dass sich in Zwillings- und Familienstudien eine familiäre Häufung von Major Depression zeigt.¹⁶ Das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Verwandtschaftsgrad an. Insgesamt schätzen sie die Heritabilität der Major Depression auf 31 - 42 %. Die Bipolare Störung besitzt eine geschätzte Heritabilität von 59 - 87% mit Konkordanzraten von 67% in monozygoten und 20% in dizygoten Zwillingen und Verwandten ersten Grades.^{17,18,19}

1.2.1.3 Schizophrenie

Der Begriff Schizophrenie wurde im Jahre 1907 durch den Schweizer Psychiater Eugen Bleuler geprägt. Bezogen auf die Gesamtbevölkerung besitzt die Schizophrenie eine Auftretensfrequenz von 0.6 – 1%.²⁰ Die schizophrenen Störungen sind im Allgemeinen durch grundlegende und charakteristische Störungen von Denken und Wahrnehmung sowie inadäquate oder verflachte Affekte gekennzeichnet. Die Bewusstseinsklarheit und intellektuellen Fähigkeiten sind in der Regel nicht beeinträchtigt, obwohl sich im Laufe der Zeit gewisse kognitive Defizite entwickeln können. In der Ätiologie der Schizophrenie wird der Heritabilität der Krankheit hohe Bedeutung beigemessen. Metaanalysen gehen von einem Wert von bis zu 70 % aus.^{21,22}

1.2.1.4 Suchterkrankungen

Suchterkrankungen umfassen ein weites Spektrum von Krankheiten. Eine Gemeinsamkeit besteht im Konsum psychotroper Substanzen, der zu einer Gesundheitsschädigung führt. Als Abhängigkeitssyndrom wird nach ICD 10 in diesem Zusammenhang eine Gruppe von Verhaltens-, kognitiven und körperlichen Phänomenen, die sich nach wiederholtem Substanzgebrauch entwickeln, definiert. Suchterkrankungen gehören zu den psychiatrischen Erkrankungen mit der höchsten erblichen Komponente. Groß angelegte Kohortenstudien mit Zwillingen ergaben Schätzungen der Heritabilität von 39 % für Halluzinogene, 64 % für Alkohol und 72 % für Kokain.²³

Gemein ist den verschiedenen psychiatrischen Erkrankungen die Beschreibung von Dysregulationen im Metabolismus der Neurotransmitter Serotonin, Dopamin, sowie der Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin. Nicht zuletzt aus dieser Beobachtung resultiert, dass Kandidatengene für psychiatrische Erkrankungen Rezeptoren, Transporter und Enzyme codieren, die mit entsprechenden Neurotransmittern wechselwirken.

1.3 Bedeutung des serotonergen Systems in der psychiatrischen Genetik

1.3.1 Serotonin

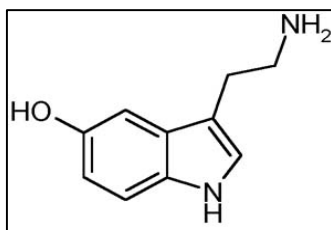


Abbildung 1:
Strukturformel Serotonin

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist ein biogenes Amin, welches über die Zwischenstufe des 5-Hydroxytryptophan ausgehend von der Aminosäure L-Tryptophan synthetisiert wird. 90% des Gehaltes an Serotonin finden sich beim Menschen in den enterochromaffinen Zellen der Darmmukosa, die restlichen 10% verteilen sich auf Gehirn, Thrombozyten und Mastzellen. Serotonin wirkt als peripherer und als zentraler Neurotransmitter.

Im Zentralen Nervensystem (ZNS) stellt Serotonin einen der Hauptneurotransmitter dar. Die Somata der serotonergen Neurone finden sich in den beiden mesencephal gelegenen Raphekernen, dem größeren Nucleus raphe dorsalis und dem etwas kleineren Nucleus

raphe medianus. Von dort reichen die serotonergen Neurone in verschiedene Hirnregionen. Die Fasern des Nucleus raphe dorsalis projizieren in erster Linie zum Striatum, Frontalcortex, lateralem Septum, Amygdala und medialem Hippocampus. Die Projektionen des Nucleus raphe medianus reichen zum Hypothalamus, medianem Septum, sowie dorsalem und ventralem Hippocampus. Im ZNS wird Serotonin im Soma der Nervenzelle synthetisiert und gelangt durch axonalen Transport in das Gebiet der Präsynapse, wo es vesikulär gespeichert wird. Wird Serotonin bei Erregung der Zelle in den synaptischen Spalt freigesetzt, bindet es an unterschiedliche prä- und postsynaptisch gelegene Rezeptoren. Zurzeit sind insgesamt 19 5-HT-Rezeptoren, klassifiziert in sieben Familien, bekannt. Durch die Stimulation präsynaptischer 5-HT-_{1A}-Rezeptoren gelangt Serotonin durch den selektiven Transporter 5-HTT, auf den im Folgenden eingegangen wird, zurück in das Neuron.²⁴

1.3.2 Der humane Serotonintransporter (*SLC6A4*, 5-HTT)

SLC6A4 (solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4) ist das Gen des humanen Serotonintransporters, zugehörig zu der Familie der Monoamintransporter. Neben dem offiziellen Namen *SLC6A4* finden sich in der Literatur weitere Bezeichnungen, von denen 5-HTT, HTT (von 5-Hydroxytryptamintransporter) und SERT (von Serotonintransporter) die prominentesten sind.

SLC6A4 kartiert im menschlichen Genom auf dem langen Arm von Chromosom 17, an der Stelle 17q11.1-q12. Es besteht aus 14 Exons, die etwa 35 Kilobasen (kb) umfassen.^{20,25} Der Promoter weist eine TATA-Box auf und mehrere potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren.²⁶

Das 5-HTT Gen codiert ein integrales, präsynaptisch gelegenes 12-Membranprotein (vgl. Abb. 2), das für den Rücktransport des Neurotransmitters Serotonin aus dem synaptischen Spalt in das präsynaptische Neuron verantwortlich ist. Die Wirkung des Serotonins wird damit beendet und eine natriumabhängige Wiederverwertung des Serotonins als Neurotransmitter eingeleitet.

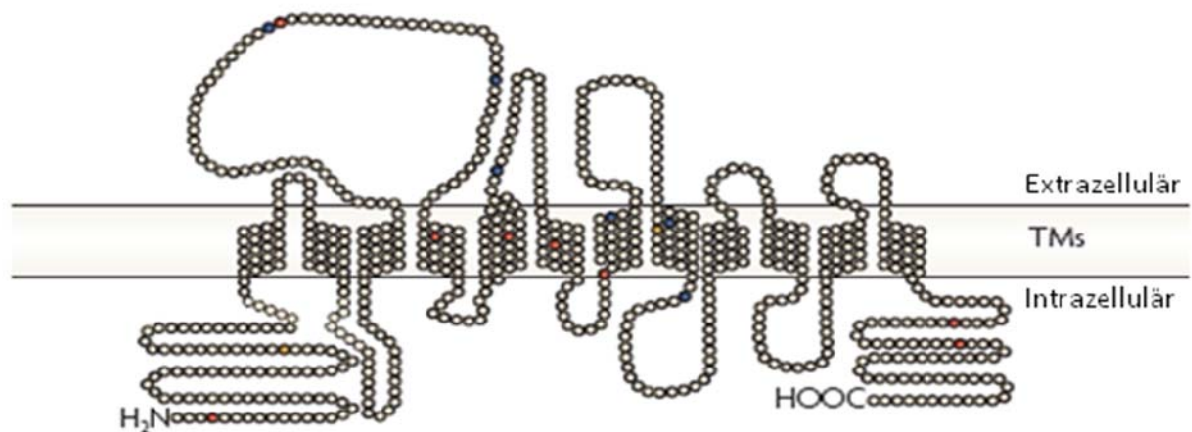


Abbildung 2: 5-HTT - Schematische Darstellung des humanen Serotonintransporters

Serotonintransporterprotein mit 12 Transmembransegmenten (TMs) (nach Murphy und Lesch, 2007)

Der Serotonintransporter wird exprimiert in Membranen von Neuronen, aber auch in Thrombozyten sowie Plazenta- und Lungengewebe.²⁷

In der Behandlung psychiatrischer Erkrankungen ist der Serotonintransporter von entscheidender Bedeutung, da serotonerge Antidepressiva hier wirksam sind. Zudem ist er als Angriffspunkt verschiedener psychomotorischer Stimulantien bekannt.

Kartierung und Identifizierung des humanen Serotonintransporters durch Ramaamorthy et al. 1993 haben zur Identifizierung einer Anzahl polymorpher Regionen innerhalb des Gens geführt, die zum Teil Wirkung auf die Genexpression und die Aktivität des Serotonintransporters haben.²⁷

1.3.2.1 5-HTTLPR (Serotonin Transporter Linked Polymorphic Region)

1.3.2.1.1 Bedeutung von 5-HTTLPR

5-HTTLPR ist ein Insertions/Deletions – Polymorphismus, der in der Promoterregion von 5-HTT lokalisiert ist und aus einer GC-reichen imperfekten Wiederholungssequenz von 20-23 Basenpaaren besteht. Durch die Insertions/Deletion (In/Del) kommt es zur Entstehung eines kürzeren S-Allels, bestehend aus 14 Wiederholungen und eines längeren L-Allels mit 16 Wiederholungen (vgl. Abb. 3).²⁶

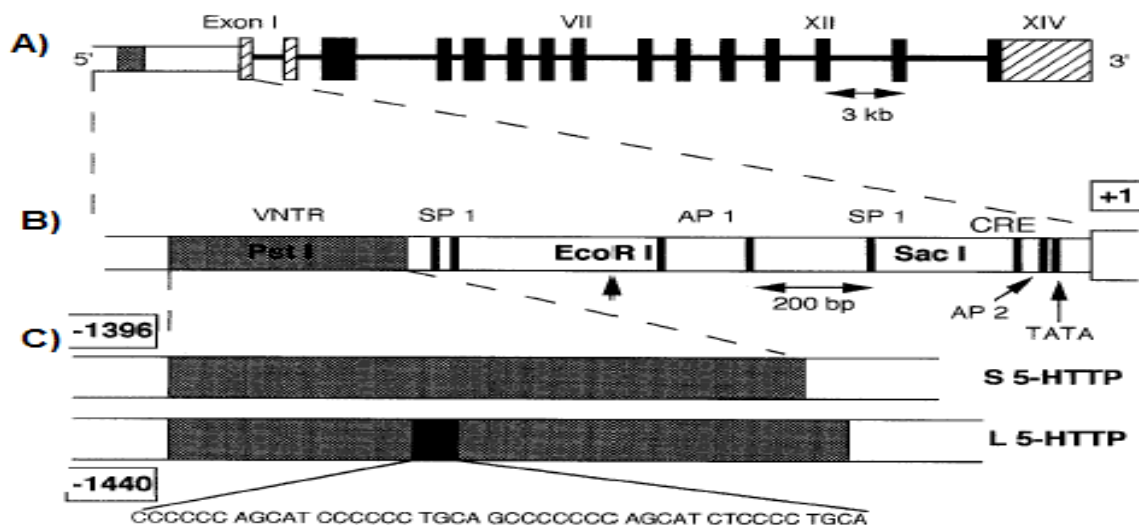


Abbildung 3: Humanes Serotonintransportergen (nach Heils et al. 1997)

- A) Organisation des Gens und der 5`-regulatorischen Promoterregion
- B) 5-HTT-Promoterregion, definiert durch TATA-Motiv, potentielle Bindungsstelle von Transkriptionsfaktoren, wie SP1, AP1, AP2
- C) Insertions-Deletions-Polymorphismus 5-HTTLPR – Darstellung von S- und L-Allel

In vitro Studien haben gezeigt, dass das kurze S- und das lange L-HTTLPR-Allel die Promoteraktivität und somit auch die 5-HTT-Genexpression unterschiedlich beeinflussen. Der Effekt der 5-HTTLPR-Längenvariabilität auf die Serotonintransporterfunktion wurde bestimmt durch Untersuchen des Verhältnisses zwischen 5-HTTLPR-Genotyp, 5-HTT-Transkription und 5-HT-Aufnahmeaktivität in humanen lymphoblastoiden Zelllinien. Homozygote Zellen für das L-Allel zeigten höhere mRNA-Raten als Zellen mit einem oder zwei der kürzeren S-Allele.²⁸ Zudem erwies sich die Rate der spezifischen 5-HT-Aufnahme mehr als doppelt so hoch in Zellen, die homozygot für das L-Allel, als in Zellen, die homo- oder heterozygot für das S-Allel von 5-HTTLPR waren.² Eine Studie zu mRNA-Konzentrationen in den Raphekernen in menschlichem post mortem Hirngewebe berichtete höhere mRNA-Konzentrationen bei Probanden mit LL-Genotyp als bei Trägern von einem oder zwei S-Allelen.²⁹ Eine *in vivo* Bildgebungsstudie des menschlichen Mittelhirns bestätigte, die Assoziation des S-Allels mit geringeren 5-HTT-Expressionsraten.³⁰

Eine Reihe von Publikationen beschreibt jedoch, dass keine Korrelation zwischen 5-HTTLPR-Allelen und 5-HTT-Expressionsraten gefunden wurde.^{31,32,33}

1.3.2.1.2 Allelfrequenzen in Populationen unterschiedlicher Ethnizität

Die 5-HTTLPR Allelfrequenzen unterscheiden sich in verschiedenen ethnischen Gruppen. In Populationen mit europäischem Hintergrund liegt die Allelfrequenz für das L-Allel bei ungefähr 0.6 gegenüber 0.4 für das S-Allel. Populationen afrikanischen Ursprungs zeigen eine höhere Frequenz des L-Allels mit mehr als 0.7. Bei Asiaten ist dagegen eine deutlich höhere Auftretenswahrscheinlichkeit des S-Allels mit 0.8 gegenüber dem L-Allel mit etwa 0.2 zu finden.³⁴

Zusätzlich zu den bekannten S- und L- Allelen wurden weitere, selten auftretende Formen gefunden. Beschrieben sind unter anderen Allelformen mit 18- und 20 Wiederholungen, die in der Literatur als VL und XL bezeichnet werden. Der Großteil dieser seltenen Allelformen ließ sich bisher nur bei Asiaten und Afrikanern bzw. Afroamerikanern nachweisen, nicht jedoch bei Europäern. Bei Afrikanern wird das Auftreten des XL-Allels als nicht untypisch beschrieben; angenommen wird eine Frequenz von etwa 0.06. Der Einfluss der seltenen Allele auf die 5-HTT-Expression und Funktion sind bisher kaum untersucht.^{34,35}

1.3.2.1.3 5-HTTLPR und Persönlichkeitsmerkmale / psychiatrische Erkrankungen

Wiederholt wurde auf eine Assoziation zwischen 5-HTTLPR und Angst-assoziierten Persönlichkeitsmerkmalen untersucht. Ein Blick in die Literatur zeigt inkonsistente Ergebnisse: In der Ursprungspublikation berichteten Lesch et al. 1996, dass Individuen mit einer oder zwei Kopien des S-Allels höhere NEO-Neurotizismuswerte aufwiesen als Individuen, homozygot für das L-Allel. Sie postulierten, dass unter der Annahme einer 40 – 60%igen Heritabilität für Angst-assoziierte-Persönlichkeitsmerkmale, der 5-HTTLPR-Genotyp für 3 – 4% der totalen Varianz und 7 – 9% der genetischen Varianz dieser Persönlichkeitsmerkmale verantwortlich sei.²⁶ Zahlreiche Studien sind seitdem unternommen worden, mit der Intention diese Ergebnisse zu replizieren, jedoch mit unterschiedlichem Ergebnis.^{36,37,38} Zwei Metaanalysen, je 26 Studien einschließend, die den Zusammenhang von 5-HTTLPR und Angst-assoziierten Persönlichkeitsmerkmalen untersuchten, betonten die Notwendigkeit, die Angst-assoziierten Persönlichkeitsmerkmale klar zu differenzieren.^{39,40} In der Analyse der Studien, die die Assoziation des NEO-Neurotizismus mit 5-HTTLPR überprüften, zeigte sich in der Metaanalyse von Sen et al. ein hochsignifikantes Ergebnis ($p = 0.000016$). Die Analyse der Studien, die ‚Harm

'Avoidance' nach TCI/TQP untersuchten, ergab bei ihnen eine statistisch nicht signifikante Assoziation ($p = 0.166$) und keine Assoziation fanden sie in der Analyse der Studien, die andere Angst-assoziierte Persönlichkeitsmerkmale untersucht hatten ($p = 0.944$). Sie folgerten, Gründe der inkonsistenten Ergebnisse der Studien, die die Assoziation des S-Allels von 5-HTTLPR und Angst-assoziierten Persönlichkeitsmerkmale untersuchten, seien zum Teil einer zu geringen Stichprobengröße sowie der Nutzung unterschiedlicher Persönlichkeitsinventare geschuldet.³⁹ Eine 2005 von Munafò et al. vorgenommene Metaanalyse von 24 Studien kam zu einem gegenteiligen Ergebnis. Sie fanden eine statistische signifikante Assoziation zwischen Cloninger's 'Harm Avoidance' ($p = 0.0024$) und 5-HTTLPR und keine zwischen Costa und McCrae's NEO-Neurotizismus und 5-HTTLPR ($p = 0.9109$).⁴¹ In einer 2009 publizierten Metaanalyse unter Einschluss neuer Daten gelangten Munafò et al. zu einem anderen Schluss. Sie fanden in dieser Analyse keinen Hinweis auf eine Assoziation zwischen 'Harm Avoidance' und 5-HTTLPR ($p = 0.37$), jedoch konkordant zu den Metaanalysen von Sen et al. und Schinka et al. einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen NEO-Neurotizismus und 5-HTTLPR ($p < 0.001$).⁴² Eine funktionale Rolle des S-Allels von 5-HTTLPR in der Ätiologie von affektiven Störungen wurde 1996 von Collier et al. beschrieben. Sie berichteten über höhere Frequenzen des geringer transkribierten Allels bei Patienten mit uni- oder bipolarer Störung aus drei europäischen Zentren.⁴³ Caspi et al. veröffentlichten 2003 einen Bericht über eine Längsschnittstudie mit 847 Individuen, die im Alter zwischen 3 und 26 Jahren untersucht wurden. Sie fanden, dass Individuen mit einem oder zwei S-Allelen eine höhere Vulnerabilität bezüglich der Entwicklung einer Major Depression nach kritischen Lebensereignissen (stressful life events) zeigten als Individuen, die homozygot für das L-Allel waren. Die kritischen Lebensereignisse bezogen sich in der Studie auf Stressoren, ausgelöst durch Beruf, Finanzen, Lebenssituation, Gesundheit, sowie zwischenmenschliche Beziehungen. Weiterhin wurde nur bei Individuen mit S-Allel (nicht solchen mit LL-Genotyp) eine positive Assoziation zwischen einer Misshandlung in der Kindheit und der Entwicklung einer Major Depression im Erwachsenenalter gefunden. Der 5-HTTLPR-Genotyp allein war in dieser Studie nicht ausreichend, um eine Prognose hinsichtlich der Entwicklung einer Major Depression zu treffen. Die Ergebnisse gelten somit als prototypisches Beispiel einer Gen x Umwelt-Interaktion.⁴⁴ Vielfältige Diskussionen löste

die im Juni 2009 im Journal of the American Medical Association (JAMA) erschienene Metaanalyse von Risch et al. aus. Die Autoren, die Daten von 14 zwischen 2003 und 2009 publizierten Studien auswerteten, konnten die Ergebnisse Caspis nicht replizieren.⁴⁵

Auch mit Alkoholabhängigkeit wurde das S-Allel von 5-HTTLPR in Verbindung gebracht. Eine 2005 veröffentlichte Metanalyse, die 17 Studien einschloss, beschrieb, dass der 5-HTTLPR Genotyp signifikant, wenn auch nur mit geringem prädiktiven Wert auf eine Alkoholabhängigkeit hinweist. Die stärkste Assoziation wurde bei Individuen mit frühem Beginn (early onset) und bei Komorbidität mit psychiatrischen Krankheiten gefunden.⁴⁶ Kaufman et al. beschrieben 2007, insbesondere früher Alkoholkonsum, der als potenter Hinweis auf spätere Abhängigkeit gilt, sei mit dem Vorhandensein des S-Allels assoziiert. Verstärkt fand sich dieser Effekt bei misshandelten Kindern.⁴⁷

Einige psychiatrische Krankheiten, vor allem Zwangsstörungen, werden mit dem stärker exprimierenden 5-HTTLPR L-Allel assoziiert.^{48,49}

Auch der Einfluss des 5-HTTLPR-Genotyps auf Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis ist mehrfach untersucht worden. In der Mehrzahl der Studien fand sich jedoch keine Assoziation.²⁰

1.3.2.2 rs25531 – Funktionaler A→G SNP

Hu et al. beschrieben 2006 einen A→G SNP, den sie im sechsten Nukleotid der ersten der beiden 20-23 bp Wiederholungssequenzen der Insertion des L-Allels von 5-HTTLPR lokalisierten. Sie berichteten, der SNP fordere eine Neubetrachtung von 5-HTTLPR nicht wie bisher als biallelen (L versus S), sondern als triallelen Locus mit den Allelen L_A, L_G und S. Ihren Untersuchungen zufolge besitzt das L_G-Allel eine potentielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-2, welcher in die Regulation mehrerer Gene des monoaminergen Systems einbezogen ist. Bei 5-HTTLPR wurde die Wirkung von AP-2 als expressionsmindernd beschrieben. Die Quantifizierung der 5-HTT-Expression haben Hu et al. in 62 lymphoblastoiden Zelllinien mittels Real-Time PCR vorgenommen. Die Zelllinien stammten von 30 männlichen und 32 weiblichen Finnen mit psychiatrischen Diagnosen, etwa Alkoholismus, Major Depression und Angststörungen. Ihren Ergebnissen zufolge kamen dem L_G-Allel ähnlich niedrige 5-HTT-mRNA-Expressionsraten zu wie dem bekanntermaßen geringer exprimierten S-Allel⁴⁹ (vgl. Abb.4).

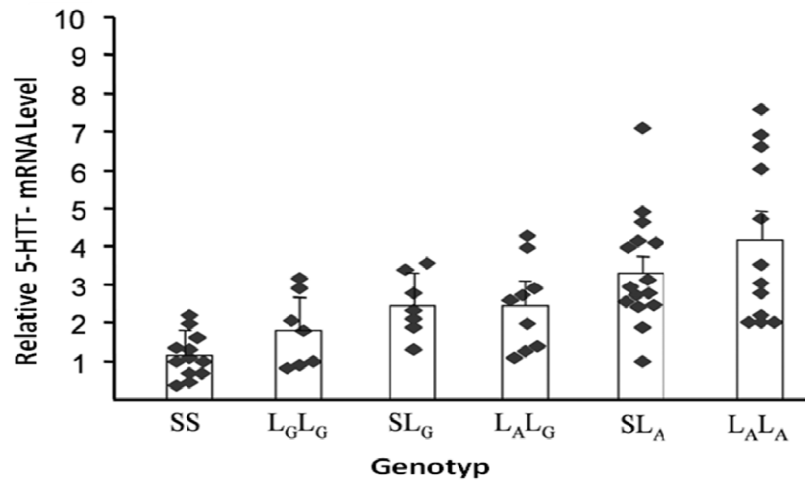


Abbildung 4: Trialleler Locus 5-HTTLPR – 5-HTT-Expression: Darstellung des expressionsmindernden Effektes des G-Allels des SNPs rs25531 auf die 5-HTT-spezifische mRNA-Expression in Lymphoblastoidzelllinien nach trialleler Genotypisierung des Locus 5-HTTLPR (L_A versus L_G versus S_A) (nach Hu et al., 2006)

Wendland et al. veröffentlichten wenig später einen Bericht, in welchem sie beschrieben, bei dem von Hu geschilderten SNP handle es sich um den bereits zuvor als funktional beschriebenen SNP rs25531.⁵⁰ Diesen hatten Kraft et al. 2005 direkt ‚upstream‘ von 5-HTTLPR in einer AP-2 Bindungsregion lokalisiert und das seltenere G-Allel des SNPs mit geringeren Erfolgsraten in der Behandlung von Patienten mit Major Depression in Verbindung gebracht.⁵¹ Wendland und Mitarbeiter berichteten, die unterschiedliche Lokalisation dieses A→G SNPs durch Hu und Kraft beruhe auf einer verschiedenartigen Definition der Grenzen der repetitiven Elemente des In/Dels von 5-HTTLPR durch die beiden Arbeitsgruppen (vgl. Abb. 5). Wendland und Mitarbeiter schlossen sich in ihrem Bericht der Definition von Kraft und somit der Lokalisation des SNPs ‚upstream‘ von 5-HTTLPR an. Die Literatur geht bei Kaukasiern von Allelfrequenzen von 0.5 für L_A, 0.065 für L_G, 0.43 für S_A und 0.0025 für das seltene S_G Allel aus.

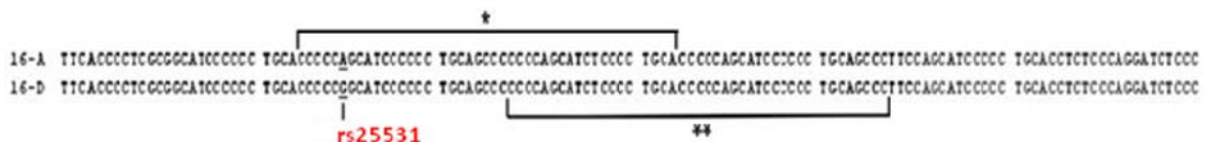


Abbildung 5: Grenzen der Insertion/Deletion von 5-HTTLPR und Lokalisation von rs25531

* Begrenzung nach Hu et al. 2006; ** Begrenzung nach Kraft et al. 2005 (nach Wendland et al., 2006)

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Persönlichkeitsmerkmale und psychiatrische Erkrankungen sind von komplexer Natur. Dass Erbanlagen in ihrer Ätiogenese eine Rolle spielen, ist seit dem frühen 20. Jahrhundert hinlänglich bekannt. Die Identifizierung von Kandidatengenomen hat sich in der Vergangenheit jedoch als schwierig erwiesen. Der Insertions/Deletionspolymorphismus 5-HTTLPR, lokalisiert in der Promoterregion des Serotonintransportergens 5-HTT, ist auf einen Zusammenhang zu Neurotizismus und psychiatrischen Krankheiten wie Major Depression und Alkoholismus mehrfach untersucht worden. Neuere Erkenntnisse postulierten jedoch, dass angesichts der Identifizierung eines funktionalen Einzelnukleotidpolymorphismus (rs25531) eine Revalidierung der bisherigen Ergebnisse vorgenommen werden sollte.⁴⁹

Die vorliegende Arbeit hat zunächst das Ziel, den A→G SNP rs25531 und seinen Einfluss auf die funktionale Bedeutung des Insertions/Deletionspolymorphismus 5-HTTLPR zu charakterisieren.

In einem ersten Schritt soll die korrekte Lokalisation des SNPs rs25531 bestimmt werden, da rs25531 durch verschiedene Arbeitsgruppen unterschiedlich lokalisiert wurde. Hu und Mitarbeiter beschrieben den SNP im Insertionsbereich des L-Allels von 5-HTTLPR, während Kraft und Wendland von einer Lage direkt ‚upstream‘ der In/Del-Region ausgingen.

Es ist bekannt, dass sich die Allelfrequenzen von 5-HTTLPR und rs25531 in verschiedenen Populationen und Ethnien unterscheiden. In einem zweiten Schritt soll in dieser Arbeit daher eine Frequenzanalyse sowie eine Untersuchung des Kopplungsungleichgewichtes bei kaukasischen Studienprobanden, zur weiteren Charakterisierung des Locus, durchgeführt werden.

Hu et al. berichteten 2006, dass das G-Allel des SNPs rs25531 bei Trägern des 5-HTTLPR -L-Allels eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-2 generiere. Resultierend zeige das L_G-Allel ähnlich niedrige Expressionsraten wie das in der Literatur als geringer exprimierend beschriebene S-Allel. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit in einem dritten Schritt geprüft werden, ob die Genotypisierung von rs25531 und eine gemeinsame Analyse

von S- und L_G-Allel die Assoziation des Genotyps zu Neurotizismus und affektiven Erkrankungen im Vergleich zur alleinigen Betrachtung des 5-HTTLPR-Genotyps stärkt. Geprüft werden soll zudem, ob die von Caspi beschriebene Gen x Umwelt-Interaktion für Major Depression im Zusammenhang mit der Erfahrung stressvoller Lebensereignisse durch den 5-HTTLPR-Genotyp tatsächlich beeinflusst wird und die Assoziation durch Genotypisierung von rs25531 gestärkt wird.

Neben der Überprüfung der Assoziation des Genotyps zu Neurotizismus und psychiatrischen Erkrankungen besteht ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit in einer Expressionsanalyse des Serotonintransporters 5-HTT in humanen post mortem Hirnregionen. Es ist wiederholt beschrieben worden, dass sich bei Trägern des S-Allels von 5-HTTLPR eine geringere 5-HTT-Expression gegenüber Trägern des L-Allels findet. Der Großteil der Expressionsanalysen ist an Lymphblastoidzelllinien durchgeführt worden. Nur wenige Studien beschäftigten sich bisher mit den 5-HTT-Expressionsniveaus in humanem Hirngewebe. In dieser Arbeit wird mittels Microarray-Expressionsdaten der Einfluss des 5-HTTLPR-Genotyps auf die 5-HTT-Expression untersucht. Analysen wurden sowohl in Lymphblastoidzelllinien als auch insbesondere in den für den Serotoninmetabolismus bedeutsamen mesencephalen Regionen des Nucleus raphe dorsalis und Nucleus raphe medianus durchgeführt.

Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit soll eine Beurteilung der funktionalen Wirkung des SNPs rs25531 im Rahmen der Genotypisierung von 5-HTTLPR ermöglicht werden. In diesem Zusammenhang soll dokumentiert werden, wie der Locus 5-HTTLPR in zukünftigen Assoziationsanalysen mit bestmöglicher Validität genotypisiert werden kann. Durch die Überprüfung der genetische Assoziation des tri-/quatroallelen Polymorphismus 5-HTTLPR zu depressionsrelevanten Phänotypen soll eine Evaluierung des beschriebenen Zusammenhangs zu Neurotizismus und der von Caspi formulierten Gen x Umwelt-Interaktion erfolgen.⁴⁴ Ferner soll eine Aussage über die Bedeutung der 5-HTTLPR-Allele auf die Expression des Serotonintransporters 5-HTT in den für den Serotoninmetabolismus relevanten Hirnregionen des Nucleus raphe dorsalis und Nucleus raphe medianus getroffen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose	Invitrogen, AGTC Bioproducts
Betaine free base anhydrous	MP Biomedicals, Inc.
BSA (Bovine Serum Albumin)	New England BioLabs
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SIGMA
DNA Ladder, 100 bp	New England BioLabs
DTT(Dithiothreitol) (1M)	Molecular Staging
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Ambion
Ethanol (100%)	Fisher Scientific
Ethidiumbromid (10mg/ml)	SIGMA, Fisher Scientific
Gel Loading Dye Blue (6x)	New England BioLabs
Glacial Acetic Acid	Fisher Scientific
Magnesiumchlorid (25mM, 50mM)	Invitrogen, Roche
2-Mercaptoethanol	Fisher Scientific
NEB 1	New England BioLabs
dNTP Set (100mM)	Invitrogen
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Ammoniumsulfat)	Fisher Scientific
Orange G	SIGMA
Tris Base	SIGMA

2.1.2 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung/ Dye	Bestandteile	Konzentration
NEBuffer 1 (1x)	Bis-Tris Propan – HCl MgCl ₂ DTT	10 mM 10 mM 1 mM
SCB – Puffer	(NH ₄) ₂ .SO ₄ Tris pH 8.8 MgCl ₂ 2-Mercaptoethanol BSA	167 mM 670 mM 20 mM 100 mM 10mg/ml
TAE-Puffer (50x) 4L	Tris Base Clacial Acetic Acid 0.5M EDTA pH 8.0 H ₂ O, dist.	968 g 228.4 ml 400 ml

Orange Dye (6x)	Orange G Ficoll TAE (1x)	100 mg 2 g 10 ml
-----------------	--------------------------------	------------------------

2.1.3 Kits

Bezeichnung	Hersteller
DNA Purification Protocol For 3 ml Whole Blood	Puregene
DNA Purification Protocol From Oragene	DNAgenotek
DNA Purification Kits From 10-20 mg Solid Tissue	Puregene
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen

2.1.4 Enzyme

	Enzym	Aktivität	Hersteller
Endonuclease	HpaII	10.000 U/μl, 50.000 U/μl	New England BioLabs
Endonuclease	MspI	10.000 U/μl	New England BioLabs
DNA-Polymerase	Taq-Polymerase	1- 5 U/ μl	University of Michigan
Exonuclease	Exonucleasel	20.000 U/ml	New England BioLabs
Phosphatase	Phosphatase alkaline, shrimp	1 U/ μl	Roche

2.1.5 Primer

Zielregion	Name	Sequenz
5-HTTLPR	HTT-F HTT-R	5'-TCC TCC GCT TTG GCG CCT CTT CC-3' 5'-TGG GGG TTG CAG GGG AGA TCC TG-3'

2.1.6 Microarrays

Chip	Hersteller
Plus 2 Expression Chip	Affymetrix
Human Ref-8.v.20 Expression Bead Chip	Illumina

2.1.7 Sonstige Materialien

Artikel	Hersteller
BioDot Microplate Sealing Tape	DOT Scientific, Inc.
Filter Standardtips 10µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf
Micro Amp™ Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems
Micro Amp™ Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
Nonfilter Standardtips 10µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf
Non Skirted 96 Well PCR Plate	DOT Scientific, Inc.
Parafilm	American National Can
Repeater Plus Pipette	Eppendorf
Standardpipetten	Eppendorf, Oxford Labware
Titer-Tops Film for Sealing Microplates	Diversified Biotech

2.1.8 Geräte

Gerät	Hersteller
ABI PRISM 7900HT SDS - Thermocycler	Applied Biosystems
Biomek 3000 Laboratory Automatic Workstation	Beckman Coulter
Heizblock	Torrey Pines Scientific
Hot Shaker	Sciera
PTC 200 PCR – Thermocycler	MJ Research
Spectrophometer ND-1000	Nano Drop
Stromversorgungsgerät für die Elektrophoresekammer	Fisher Scientific
Laborwaage	Sartorius
Mikrozentrifuge 5415C	Eppendorf
NanoDrop	Thermo Scientific
Mikrozentrifuge mit Kühlfunktion 5417R	Eppendorf
Ultrazentrifuge 5804	Eppendorf
UV Transilluminator	Nucleo Vision
Vortex-Gerät	Fisher Scientific

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Proben mehrerer Studien untersucht, an denen die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Margit Burmeister der University of Michigan, in welcher der experimentelle Teil dieser Arbeit entstanden ist, beteiligt ist.

2.2.1.1 Michigan Longitudinal Studie (MLS)

Bei der Michigan Longitudinal Studie handelt es sich um eine Kohortenstudie, die Familien einschließt, deren G1-Generation (Elterngeneration) sich durch hohe Raten an Genussmittelkonsum auszeichnet. Über einen Zeitraum von mehr als 20 Jahren ist der Gebrauch bzw. Missbrauch von Alkohol, Nikotin und Cannabis untersucht worden.

Die Kerngruppe der Studie, rekrutiert Mitte bis Ende der 1980er Jahre, ist in den vergangenen Jahren kontinuierlich untersucht worden.

Die Studie wurde ursprünglich mit dem Ziel etabliert, eine Gruppe Kinder alkoholabhängiger Eltern, initial im Vorschulalter, im Vergleich mit zwei Kontrollgruppen im Zeitverlauf zu beobachten. Im Bestreben einer detaillierten Charakterisierung von Gen- und Umwelt-Interaktionen auf Suchtverhalten, wurde als Einschlusskriterium in die Studie die Partizipation beider biologischen Elternteile festgesetzt. Im Rahmen der Studie wurden die Kinder wie auch die Eltern in den acht Phasen t1-8 in Dreijahresintervallen weiterverfolgt (vgl. Tab. 1). Kinder im Alter zwischen 11 und 17 Jahren sind jeweils in jährlichem Abstand untersucht worden. In den vergangenen Jahren sind weitere Familien rekrutiert worden.

Tabelle 1: Acht Phasen der Michigan Longitudinal Studie

Mittleres Alter der Parentalgeneration (G1) sowie der ersten Filialgeneration (G2)

Altersangabe in Jahren	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8
G1 – Eltern	32.4 ± 5.2	35.4 ± 5.2	38.4 ± 5.3	41.3 ± 5.4	44.3 ± 5.3	47.4 ± 5.3	50.3 ± 5.3	53.2 ± 5.3
G2 - Kinder	3-5	6-8	9-11	12-14	15-17	18-20	21-23	24-26

Die Untersuchungsgruppe samt Familien wurde durch Ermittlung betrunkenener männlicher Autofahrer der G1-Generation gewonnen. Hohe Blut-Alkoholwerte wurden als starker Hinweis auf einen Alkoholmissbrauch gewertet. Die beiden Kontrollgruppen wurden jeweils in derselben Nachbarschaft rekrutiert, um einen einheitlichen (im Vergleich zur Allgemeinpopulation niedrigeren), sozioökonomischen Status von Untersuchungs- und Kontrollgruppen zu gewährleisten. Alle Studienteilnehmer entstammen einem vier Bezirke umfassenden Gebiet (1990 Bevölkerung 502 000), welches die Hauptstadt Lansing des US Bundesstaates Michigan im mittleren Westen der USA umgibt. Bei den ersten Kontrollprobanden wurde sichergestellt, dass bei keinem der beteiligten Elternteile eine Feighner Diagnose bezüglich eines wahrscheinlichen oder definitiven Alkoholismus oder Drogenmissbrauchs vorlag. Eine zweite Kontrollgruppe umfasste Familien mit Alkoholismus, jedoch ohne Fälle von Trunkenheit am Steuer. Die Feighner Diagnose wurde als Auswahlkriterium herangezogen, weil sie Mitte der 1980er Jahre, zu Beginn der Longitudinal Studie, Diagnosekriterium der Wahl war.⁵² Bei der Rekrutierung weiterer Studienteilnehmer in den folgenden Jahren wurde die Diagnose nach Feighner durch Diagnosen nach dem ‚Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders‘, in dritter, überarbeiteter (DSM III-R) und vierter Auflage (DSM IV) abgelöst. Inzwischen existieren nicht nur umfassende klinische Daten der Kinder, sondern auch Daten zum Verlauf von Substanzmissbrauch in der G1-Generation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 794 Studienteilnehmer für 5-HTTLPR und rs25531 genotypisiert. In 353 Fällen handelte es sich um Proben von Probanden der G1-Generation. Untersucht wurden 194 Mütter, davon 7 Stiefmütter, 159 Väter, davon 18 Stiefväter. In der G2-Generation wurden 441 Kinder untersucht. Da nicht bei allen genotypisierten Studienteilnehmern klinische Daten der in dieser Arbeit untersuchten Parameter vorlagen, wurden die Analysen jeweils mit entsprechenden Subgruppen durchgeführt.

2.2.1.2 Tecumseh Blutdruck Programm

Das Familiäre Blutdruck Programm in Tecumseh, Michigan wurde 1958 mit der Intention etabliert, Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen in einer ländlichen, ethnisch homogenen Population zu ermitteln. Dementsprechend sollten auch disponierende Gene

identifiziert werden, die in die Pathogenese kardiovaskulärer Krankheiten, mit einem Fokus auf arteriellem Hypertonus, involviert sind. Um zusätzlich die Zusammenhänge psychologischer Variablen mit arteriellem Hypertonus zu ergründen, wurden von einer Teilmenge der Studienteilnehmer Fragebögen wie der NEO-PI-R ausgefüllt.

Die beteiligten Studienteilnehmer wurden rekrutiert über ein Familienmitglied im Alter zwischen 25 und 40 Jahren mit einem systolischen Blutdruck im Bereich der oberen 15% der normalen Blutdruckverteilung sowie einen an der Studie partizipierenden Geschwisterteil. Sofern verfügbar, wurden Eltern und weitere Geschwister ebenfalls in die Studie aufgenommen.

Analysiert wurden DNA-Proben von 316 Studienteilnehmern des Tecumseh Blutdruck Programms. 139 Männer (43.99%) und 177 Frauen (56.01%) aus 147 Familien wurden untersucht. Bei allen Studienteilnehmern handelte es sich um US-Amerikaner kaukasischen Ursprungs.

2.2.1.2 Bipolar Studie

Im Jahr 1988 unternahm das National Institute of Mental Health (NIMH) der USA eine Initiative zur Etablierung einer Kohorte für Studien zur Bipolaren Störung. Die Rekrutierung einer großen Anzahl von Familien, von denen mehrere Verwandte ersten Grades mit der Diagnose einer Bipolaren und/oder einer anderen affektiven Störung aufwiesen, stellte den Ausgangspunkt dar. Kooperationspartner dieser ursprünglichen Initiative waren die Indiana University, die John Hopkins University, die Washington University, St Louis, sowie das NIMH Intramural Research Program. Die an folgenden Studien beteiligten Familien wurden entweder systematisch durch die an der Initiative beteiligten medizinischen Behandlungsinstitutionen oder nicht systematisch durch nicht klinische Partner wie Interessensgruppen gewonnen. Alle Studienteilnehmer wurden von erfahreinem medizinischem Fachpersonal nach dem ‚Diagnostic Instrument for Genetic Studies‘ (DIGS) und dem ‚Family Interview for Genetic Studies‘ (FIGS) interviewt.⁵³ Für alle Studienteilnehmer wurden zusätzlich klinische Daten zu vergangenen psychiatrischen Behandlungen angefordert. Basierend auf den Ergebnissen des DIGS wurde eine Arbeitsdiagnose erstellt, die durch zwei Ärzte separat unter Einbeziehung aller

vorhandenen Daten validiert wurde. Die endgültige Diagnose wurde gemäß dem DSM-III-R⁴⁷ und dem ‚Research Diagnostic Criteria‘ (RDC) vorgenommen.⁵⁵

Untersucht wurden in dieser Arbeit Proben von 228 Individuen aus 69 Familien. 100 (43.85%) der Studienteilnehmer waren männlichen und 128 (56.15%) weiblichen Geschlechts. Bei 84 lag die Diagnose einer Bipolaren Störung vor, 144 waren gesund.

Über 90% der Probanden waren kaukasischen Ursprungs.^{56,57}

2.2.1.3 Pritzker Projekt

Das Pritzker Neuropsychiatric Disorders Research Consortium wurde im Jahre 2000 mit dem Ziel etabliert, das Verständnis der neurobiologischen und genetischen Ursachen von affektiven Störungen sowie auch Schizophrenie zu mehren.

Arbeitsgruppen der US-Universitäten University of California Davis (UCD), University of California Irvine (UCI), Stanford, Cornell und der University of Michigan führen Kohortenstudien mit verschiedenen Populationen, Analysen von humanem post mortem Hirngewebe und Untersuchungen an verschiedenen Tiermodellen durch. Es wurde als Ziel formuliert, veränderte Genexpressionsprofile in Hirnregionen und –kreisläufen, die mit psychiatrischen Erkrankungen assoziiert sind, aufzudecken. Aus einer Kooperationen der Universitäten UCI und UCD ist die sogenannte ‚Brainbank‘ hervorgegangen, welche post mortem Hirngewebe von Patienten und individuell abgestimmten gesunden Kontrollen beinhaltet. Es hat sich gezeigt hat, dass Genexpressionsmuster im Gehirn stark beeinflusst werden durch das Ausmaß und die Dauer von physiologischem Stress zum Todeszeitpunkt, was die Expressions-Analysen von post mortem Hirngewebe durch die Up-Regulierung von „Stress-Genen“, beeinflussen kann. Von Mitgliedern des Pritzker Consortiums wurde eine Methode zur Evaluierung von post mortem Hirnproben entwickelt, die sicherstellt, dass in den Expressionsanalysen nur Proben Verwendung finden, bei denen zuvor ein erhöhter Stressfaktor ausgeschlossen wurde. Zudem erfolgt eine genaue Auswertung aller klinischen Daten, eine neuroanatomische Klassifizierung der Hirnregionen, sowie eine entsprechende Aufbewahrung der Proben, um die Gewinnung qualitativ hochwertiger mRNA für Microarrayanalysen zu gewähren.

157 DNA-Proben wurden untersucht. 40 (25%) Proben stammten von Patienten mit Major Depression, 23 (15%) von Bipolar-Patienten, 19 (12%) von Patienten mit Schizophrenie und 75 (48%) Proben von gesunden Kontrollprobanden.

2.2.1.5 Alkoholismus Studie

Im Zeitraum von April 2004 bis Juni 2005 sind in Polen 160 Alkoholiker für eine Kohortenstudie gewonnen worden. Die Rekrutierung erfolgte im Rahmen eines stationären psychiatrischen Aufenthaltes in verschiedenen Kliniken des Landes. Eine klinische Anamnese ist mittels verschiedener standardisierter Fragebögen und Tests vorgenommen worden. Ausführliche Informationen zu weiteren psychiatrischen Erkrankungen wie Major Depression, Misshandlung im Kindesalter und Drogenabusus sind über die Diagnose der Alkoholabhängigkeit hinaus gewonnen worden. Man erhob zudem eine Familienanamnese, in der die Probanden zu den oben genannten psychiatrischen Erkrankungen sowie zu Suiziden bzw. Suizidversuchen im Familienkreis befragt wurden. Genotypisiert wurden in dieser Arbeit 152 der Probanden. Bei allen Studienteilnehmern handelte es sich um weiße Europäer. 119 der Probanden (78%) waren männlichen und 33 (22%) weiblichen Geschlechts.

2.2.1.6 Studie zu Heroinabusus

Untersucht wurden im Rahmen dieser zwischen 2002 und 2005 durchgeführten Kohortenstudie 157 Freiwillige mit bekanntem Heroinabusus. Rekrutiert wurden die Studienteilnehmer, davon 113 männlichen und 44 weiblichen Geschlechts mit einem Durchschnittsalter von 44.05 Jahren durch medizinische Einrichtungen der Wayne State University, Detroit. Nach einem semistrukturierten Telefoninterview erfolgten eine ärztliche Untersuchung der in Frage kommenden Studienteilnehmer sowie eine umfassende Datenerhebung mittels Fragebögen zur persönlichen Krankengeschichte. Mit einigen Probanden wurde zudem ein Interview, basierend auf den Kriterien des DSM IV, durchgeführt.⁵⁸

Bei den Teilnehmern handelte es sich um 94 Amerikaner europäischen Ursprungs (60%), 60 Amerikaner afrikanischen Ursprungs (38%) und jeweils einen Asiaten, einen indianischen Amerikaner (Native American) und einen Patienten „multiethnischer“

Herkunft. Gemeinsam war allen Freiwilligen der durchschnittlich 21 Jahre bestehende Abusus von Heroin. 99 der Probanden injizierten sich regelmäßig Heroin. In 84 Fällen wurde zusätzlich zum Heroinabusus auch der Gebrauch von Kokain angegeben.

2.2.2 Genotypisierung

2.2.2.1 Isolierung genomischer DNA

Die DNA-Proben der verschiedenen Studien sind im Vorfeld durch Standard-Extraktionsmethoden gewonnen worden.

Bei etwa 70% und somit einem Großteil der Proben ist die DNA nach dem ‚DNA Purification Protocol For 3 ml Whole Blood‘ aus Vollblut gewonnen worden.

In der G2-Generation der Longitudinal Studie ist DNA bei einem Teil der Probanden gemäß dem ‚DNA Purification Protocol from Oragene‘ aus Speichel gewonnen worden.

Die 160 DNA-Proben der Pritzker Studie wurden mittels des ‚DNA Purification Kits From 10-20 mg Solid Tissue‘ aus Hirngewebe extrahiert.

In den 228 Fällen der Bipolar Studie ist DNA aus Epstein-Barr-Virus- (EBV-) transformierten lymphoblastoiden Zelllinien gewonnen worden.

Zur Mengen- und Reinheitsbestimmung der erhaltenen DNA wurden die Proben mit NanoDrop gemessen und die DNA-Konzentration in der Einheit ng/µl bestimmt.

2.2.2.2 Herstellung von DNA-Arbeitsplatten

Für eine effiziente Genotypisierung wurden DNA-Arbeitsplatten angelegt. Zu diesem Zweck wurden die DNA-Proben mit H₂O bidest. je nach Studie auf eine finale Konzentration von 10 bzw. 20 ng/µl verdünnt und 100 µl in eine 96 well Mikrotiterplatte pipettiert.

2.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde in einem Gesamtreaktionsvolumen von 30 µl durchgeführt, wobei zwischen 30 und 60 ng genomische DNA eingesetzt wurden.

Der Mastermix (100x) ist aus 2 µl SCB Puffer ohne MgCl₂, 1.2 µl MgCl₂ (50mM), 3 µl dNTPs (2.5 mM), je 1.5 µl Primer f und Primer r, 0.3 µl Taq Polymerase und 14.5 µl Aqua bidest. hergestellt worden.

Nachdem 3 µl genomischer DNA einer Konzentration von 10 bis 20 ng/µl in eine 96-well PCR-Mikrotiterplatte pipettiert worden sind, wurden je 27 µl Mastermix zugefügt. Im Anschluss wurde die PCR-Mikrotiterplatte mit Folie versiegelt, in den PCR-Thermocycler gegeben und das PCR-Programm gestartet.

Das PCR-Programm begann mit einer initialen DNA-Denaturierung bei 95°C für 5 min, gefolgt von 40 Zyklen aus 30 sec Denaturierung bei 94°C, gefolgt von 90 sec bei 60.2°C, der primerspezifischen ‚Annealing‘-Temperatur und 60 sec bei 72°C zur Elongation des neu synthetisierten DNA-Stranges. Die finale Elongation erfolgte bei 72°C für 10 min.

Nach Beendigung der PCR wurden die Proben kurz zentrifugiert und bei 4°C gelagert.

2.2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese I

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem 3% Agarose Gel. Für die Herstellung des Gels wurden 4.5 g Ultra Pure Agarose abgewogen und mit 150 ml TAE-Puffer für 10 min in einer Mikrowelle erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurden 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Das flüssige Produkt wurde in ein 14 cm langes und 12 cm breites Tablett gegossen, dessen offene Schmalseiten zuvor durch Paketklebeband verschlossen worden waren. Zwei Kämmen mit jeweils 13 Zacken wurden eingespannt, während das Gel noch flüssig war. Nach etwa 30 Minuten war das Gel erkaltet und in festem Zustand. Das Klebeband wurde entfernt und die Kämmen gezogen, so dass pro Gel 26 Taschen zur Probenauftragung zur Verfügung standen. Das fertige Gel wurde in die Gelelektrophoresekammer gelegt und 500 ml TAE-Puffer mit 20 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Im Folgenden wurden 8 µl PCR-Produkt in eine 96 well Mikrotiterplatte gegeben und zur Anfärbung 2 µl Orange Dye beigefügt. Das Gesamtvolumen von 10 µl pro Probe ist mit einer 12 Spitzen fassenden Multikanalpipette auf das Gel aufgetragen worden. In jeweils eine Tasche pro Reihe wurden 5 µl 100 bp Ladder pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung des Gels erfolgte bei 100 Volt für ca. 2 Stunden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entnommen und in einem Transilluminator unter UV-Licht betrachtet und abphotographiert.

2.2.2.5 RFLP (Restriktions Fragment Längenpolymorphismus)

Die Bestimmung des SNP rs25531 erfolgte durch einen Restriktions Fragment Längenpolymorphismus. Es wurde das Restriktionsenzym HpaII mit der Erkennungssequenz $\begin{matrix} 5' \dots CCGG \dots 3' \\ 3' \dots GGCC \dots 5' \end{matrix}$ verwendet.

Das Protokoll wurde in einem Volumen von 20 μ l durchgeführt. Abhängig von der Bandenstärke des PCR-Produktes wurden zwischen 7 und 10 μ l PCR-Produkt verwendet und in eine 96 well Mikrotiterplatte pipettiert. Aus 2 μ l NEBuffer 1 und 0.4 μ l HpaII (10 000 U) bzw. 0,1 μ l HpaII (50 000 U) wurde ein Mastermix erstellt und mit Aqua bidest bis zum Erreichen des Gesamtreaktionsvolumens aufgefüllt. Je 13 bzw. 10 μ l dieses Mastermixes wurden dem PCR-Produkt in der Mikrotiterplatte zupipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit Folie versiegelt und in den Thermocycler gegeben. Dann wurde das Programm gestartet. Die Proben wurden für 4 Stunden in 37°C, der optimalen Arbeitstemperatur des Enzyms, inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Denaturierung des Enzyms durch zwanzigminütiges Erhitzen bei 65°C. Nach Beendigung des Programms wurden die Proben kurz zentrifugiert und dann bei 4°C gelagert.

2.2.2.6. Agarose-Gelelektrophorese II

Die RFLP-Produkte wurden wiederum durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Ein 3% Gel wurde gemäß dem bereits beschriebenen Protokoll angefertigt und in die Elektrophoresekammer gelegt. In die Mikrotiterplatte mit den RFLP – Produkten wurden zu Anfärbungszecken 4 μ l Orange Dye den Proben hinzugegeben und ein Volumen von 20 μ l in die Geltaschen pipettiert. In eine Tasche pro Reihe wurden 5 μ l 100 bp Ladder gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte wieder bei 100 Volt für zwei Stunden. Im Anschluss wurde das Gel aus der Kammer entnommen und unter UV – Licht betrachtet und photographiert.

2.2.2.7 DNA Sequenzierung

Zur stichprobenartigen Kontrolle der manuell gewonnenen Genotypisierungsergebnisse ist ein Teil der Proben zusätzlich sequenziert worden. Es erfolgte zunächst eine Aufreinigung von 20 μ l PCR-Produkt nach dem MinElute PCR Purification Protokoll. In einem ersten Schritt wurden 100 μ l des in dem Kit enthaltenen Puffers PB zu den 20 μ l PCR-Produkt

hinzugefügt. Die gewonnene Mischung wurde in ein mit einer MinElute Säule versehenes 2 ml Eppendorfgefäß gegeben und in einer Mikrozentrifuge eine Minute bei 10 000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule wiederum im selben Gefäß platziert. In einem Waschschrift wurden 750 µl des Puffers PE hinzugegeben und eine Minute lang bei 10 000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde erneut verworfen und noch einmal für eine Minute bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. Die MinElute Säule wurde in ein sauberes 1.5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Zur Eluierung der DNA wurden 10 µl Puffer EB auf die Säulenmitte aufgetragen, eine Minute gewartet und dann erneut für eine Minute bei 10 000 x g zentrifugiert.

Mittels eines Spektrometers wurde eine Konzentrationsbestimmung des gereinigten PCR-Produktes bei einer Wellenlänge von 260 – 280 nm vorgenommen.

Es erfolgte daraufhin eine Verdünnung von je 10 µl pro Reaktion auf eine Finalkonzentration von 3 ng/µl für die Sequenzierung. Auch die 5 HTTLPR-Stock-Primer wurden von der Ausgangskonzentration von 100 µM (pmol/µl) auf eine Konzentration von 1 pM/µl verdünnt und je 10 µl für eine Reaktion erstellt.

Die verdünnten Proben und Primer wurden weitergegeben zum ‚DNA Sequencing Core‘ der University of Michigan und die Sequenzierung dort nach der Didesoxymethode nach Sanger durchgeführt.

Die Resultate wurden per E-Mail verschickt und mit dem Programm SeqMan (Lasergene 6) analysiert.

2.2.3 Genexpressionsanalyse

Zu den DNA-Proben des Pritzker Projektes und der Bipolar Studie lagen zum Erstellungszeitpunkt dieser Arbeit bereits mRNA-Expressionsdaten des Serotonintransporters 5-HTT vor, die in die statistische Analyse einbezogen wurden. Die Expressionsraten wurden mittels DNA-Microarray-Technologie gewonnen (vgl. Abb. 6).

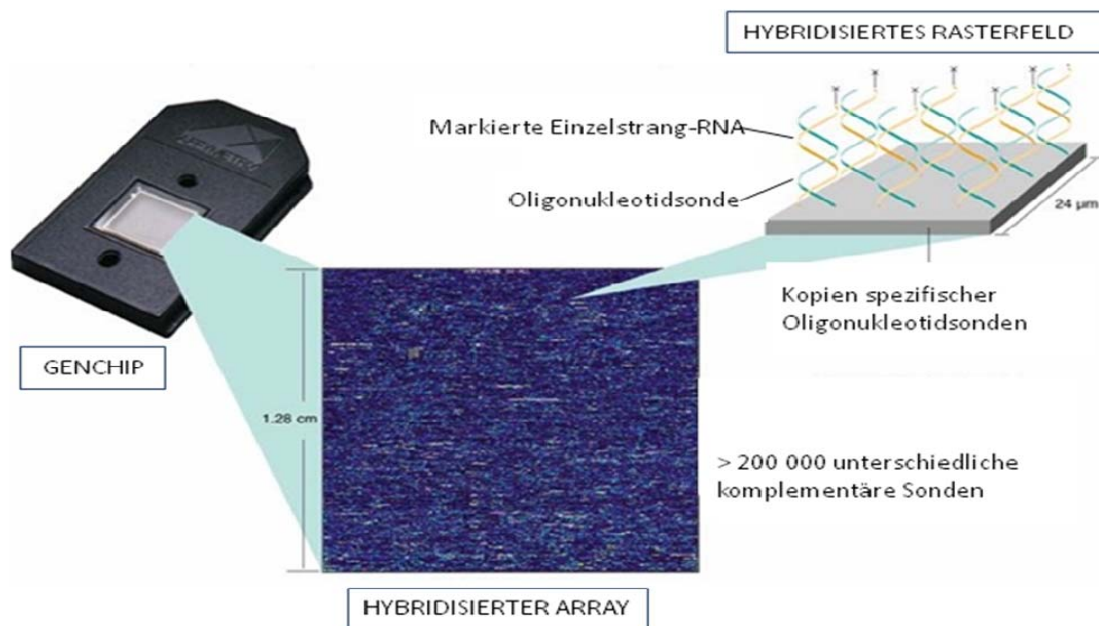


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Microarray-Technologie. Genchip enthält Oligonukleotidsonden an definierten Rasterpositionen. Im Hybridisierungsschritt entsteht durch komplementäre Bindung der Sonden mit fluoreszenzmarkierter cRNA ein Fluoreszenzsignal, welches mittels Laser ausgelesen wird. (nach <http://cnx.org/content/m12387/latest>)

Verwendet wurde für die Proben des Pritzker Projektes ein Affymetrix Plus 2 Expression Chip, der mit synthetisch hergestellten Oligonukleotiden 14 500 gut charakterisierte Gene des humanen Genoms repräsentiert. Für das 5-HTT-Gen weist der Chip drei Sondenansätze auf, die jeweils aus 11 Sonden bestehen. Die Sonden haben eine Länge von 25 Basen, die sich zum Teil überlappen und der Basensequenz von Abschnitten des Gens entsprechen. In der Untersuchung der Proben der Bipolar Studie wurde der HumanRef-8.v.20 Expression Bead Chip von Illumina verwendet, dessen Konstruktion die parallele Analyse von acht Proben erlaubte. Dieser Chip enthielt eine genspezifische Sonde mit 50 Basen für 5-HTT. Beide verwendeten Chips basierten auf einem analogen Funktionsprinzip. Nach Standardmethoden wurde zunächst RNA aus den Lymphoblastoidzellen bzw. den post mortem Hirngewebeproben gewonnen. In einem zweiten Schritt wurde die RNA in cDNA, dann cRNA umgeschrieben und mit Fluoreszenzfarbstoffen, in diesem Fall Biotin, markiert. Bei der folgenden Hybridisierung mit dem Genchip dienten die Oligonukleotide als Sonde. Nicht gebundene cRNA wurde durch Waschschriffe entfernt. Ein durch die komplementäre

Bindung von Sonde und markierter cRNA entstandenes Fluoreszenzsignal jeder Position des DNA-Microarrays wurde mittels eines Lasers ausgelesen und durch einen Computer normalisiert und ausgewertet. Die Expressionswerte für das 5-HTT-Gen wurden unter Verwendung der Referenz Sequenz (RefSeq) NM-001045.3 aus der Datei mit sämtlichen Expressionsdaten extrahiert.

2.2.4 Statistische Analyse

2.2.4.1 Überprüfung nach Mendelschen Regeln

Bei den genotypisierten Proben der Michigan Longitudinal Studie, der Tecumseh Studie, sowie der Bipolar Studie handelte es sich um Proben familiärer Kohortenstudien.

Es wurde sowohl eine manuelle als auch eine mit dem Programm Haploview 3.32 computerisierte Familien- und Stammbaumanalyse durchgeführt und die Genotypisierungsergebnisse der Familienmitglieder auf Konsistenz mit den Mendelschen Vererbungsregeln überprüft.

2.2.4.2 Hardy-Weinberg–Equilibrium (HWE)

Genotypfrequenzen werden durch Vererbungsmuster bestimmt. Hardy und Weinberg beschrieben, dass Allelhäufigkeiten und somit auch Genotypfrequenzen unter konstanten äußeren Bedingungen von Generation zu Generation gleichmäßig vererbt werden. Das von ihnen begründete Modell zeigt eine mathematische Beziehung zwischen Allelfrequenz und Genotypfrequenz auf. Die beiden Formeln zur Beschreibung des HWE lauten:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad \text{und} \quad p + q = 1$$

p bzw. q steht dabei für die relative Häufigkeit des Auftretens des Allels A, bzw. und p^2 , $2pq$, q^2 stellen die Häufigkeit der jeweiligen Genotypen dar.⁵⁹

Bei Proben der G1-Generation der Michigan Longitudinal Studie, des Pritzker Projektes, der Alkoholismus Studie und der Drogenabusus Studie, die von nicht verwandten

Personen stammen, erfolgte mittels eines χ^2 -Tests eine Untersuchung auf Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

Signifikante Abweichungen vom HWE deuten in der Praxis oft auf ein technisches Genotypisierungsproblem hin.⁶⁰ Die Kontrolle diente daher auch der Überprüfung der Genotypisierungsqualität.

2.2.4.3 Frequenz- und Assoziationsanalyse

Die statistische Auswertung in Form von deskriptiven statistischen Methoden zur Berechnung von Allelaufretensfrequenzen, Kreuztabellen, χ^2 – Tests und einfachen Varianzanalysen (ANOVA) wurden mit dem Computerprogramm SPSS 14.0 für Windows vorgenommen.

Die familiäre Struktur einiger der untersuchten Studien wurde berücksichtigt. In diesen Fällen wurde für Assoziationsuntersuchungen das Programm MERLIN 1.1.2 verwendet.⁶¹ Um mit dem Programm zu arbeiten, wurden drei Dateien generiert. Die erste Datei enthielt Genotypdaten, Werte der auf eine Assoziation zu untersuchenden Variablen sowie vollständige Familieninformationen der Probanden. Die weiteren beiden Dateien dienten der Beschreibung der Variablen und der genomischen Lokalisation der untersuchten Region.

Mittelwerte wurden jeweils mit Standardabweichung (Mittelwerte \pm SD) angegeben. Das Signifikanzniveau (α) wurde auf $p < 0.05$ festgelegt. Von einem Trend wurde ab einem $p \leq 0.1$ ausgegangen.

Je mehr Hypothesen getestet werden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine „zufällige Signifikanz“ auftritt, also dass ein tatsächlich nicht vorhandener Unterschied „aufgedeckt“ wird (Alpha-Fehler). Diese Problematik des multiplen Testens wurde berücksichtigt. Eine Korrektur des Signifikanzniveaus durch Bonferroni-Methode ($\alpha^f = \frac{\alpha}{m}$),

wobei α dem 0.05 Signifikanzniveau und m der Anzahl der Tests entspricht, erfolgte entsprechend in den betroffenen Analysen unter Verwendung von SPSS. In den Expressionsanalysen wurde als Post-Hoc-Analyse ein Tukey HSD (Honestly Significant Difference) Test durchgeführt.

2.2.4.4 Kopplungsungleichgewicht (LD)

Der Parameter D wird als Koeffizient des Ungleichgewichts (disequilibrium coefficient) bezeichnet und misst den Grad der nichtzufälligen Assoziation von Allelen der beiden zu untersuchenden Loci. D hängt jedoch nicht nur vom Kopplungsungleichgewicht, sondern auch von der Allelfrequenz ab. Die theoretisch möglichen Maximal- und Minimalwerte von D werden nur erreicht, wenn beide Allele die gleiche Häufigkeit aufweisen. Deswegen wurden weitere Parameter zur Bestimmung des Kopplungsungleichgewichtes entwickelt.

Die beiden wichtigsten, und in dieser Arbeit errechneten, sind D' und r^2 :

$$D' = \frac{D}{D_{max}}$$

$$r^2 = \frac{D^2}{p_1 p_2 q_1 q_2}$$

D_{max} entspricht dem maximalen D , welches an zwei Loci für gegebene Allelfrequenzen möglich ist. D_{max} entspricht dem größeren Wert von $p_1 q_2$ oder $p_2 q_1$ wenn D positiv ist oder dem kleineren Wert von $p_1 q_2$ oder $p_2 q_1$, wenn D negativ ist. Der Wert von D' bewegt sich zwischen -1 und 1, unabhängig von den Allelfrequenzen eines Locus.⁶²

Der zweite Parameter entspricht dem Quadrat des Korrelationskoeffizienten.⁶³ Wenn die Allelfrequenzen an beiden Loci identisch sind, liegt r^2 zwischen 0 und 1.

Die Berechnung des Kopplungsungleichgewichts erfolgte in dieser Arbeit mittels des Programms Haploview 3.32.⁶⁴ Es wurde eine Datei erstellt, die codierte Informationen zu Familienzugehörigkeit, Identität des Probanden und soweit vorhanden von Mutter und Vater, Geschlecht, Affektstatus und Genotypisierungsergebnisse der auf LD zu untersuchenden Loci enthielt. Die LD-Berechnung und damit das jeweilige D' und r^2 erfolgte nach Laden dieser Stammbaum-Datei und einer weiteren Datei mit Informationen zur genomischen Lokalisation der beiden Loci durch das Programm.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der Genotypisierungsmethode für 5-HTTLPR und rs25531

Obwohl verschiedene Protokolle existieren, gilt 5-HTTLPR, wegen GC-reichen Regionen, als bekanntermaßen extrem schwierig zu genotypisieren.^{65,66}

In ihrer Publikation von 2006, die den SNP rs25531 im Zusammenhang mit dem In/Del-Polymorphismus 5-HTTLPR als funktional beschreibt, berichteten Hu und Mitarbeiter auch über die von ihnen verwandte Taqman-Genotypisierungsmethode, die in zwei Schritten zunächst das L- und S-Allel und dann die SNP-Allele voneinander unterschied.⁴⁹ Der Versuch, diese Methode unter Verwendung der gleichen Primer und PCR-Bedingungen erfolgreich zu replizieren, gelang nicht.

Das erste Ziel des experimentellen Teils dieser Arbeit stellte somit die Etablierung einer zuverlässigen Genotypisierungsmethode dar. Als Ausgangspunkt ist das 2006 in einer Veröffentlichung von Wendland et al. geschilderte Protokoll samt der ebenda beschriebenen Primer verwandt worden. Modifizierungen der Annealing- und Elongationstemperatur des PCR-Programms, sowie die Verwendung eines speziell für GC-reiche Regionen konzipierten SCB-Puffers mit Betain und DMSO, erwiesen sich als notwendig. Die

erfolgreiche Amplifizierung von 5-HTTLPR führte zu einer durch Agarose-Gelelektrophorese nachweisbaren Bande des L-Allels bei 512 bp und des S-Allels bei 469 bp. Das Amplifizierungsergebnis zeigte sich stark abhängig von der Menge der

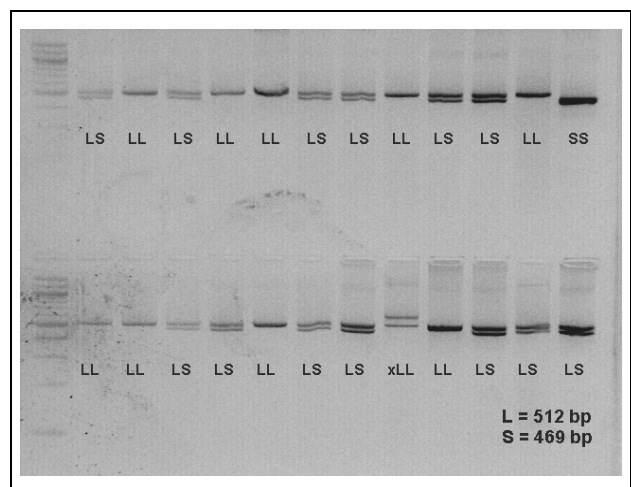


Abbildung 7: Bialleles Genotypisierungsergebnis des Locus 5-HTTLPR: Agarose-Gelelektrophorese Photographie nach PCR-Amplifizierung genomischer DNA von 24 Individuen: LL (n=9), xLL (n=1), LS (n=13), SS (n=1)

eingesetzten genomischen DNA. Für eine erfolgreiche PCR waren mindestens 30 ng DNA erforderlich.

Als wesentlich erwies sich darüber hinaus die im Mastermix verwendete $MgCl_2$ -Konzentration. Schon bei einer Erhöhung der Konzentration um 0.5 mM von 2 auf 2.5 mM kam es bei durch Sequenzierung als heterozygot bestimmten Proben zu einer präferentiellen Amplifikation des S-Allels. Bei Verwendung geringerer $MgCl_2$ -Konzentrationen oder höherer Konzentrationen als 4 mM war im Elektrophoresebild überhaupt kein PCR-Ergebnis mehr nachweisbar. Die Gefahr der Fehldeutung eines heterozygoten Genotyps als homozygot SS infolge höherer $MgCl_2$ -Konzentration bei der Genotypisierung des Locus 5-HTTLPR wurde in dieser Arbeit folglich stets beachtet. Diesem Problem wurde durch eine exakte Einstellung der $MgCl_2$ -Konzentration im PCR-Mastermix sowie der Sequenzierung einzelner Stichproben begegnet.

PCRs mit ‚whole genome‘ amplifizierten DNA-Proben durchzuführen, war nicht erfolgreich. Bei der Betrachtung der Elektrophoresegele fanden sich unspezifische Banden, die eine Genotypisierung erschwerten. (vgl. Abb. 9) Der dennoch durchgeführte Versuch bei 685 Proben der Familienstudie Tecumseh ergab eine überproportionale Häufung von Abweichungen von der Mendelschen Vererbung. Entsprechende Proben wurden daraufhin von allen weiteren Analysen ausgeschlossen.

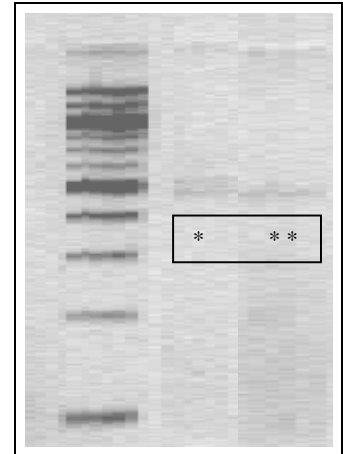


Abbildung 8:
Präferentielle S-Allel-Amplifikation: 5-HTTLPR-PCR bei identischer DNA-Probe (Genotyp LS) in Abhängigkeit von Höhe der $MgCl_2$ -Konzentration im PCR-Mastermix
* 2 mM $MgCl_2$
** 2.5 mM $MgCl_2$

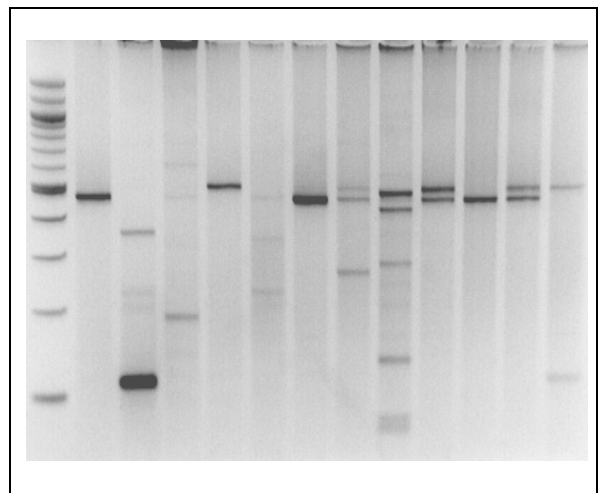


Abbildung 9: 5-HTTLPR-PCR mit ‚whole genome‘ amplifizierten DNA-Proben: Agarose Gelelektrophorese zeigt unspezifische Banden. Eine sichere Genotypisierung von 5-HTTLPR war unmöglich. 685 ‚whole genome‘ amplifizierte DNA-Proben wurden daraufhin von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Zur Genotypisierung des SNPs rs25531 (siehe Abb. 5) wurden RFLPs im Anschluss an die 5-HTTLPR-Genotypisierungs-PCR durchgeführt. Alternativ wurden Versuche mit den beiden isoschizomeren Restriktionsenzymen MspI und HpaII unternommen, wobei HpaII auf Grund akkuraterer Ergebnisse gewählt wurde. Bei Präsenz des selteneren G-Allels kam es immer zum aktiven Schneiden des Enzyms, was nach der Elektrophorese zu einer sichtbaren Bande von 402 bp Länge führte. Ein Phänomen, das sich konsistent im Rahmen der RFLP heterozygoter $L_G S_A$ -Proben zeigte, war das Zurückbleiben einer schwachen, ungeschnittenen Bande von 512 bp, welches auch durch verschiedenste Modifizierungsversuche des RFLP-Protokolls nicht behoben werden konnte.

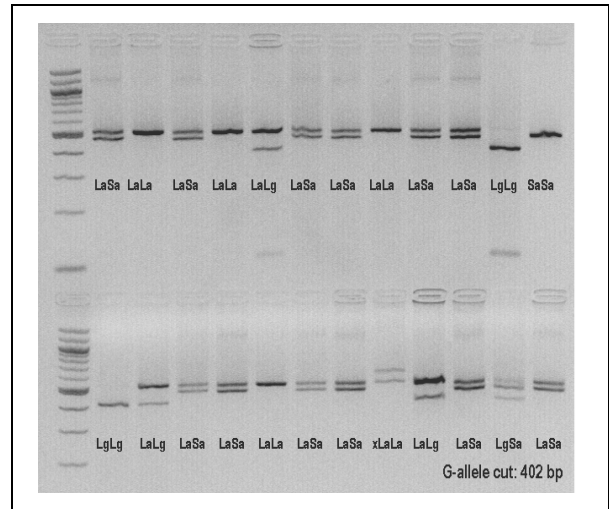


Abbildung 10: Tri- bzw. quatoallele Genotypisierungsergebnis: Agarose-Gelelektrophorese nach 5-HTTLPR-PCR und RFLP mit Restriktionsenzym HpaII von 24 Individuen. Genotypen sind $L_A L_A$ (n=4), $xL_A L_A$ (n=1), $L_A L_G$ (n=3), $L_G L_G$ (n=2), $L_A S_A$ (n=12), $L_G S_A$ (n=1), $S_A S_A$ (n=1)

Als Validierung der entwickelten Genotypisierungsmethode wurde in Stichproben eine DNA-Sequenzierung vorgenommen. Es ergab sich dabei eine Konkordanzrate von 100%. Die DNA-Sequenzierung bestätigte, dass der SNP rs25531 18 Basenpaare 'upstream' des In/Dels von 5-HTTLPR zu lokalisieren ist. Da zudem zehnmals das S_G -Allel experimentell gefunden wurde (vgl. Tab. 2) stellte sich die Kombination von 5-HTTLPR und rs25531 nicht nur als tri- sondern als quatoalleler Locus dar (vgl. auch Abb. 5 und Abb. 10). Weil über die Funktion des S_G -Allels keine Kenntnisse bestehen, wurde der Genotyp jedoch als funktionell triallelisch behandelt.

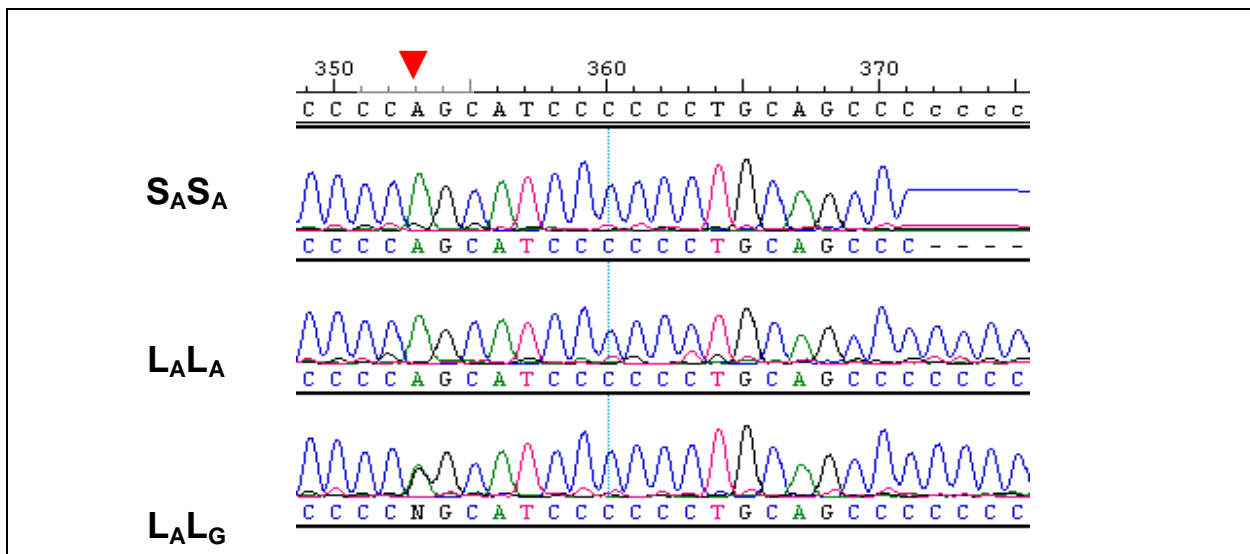


Abbildung 11: DNA-Sequenzierungsergebnis: Drei Individuen mit den Genotypen S_AS_A, L_AL_A und L_AL_G: Nachweis der Lage des SNPs rs25531 (bei 353 bp) = 18 Basenpaare ‚upstream‘ des In/Dels von 5-HTTLPR (ab 371 bp)

3.2 Genotypisierungsergebnis

3.2.1 Tabellarische Übersicht der Genotypisierungsergebnisse

Die Genotypisierungsergebnisse aller bearbeiteten Studien finden sich tabellarisch dargestellt (vgl. Tab. 2). Abgebildet sind jeweils der 5-HTTLPR-Genotyp sowie der quatroallele Genotyp von 5-HTTLPR und rs25531. Der „kombinierte“ Genotyp wurde gemäß der in der jüngeren Literatur vorgeschlagenen Allelgruppierung nach funktionellen Aspekten durchgeführt. Das L_G-Allel wurde zusammen mit dem S_A-Allel als „S“-Allel gerechnet. Aufgrund der Tatsache, dass über funktionelle Auswirkungen des S_G-Allels nichts bekannt ist, wurden die 10 Proben mit diesem Allel im Genotyp bei der Erstellung des „kombinierten“ Genotyps nicht berücksichtigt. Seltene Allelformen von 5-HTTLPR sind in der detaillierten tabellarischen Übersicht der Genotypisierungsergebnisse nicht aufgeführt und wurden wegen mangelnder Kenntnisse ihrer Funktionalität nur in der populationsgenetischen Analyse berücksichtigt. Studien, in deren Untersuchung sich die seltene XL-Allelform fand, wurden allerdings mit einer *- Markierung mit Darstellung des Genotypisierungsergebnisses unterhalb des jeweiligen Tabellenabschnitts versehen.

Tabelle 2: Übersicht aller erhobenen Genotypisierungsergebnisse

MLS; Michigan Logitudinal Studie											
	5-HTTLPR Genotyp				Gesamt			„Kombinierter“ Genotyp			Gesamt
	LL	LS	SS	“LL”				“LS”	“SS”		
Gesamt	260	393	141	794			185	388	215	788	
NEO-PI-R: G1	81	130	49	260			61	125	72	258	
NEO-PI-R: G2	72	114	44	230			54	103	70	227	
5-HTTLPR + rs25531 Genotyp											
	L _A L _A	L _A L _G	L _G L _G	L _A S _A	L _A S _G	L _G S _A	L _G S _G	S _A S _A	S _A S _G	Gesamt	
Gesamt	185	70	7	318	2	67	3	141	1	794	
NEO-PI-R: G1	61	19	2	106	1	22	0	48	1	260	
NEO-PI-R: G2	54	14	1	89	0	24	0	45	0	227	
Tecumseh Blutdruck Programm											
	5-HTTLPR Genotyp				Gesamt			„Kombinierter“ Genotyp			Gesamt
	LL	LS	SS	“LL”				“LS”	“SS”		
Gesamt/ NEO-PI	107	161	47	315			68	161	71	300	
5-HTTLPR + rs25531 Genotyp											
	L _A L _A	L _A L _G	L _G L _G	L _A S _A	L _A S _G	L _G S _A	L _G S _G	S _A S _A	S _A S _G	Gesamt	
Gesamt/ NEO-PI	68	26	1	135	1	23	0	47	0	301	
Alkoholismus Studie											
	5-HTTLPR Genotyp				Gesamt			„Kombinierter“ Genotyp			Gesamt
	LL	LS	SS	“LL”				“LS”	“SS”		
Gesamt	63	68	21	152			34	88	24	146	
NEO-FFI	60	60	29	149			32	81	23	136	
5-HTTLPR + rs25531 Genotyp											
	L _A L _A	L _A L _G	L _G L _G	L _A S _A	L _A S _G	L _G S _A	L _G S _G	S _A S _A	S _A S _G	Gesamt	
Gesamt	34	25	0	63	0	3	0	21	0	146	
NEO-FFI	32	25	0	56	0	3	0	20	0	136	
Bipolar Studie											
Diagnose	5-HTTLPR Genotyp				Gesamt			„Kombinierter“ Genotyp			Gesamt
	LL	LS	SS	“LL”				“LS”	“SS”		
Gesamt	81	106	41	228			53	109	63	225	
BP	26	43	15	84			17	42	24	83	
Kontrolle	55	63	26	144			36	67	39	142	

Diagnose	5-HTTLPR + rs25531 Genotyp									Gesamt
	L _A L _A	L _A L _G	L _G L _G	L _A S _A	L _A S _G	L _G S _A	L _G S _G	S _A S _A	S _A S _G	
Gesamt	54	23	2	85	0	16	0	45	0	225
BP	18	8	1	33	0	7	0	16	0	83
Kontrolle	36	15	1	52	0	9	0	29	0	142
Pritzker Projekt *										
Diagnose	5-HTTLPR Genotyp				Gesamt		„Kombinierter“ Genotyp			Gesamt
	LL	LS	SS	“LL”			“LS”	“SS”		
Gesamt	54	74	29	157			36	76	40	152
MDD	11	20	9	40			9	16	12	37
BP	6	13	4	23			3	11	8	22
Schiz	7	7	5	19			4	10	5	19
Kontrolle	30	34	11	75			20	39	15	74
Diagnose	5-HTTLPR + rs25531 Genotyp									Gesamt
	L _A L _A	L _A L _G	L _G L _G	L _A S _A	L _A S _G	L _G S _A	L _G S _G	S _A S _A	S _A S _G	
Gesamt	36	14	0	62	1	11	0	29	0	153
MDD	9	1	0	15	1	3	0	9	0	38
BP	3	2	0	9	0	4	0	4	0	22
Schiz	4	3	0	7	0	0	0	5	0	19
Kontrolle	20	8	0	31	0	4	0	11	0	74
* Bei einer zusätzlich genotypisierten Kontrolle fand sich der seltene Genotyp XLL bzw. XLL _A										
Studie zu Heroinabusus**										
Diagnose	5-HTTLPR Genotyp				Gesamt		„Kombinierter“ Genotyp			Gesamt
	LL	LS	SS	“LL”			“LS”	“SS”		
Gesamt	62	75	13	150			36	78	34	148
Opioidabusus	32	38	7	77			17	39	20	76
Opioidabusus + MDD	8	6	2	16			6	7	2	15
Diagnose	5-HTTLPR + rs25531 Genotyp									Gesamt
	L _A L _A	L _A L _G	L _G L _G	L _A S _A	L _A S _G	L _G S _A	L _G S _G	S _A S _A	S _A S _G	
Gesamt	36	19	7	59	0	16	0	11	2	150
Opioidabusus	17	9	6	30	0	8	0	6	1	77
Opioidabusus + MDD	6	2	0	5	0	1	0	1	1	16
** Bei zwei zusätzlich genotypisierten Individuen mit Opioidabusus fand sich der seltene Genotyp XLL bzw. XLL _A										

Gesamt Genotypisierungsergebnis aller Studien***										
	5-HTTLPR Genotyp				Gesamt		„Kombinierter“ Genotyp			Gesamt
	LL	LS	SS	“LL”			“LS”	“SS”		
Gesamt	627	877	292	1796		412	900	447	1759	
	5-HTTLPR + rs25531 Genotyp									
	L _A L _A	L _A L _G	L _G L _G	L _A S _A	L _A S _G	L _G S _A	L _G S _G	S _A S _A	S _A S _G	Gesamt
Gesamt	413	196	17	722	4	136	3	294	3	1788

*** Insgesamt fand sich zusätzlich dreimal der Genotyp XLL bzw. XLL_A

3.3 Populationsgenetische Analyse

3.3.1 Frequenzanalyse in unterschiedlichen Populationen

Die Genotypen- und Allelfrequenzen wurden in drei Populationen von insgesamt 1265 Individuen berechnet. Genotypisierungsergebnisse aller im Rahmen dieser Arbeit bearbeiteten Studien wurden in diese Analyse einbezogen. Nach dem Zufallsprinzip wurden ein bzw. zwei nicht miteinander verwandte Familienmitglieder der Familienstudien in die Frequenzanalyse eingeschlossen. Bei 1002 Individuen handelte es sich um weiße US-Amerikaner, zu 75% wohnhaft im Bundesstaat Michigan. 151 Individuen entstammten dem Staatsgebiet Polens. Zudem wurden 112 Afroamerikaner untersucht.

Tabelle 3: Genotypen- und Allelfrequenz von 5-HTTLPR und rs25531 in unterschiedlichen Populationen; berechnet anhand der Genotypisierungsergebnisse aller bearbeiteten Studien

POPULATION	GENOTYPENFREQUENZ										ALLELFREQUENZ					
	N	L _A L _A	L _A L _G	L _G L _G	L _A S _A	L _A S _G	L _G S _A	L _G S _G	S _A S _A	S _A S _G	XLL _A	L _A	L _G	S _A	S _G	xL
Kaukasische US-Amerikaner	1002	.23	.12	.06	.40	.02	.08	.02	.17	.006	006	.49	.11	.40	.002	.0003
Polen	151	.24	.17	.07	.42	.00	.03	.00	.14	00	00	.53	.11	.36	00	00
<i>Kaukasier gesamt</i>	1153	.23	.12	.07	.40	.02	.07	.02	.16	.006	.006	.49	.11	.40	.002	.0003
Afroamerikaner	112	.27	.17	.06	.32	.00	.10	.00	.06	.00	.02	.52	.20	.27	.00	.01

Die Frequenz des S_A -Allels war mit 0.27 am niedrigsten bei Individuen afrikanischen Ursprungs (vgl. Tab. 3). Das L_G -Allel fand sich dagegen mit 0.2 signifikant ($p = 0.007$) häufiger in dieser Population als bei Kaukasiern, bei denen eine Frequenz von 0.11 vorlag. Das mit einer Frequenz von 0.002 sehr selten auftretende S_G -Allel fand sich in dieser Untersuchung nur bei Kaukasiern. Zu beachten ist jedoch, dass etwa 18 mal so viele Kaukasier wie Afroamerikaner untersucht wurden. Von den als selten beschriebenen Allelformen wurde das XL-Allel gefunden. Für Afroamerikaner wurde eine Frequenz des XL-Allels von 0.01 berechnet. In dieser Untersuchung wurde ein XL-Allel auch bei einem US-Amerikaner gefunden, der als kaukasisch klassifiziert worden war.

3.3.2 Kopplungsungleichgewicht

Zur Berechnung des Kopplungsungleichgewichts zwischen dem Polymorphismus 5-HTTLPR und dem direkt 'upstream' gelegenen SNP rs25531 wurden von den Studienteilnehmern der Michigan Longitudinal Studie, der Tecumseh Studie und der Bipolar Studie 273 Einzelpersonen und 141 Trios, zugehörig zu 439 Familien analysiert. Es wurden nur Fälle ausgewählt, in denen eine gesicherte kaukasische Abstammung vorlag. r^2 charakterisiert den Korrelationseffizienten zwischen den beiden Loci rs25531 und 5-HTTLPR, der mit 0.3 nur eine schwache Assoziation angab.

Es erfolgte die zusätzliche Berechnung des D' -Index, welcher die sehr unterschiedlichen Allelfrequenzen der Polymorphismen mit einbezog. Ein D' -Index von 0.59 wies auf das Vorliegen eines Kopplungsungleichgewichtes hin, welches von dem eingesetzten Berechnungsprogramm Haploview auch durch Rotfärbung angezeigt wurde.

Mit einem Kopplungsungleichgewicht von $D' = 0.59$ ist es nicht möglich bei Kenntnis eines der beiden Genotypen direkt auf den Genotyp des anderen Polymorphismus

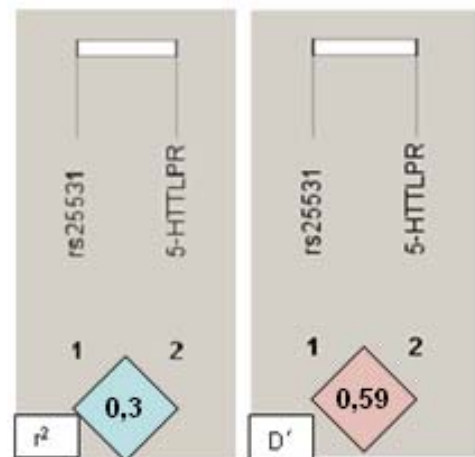


Abbildung 12: Berechnung Kopplungsungleichgewicht (LD) von rs25531 und 5-HTTLPR, $D' = 0.59$ wies auf LD hin.

rückzuschließen. Die Wahrscheinlichkeit, dass bei Auftreten des G-Allels des SNPs das L-Allel von 5-HTTLPR vorliegt ist aber deutlich höher als statistisch zufällig.

3.4 Assoziation zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und Persönlichkeitsmerkmalen

3.4.1 Michigan Longitudinal Studie

863 DNA-Proben konnten für 5-HTTLPR und rs25331 genotypisiert werden. Dabei handelte es sich in 61 Fällen um Duplikate, die zu 100% übereinstimmende Genotypisierungsergebnisse zeigten. Je eine dieser Proben wurde in weiteren Analysen verworfen. Acht weitere Proben wurden aus bekannten Gründen, etwa in vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe als konsistent erwiesene Fehler nach Mendel, von der Analyse ausgeschlossen. Insgesamt lagen somit Genotypisierungsergebnisse von 794 Proben aus 232 Familien vor, die in weitere Analysen integriert werden konnten. Für das L-Allel fand sich eine Frequenz von 0.57 gegenüber der des S-Allels von 0.43 sowohl in der alleinigen Betrachtung der G1-Generation als auch unter Einbeziehung der G2-Generation. Die Durchführung eines χ^2 -Tests für die nicht miteinander verwandten Probanden der G1-Generation bewies das Vorliegen eines Hardy-Weinberg-Equilibriums ($\chi^2 = 0.003$, $p = 0.96$). Auf das Vorhandensein des Hardy-Weinberg-Equilibriums wurde trotz der familiären Struktur auch für die Gesamtheit von G1- und G2-Probanden geprüft und das Gleichgewicht bestätigt ($\chi^2 = 0.13$, $p = 0.72$). Als erster Schritt wurde auf eine Assoziation des 5-HTTLPR-Genotyps mit Neurotizismuswerten untersucht. Die Erhebung von NEO-PI-R-Werten für 260 Probanden in der zunächst analysierten G1-Generation erfolgte zu den Zeitpunkten t2,t3,t4,t5 und t6 der acht Phasen (t1-t8) der Michigan Longitudinal Studie. Die einzelnen NEO-PI-Werte der fünf Erhebungszeitpunkte wurden auf eine Korrelation miteinander überprüft. Da die Pearson Korrelationseffizienten ≥ 0.68 lagen, was einem Signifikanzniveau von $p = 0.001$ entsprach, wurde zur Erstellung eines für die Probanden repräsentativen NEO-PI-R-Wertes der Mittelwert der fünf Erhebungszeitpunkte berechnet und in der Assoziationsanalyse verwendet.

Der absolut gefundene Mittelwert der NEO-PI-R-Werte aller 260 untersuchten Probanden ergab 79.2 mit einer Standardabweichung von ± 24.99 und war somit signifikant höher ($p < 0.001$) als der von Costa und McCrae beschriebene mittlere Neurotizismuswert von 71.7 ± 22.2 .⁶⁸

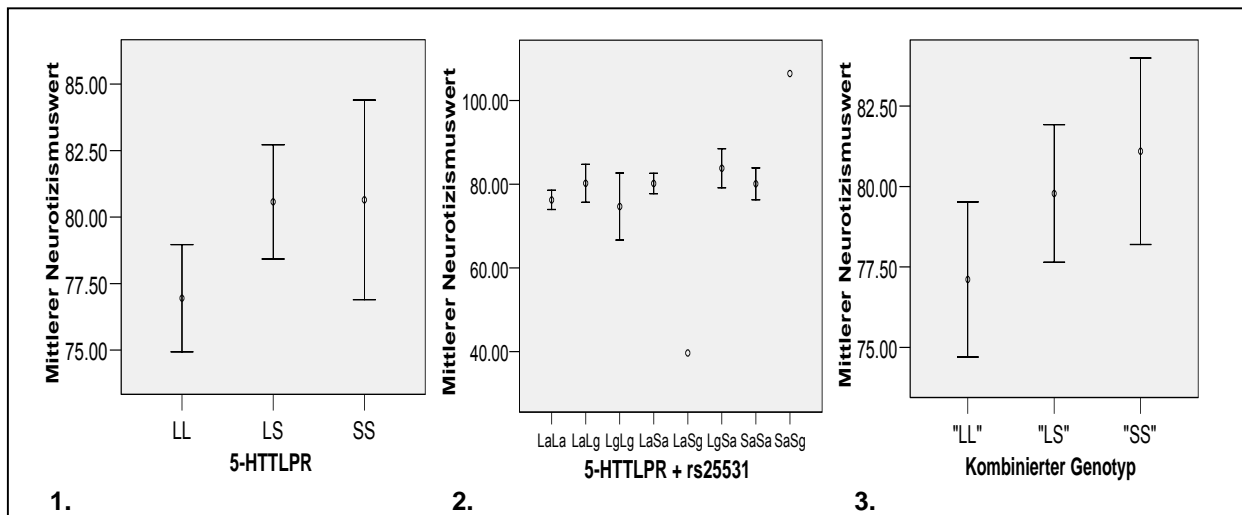


Abbildung 13: MLS G1-Generation: Prüfung auf Assoziation Genotyp – Mittlerer Neurotizismuswert (NEO-PI-R-Wert) bei 260 Individuen. 1. 5-HTTLPR-Genotyp – NEO-PI-R-Wert: Genotyp LL zeigte niedrigsten mittleren Neurotizismuswert, SS den höchsten Wert, Assoziation ohne statistische Signifikanz ($p = 0.5$, $r^2 = 0.005$; $p = 0.31$, $r^2 = 0.004$ nach linearer Regression) 2. 5-HTTLPR + rs25531 – NEO-PI-R-Wert: kein signifikanter Zusammenhang, 3. „Kombinierter“ Genotyp – NEO-PI-R-Wert: Genotyp „LL“ zeigte niedrigsten mittleren Neurotizismuswert, „SS“ den höchsten Wert, Assoziation ohne statistische Signifikanz ($p = 0.59$, $r^2 = 0.004$; $p = 0.32$, $r^2 = 0.004$ nach linearer Regression)

In den 260 Proben der G1-Generation fand sich in 81 Fällen der LL-Genotyp, der mit durchschnittlich 76.95 ± 2.56 den niedrigsten NEO-PI-R-Wert aufwies, 130 mal trat der LS-Genotyp mit einem mittleren NEO-PI-R-Wert von 80.57 ± 2.02 auf. Der SS-Genotyp, der 49 mal zu finden war, wies mit einem Wert von 80.65 ± 3.30 den durchschnittlich höchsten Neurotizismuswert auf, der jedoch nur minimal höher lag als der Wert des heterozygoten 5-HTTLPR-Genotyps. Eine ANOVA-Analyse ergab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen 5-HTTLPR-Genotyp ($p = 0.5$, $r^2 = 0.005$) und Neurotizismuswerten. Eine lineare Regression zeigte einen p-Wert von 0.31 und $r^2 = 0.004$ an. Die Einbeziehung des SNPs rs25531 in der Analyse des „kombinierten“ Genotyps, bei welchem das L_G -Allel als „S“-Allel gewertet wurde, zeigte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Genotyp und Neurotizismuswerten ($p = 0.59$, $r^2 = 0.004$ – nach linearer Regression: $p =$

0.32, $r^2 = 0.004$). Den niedrigsten mittleren Neurotizismuswert zeigte der $L_G L_G$ -Genotyp mit 74.83. Hier lag jedoch eine Standardabweichung von ± 16.31 vor. Der durchschnittliche NEO-PI-R-Wert des $L_A L_A$ -Genotyps lag bei 76.25 ± 2.95 . Die Mittelwerte von $L_A L_G$ mit 80.21 ± 5.29 , $L_A S_A$ mit 80.175 ± 2.24 und $S_A S_A$ mit 80.11 ± 3.33 wiesen ähnliche Neurotizismuswerte auf. Der mittlere NEO-PI-R-Wert des $L_G S_A$ -Genotyps lag mit 83.83 ± 4.92 am höchsten. Das äußerst selten vorkommende S_G -Allel zeigte in dieser Untersuchung Extremwerte an. Der $L_A S_G$ -Genotyp wies einen auffallend niedrigen Wert von 39.67 ± 23.07 auf und der $S_A S_G$ -Genotyp zeigte mit 106.47 ± 23.07 einen sehr hohen Wert an. Sowohl der $L_A S_G$ - als auch der $S_A S_G$ -Genotyp traten in der untersuchten G1-Subgruppierung mit NEO-PI-R-Werten nur ein einziges Mal auf und wiesen eine dementsprechend hohe Standardabweichung auf. Aus diesem Grund und weil über einen Effekt des G-Allels von rs25531 nichts bekannt ist, wurden diese beiden Proben, wie bereits angesprochen, aus weiteren Analysen ausgeschlossen (vgl. Abb. 13).

Der durchschnittliche NEO-PI-R-Wert für die Domäne Neurotizismus bei Probanden weiblichen Geschlechts ($n = 142$) der G1-Generation lag mit 83.04 ± 23.21 deutlich höher als der Mittelwert von männlichen Probanden ($n = 118$), der bei 75.14 ± 22.19 lag. Dies deckt sich fast exakt mit den in der Literatur zu findenden NEO-PI-R-Mittelwerten für Männer bei 75.2 ± 19.9 und Frauen bei 83.1 ± 21.7 .⁶ Der Einfluss des Geschlechts auf die Höhe der Neurotizismuswerte stellte sich mit einem p-Wert von 0.001 hier somit signifikant dar (vgl. Abb. 14). Daher wurde die oben

erwähnte Assoziation zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und NEO-PI-R-Wert nochmals in einer ANOVA- und Regressionsanalyse unter Einbeziehung des Geschlechts als Kovariate. Auch dabei wurde keine signifikante Assoziation gefunden ($p = 0.61$). Eine parallele

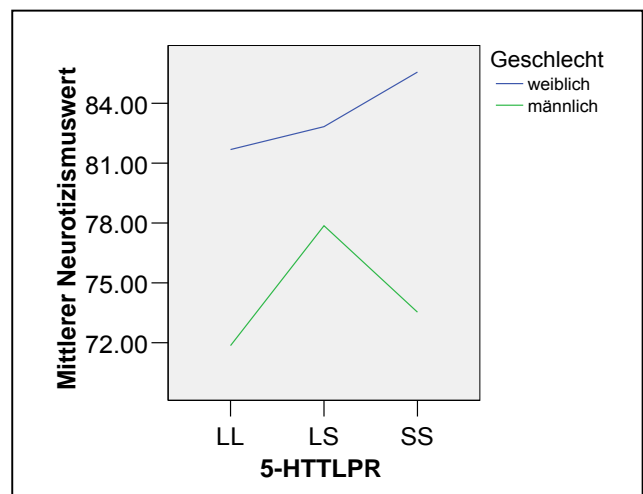


Abbildung 14: MLS G1: Einfluss des Geschlechts auf die Höhe des mittleren Neurotizismuswertes. Das weibliche Geschlecht zeigte unabhängig vom 5-HTTLPR-Genotyp signifikant höhere Neurotizismuswerte als das männliche Geschlecht. ($p = 0.001$)

Analyse des „kombinierten“ Genotyps ist graphisch nicht dargestellt, zeigte aber nahezu identische Ergebnisse, ebenfalls ohne statistische Signifikanz ($p = 0.7$).

Weiterhin wurde bei den 260 Probanden der G1-Generation geprüft, ob die DSM IV-Diagnose des Alkoholabusus, beziehungsweise der Alkoholabhängigkeit in Erfassung der Lebenszeitprävalenz Einfluss auf die Verteilung der Neurotizismuswerte hatte (vgl. Abb. 15). Bei Probanden mit Alkoholismusdiagnose ($n = 137$) zeigte sich ein signifikant höherer mittlerer Neurotizismuswert von 82.06 ± 22.94 als bei Studienteilnehmern ohne Alkoholabusus bzw. -missbrauch ($n = 123$), die einen Mittelwert von 77.12 ± 22.96 aufwiesen ($p = 0.02$).

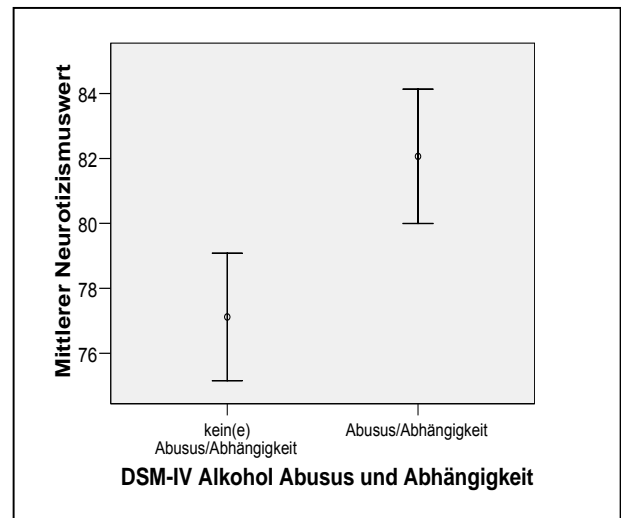


Abbildung 15: Alkoholabusus – Neurotizismus: In der Analyse von 260 Probanden der MLS G1 fanden sich bei Probanden mit Alkoholabusus ($n = 137$) signifikant höhere Neurotizismuswerte als bei Probanden ohne Abusus ($n = 123$), $p = 0.02$

Eine Aufschlüsselung in homo- und heterozygote Allelträger ergab bei Probanden mit und ohne Alkoholabusus vergleichbare Verteilungsmuster der mittleren Neurotizismuswerte, jedoch auf quantitativ unterschiedlichem Niveau (vgl. Abb. 16a). Übereinstimmend fanden sich geringere Neurotizismuswerte bei Individuen mit LL-Genotyp gegenüber Trägern des S-Allels. So fand sich bei den Probanden ohne Alkoholabusus bei Vorliegen des Genotyps SS mit einem mittleren Neurotizismuswert von 77.69 ± 23.28 ein niedrigerer Wert als bei den Individuen mit dem Genotyp SS unter den Studienteilnehmern mit Alkoholabusus, die einen mittleren Neurotizismuswert von 84.12 ± 24.73 boten. Dieser Trend war statistisch nicht signifikant ($p = 0.49$). Auch eine Assoziation der Interaktion DSM-IV-Diagnose und 5-HTTLPR-Genotyp mit den mittleren Neurotizismuswerte wurde nicht gefunden ($p = 0.87$). Eine Analyse des „kombinierten“ Genotyps zeigte ebenfalls höhere mittlere

Neurotizismuswerte bei Probanden mit Alkoholabusus gegenüber denen ohne eine derartige DSM-IV-Diagnose (vgl. Abb. 16b). Für die Subgruppe der Individuen mit Abusus/Abhängigkeit zeigte sich der bekannte Trend der höchsten Neurotizismuswerte mit 86.68 ± 25.03 bei Probanden mit "SS"- Genotyp und der niedrigste Wert mit 76.70 ± 19 bei Vorliegen des "LL"-Genotyps. Beim Genotyp "LS" fand sich ein mittlerer Neurotizismuswert von 81.71 ± 23.08 . Die Probanden ohne Alkoholabusus zeigten eine andere Verteilung. Hier fand sich bei Individuen mit "SS"-Genotyp der niedrigste mittlere Neurotizismuswert mit 74.49 ± 22.7 und der höchste Wert von 78.29 ± 24.44 bei Probanden mit heterozygotem "LS"- Genotyp. Bei Individuen des Genotyps "LL" fand sich ein mittlerer Neurotizismuswert von 77.5 ± 19.24 . Eine signifikante Assoziation zwischen der abhängigen Variable des mittleren Neurotizismuswertes und der Interaktion des „kombinierten“ Genotyps und der DSM-IV-Diagnose wurde auch hier nicht gefunden. ($p = 0.36$)

230 Probanden der G2-Generation, für die NEO-PI-R Werte vorlagen, wurden untersucht. Für die G2-Generation lagen

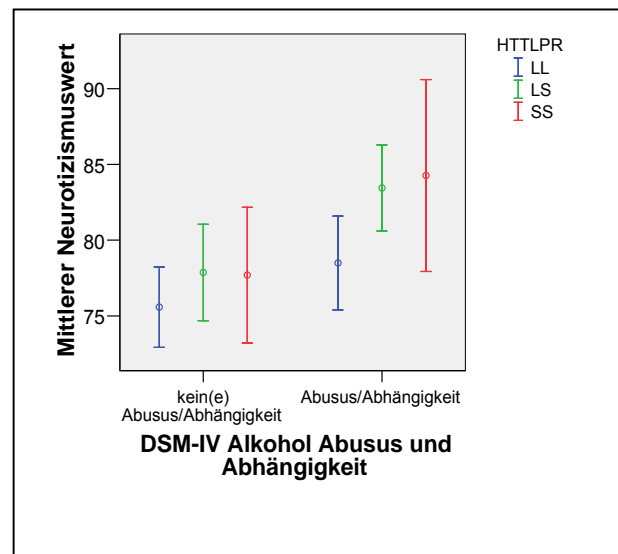


Abbildung 16a: 5-HTTLPR - Alkoholabusus – Neurotizismus: Übereinstimmend fanden sich niedrigere mittlere Neurotizismuswerte bei Individuen des Genotyps LL bei Probanden mit und ohne Alkoholabusus. Die Interaktion von 5-HTTLPR und Alkoholabusus mit Neurotizismus zeigte sich statistisch nicht signifikant ($p = 0.86$)

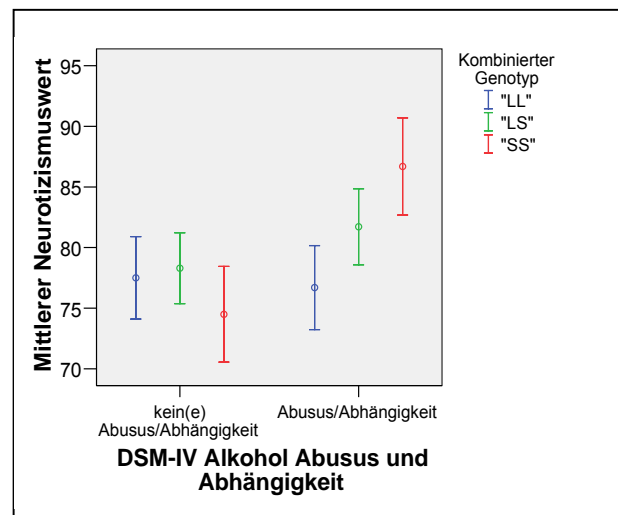


Abbildung 16b: „Kombinierter“ Genotyp – Alkoholabusus – Neurotizismus: Bei Probanden mit Alkoholabusus fanden sich bei Individuen mit "LL" die niedrigsten und bei Individuen mit "SS" den höchsten mittleren Neurotizismuswert. Bei Probanden ohne Abusus zeigten die Individuen mit "SS" den niedrigsten mittleren Neurotizismuswert. Die Interaktion von „kombiniertem“ Genotyp und Alkoholabusus mit Neurotizismus zeigte sich statistisch nicht signifikant ($p = 0.37$)

NEO-PI-R-Werte der Erhebungsphasen t5, t6, t7 und t8 vor. Wie auch in der Analyse der Elterngeneration wurde die Korrelation der einzelnen Neurotizismuswerte der einzelnen Erhebungsphasen überprüft. Die Pearson Korrelation zeigte sich mit Werten ≥ 0.62 auf dem 0.01 Level signifikant, weshalb der Mittelwert des NEO-PI-R-Wertes errechnet und in der folgenden Analyse verwendet wurde. Der NEO-PI-R-Mittelwert von 83.49 ± 20.20 lag etwas höher als der mittlere Wert der Elterngeneration. McCrae et al. beschrieben, dass die NEO-PI-R-Werte im „Collegealter“ zwischen 17 und 20 Jahren mit einem Durchschnittswert von 96.3 ± 21.9 deutlich höher liegen als in anderen Lebensphasen.⁵ Die Erhebungsphasen t5 und t6 umfassten diese Lebensjahre und sind in die Berechnung des mittleren NEO-PI-R-Wertes eingegangen.

Die Ergebnisse der Prüfung auf eine Assoziation zwischen Neurotizismuswerten und biallelem beziehungsweise tri/quatroallem 5-HTTLPR-Genotyp ähnelten denen der Elterngeneration. Es wurde ein schwacher Hinweis gefunden, der höhere NEO-PI-R-Werte für den SS-Genotyp gegenüber dem LS- und LL-Genotyp andeutete, jedoch nicht signifikant war ($p = 0.32$, $r^2 = 0.026$). Die Gruppierung des L_G-Allels zusammen mit dem S-Allel führte wie auch in der G1-Generation zur weiteren Abschwächung des Signifikanzniveaus ($p = 0.58$, $r^2 = 0.005$). Die dargestellten Ergebnisse der G2-Generation (vgl. Abb. 17) sind jedoch nur bedingt aussagekräftig, da der Studie eine familiäre Struktur zugrunde lag und es sich bei den Probanden der Kindergeneration somit teilweise um Geschwister handelte.

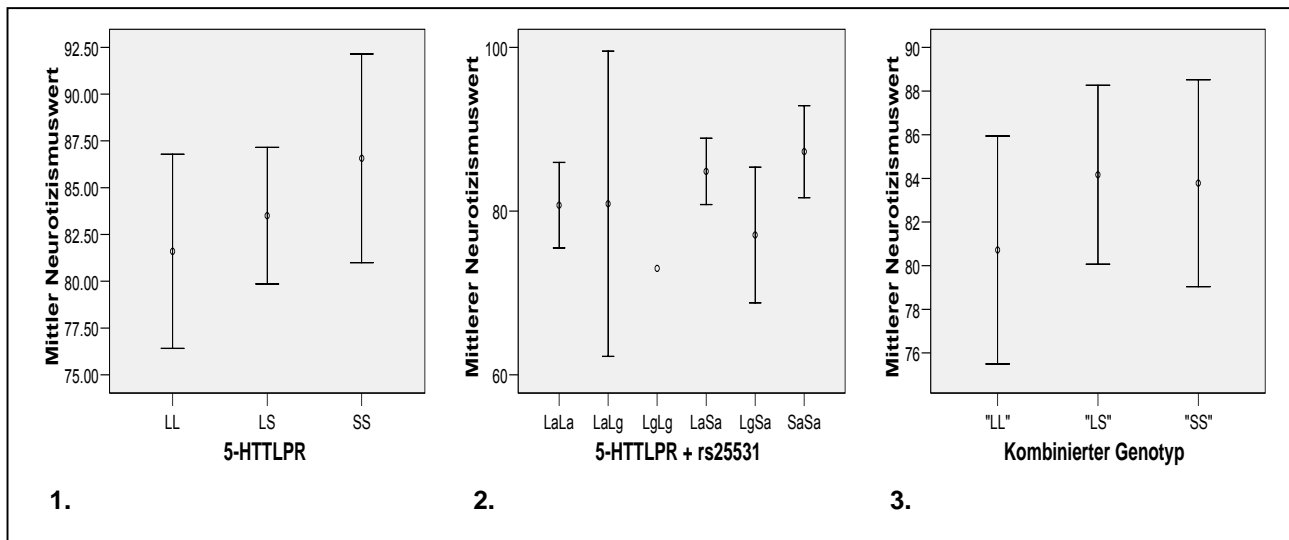


Abbildung 17: MLS G2-Generation: Prüfung auf Assoziation Genotyp - Mittlerer Neurotizismuswert (NEO-PI-R-Wert) bei 230 Individuen. 1. 5-HTTLPR-Genotyp – NEO-PI-R-Wert: Genotyp LL zeigte niedrigsten mittleren Neurotizismuswert, SS den höchsten Wert, Assoziation ohne statistische Signifikanz ($p = 0.32$, $r^2 = 0.026$) 2. 5-HTTLPR + rs25531 – NEO-PI-R-Wert: kein signifikanter Zusammenhang, 3. „Kombinierter“ Genotyp – NEO-PI-R-Wert: Genotyp „LL“ zeigte niedrigsten mittleren Neurotizismuswert, Assoziation ohne statistische Signifikanz ($p = 0.58$, $r^2 = 0.005$) Auf Grund der familiären Struktur Einschränkung der Ergebnisse der G2-Generation. Eine MERLIN-Analyse zur Berücksichtigung der Familienstruktur erfolgte (siehe Fließtext).

Eine Assoziations-Analyse, die die G1-und G2-Generation umfasste, wurde aus diesem Grund mit dem Programm MERLIN durchgeführt, welches die Familienstruktur in der Analyse berücksichtigte. Insgesamt wurden nach Ausschluss der beiden Genotypen, die ein S_G -Allel aufwiesen, 485 Proben in die Analyse integriert. Ein Assoziationstest ergab hier einen signifikanten Zusammenhang zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und NEO-PI-R-Wert ($p = 0.028$). Dabei erklärte der 5-HTTLPR-Genotyp 4.2% der genetischen Varianz der Neurotizismuswerte. Die Gruppierung des L_G -Allels zum S-Allels zum „kombinierten“ Genotyp zeigt dagegen keine signifikante Assoziation ($p = 0.1$).

3.4.2 Tecumseh Studie

Analysiert wurden DNA-Proben von 315 Studienteilnehmern des Tecumseh Blutdruck Programms. Die Genotypisierung wurde zweifach durchgeführt und auf Abweichungen der Mendelschen Vererbungsregeln untersucht. Drei „Mendelsche Fehler“ blieben auch nach erneuter Regentypisierung bestehen.

Geprüft wurde auf eine Assoziation zwischen dem 5-HTTLPR-Genotyp und den NEO-PI-Werten als Neurotizismusparameter der Studienteilnehmer (vgl. Abb. 18). Bei den untersuchten Studienteilnehmern fand sich ein Mittelwert von 86.09 mit einer Standardabweichung von 20.11 für beide Geschlechter.

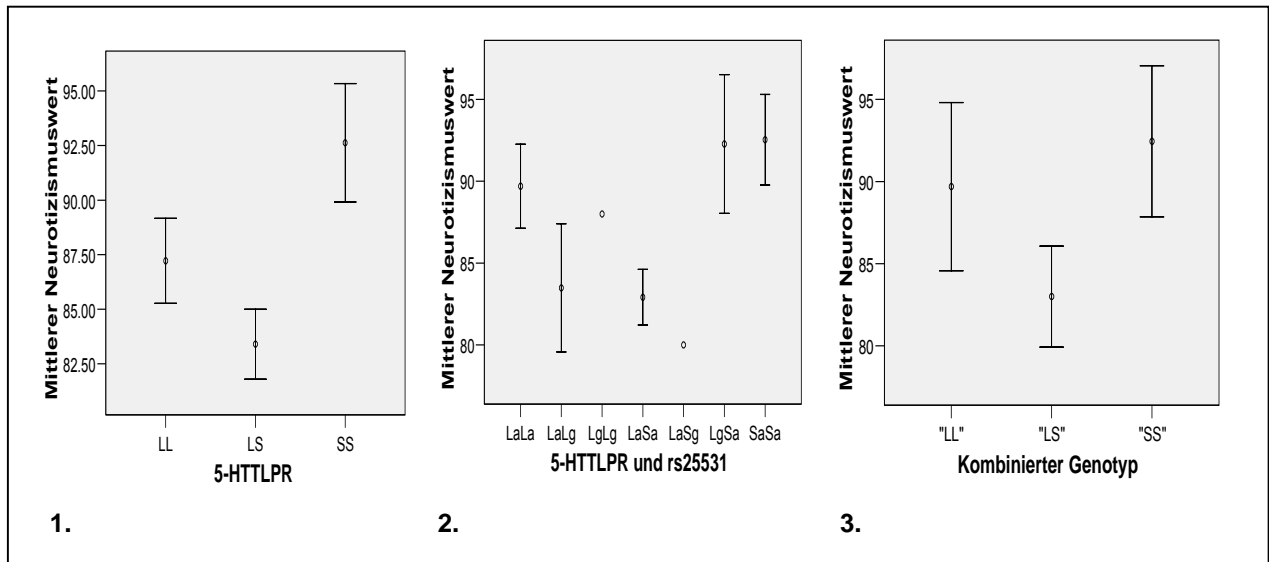


Abbildung 18: Tecumseh Studie: Prüfung auf Assoziation Genotyp – Mittlerer Neurotizismuswert bei 316 Individuen. 1. 5-HTTLPR-Genotyp – NEO-PI-Wert: Anders als im Großteil der publizierten Ergebnisse zeigte der Genotyp LS den niedrigsten mittleren Neurotizismuswert, SS aber den höchsten Wert, Assoziation mit statistischer Signifikanz ($p = 0.02$, $r^2 = 0.03$) 2. 5-HTTLPR + rs25531 – NEO-PI-Wert: Vergleichbar hohe Neurotizismuswerte von $L_G S_A$ - und $S_A S_A$ -Genotyp, kein signifikanter Zusammenhang, 3. „Kombinierter“ Genotyp – NEO-PI-Wert: Genotyp „LS“ zeigte wiederum den niedrigsten und „SS“ den höchsten mittleren Neurotizismuswert, Assoziation mit statistischer Signifikanz ($p = 0.002$, $r^2 = 0.04$) Auf Grund der familiären Struktur Einschränkung der Ergebnisse der G2-Generation. Eine MERLIN-Analyse zur Berücksichtigung der Familienstruktur erfolgte (siehe Fließtext).

Eine ANOVA-Analyse ergab eine signifikante Assoziation ($p = 0.02$, $r^2 = 0.03$) zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und NEO-PI-Wert. Probanden mit SS-Genotyp wiesen einen Mittelwert von 92.53 ± 2.90 auf, Probanden mit LL-Genotyp einen mittlerem NEO-PI-R-Wert von 90.42 ± 6.19 und LS-Träger zeigten einen mittleren Wert von 84.97 ± 6.79 . Die Neurotizismuswerte der Individuen mit LL-Genotyp zeigten sich somit anders als in den meisten publizierten Studien höher als die Werte für Studienteilnehmer mit heterozygotem Genotyp. Die Einbeziehung des SNPs rs25331 in die Analyse zeigte, dass Individuen mit $L_G S_A$ -Genotyp vergleichbar hohe Neurotizismuswerte (92.27 ± 20.33) aufwiesen wie Studienteilnehmer mit $S_A S_A$ -Genotyp (92.53 ± 18.98), während die Werte von $L_A L_G$ -Trägern

(83.48 ± 19.59) und $L_A S_A$ -Trägern (82.91 ± 19.73) in einem quantitativ ähnlichen Bereich lagen. Die Gruppierung des L_G -Allels zusammen mit dem S-Allel zeigte in einer ANOVA-Analyse eine signifikantere Assoziation ($p = 0.002$, $r^2 = 0.04$) im Vergleich zur alleinigen Analyse von 5-HTTLPR und somit einen vermeintlichen Effekt des G-Allels des SNPs rs25531.

Da es sich bei der Tecumseh Studie um eine Familienstudie handelte, wurden die gleichen Assoziations-Analysen auch mit dem Programm MERLIN vorgenommen, welches die familiäre Struktur berücksichtigt. Hier fand sich keine Assoziation zwischen 5-HTTLPR-Genotyp ($p = 0.58$) und auch nicht nach der Gruppierung des L_G -Allels zum S-Allel ($p = 0.48$), welches sich nicht nur durch die Berücksichtigung der Familienähnlichkeit, sondern auch durch die automatische Durchführung einer linearen Regression zustande kam.

Um dennoch auf einen Effekt des G-Allels zu prüfen, erfolgte wegen des in dieser Analyse als dominant erscheinenden 5-HTTLPR- L-Allels eine Zusammenfassung von LL- und LS-

Genotyps. Dies führte zu einer nominal signifikanten Assoziation ($p = 0.04$) zwischen Genotyp und NEO-PI-Werten. Die Analyse des „kombinierten“ Genotyps zeigte eine deutliche Signifikanzsteigerung ($p = 0.01$) (vgl. Abb. 19).

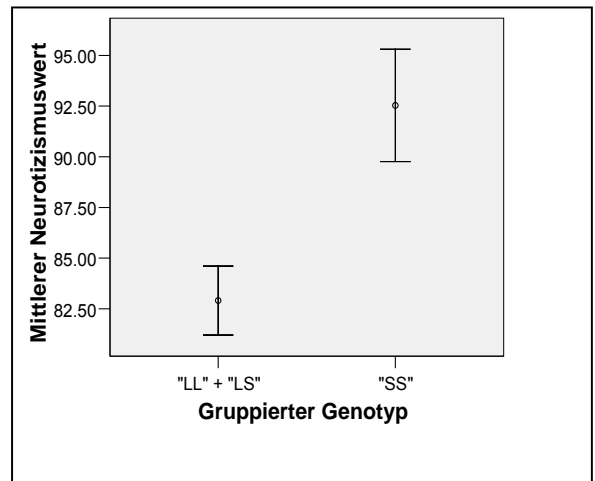


Abbildung 19: Gruppierter Genotyp – Neurotizismus: In MERLIN-Analyse erfolgte eine Allelkategorisierung „LL“ + „LS“ versus „SS“ gemäß der Höhe erreichten Neurotizismuswerte (vgl. Abb. 18). Im direkten Vergleich ergab sich in der Assoziationsanalyse des „kombinierten“ Genotyps mit mittlerem NEO-PI-Wert eine Signifikanzsteigerung ($p = 0.01$) zur Analyse des 5-HTTLPR-Genotyps ($p = 0.04$).

3.4.3 Gemeinsame Analyse von Michigan Longitudinal Studie und Tecumseh Studie

Neurotizismuswerte lagen für Probanden der MLS und der Tecumseh Studie vor. Eine gemeinsame MERLIN-Analyse von 788 Proben beider Studien ergab einen Trend ($p = 0.07$) bezüglich einer Assoziation zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und Neurotizismus. Die Trendrichtung entsprach zuvor publizierten Ergebnissen, weshalb statt eines zweiseitigen

ein einseitiger T-Test durchgeführt wurde. Ein p-Wert von 0.03 zeigte eine statistisch signifikante Assoziation an. Die Analyse des „kombinierten“ Genotyps, in welcher das L_G-Allel zusammen mit dem S_A-Allel als „S“-Allel gerechnet wurde, führte weder in einem zweiseitigen ($p = 0.28$) noch in einem einseitigen T-Test ($p = 0.14$) zu einem statistisch signifikanten Ergebnis.

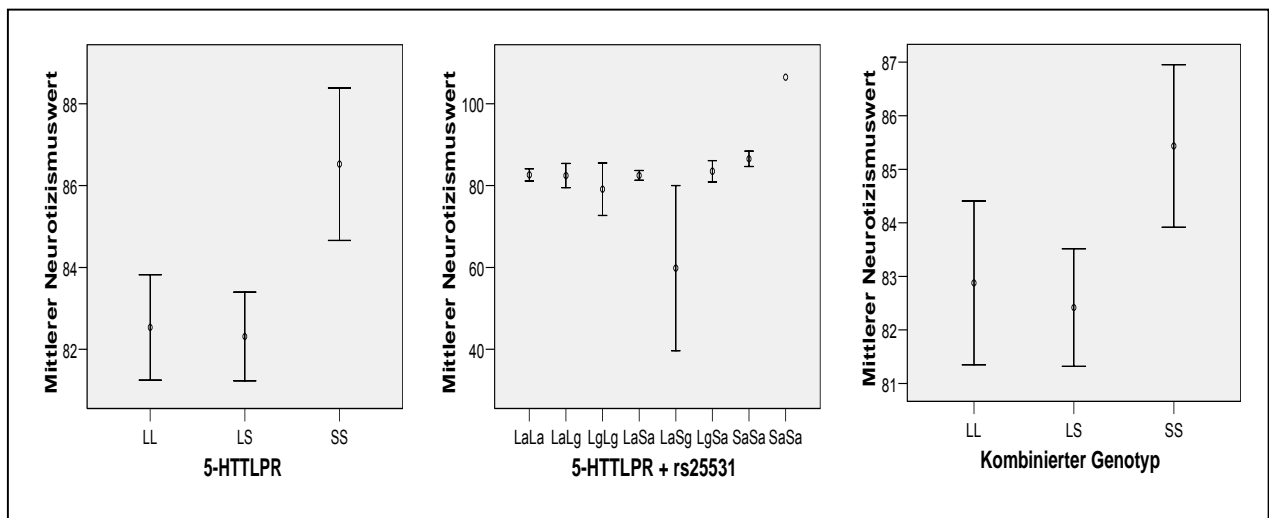


Abbildung 20: MLS und Tecumseh Studie: Prüfung auf Assoziation Genotyp – Mittlerer Neurotizismuswert bei 788 Individuen. In der gemeinsamen MERLIN Analyse der beiden Studien ergab sich eine statistisch signifikante Assoziation zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und mittlerem Neurotizismuswert ($p = 0.03$). Die Analyse des „kombinierten“ Genotyps ergab denselben Trend der höchsten Neurotizismuswerte bei Vorliegen des Genotyps „SS“, aber keine Assoziation von statistischer Signifikanz ($p = 0.14$).

3.4.4 Alkoholismus Studie

In der experimentellen Untersuchung dieser Arbeit wurden auch DANN-Proben von 152 Individuen der Alkoholismus Studie genotypisiert, denen die ICD-10-Diagnose F10 (Alkoholabhängigkeit) gemeinsam war. Bei 146 der Proben konnte nicht nur der 5-HTTLPR-Genotyp, sondern zusätzlich auch der SNP rs25531-Genotyp identifiziert werden (vgl. Tab. 2). Die Genotypisierungsergebnisse wurden auf das Hardy-Weinberg-Equilibrium überprüft und dieses durch einen Chi²-Test bestätigt (Chi² = 0.15, $p = 0.69$). Für das L-Allel von 5-HTTLPR fand sich eine Frequenz von 0.64 und für das S-Allel lag eine Frequenz von 0.36 vor. Im Rahmen der Alkoholismus Studie ist der NEO-FFI-Persönlichkeitstest bei 136 Probanden durchgeführt worden. In einer ANOVA-Analyse war keinerlei Assoziation der

vorliegenden Neurotizismuswerte mit dem 5-HTTLPR-Genotyp auffindbar. ($p = 0.94$, $r^2 = 0.0001$). Auch eine Analyse unter der Verwendung des „kombinierten“ Genotyps erbrachte keine relevante Signifikanzsteigerung ($p = 0.85$, $r^2 = 0.0003$), weshalb auf eine graphische Darstellung verzichtet wurde.

In der Auswertung dieser Studie fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Domäne der Offenheit des NEO-FFI und dem 5-HTTLPR-Genotyp. Die 140 vorliegenden NEO-FFI-Werte zeigten sich normalverteilt. Es lag ein Mittelwert von 27.01 ± -6.74 vor.

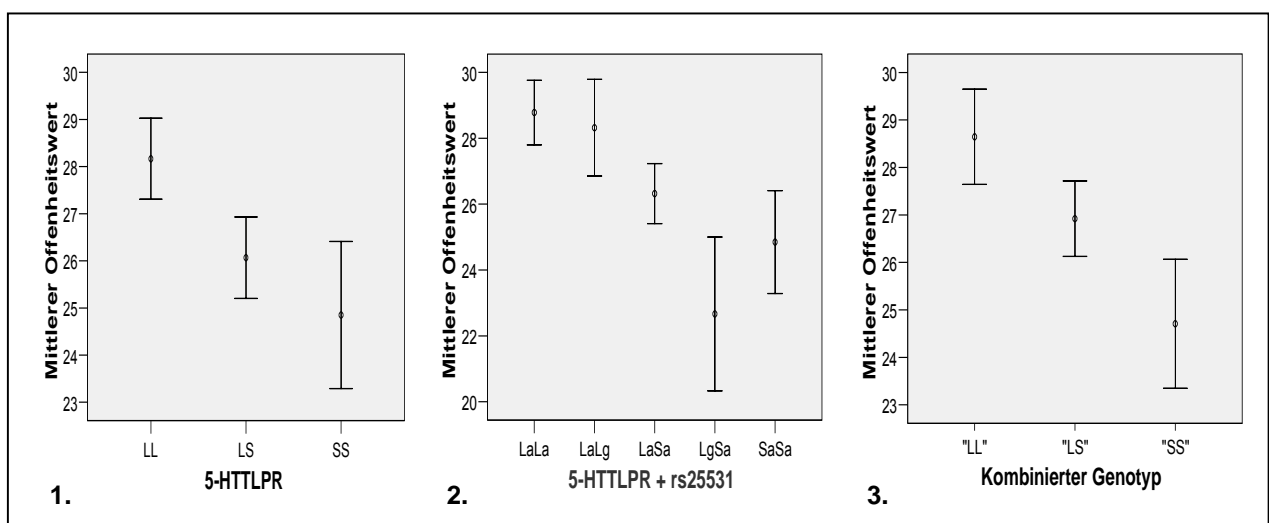


Abbildung 21: Alkoholismusstudie: Prüfung auf Assoziation Genotyp – Mittlerer Offenheitswert bei 140 Individuen. 1. 5-HTTLPR-Genotyp – NEO-FFI-Wert: Der Genotyp LL zeigte signifikant höhere mittlere Offenheitswerte als SS ($p = 0.03$, $r^2 = 0.03$) 2. 5-HTTLPR-Genotyp + rs25531 – NEO-FFI-Wert: Signifikante Assoziation ($p = 0.01$, $r^2 = 0.05$) 3. „Kombiniertes Genotyp“ – NEO-FFI-Wert: Der Genotyp „LL“ zeigte signifikant höhere mittlere Offenheitswerte als „SS“ ($p = 0.03$, $r^2 = 0.04$)

Der höchste mittlere NEO-FFI-Wert für Offenheit fand sich beim LL-Genotyp mit 28.17 ± 0.89 . Der LS-Genotyp wies einen mittleren Wert von 26.07 ± 0.87 und der SS-Genotyp einen Mittelwert von 24.85 ± 1.5 . Wurde der SNP rs25531 in die Analyse einbezogen, so zeigte der $L_A L_A$ -Genotyp mit 28.78 ± 1.17 einen minimal höheren Wert als der $L_A L_G$ -Genotyp mit 28.32 ± 1.33 . Einen mittleren Wert von 26.32 ± 0.89 stellte der $L_A S_A$ -Genotyp. Der $L_G S_A$ -Genotyp zeigte den niedrigsten Mittelwert von 22.67 ± 3.8 . Dem $S_A S_A$ -Genotyp kam der Wert von 24.85 zu, jedoch mit einer geringeren Standardabweichung von ± 1.48 . Insgesamt ergab sich für den 5-HTTLPR-Genotyp nach der Durchführung einer linearen Regression eine signifikante Assoziation zur Domäne der Offenheit des NEO-FFI ($p =$

0.03, $r^2 = 0.03$) Die quatroallele Analyse von 5-HTTLPR und rs25531 zeigte sich höher signifikant ($p = 0.01$, $r^2 = 0.05$). Die Analyse des „kombinierten“ Genotyps ergab keinen statistisch detektierbaren Unterschied der Signifikanz zu den Ergebnissen der alleinigen Betrachtung des 5-HTTLPR-Genotyps und der berechnete Korrelationseffizient lag mit einem r^2 von 0.04 nur minimal höher.

3.5 Analyse der Genotypenfrequenz bei psychiatrischen Erkrankungen

3.5.1 Bipolar Studie

Von den Proben der Bipolar Studie wurde von 228 Individuen der 5-HTTLPR-Genotyp bestimmt, von 225 Individuen auch der rs25531-Genotyp (vgl. Tab. 2 / Tab. 4a/b). Die Auftretensfrequenzen des bi- und quatroallelen 5-HTTLPR-Genotyps der Studienteilnehmer mit Bipolarer Erkrankung und der gesunden Kontrollprobanden wurden berechnet. Die Durchführung eines Chi²-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0.49$) in der Auftretensfrequenz der verschiedenen 5-HTTLPR-Genotypen zwischen gesunden Studienteilnehmern und Patienten, diagnostiziert mit Bipolarer Erkrankung. Die Durchführung einer logistischen Regression zeigte mit fast identischen p-Werten ein vergleichbares Resultat. Auch die Verteilungsfrequenzen in der Analyse des „kombinierten“ Genotyps erwiesen sich weder im Chi²-Test noch bei Durchführung einer logistischen Regression als statistisch signifikant ($p = 0.71$).

Tabelle 4a: Diagnose * 5-HTTLPR-Genotyp Kreuztabelle ($p = 0.493$)

		5-HTTLPR-Genotyp			Gesamt
		LL	LS	SS	
Diagnose	Kontrolle	55	63	26	144
	BP	26	43	15	84
Gesamt		81	106	41	228

Tabelle 4b: Diagnose * „Kombinierter“ Genotyp Kreuztabelle ($p = 0.96$)

		„Kombinierter“ Genotyp			Gesamt
		"LL"	"LS"	"SS"	
Diagnose	Kontrolle	36	67	39	142
	BP	17	42	24	83
Gesamt		53	109	63	225

3.5.2 Pritzker Projekt

157 Proben der Probanden des Pritzker Projektes wurden genotypisiert und analysiert (vgl. Tab. 2). Das L-Allel von 5-HTTLPR fand sich mit einer Häufigkeit von 0.58 und das S-Allel zeigte eine Frequenz von 0.42. Ein χ^2 -Test zeigte ein Hardy-Weinberg-Equilibrium an ($\chi^2 = 0.7$, $p = 0.68$). Kreuztabellen wurden angefertigt, um zu überprüfen, ob sich die Genotypfrequenzen bei Individuen, diagnostiziert mit Major Depression, Bipolarer Erkrankung und Schizophrenie, sowie Kontrollen statistisch signifikant voneinander unterscheiden (vgl. Tab. 5a/b). Weder die Betrachtung des 5-HTTLPR-Genotyps allein ($p = 0.1$), noch die Einbeziehung von rs25531 ($p = 0.2$) und auch nicht die Gruppierung von L_G -Allel zum S-Allel ($p = 0.15$) zeigten einen statistisch relevanten Zusammenhang zwischen Genotyp und Erkrankungsstatus. Auch eine Analyse, in der nur zwei Gruppen – Kontrollen und Erkrankte – differenziert wurden, zeigte keine statistisch signifikante Assoziation zum 5-HTTLPR-Genotyp ($p = 0.2$) und dem „kombinierten“ Genotyp ($p = 0.11$). Wurden nicht die Genotypen sondern die Frequenz des L-Allels gegenüber der des S-Allels bei psychiatrisch Erkrankten gegenüber den Kontrollen betrachtet, ergaben sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede, aber deutliche Trends wurden sichtbar ($p = 0.11$). Eine logistische Regression ergab einen Trend mit einem p-Wert von 0.08. Wurde das L_G -Allel als S-Allel gerechnet und die Analyse durchgeführt, so zeigte sich der Trend des häufiger auftretenden S-Allels leicht verstärkt. ($p = 0.1$). Eine logistische Regression ergab hier einen p-Wert von 0.07.

Tabelle 5a: Diagnose * 5-HTTLPR-Genotyp Kreuztabelle ($p = 0.102$)

		5-HTTLPR-Genotyp			Gesamt
		LL	LS	SS	
Diagnose	MDD	11	20	9	40
	BP	6	13	4	23
	Schiz	7	7	5	19
	Kontrolle	30	34	11	75
Gesamt		54	74	29	157

Tabelle 5b: Diagnose * „Kombinierter“.Genotyp Kreuztabelle ($p = 0.147$)

		„Kombinierter“ Genotyp			Gesamt
		“LL”	“LS”	“SS”	
Diagnose	MDD	9	16	12	37
	BP	3	11	8	22
	Schiz	4	10	5	19
	Kontrolle	20	39	15	74
Gesamt		36	76	40	152

3.5.3 Studie zu Heroinabusus

Erfolgreich genotypisiert werden konnten 150 DNA-Proben von Studienteilnehmern dieser Drogenabusus Studie. Für 93 der Probanden, 69 männlichen und 24 weiblichen Geschlechts, lagen Informationen zur DSM-IV Diagnose MDD vor. Es erfolgte eine Kategorisierung der Probanden in zwei Gruppen: eine Gruppe ohne Depressionsdiagnose und eine Gruppe mit aktueller Diagnose einer MDD bzw. einer Depressionsdiagnose in der Vergangenheit. 16 der Probanden zeigten neben einer manifesten Opioidabhängigkeit eine akute oder subakute psychiatrische Diagnose einer Major Depression auf. Mittels einer logistischen Regression wurde kein statistisch signifikanter Unterschied der Genotypenfrequenzen bzw. Allelfrequenzen bei Probanden mit MDD gegenüber Probanden ohne derartige psychiatrische Diagnose gefunden ($p = 0.26$) (vgl. Tab. 6a). Auch in der Analyse des triallelen „kombinierten“ Genotyps, in welchem das L_G -Allel als S-Allel gewertet wurde, fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0.33$) in der Frequenz der Genotypen bei Probanden mit und ohne psychiatrische Diagnose einer MDD (vgl. Tab. 6b).

Tabelle 6a: Diagnose * 5-HTTLPR-Genotyp Kreuztabelle ($p = 0.259$ log. Regression)

		5-HTTLPR-Genotyp			Gesamt
		LL	LS	SS	
Diagnose	MDD	8	6	2	16
	Keine MDD	32	38	7	77
Gesamt		40	44	9	93

Tabelle 6b: Diagnose * „Kombinierter“ Genotyp Kreuztabelle ($p = 0.327$ log. Regression)

		„Kombinierter“ Genotyp			Gesamt
		“LL”	“LS”	“SS”	
Diagnose	MDD	6	7	2	15
	Keine MDD	17	39	20	76
Gesamt		23	46	22	91

3.6 Moderation des Einflusses stressvoller Lebensereignisse auf die Vulnerabilität für Depression durch 5-HTTLPR

223 Probanden der G1-Generation der Michigan Longitudinal Studie wurden mit der Fragestellung analysiert, ob der Einfluss stressvoller Lebensereignisse auf das Erkrankungsrisiko für Major Depression durch den 5-HTTLPR-Genotyp modifiziert wird. Als Parameter zur Einschätzung der Depression wurde die Hamilton Skala für Depression verwendet. Da sich die Werte der Studienteilnehmer über die acht Erhebungsphasen nicht normal verteilt zeigten, wurde die Quadratwurzel berechnet und in den folgenden Analysen verwendet.

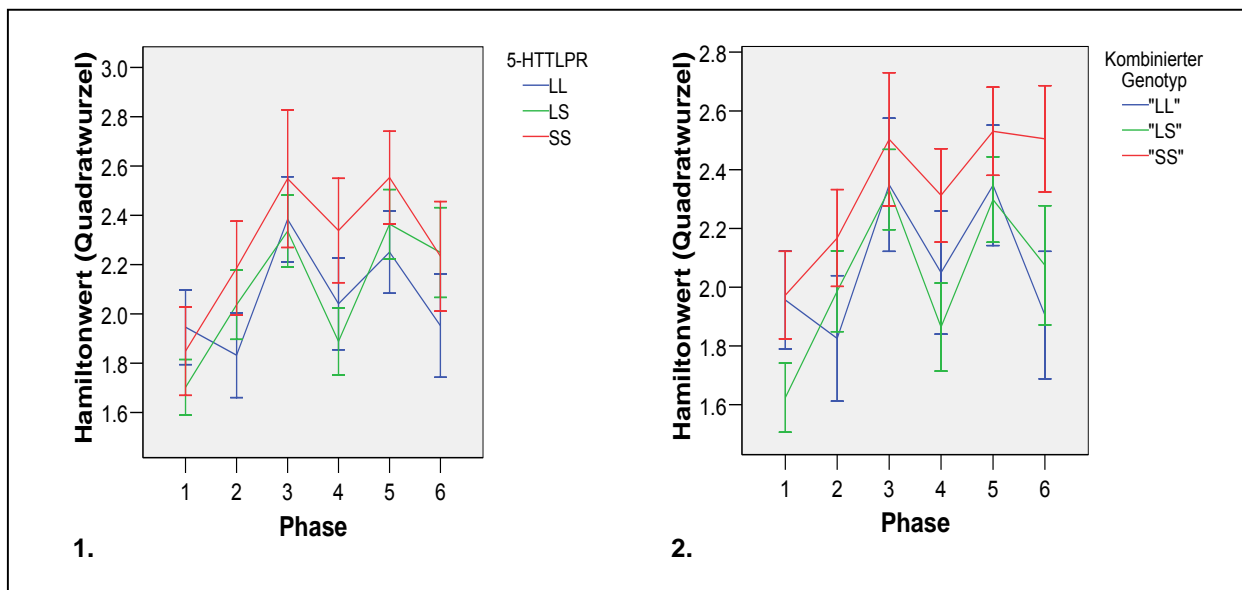


Abbildung 22: MLS-G1: Verlauf der mittleren Hamilton-Depressionswerte von 223 Probanden über die Erhebungsphasen 1-6 der Studie. Es erfolgte eine farbliche Differenzierung der 1. 5-HTTLPR-Genotypen bzw. 2. der „kombinierten“ Genotypen

Die Betrachtung der Hamilton-Mittelwerte über sechs Phasen (t1-t6) von G1-Probanden der Michigan Longitudinal Studie zeigte im Studienverlauf eine zunehmende Tendenz. Die konstant höchsten Werte fanden sich bei Vorliegen des SS-Genotyps von 5-HTTLPR vor LS- und LL-Genotyp. Ein vergleichbares Verteilungsmuster ergab sich nach der Gruppierung des L_G -Allels zusammen mit dem S-Allel.

Zur Einschätzung des Ausprägungsgrades stressvoller Lebensereignisse wurde zum Zeitpunkt t5 ein familiärer Stressindex für die vergangenen drei Jahre erstellt. Als Beurteilungskriterien wurden stressvolle Ereignisse aus der familiären Lebenssituation, Arbeitswelt und Sozialleben zwischen 0 und 15 gezählt. Auf Grund der geringen Probandenzahl, die mehr als vier Lebensereignisse aufwies, erfolgte eine Kategorisierung in fünf Gruppen. Ein familiärer Stressindex von 0 zeigte keine stressvollen Lebensereignisse an, während ein Index von 4 eine hohe familiäre Stressbelastung während der vergangenen drei Jahre angab.

Bei den 223 analysierten Probanden der G1-Generation handelte es sich um 124 Frauen und 99 Männer. Der LL-Genotyp fand sich in 69 Fällen. Bei 113 Probanden lag der LS-Genotyp und bei 41 der SS-Genotyp von 5-HTTLPR vor. Es zeigte sich, dass Probanden aller drei Genotypen mit einem familiären Stressindex von 0 und 1 Hamilton-Depressionswerte zwischen 1.75 (Genotyp LL, Stressindex 0) und 2.68 (Genotyp LL, Stressindex 1) zeigten, die sich nicht signifikant voneinander unterschieden. Bei einem familiären Stressindex von 4 wiesen die Probanden mit SS-Genotyp mit 3.75

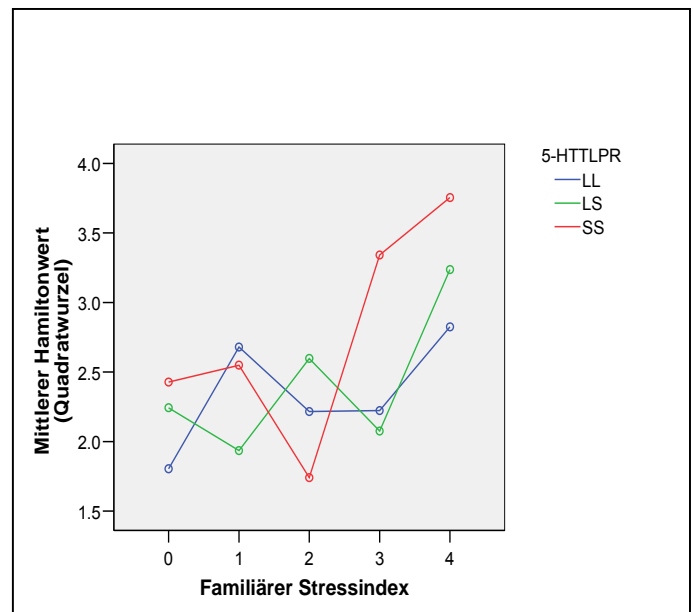


Abbildung 23a: MLS-G1: Hamiltonwert - familiärer Stressindex - 5-HTTLPR: Eine Untersuchung der Moderation des Einflusses familiären Stresses auf den mittleren Hamilton-Depressionswert durch 5-HTTLPR-Genotyp ergab keine statistisch signifikante Assoziation ($p = 0.31$) bei 223 Probanden.

einen deutlich höheren Hamilton-Mittelwert auf als Probanden mit LS- (3.23) und LL-Genotyp (2.82). Eine ANOVA-Analyse ergab bei der Betrachtung des 5-HTTLPR-Genotyps keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und Hamilton-Depressionswert ($p = 0.54$). Die Interaktion von Genotyp und familiärem Stressindex zeigte zwar einen stärkeren Zusammenhang, war aber ebenfalls nicht statistisch signifikant ($p = 0.31$). Beobachtet wurde ein Einfluss des Geschlechts auf den Ausprägungsgrad einer Depression, gemessen nach Hamilton ($p = 0.06$). Bei den weiblichen Probandinnen fanden sich höhere Hamilton-Werte. Eine besondere Prädisposition eines Geschlechtes für die Höhe des familiären Stressindex wurde hingegen nicht gefunden ($p = 0.34$) (vgl. Tab. 7a).

Tabelle 7a: 5-HTTLPR: ANOVA-Analyse; abhängige Variable: Mittlerer Hamiltonwert (Quadratwurzel)

Quelle	F	P
Korrigiertes Modell	1.658	0.040
Abschnitt	287.057	0.000
5-HTTLPR	0.619	0.539
Geschlecht	3.689	0.056
Familiärer Stressindex	1.427	0.226
5-HTTLPR * Geschlecht	0.331	0.719
5-HTTLPR * Familiärer Stressindex	1.184	0.310
Geschlecht * Familiärer Stressindex	1.143	0.337

In der Analyse des „kombinierten“ Genotyps lag der „LL“-Genotyp in 56 Fällen vor, „LS“ fand sich in 107 und „SS“ in 60 Fällen. Eine ANOVA-Analyse, in welcher auf eine Assoziation des „kombinierten“ Genotyps mit dem Hamilton-Wert für Depression geprüft wurde, ergab wie auch bei der alleinigen Betrachtung von 5-HTTLPR kein statistisch signifikantes Ergebnis ($p = 0.3$). Hier zeigte sich jedoch bezüglich des Effekts von „kombinierten“ Genotyp und familiärem Stressindex auf den Hamilton-Wert ein deutlicher Trend ($p = 0.06$), welcher eine höhere Suszeptibilität für Depression nach der Erfahrung stressvoller Lebensereignisse im familiären Umfeld während der vergangenen drei Jahre bei Individuen mit S- bzw. L_G -Allel anzeigte. Deutlicher als

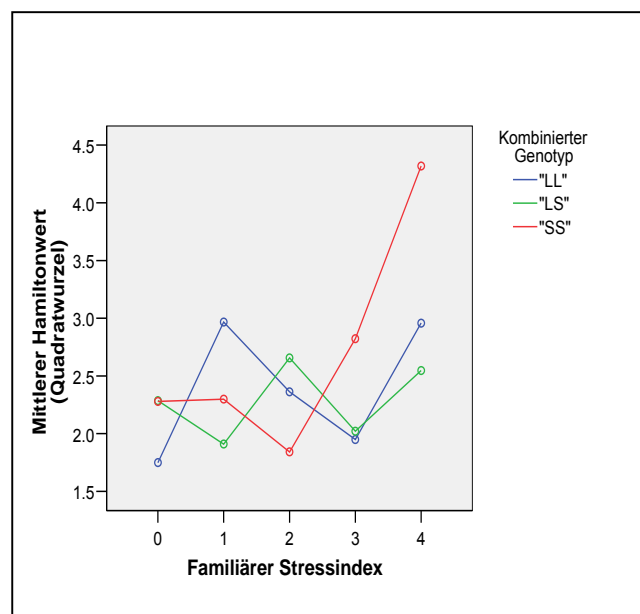


Abbildung 23b: MLS-G1: Hamiltonwert - familiärer Stressindex - „Kombinierter“ Genotyp: Eine Untersuchung der Moderation des Einflusses familiären Stresses auf den mittleren Hamilton-Depressionswert durch den „kombinierten“ Genotyp ergab einen Assoziationstrend ($p = 0.06$) bei 223 Probanden. Es ergaben sich somit Hinweise auf eine Gen x Umwelt-Interaktion im Sinne einer erhöhten Vulnerabilität für Depression, messbar durch Hamiltonwerte bei Individuen mit „SS“-Genotyp, die einen hohen familiären Stressindex aufwiesen

bei der Analyse des 5-HTTLPR-Genotyps ohne Berücksichtigung des SNPs rs25531 ergab sich auch der Einfluss des Geschlechts auf die erreichten Hamilton-Werte ($p = 0.009$). Die weiblichen Studienteilnehmer wiesen mit einem mittleren Hamilton-Wert von 2.80 ± 0.16 eine deutlich höhere Depressionsneigung auf als die männlichen Probanden, die einen

Hamilton-Wert von 2.13 ± 0.2 zeigten. Eine Interaktion zwischen Geschlecht und Genotyp ($p = 0.97$), sowie Geschlecht und familiärem Stressindex in Bezug auf den Hamilton-Wert wurde wiederum nicht beobachtet ($p = 0.17$) (vgl. Tab. 7b).

Tabelle 7b: „Kombinierter“ Genotyp: ANOVA-Analyse; abhängige Variable: Mittlerer Hamiltonwert t5 (Quadratwurzel)

Quelle	F	P
Korrigiertes Modell	1.923	0.011
Abschnitt	364.059	0.000
„Kombinierter“ Genotyp	1.211	0.300
Geschlecht	7.005	0.009
Familiärer Stressindex	2.152	0.076
„Kombinierter“ Genotyp * Geschlecht	0.036	0.965
„Kombinierter“ Genotyp * Familiärer Stressindex	1.885	0.064
Geschlecht * Familiärer Stressindex	1.633	0.167

Es ergaben sich somit Hinweise auf einen moderierenden Einfluss des 5-HTTLPR-Genotyps auf den Ausprägungsgrad einer Major Depression bei Erleben von familiärem Stress. Wie auch in der Publikation Caspis et al. beschrieben, erfolgte kein direkter Rückschluss auf eine Gen x Umwelt-Interaktion aufgrund der Möglichkeit, dass die Ergebnisse auch auf einer Gen x Gen-Interaktion zwischen 5-HTTLPR, bzw. dem „kombinierten“ Genotyp und anderen Genen beruhen konnte, die hier nicht untersucht wurden.⁴⁴ In diesem Fall hätte sich zu jeder Zeit eine Interaktion mit dem Genotyp finden lassen. Folglich wurde untersucht, ob der hier erstellte familiäre Stressindex tatsächlich einen Umwelteinfluss repräsentierte und somit der Auftrittszeitpunkt von Stress und Depression im Sinne einer Ursache-Wirkungs-Relation relevant war. Zur Prüfung der Hypothese, dass der Schweregrad der Depression der Studienteilnehmer am Erhebungspunkt t5 durch familiären Stress während der vergangenen drei Jahre beeinflusst wurde, ist einer Analyse getestet worden, ob eine Assoziation zwischen dem zum Zeitpunkt t5 erstellten Stressindex und den Hamilton-Depressionswerten des Zeitpunktes t4 gefunden werden konnte.

211 Probanden der G1-Generation wurden zum Zeitpunkt t4 untersucht. In 66 Fällen handelte es sich um Studienteilnehmer mit LL-Genotyp, 107 wiesen den LS- und 38 den SS-Genotyp auf. 119 Probanden waren weiblichen, 92 männlichen Geschlechts. Das L_G-

Allel lag in 21 Fällen vor. Eine Gruppierung mit dem S_A-Allel führte zu Genotypenfrequenzen von "LL" = 50, "LS" = 102 und "SS" = 57. Zwei Proben, je eines männlichen und weiblichen Probanden, die das S_G-Allel enthielten, wurden aus der Analyse ausgeschlossen. Im Vergleich mit dem Einfluss des familiären Stressindex t5 auf die Hamilton-Depressionswerte zu ebendiesem Zeitpunkt ($p = 0.3$) fand sich eine schwächere Assoziation des familiären Stresses t5 zu den Hamilton-Depressionswerten des Zeitpunktes t4 bei den unterschiedlichen untersuchten Probanden ($p = 0.59$). Ebenfalls eine Abschwächung des Signifikanzniveaus fand sich in der Untersuchung der Moderation der Höhe der Hamilton-Depressionswerte t4 durch den 5-HTTLPR-Genotyp in der Analyse mit dem familiären Stressindex, erhoben zum Zeitpunkt t5 ($p = 0.39$ (t4) versus $p = 0.31$ (t5)). Die Analyseergebnisse der beiden Erhebungszeitpunkte können den Tabellen 7a und 8a entnommen werden.

Tabelle 8a: 5-HTTLPR: ANOVA-Analyse; abhängige Variable: Mittlerer Hamiltonwert t4 (Quadratwurzel)

Quelle	F	P
Korrigiertes Modell	1.457	0.097
Abschnitt	175.762	0.000
5-HTTLPR	0.858	0.426
Geschlecht	3.407	0.066
Familiärer Stressindex	0.705	0.590
5-HTTLPR * Geschlecht	0.182	0.833
5-HTTLPR * Familiärer Stressindex	1.064	0.390
Geschlecht * Familiärer Stressindex	1.616	0.172

Bei den Allelträgern des „kombinierten“ Genotyps ergab sich in der Interaktionsanalyse mit den Hamilton-Depressionswerten des Zeitpunktes t4 ($p = 0.29$) (vgl. Tab. 8b) im Gegensatz zur Analyse mit den Hamilton-Depressionswerten des Zeitpunktes t5 ($p = 0.06$) (vgl. Tab. 7b) kein signifikanter Effekt bzw. Trend des familiären Stressindex t5 auf den Ausprägungsgrad der Depression.

Tabelle 8b: „Kombinierter“ Genotyp: ANOVA-Analyse; abhängige Variable: Mittlerer Hamiltonwert t4 (Quadratwurzel)

Quelle	F	P
Korrigiertes Modell	1.482	0.088
Abschnitt	252.042	0.000
„Kombinierter“ Genotyp	0.678	0.509
Geschlecht	2.316	0.130
Familiärer Stressindex	1.374	0.245
„Kombinierter“ Genotyp * Geschlecht	0.120	0.887
„Kombinierter“ Genotyp * Familiärer Stressindex	1.211	0.294
Geschlecht * Familiärer Stressindex	1.445	0.221

Insgesamt bestätigte dies Ergebnis, dass der Genotyp von 5-HTTLPR und rs25531 allein für die Ausprägung einer Major Depression, hier quantifiziert durch entsprechend hohe Hamiltonwerte, nicht ausreicht. Stressvolle familiäre Ereignisse im Zeitraum von drei Jahren zwischen den Erhebungszeitpunkten t4 und t5 der Michigan Longitudinal Studie zeigten insbesondere bei Individuen mit „SS“-Genotyp eine Steigerung der Vulnerabilität für Major Depression im Vergleich mit Trägern des „L“-Allels.

3.7 Expressionsanalyse

3.7.1 5-HTT-Expression in Lymphoblastoidzelllinien

Ausgewertet wurden Microarray-Expressionsdaten, gewonnen von Lymphoblastoidzellen der Bipolar Studie. Die Daten wurden normalisiert und logarithmiert dargestellt, was den Vergleich der Expressionswerte untereinander erlaubte. Obwohl der LL-Genotyp mit einem Mittelwert von 5.98 ± 0.33 eine höhere Expression als der LS- mit 5.96 ± 0.36 und SS-Genotyp mit 5.92 ± 0.31 (vgl. Abb. 27) zeigte, waren diese Unterschiede weder nach einer ANOVA- noch nach einer Regressionsanalyse signifikant.

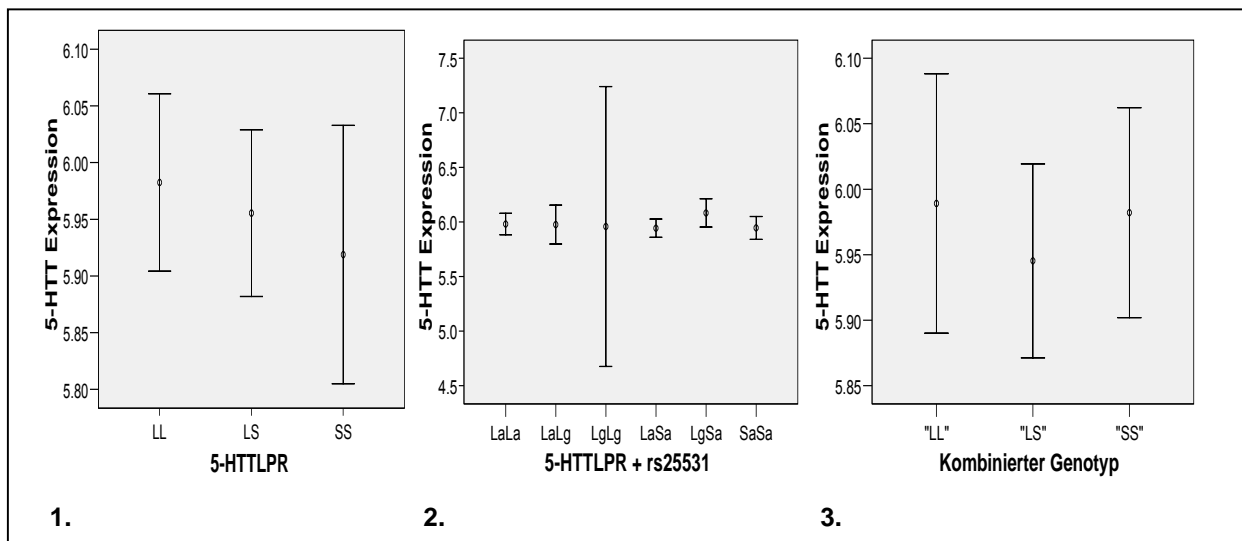


Abbildung 24: Bipolar Studie: Prüfung auf Assoziation Genotyp – 5-HTT-Expression in Lymphblastoidzellen. 1. 5-HTTLPR-Genotyp – 5-HTT Expression: Genotyp LL zeigte die höchsten, SS die geringsten Expressionsraten, keine statistisch signifikante Assoziation ($p = 0.68$, $r^2 = 0.004$) 2. 5-HTTLPR + rs25531 5-HTT Expression: keine statistische Assoziation 3. „Kombinierter“ Genotyp – 5-HTT Expression: Im Vergleich zur Analyse des biallelen Genotyps weitere Abschwächung der statistischen Assoziation ($p = 0.71$, $r^2 = 0.004$)

Ein r^2 -Wert von 0.004 wies zudem darauf hin, dass an dieser Stelle beinahe keine Assoziation zwischen Genotyp und Expression nachweisbar war. Die Auswertung der quatioallelen Genotypisierungsergebnisse unter Einbeziehung des SNPs rs25531 ergab keinen Hinweis darauf, dass das Vorhandensein des G-Allels des SNPs das Expressionsniveau des HTTLPR-L-Allels in Richtung des geringer exprimierenden S-Allels beeinflusste. Jedoch war auch nach Durchführung einer linearen Regression keinerlei signifikanter Unterschied ($p = 0.84$) in Bezug auf die Expressionsniveaus überhaupt erkennbar. Auch die in jüngerer Literatur vorgeschlagene Gruppierung des L_G -Allels zusammen mit dem S-Allel von 5-HTTLPR zum „kombinierten“ Genotyp zeigte folglich keinen signifikanten Zusammenhang ($p = 0.71$ bzw. 0.93) zwischen Genotyp und Expression.⁶⁹

Als Kovariaten wurden sowohl die psychiatrische Diagnose als auch das Geschlecht in eine univariate Analyse einbezogen. Auch hier ließen sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge nachweisen. (vgl. Tab. 9)

Tabelle 9: Statistische Beziehung zwischen 5-HTT-Expression und Genotyp unter Einbeziehung der Kovariaten Diagnose und Geschlecht

Kovariate		5-HTTLPR Genotyp	5-HTTLPR + rs25531 Genotyp	„Kombinierter“ Genotyp
Diagnose	p- ANOVA	0.098	0.119	0.117
	r^2	0.018	0.024	0.016
Geschlecht	p- ANOVA	0.403	0.316	0.303
	r^2	0.007	0.016	0.009

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden war es folglich nicht möglich die Ergebnisse von Hu et al., die eine vergleichbar niedrige Expression von S- und L_G-Allel in Lymphoblastoidzelllinien postulierten, zu replizieren.

3.7.2 5-HTT-Expression in humanem post mortem Hirngewebe

Zusätzlich zu den 5-HTT-Expressionsniveaus in Lymphoblastoidzelllinien wurde die Expression des Serotonintransporters in Hirnregionen von humanem post mortem Hirngewebe mittels Microarrayanalyse untersucht. In erster Linie wurden Expressionsdaten des im Mesencephalon lokalisierten Nucleus raphe dorsalis der Formatio reticularis als zentralem Locus des Serotoninstoffwechsels analysiert. Es erfolgte die Analyse von 24 Proben des Pritzker Projektes. Eine Probe mit dem Genotyp L_AL_A wurde aus der Analyse ausgeschlossen, weil sie in der Auswertung der Microarraydaten als ‚absent call‘ geführt wurde. Die übrigen 23 Proben zeigten ‚present calls‘ und wurden weiter analysiert.

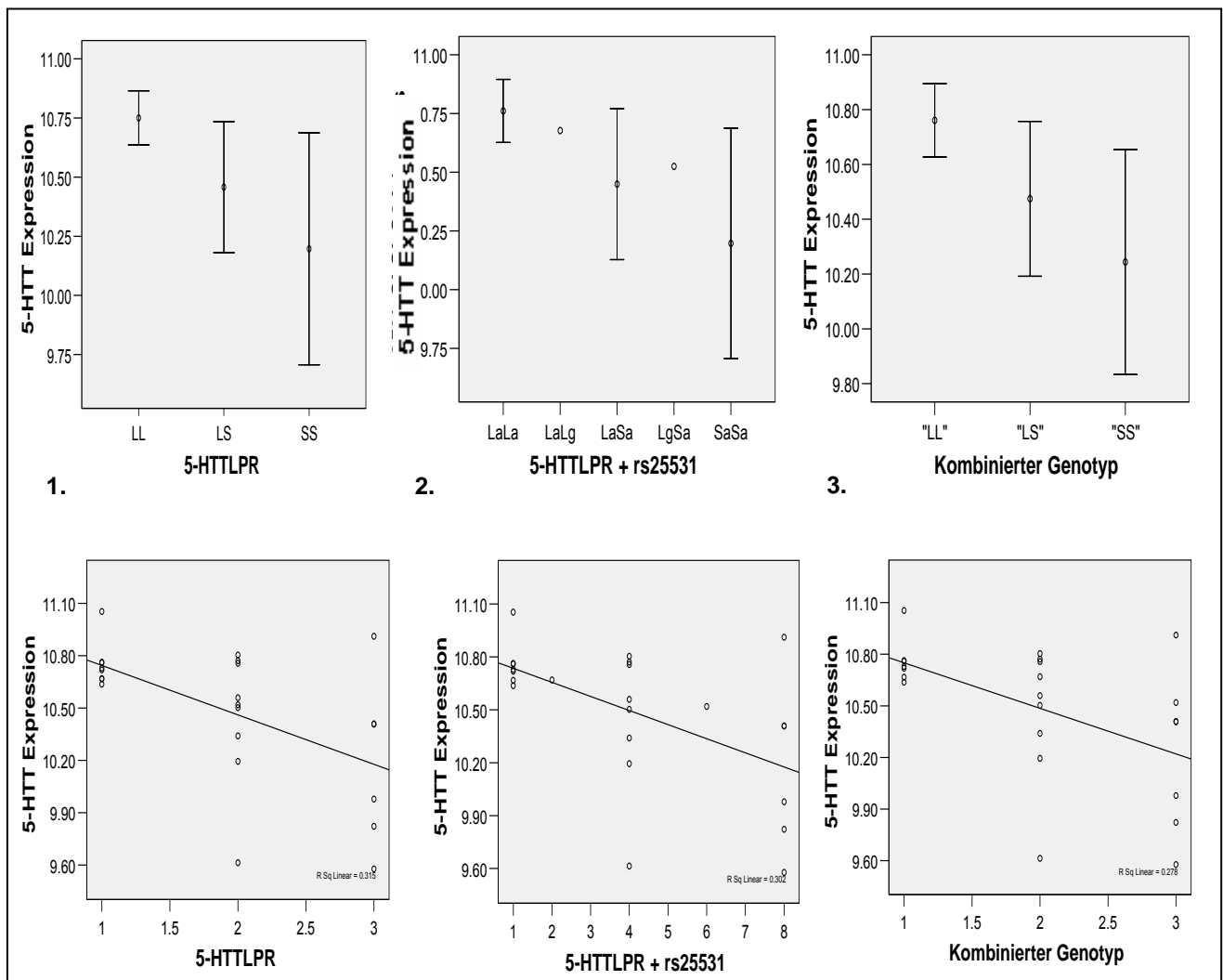


Abbildung 25: Pritzker Projekt: Prüfung auf Assoziation: Genotyp – 5-HTT-Expression im Nucleus raphe dorsalis bei 23 Gewebeproben. Reihe 1: ANOVA Analyse, Reihe 2: Lineare Regression **1.** 5-HTTLPR-Genotyp – 5-HTT-Expression: Bei Vorliegen des LL-Genotyps ($n = 8$) fanden sich statistisch signifikant höhere Expressionsraten als bei LS- ($n = 9$) bzw. SS-Genotyp ($n = 6$) ($p = 0.02$ bzw. $p = 0.005$ nach linearer Regression) **2.** 5-HTTLPR + rs25531 – 5-HTT-Expression: In der quatruallelen Aufschlüsselung fand sich nur ein Mal das G-Allel von rs25531 in Form von $L_G S_A$ **3.** „Kombierter“ Genotyp – 5-HTT-Expression: Signifikante Assoziation ($p = 0.4$ bzw. $p = 0.01$ nach linearer Regression)

Die alleinige Analyse des 5-HTTLPR-Genotyps ergab mit einem p -Wert von 0.02 einen signifikanten Effekt des am stärksten exprimierenden LL-Genotyps ($n = 8$) mit einem Mittelwert von 10.75 ± 0.12 , gegenüber dem weniger exprimierenden LS-Genotyp ($n = 9$) mit 10.46 ± 0.11 und dem SS-Genotyp ($n = 6$) mit 10.2 ± 0.14 . Die Einbeziehung des SNPs in die Analyse zeigte, dass das 5-HTTLPR L-Allel mit dem G-Allel ($n = 1$) des SNPs rs25531 mit einem Wert von 10.68 ± 0.35 einen leicht geringeren Expressionswert als der

durchschnittliche Wert (10.76 ± 0.13) für die sieben Genotypen mit $L_A L_A$. Ein Mal fand sich der $L_G S_A$ -Genotyp und zeigte mit 10.53 ± 0.35 einen höheren Expressionswert an als die durchschnittlichen Werte für den $L_A S_A$ -Genotyp mit 10.45 ± 0.13 , der achtmal gefunden wurde und als der Wert für den $S_A S_A$ -Genotyp mit 10.2 ± 0.14 , der sechsmal vorkam. Die Gruppierung des zwei Mal gefundenen L_G -Allels zum S-Allel als „kombinierter“ Genotyp wies im Vergleich zur alleinigen Betrachtung des 5-HTTLPR-Genotyps eine weniger signifikante Assoziation ($p = 0.04$, $r^2 = 0.28$) zwischen Genotyp und Expressionswerten auf. Die Durchführung einer linearen Regression zeigte auch für die Gruppierung der Allele einen signifikanten Zusammenhang ($p = 0.01$, $r^2 = 0.24$), jedoch war die Assoziation weniger signifikant als bei der alleinigen Betrachtung des 5-HTTLPR-Genotyps ($p = 0.005$, $r^2 = 0.32$). Ein expressionsmindernder Einfluss des G-Allels von rs25531 war folglich nicht nachweisbar.

Neben dem Nucleus raphe dorsalis wurde auch der Kernkomplex des Nucleus raphe medianus analysiert, dem ebenfalls eine Rolle im Serotoninstoffwechsel zukommt, sich aber in den Projektionsgebieten seiner serotonergen Neuronen vom Nucleus raphe dorsalis unterscheidet. Microarray-Expressionsdaten lagen für 24 Proben vor. Nach Normalisierung der Daten fanden sich für drei der Proben ‚absent calls‘, weshalb die entsprechenden Proben (zweimal $L_A L_A$, einmal $L_A L_G$) aus der Analyse ausgeschlossen wurden.

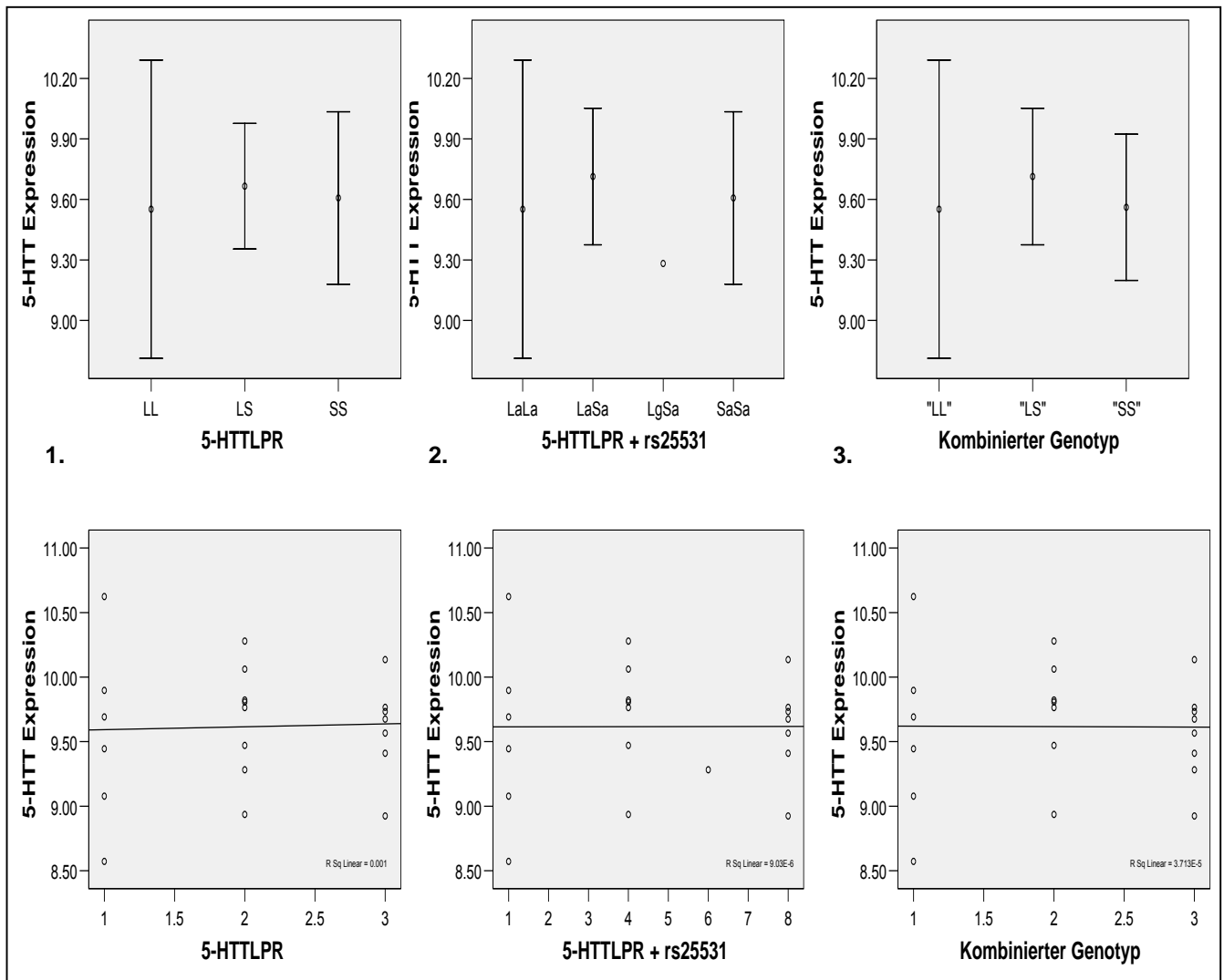


Abbildung 26: Pritzker Projekt: Prüfung auf Assoziation: Genotyp – 5-HTT-Expression im Nucleus raphe medianus bei 21 Gewebeproben. Reihe 1: ANOVA Analyse, Reihe 2: Lineare Regression 1. **1.** 5-HTTLPR-Genotyp – 5-HTT-Expression: Bei Vorliegen des LS-Genotyps (n = 9) fand sich eine etwas höhere mittlere 5-HTT-Expression als beim SS-Genotyp (n = 6) und beim LL-Genotyp (n = 6) ohne statistische Signifikanz ($p = 0,89$ bzw. $p = 0,88$ nach linearer Regression) **2.** 5-HTTLPR + rs25531 – 5-HTT-Expression: In der quatraoallelen Aufschlüsselung fand sich nur ein Mal das G-Allel von rs25531 in Form von L_{GSA} **3.** „Kombiniertes“ Genotyp – 5-HTT-Expression: Keine signifikante Assoziation ($p = 0,75$ bzw. $p = 0,98$ nach linearer Regression)

In der Analyse der verbliebenen 21 Proben lag sechs Mal der LL-Genotyp vor, der mit $9,55 \pm 0,21$ eine geringfügig niedrigere mittlere Expression zeigte als der neun Mal vorliegende LS-Genotyp, der einen Expressionswert von $9,68 \pm 0,18$ aufwies. Dem SS-Genotyp, der in sechs Fällen vorlag, kam ein mittlerer Wert von $9,60 \pm 0,19$ zu. Eine signifikante Assoziation zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und 5-HTT-Expression wurde in einer ANOVA-

Analyse nicht gefunden ($p = 0.9$, $r^2 = 0.1$), auch nicht nach Durchführung einer linearen Regression ($p = 0.88$, $r^2 = 0.001$). Das G-Allel von rs25531 trat in dieser Untersuchung des medianen Raphekernes nur ein einziges Mal in Form eines L_GS_A-Genotyps auf. Der hier erfasste Expressionswert von 9.28 lag niedriger als die Mittelwerte der übrigen Genotypen, am nächsten dem mittleren Expressionswert des S_AS_A-Genotyps von 9.6 ± 0.19 . Eine signifikante Assoziation wurde nicht gefunden. ($p = 0.82$, $r^2 = 0.05$ bzw. $p = 0.99$, $r^2 = 0$ nach linearer Regression). Eine Gruppierung der Allele ergab wiederum kein statistisch signifikantes Resultat ($p = 0.75$, $r^2 = 0.03$ bzw. $p = 0.98$, $r^2 = 0$ nach linearer Regression).

Auf Grund der abweichenden Ergebnisse des Nucleus raphe dorsalis und des Nucleus raphe medianus wurden die Microarray-Expressionsdaten der 21 Proben der beiden serotonergen Raphekomplexe auf eine Korrelation miteinander überprüft.

Ein Pearson-Korrelationseffizient von -0.17 ($p = 0.49$) zeigte praktisch keine Korrelation der Expressionswerte des Nucleus raphe dorsalis und des Nucleus raphe medianus an. Auf Grund der geringen Stichprobengröße wurde bei beiden Raphekernen auf eine Analyse, in welcher psychiatrische Diagnose und Geschlecht als Kovariaten geführt wurden, verzichtet.

Eine Microarrayanalyse wurde neben den Raphekernkomplexen noch in sechs weiteren, mit der Ätiopathogenese psychiatrischer Krankheiten in Verbindung gebrachten Hirnregionen, durchgeführt. Eine aktualisierte Datennormalisierung zeigte in diesen Regionen der Amygdala, des Hippocampus, des Locus Coeruleus, des Anteriores Cingulums, des Präfrontalen Dorsolateralen Cortex und des Cerebellums ‚absent calls‘ und somit keine Expression des Serotonintransporters in diesen Hirnregionen an. Dies entsprach insofern der Erwartung, als nur in den beiden mesencephalen Raphekernen die Somata der serotonergen Neurone lokalisiert sind und somit mRNA zu erwarten war.

4 Diskussion

4.1 Evaluierung der Genotypisierung

Auch in dieser Arbeit bestätigte sich, dass es sich bei 5-HTTLPR um einen äußerst schwierig zu amplifizierenden Locus handelt. Der Versuch, die von Hu et al. beschriebene Genotypisierungsmethode zur simultanen Genotypisierung des Insertions/Deletions- und Einzelnukleotidpolymorphismus 5-HTTLPR und rs25531 zu replizieren, gelang nicht.⁴⁹ Die von ihnen verwendete automatisierte Taqman-Genotypisierungsmethode beruhte auf allelspezifischem ‚Annealing‘ von fluorogenen Sonden an komplementäre DNA-Bereiche. Hu und Kollegen berichteten über die Generierung einer Sonde, komplementär zur Insertion des L-Allels zur Differenzierung von L- und S-Allel. Zu beachten ist, dass sie in ihrer Arbeit von anderen Grenzen der In/Del-Region ausgingen. Unter Verwendung der dargestellten Methodik, war es nicht möglich, die Amplifikationsprodukte zu differenzieren und somit einem Genotyp zuzuordnen. Aus diesem Grund wurde auf eine herkömmliche PCR-Methodik in Verbindung mit einer RFLP-Analyse zurückgegriffen. Diese 5-HTTLPR-Genotypisierungs-PCR zeigte sich besonders empfindlich gegenüber der $MgCl_2$ -Konzentration des Mastermixes. Unter anderem Kramer und Coen wiesen bereits 2001 auf die Bedeutung der $MgCl_2$ -Konzentration für die Qualität von PCR-Ergebnissen hin⁷⁰, was die Arbeitsgruppe um Amanda L. Yonan in einer 2006 veröffentlichten Publikation für die 5-HTTLPR-PCR bestätigte.⁶⁶

Schwierigkeiten ergaben sich hier bei der Genotypisierung von ‚whole genome‘ amplifizierten DNA-Proben, was dazu führte, dass letztlich über 600 Proben von weiteren Analysen ausgeschlossen werden mussten. Die verwendeten DNA-Proben sind zuvor erfolgreich zur Genotypisierung verschiedenster SNPs eingesetzt worden. Grundsätzlich kann somit davon ausgegangen werden, dass die Methodik der ‚whole genome‘ Amplifizierung des Ausgangsmaterials funktional gewesen ist. Das überproportional häufige Auftreten unspezifischer Banden nach der 5-HTTLPR-PCR dieser DNA-Proben kann als weiterer Hinweis darauf gedeutet werden, dass Längenpolymorphismen wie 5-

HTTLPR Amplifikationsmethoden gegenüber insgesamt sehr empfindlich sind. Im vorliegenden Fall ist zu vermuten, dass die bei der ‚whole genome‘ Amplifizierung verwendeten randomisierten Primer nur zu einer unzureichenden Amplifikation der GC-reichen 5-HTTLPR-Region geführt haben. Folglich konnte auch die sich anschließende 5-HTTLPR-PCR keine validen Ergebnisse zeigen. Vielmehr kam es vermehrt zu unspezifischen Amplifizierungen anderer Bereiche des Genoms. Dies weist darauf hin, dass Genotypisierungsergebnisse von Längenpolymorphismen, die mit ‚whole genome‘ amplifizierten DNA-Proben durchgeführt wurden, kritisch zu hinterfragen sind.

Ein weiteres Problem war, dass nach Schneiden mit dem Restriktionsenzym regelmäßig eine schwache zusätzliche Bande bei etwa 512 bp auftrat, die charakteristisch für das L-Allel von 5-HTTLPR bei Vorliegen des $L_G S_A$ -Genotyps ist. Diese schwache Bande kann auf die Bildung von Heteroduplexen zwischen Elementen von L- und S-Allel-DNA während der PCR, die das Enzym natürlich nicht schneiden kann, zurückgeführt werden. Nagamine et al. beschrieben 1990, dass es in jeder PCR Reaktion, bei der mehrere homologe Gene oder Allele amplifiziert werden, zur Generierung von Heteroduplexen kommt.⁷¹ In diesem Fall waren keine Extrabanden auf dem Elektrophoresegele nach der PCR erkennbar. Die Tatsache, dass erst nach Schneiden mit dem Restriktionsenzym HpaII eine Bande zurückblieb, lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass sich die nicht enzymatisch angreifbaren Heteroduplexe zwischen DNA von L- und S-Allel so aneinander legen, dass deren Länge der des längeren L-Allels entspricht.

Alle untersuchten Studienpopulationen ohne verwandtschaftliche Beziehung befanden sich bezüglich 5-HTTLPR und rs25531 im Hardy-Weinberg-Equilibrium. Zusammen mit der Tatsache, dass sich in den Familienstudien insgesamt nur drei Abweichungen von der Mendelschen Vererbung fanden, kann dies als guter Beleg für die Genotypisierungsqualität gewertet werden. Auch die Tatsache, dass sich 100%-ige Konkordanzraten zwischen manueller Genotypisierung und maschineller DNA-Sequenzierung von Stichproben fanden, diente der Qualitätsbestätigung. Schwerwiegende systematische Genotypisierungsfehler, wie sie in der Vergangenheit für 5-HTTLPR beschrieben sind und anhand von Trendabweichungen im Hardy-Weinberg-Equilibrium erkennbar sind⁶⁰, sind damit als unwahrscheinlich anzusehen. Die Sequenzierung der 5-HTTLPR-Region verschiedener Allelträger erbrachte die Bestätigung der Annahme Wendlands, dass es sich bei dem von

Hu et al. beschriebenen SNP wirklich um den ‚upstream‘ der In/Del-Region lokalisierten SNP rs25531 handelt. Gleichzeitig wurde durch die in dieser Arbeit gewonnenen Genotypisierungsergebnisse auch die Vermutung bestätigt, dass nicht nur ein L_G -, sondern auch ein selten vorkommendes S_G -Allel existiert. Dies kann als Nachweis dafür gewertet werden, dass es sich bei der Kombination 5-HTTLPR und rs25531 nicht nur um einen tri- sondern einen quatoallelen Locus handelt. Eine funktionale Charakterisierung des S_G -Allels wie auch des XL -Allels war jedoch auf Grund des seltenen Auftretens im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

4.1.1 Allelhäufigkeiten in unterschiedlichen ethnischen Populationen

Die gefundenen Genotypfrequenzen von 5-HTTLPR lagen für das L-Allel zwischen 0.57 und 0.64 und für das S-Allel zwischen 0.34 und 0.43. Sie glichen damit den bereits durch Lesch für Kaukasier ermittelten Allelfrequenzen von 0.57 für das L-Allel und 0.43 für das S-Allel.²⁶ Auch die Frequenzen unter Einbeziehung des SNPs rs25531 ähnelten den Literaturwerten. Hu und Mitarbeiter bestimmten die Frequenz für das L_A -Allel von 0.51 in einer finnischen Population und 0.49 bzw. 0.5 bei weißen US-Amerikanern.⁴⁹ Wendland et al. fanden in einer US-amerikanischen Population eine Frequenz von 0.5.⁵⁰ In der vorliegenden Untersuchung ergab sich für US-Amerikaner eine Frequenz von 0.49, für Polen fand sich eine Frequenz von 0.53. Damit zeigte sich, wie auch in den Ergebnissen von Hu, eine leicht höhere Frequenz des L_A -Allels bei Europäern gegenüber US-Amerikanern. Zu beachten ist jedoch, dass es sich bei allen in dieser Arbeit untersuchten Europäern um eine Kohorte von Individuen mit Alkoholabusus handelte, was durchaus auch Einfluss auf die Allelfrequenz gehabt haben könnte, da 5-HTTLPR wiederholt mit Alkoholabusus in Verbindung gebracht worden ist.^{46,47} Die Häufigkeit des L_G -Allels bestimmten Hu et al. in der finnischen Population zu 0.09 und zu 0.14 bzw. 0.15 bei US-Amerikanern.⁴⁹ Wendland ermittelte eine Frequenz von 0.065.⁵⁰ In der vorliegenden Arbeit fand sich eine Frequenz von 0.11 sowohl bei US-Amerikanern kaukasischer Abstammung als auch bei den untersuchten Polen. Für das S_A -Allel fanden Hu et al. eine Häufigkeit von 0.35 bzw. 0.37 bei US-Amerikanern und Wendland eine Frequenz von 0.43. Bei Finnen wurde eine Häufigkeit von 0.4 ermittelt.^{49,50} Die in dieser Untersuchung gefundenen

Ergebnisse von 0.36 für Polen und 0.41 für US-Amerikaner liegen in dieser Größenordnung. Während Hu et al. das Vorkommen von S_G-Allelen negierten⁴⁹, wurde von Wendland eine Frequenz von 0.0025 gefunden⁵⁰, die dem hier ermittelten Wert von 0.002 bei US-Amerikanern kaukasischen Ursprungs gut entspricht. Gemeinhin wird bei Afroamerikanern ein im Vergleich zu Kaukasiern erhöhtes Vorkommen des 5-HTTLPR L-Allels beschrieben. Hu und Mitarbeiter geben in ihrer triallelen Untersuchung eine Frequenz von 0.51 für das L_A-Allel, 0.24 für das L_G-Allel und 0.25 für das S_A-Allel an.⁴⁹ Bei den Afroamerikanern, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, fanden sich vergleichbare Frequenzen. Insgesamt zeigte sich, dass nicht nur das L-Allel in dieser Population häufiger zu finden war, sondern auch das G-Allel des SNPs rs25531.

Die hier vorgelegten Genotypisierungsergebnisse stimmten auch mit dem Resultat der LD-Untersuchung von rs25531 und 5-HTTLPR überein. Danach spricht viel dafür, dass es ursprünglich auf dem L-Allel zu einer Punktmutation gekommen ist, bei der die Base A durch G ersetzt wurde. Erst im Laufe der Zeit ist es vermutlich zu einem Rekombinationsereignis mit einem S-Allel gekommen, wodurch sich erklären ließe, dass sich das G-Allel des SNPs hier nur äußerst selten findet. Weiter kann gefolgert werden, dass dieses Ereignis zuerst in einer afrikanischen Population stattfand, da die Auftretensfrequenz hier deutlich höher als bei Kaukasiern ist. Diese Annahme wird unter anderem durch die Beobachtung von Hu über eine vergleichsweise niedrige Frequenz des L_G-Allels bei Finnen, bei denen es sich um eine relativ isolierte Population handelt, gestützt.⁴⁹

Gelernter et al. beschrieben 1997 neben den bekannten 5-HTTLPR-Allelen mit 14 und 16 Wiederholungen das Auftreten von solchen mit 19 Wiederholungen (VL-Allel) in einer japanischen Population und von 20 Wiederholungen (XL-Allel), gefunden bei Japanern und Afroamerikanern.³⁴ Nakamura und Mitarbeiter fanden 2000 in asiatischen Populationen bis zu 10 Allelvarianten von 5-HTTLPR.³⁵ Alle Allelformen mit Wiederholungen von mehr als 16 wurden bisher nur bei Afroamerikanern und Asiaten beschrieben.^{34,35,67} Im Rahmen dieser Untersuchung wurde ein XL-Allel mit 20 Wiederholungen bei zwei Afroamerikanern gefunden. Darüber hinaus trat es aber auch bei einem US-Amerikaner kaukasischen Ursprungs auf. Gerade bei US-amerikanischen Populationen handelt es sich keinesfalls um eine einheitliche Population. In dem Fall dieses Individuums lässt sich ein

afroamerikanischer Vorfahre vermuten, was sich in zukünftigen Untersuchungen mit vielen SNPs nachweisen ließe.

4.2 Genetische Assoziationsstudien

Zu den konsistenten Ergebnissen der psychologischen Forschung zählt, dass etwa ein Drittel bis die Hälfte der Varianz bei Persönlichkeitsmerkmalen genetisch bedingt ist.⁷² Eine derart starke genetische Komponente findet sich nicht nur bei „normalen“ psychologischen Charaktereigenschaften, sondern auch bei psychiatrischen Erkrankungen wie Major Depression.⁷³ Die Identifizierung relevanter Gene und Genregionen hat sich jedoch als schwierig erwiesen und die Ergebnisse von Assoziations- und Kopplungsstudien konnten in nachfolgenden Follow up Studien oftmals nicht repliziert werden. Die von Lesch beschriebene Assoziation des S-Allels des Polymorphismus 5-HTTLPR mit erhöhten Neurotizismuswerten wurde unter anderem durch Greenberg et al. bestätigt.^{2,38} In einer Vielzahl von Studien konnte diese Assoziation jedoch nicht repliziert werden.^{37,74,75,76} Die oftmals mangelhafte Replizierbarkeit gefundener Assoziationen zwischen Polymorphismen und komplexen Krankheiten ist ein gewichtiger Kritikpunkt von Assoziationsstudien im Allgemeinen. Hirschhorn et al. berichteten etwa, dass von 166 vermeintlichen Assoziationen, die zumindest dreimal untersucht wurden, nur sechs konsistent repliziert werden konnten.⁷⁷ Der mangelnden Replizierbarkeit von Assoziationsstudien liegen vermutlich unterschiedliche Ursachen zugrunde. Möglich sind sowohl falsch negative als auch falsch positive Assoziationen in einem Teil der Studien. Auch Unterschiede bei der Durchführung können Einfluss haben. Ernst zu nehmen ist auch der Aspekt der Populations-Stratifizierung, welcher dadurch relevant werden kann, dass Studienteilnehmer verschiedenen ethnischen Gruppen angehören. Typischerweise sind die Allelfrequenzen von Polymorphismen jedoch bei Angehörigen verschiedener Ethnien unterschiedlich. In Assoziationsstudien können auf diese Art Effekte überdeckt werden.^{5, 77} Ein Ansatzpunkt dieser Problematik zu begegnen, ist die Durchführung eines ‚Transmission Disequilibrium Tests‘ (TDT-Test), wenn es sich um Familienstudien handelt.⁷⁸ Diese Methode erfordert bei Nachkommen und Eltern die Überprüfung des Allels auf eine Assoziation mit der Erkrankung. Bestimmt wird die Frequenz, mit der heterozygote

Elternteile das entsprechende Allel an ihre Nachkommen vererben. Die errechnete Frequenz wird verglichen mit der nach Mendel erwarteten Übertragungsrate von 50:50 der Allele. TDT sowie auch andere familiär basierte Methoden, wie das hier verwendete Programm MERLIN, erweisen sich gegenüber Ergebnisverfälschungen infolge unterschiedlicher Ethnizitäten als immun. Eine andere Begründung für abweichende Ergebnisse sind mögliche Gen x Gen- bzw. Gen x Umwelt-Interaktionen, die zwischen Populationen differieren. Ist ein derartiger Effekt auf Populationen mit einem bestimmten genetischen oder umweltbedingten Hintergrund begrenzt, so findet sich auch die Assoziation folglich nur in diesen Populationen. Eine weitere Ursache kann das Vorliegen eines Kopplungsungleichgewichts sein. Es ist durchaus möglich, dass sich eine Assoziation in einigen Populationen findet, weil hier ein Kopplungsungleichgewicht zwischen untersuchtem Locus und dem tatsächlich kausalen Locus besteht. Besteht dieses in einer anderen Population nicht, so ist hier auch keine Assoziation zum untersuchten Merkmal zu finden. Schließlich kann eine Assoziation vorhanden, aber dennoch schlecht reproduzierbar sein, wenn der zugrunde liegende genetische Effekt nur schwach ist. Insbesondere Nachfolgestudien mit wenigen Probanden haben in diesem Fall keine ausreichende Power, um schwache Effekte zu detektieren und scheitern daran, statistische Signifikanz zu erreichen. Diese Schwierigkeit wird noch durch den sogenannten „Jackpot“-Effekt verstärkt, welcher postuliert, dass die erste Gruppe, die die signifikante Assoziation eines schwachen Locus publiziert, eher geneigt ist den wahren Effekt des Polymorphismus zu über- denn zu unterschätzen. Zu Replizierung derartiger Ergebnisse eignen sich dann nur Studien mit großer Probengröße, sowie Metaanalysen mehrerer Studien.⁷⁸

4.2.1 Assoziation zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und Persönlichkeitsmerkmalen

In der Analyse des NEO-Persönlichkeitsmerkmals fiel zunächst auf, dass sich bei den Probanden der größten der Studien, der Michigan Longitudinal Studie (MLS), signifikant höhere Neurotizismuswerte fanden als in der von Costa und McCrae beschriebenen Stichprobe. Dies erscheint insofern plausibel als die MLS-Studienprobanden einer Population mit niedrigem sozioökonomischen Status entstammen, die vergleichsweise

hohen Stressbelastungen ausgesetzt ist. Es ist bekannt, dass ein niedrigerer sozioökonomischer Status oftmals mit einem schlechteren allgemeinen Gesundheitszustand einhergeht. Auch eine Assoziation mit höheren Neurotizismuswerten ist in der Literatur beschrieben.⁷⁹

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine statistisch signifikante Assoziation ($p = 0.028$) zwischen dem 5-HTTLPR-Genotyp und Neurotizismus der MLS-Probanden gefunden. In der gemeinsamen Analyse von Eltern- und Kindergeneration wurden insgesamt 485 Individuen untersucht. Dieses Resultat ist vergleichbar mit den ursprünglichen Ergebnissen von Lesch et al., die über einen signifikanten Zusammenhang ($p = 0.028$) zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und NEO-PI-Werten in einer die Familienstruktur einbeziehenden Analyse von 468 Proben einer Familienstudie berichteten.²⁶

Dass die Einbeziehung der Familienstruktur bedeutsam ist, zeigte sich hier sehr deutlich, da erst die gemeinsame Analyse von Eltern- und Kindergeneration mit dem Programm MERLIN ein statistisch signifikantes Ergebnis zeigte. Die Assoziationsanalyse ergab aber nie einen statistisch signifikanten Befund, wenn das L_G-Allel zusammen mit dem S-Allel als „kombinierter“ Genotyp analysiert wurde. Ein Einfluss des SNPs rs25531 auf Neurotizismuswerte konnte in dieser Studie folglich nicht nachgewiesen werden. Eine signifikante Assoziation zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und Neurotizismus ($p = 0.02$) fand sich in der Analyse der 316 Proben des Tecumseh Blutdruck-Programms. Auffällig war hier jedoch, dass der LL-Genotyp deutlich höhere Neurotizismuswerte zeigte als der LS-Genotyp. Dieses Ergebnis stand nicht im Einklang mit der Annahme, dass es sich bei dem S-Allel um das dominante 5-HTTLPR-Allel handelt.^{28,75} An dieser Stelle erschien eher das L-Allel dominant gegenüber dem S-Allel, wie es auch die Studien von Hanna und Melke nahelegen.^{81,82} Eine Dominanz des L-Allels wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nur in dieser einen Studie gefunden. In den weiteren Studien erschienen L- und S-Allel eher kodominant, was den Ergebnissen des Großteils der Veröffentlichungen entspricht. In der Analyse der Tecumseh Studie wurde ein Effekt des L_G-Allels beobachtet. Die gemeinsame Analyse zusammen mit dem S-Allel führte zu einer deutlichen Signifikanzsteigerung in der Assoziationsanalyse. Lesch und Mitarbeiter berichten, dass der 5-HTTLPR-Genotyp für 7-9% der genetischen Varianz des Neurotizismus verantwortlich ist.^{25,26} In dieser Untersuchung wurde gefunden, dass der 5-HTTLPR-Genotyp etwa 4% der genetischen

Varianz erklärt, was den Ergebnissen von 4-5% von Sen et al. entspricht, die allerdings in derselben Bevölkerung mit einer zum Teil überlappenden Stichprobe gewonnen wurden und daher nicht unabhängig sind.⁸³ Diese Resultate sind konsistent mit der Beobachtung, dass in der Erstpublikation einer Assoziation die wahre Effektgröße eher überschätzt wird.⁸⁴

In der gemeinsamen Analyse beider vorliegender Studien konnte die von Lesch gefundene statistisch signifikante Assoziation des S-Allels mit hohen Neurotizismuswerten bestätigt werden. Die Auswertung des „kombinierten“ Genotyps dagegen führte in diesem Fall zu einer deutlichen Abschwächung der statistischen Signifikanz, was sich auf die höhere Probandenzahl der MLS im Vergleich zur Tecumseh Studie zurückführen lässt, in der auch zuvor keine Assoziation zwischen „S“-Allel und hohen Neurotizismuswerten gefunden worden war.

Während Sen et al. eine Assoziation des 5-HTTLPR L- Allels mit Alkoholabusus fanden, zeigte die Auswertung der Alkoholismus Studie, bei der 152 Individuen untersucht wurden, keinen signifikanten Zusammenhang zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und Neurotizismuswerten, erhoben mittels des NEO-FFI.⁸³ Dieses lässt sich als weiteren Hinweis darauf werten, dass die Stichprobengröße von wesentlicher Bedeutung für Assoziationsstudien ist. Flory et al. beschrieben 1999, dass eine Mindestanzahl von 350 Probanden notwendig ist, um 80% statistische Power auf dem 0.05 Signifikanzniveau zu erreichen, wenn die Effektgröße 0.33 ist.⁸⁵ Diese Stichprobengröße wurde in dieser Untersuchung nur bei der Michigan Longitudinal Studie erreicht, annähernd aber auch bei der Tecumseh Studie mit einer Probenzahl von 316. In der gemeinsamen Analyse dieser beiden Studien wurden mit 788 Probanden etwa doppelt so viele Individuen untersucht wie von Flory gefordert. Bekannterweise weist das weibliche Geschlecht höhere Neurotizismuswerte auf.⁶ Auch in den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit fanden sich bei Frauen stets signifikant höhere Werte als bei Männern. Eine Interaktion zwischen Neurotizismus, Geschlecht und 5-HTTLPR-Genotyp wurde jedoch nicht beobachtet. Zusätzlich fand sich in dieser Arbeit ein statistisch signifikanter Einfluss von chronischem Alkoholabusus auf die Höhe der Neurotizismuswerte, jedoch ohne Zusammenhang mit dem 5-HTTLPR-Genotyp. Auch Malouff et al. beschrieben in einer Metaanalyse höhere Neurotizismuswerte bei Individuen mit Alkoholabusus.⁸⁶ Eine Assoziation zwischen

Alkoholabusus und Vorliegen eines der 5-HTTLPR-Allele wurde in dieser Arbeit an keiner Stelle gefunden. Wie auch in der Studie von Stoltenberg et al., die den Zusammenhang zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und NEO-FFI-Testergebnissen bei 86 Probanden der G1-Generation der Michigan Longitudinal Studie untersuchte, fand sich hier in der Alkoholismus Studie eine signifikante Assoziation zum Persönlichkeitsmerkmal der Offenheit. Stoltenberg beschrieb jedoch die höchsten Werte für Offenheit bei Probanden mit SS-Genotyp, vor LS- und LL-Genotyp.⁷⁵ Im Rahmen dieser Arbeit wurde in der Analyse der Alkoholismus Studie ein entgegengesetztes Ergebnis gefunden: Der LL-Genotyp zeigte höhere Werte für das Persönlichkeitsmerkmal der Offenheit als die LS- und SS-Genotypen. Ein statistisch aufdeckbarer Unterschied in Analyse von 5-HTTLPR-Genotyp allein und „kombiniertem“ Genotyp unter Einbeziehung des SNPs rs25531 wurde an dieser Stelle nicht gefunden. Greenberg und Mitarbeiter fanden keine Assoziation zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und Offenheit.³⁸ Das Persönlichkeitsmerkmal der Offenheit gilt als assoziiert mit intellektueller Neugier und Unkonventionalität. Werden diese Neigungen als dem Angst-assoziierten Persönlichkeitsmerkmal Neurotizismus entgegengesetzt aufgefasst, so ist eine Assoziation zwischen Offenheit und LL-Genotyp durchaus vorstellbar. Insgesamt ist zu beachten, dass in der vorliegenden Studie bei allen Probanden eine Suchterkrankung manifest war, die durchaus Einfluss auf die Ausprägung von Persönlichkeitsmerkmalen gehabt haben kann. Da die ermittelte Signifikanz ($p = 0.03$) generell als grenzwertig zu beurteilen ist und nach Korrektur des multiplen Testens eher als Trend zu bewerten ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Assoziation mit Offenheit zufallsbedingt ist.

4.2.2 Assoziation zwischen Genotyp und psychiatrischen Erkrankungen

Es besteht die Hypothese, dass der 5-HTTLPR-Polymorphismus eine kausale Verbindung zu verschiedenen psychiatrischen Krankheiten aufweist. Hauser et al. beschrieben eine signifikant höhere Auftretensrate des 5-HTTLPR S-Allels bei Patienten mit Major Depression ($p = 0.003$), sowie bei Patienten mit Bipolarer Erkrankung ($p = 0.011$).⁸⁷ Lasky-Su und Mitarbeiter berichteten in einer 2005 vorgenommenen Metaanalyse von 15 Studien über eine Assoziation zwischen S-Allel und Bipolarer Erkrankung ($OR = 1.3$, $p = 0.001$). In der Analyse von 14 weiteren Studien fanden sie jedoch keinen Zusammenhang zwischen

dem kurzen Allel von 5-HTTLPR und Major Depression.⁸⁸ Craddock et al. fanden 2001 in einer Metaanalyse keine Assoziation zwischen dem S-Allel von 5-HTTLPR und Bipolarer Erkrankung.⁸⁹ In der vorliegenden Arbeit wurde durch Kreuztabellen mit Chi²-Tests sowie durch logistische Regression untersucht, ob sich eine statistisch signifikant differierende Genotypenverteilung bei psychiatrisch Erkrankten und Kontrollen fand und ob diese Assoziation durch zusätzliche Einbeziehung des SNPs rs25531 gestärkt wurde. An keiner Stelle wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen einem bestimmten Genotyp und einem der untersuchten Krankheitsbilder festgestellt. Mit p-Werten um 0.1 war jedoch ein Trend in der Analyse der Pritzker Studie erkennbar, der ein vermehrtes Vorkommen des S-Allels bei psychiatrischen Erkrankten gegenüber Kontrollen anzeigte. Wurde der „kombinierte“ Genotyp analysiert und somit das L_G-Allel als S-Allel gerechnet, zeigte sich der Trend etwas stärker, erreichte aber ebenfalls kein statistisches Signifikanzniveau. Vermutlich ist die Stichprobengröße als limitierend einzuschätzen. Da derzeit für diese Studie noch weitere Probanden rekrutiert werden, sollte es möglich sein, diese Analyse in der Zukunft mit einer erweiterten Stichprobe zu wiederholen.

4.2.3 Moderation des Einflusses stressvoller Lebensereignisse auf die Vulnerabilität für Depression durch 5-HTTLPR

Der Insertions/Deletions-Polymorphismus 5-HTTLPR ist assoziiert worden mit Major Depression, aber besonders ausgeprägt im Kontext mit Stress im persönlichen Umfeld. Die Interaktion des Polymorphismus mit stressvollen Lebensereignissen im Sinne einer Steigerung der Anfälligkeit für Major Depression und depressive Symptome wurde in vielen^{38, 90, 91, 92}, aber nicht allen^{93, 94} Studien gefunden. Hier fand sich ein deutlicher Trend für einen Einfluss des „SS“-Genotyps des „kombinierten“ Genotyps auf die Anfälligkeit für Depression, wenn drei Jahre stressvolle familiäre Verhältnisse vorlagen. Caspi und Mitarbeiter beschrieben diese Zusammenhänge für den biallelen Locus 5-HTTLPR.⁴⁴ Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine stärkere Assoziation bei der kombinierten Analyse von 5-HTTLPR und rs25531 gefunden. Die Ergebnisse können als Bestätigung der durch Caspi beschriebenen Gen x Umwelt-Interaktion in einer triallelen Analyse gewertet werden. Auch Stein et al. bestätigten 2008 in einer Untersuchung über Angsterkrankungen im

Erwachsenenalter bei Individuen, die in der Kindheit misshandelt wurden, erneut diese Gen x Umwelt-Interaktion. Auch sie fanden eine geringfügig stärkere statistische Signifikanz in der Analyse des triallelen Locus.⁹⁵

Gleichzeitig sind die Limitationen der Ergebnisse der hier untersuchten Michigan Longitudinal Studie zu beachten. Zum einen war die Stichprobengröße mit Informationen zu familiärem Stress mit 223 Probanden relativ klein. Darüber hinaus wurden die Ergebnisse im Rahmen einer Familienstudie gewonnen, in deren Elterngeneration ein hoher Prozentsatz von Alkoholabusus vorlag und deren Probanden ein eher niedriger sozioökonomischer Status gemein war. Es ist davon auszugehen, dass eine Suchterkrankung sich auf die familiären Lebensverhältnisse auswirkt und sich die gewonnenen Ergebnisse nur schwerlich auf die Allgemeinbevölkerung übertragen lassen. Andererseits hat die Analyse in einer derartigen Bevölkerung, die einem hohen Level an Stress ausgesetzt ist (7.8% der MLS-Probanden und 15% der von Caspi beschriebenen Probanden berichteten 4 oder mehr Stressereignisse in den vergangenen drei bzw. fünf Jahren) den Vorteil, dass die Power, eine Gen x Umweltinteraktion nachzuweisen, erhöht ist. Insgesamt weisen die hier gewonnenen Ergebnisse unter Einbeziehung der vergleichbaren Befunde Caspis darauf hin, dass 5-HTTLPR eine substantielle Rolle in der Modulation der Sensitivität bzw. der Resistenz eines Individuums gegenüber stressvollen Lebensereignissen spielt.⁴⁴ Der zugrunde liegende Mechanismus, mit dem Stress im menschlichen Hirn funktional „gepuffert“ werden kann und der Zusammenhang mit 5-HTTLPR ist bislang weitgehend unverstanden. Es dürfte sich um sehr komplexe Vorgänge handeln, bei denen auch die Verfügbarkeit von Neurotransmittern, wie etwa Serotonin eine Rolle spielt.

4.3 Expressionsanalyse

4.3.1 5-HTT-Expression in Lymphoblastoidzelllinien

Heils und Mitarbeiter beschrieben 1996 den Einfluss des 5-HTTLPR-Genotyps auf die Expression des 5-HTT-Gens. In humanen JAR Chorionkarzinomzellen fanden sie höhere

Serotonintransporter-mRNA-Raten bei Vorliegen des LL-Genotyps als bei Trägern des S-Allels.²⁸ Eine höhere mRNA Transkription in 53 bzw. 85 Lymphblastoidzelllinien, homozygot für LL, wurde im Jahr 2004 in einer Veröffentlichung von Hranilovic et al. sowie 2006 durch Bradley et al. bestätigt.^{96,97} In beiden Untersuchungen wurden die Ergebnisse durch Real Time PCR gewonnen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit einer Anzahl von 228 Zelllinien die bislang größte Stichprobe analysiert. Hierbei wurde keine statistisch signifikant höhere Expression von 5-HTT bei Vorliegen des LL-Genotyps gegenüber dem LS- bzw. SS-Genotyp von 5-HTTLPR gefunden. Die mittleren Expressionswerte der 5-HTTLPR-Genotypen unterschieden sich in dieser Untersuchung nur minimal. Auch hier war jedoch ein Trend erkennbar der die höchste Expression beim LL-Genotyp und die niedrigste beim SS-Genotyp zeigte, während sich beim LS-Genotyp mittlere Expressionswerte fanden. Dieses stimmt insofern mit den Ergebnissen von Hu überein, da auch seine Befunde auf eine Kodominanz der beiden 5-HTTLPR-Allele hindeuten⁴⁹, während Lesch eher eine Dominanz des S-Allels beschrieb.²⁶ Anders als in den zitierten Studien, wurden die Ergebnisse dieser Arbeit durch Microarray-Analyse gewonnen. Es ist durchaus möglich, dass die Chipanalyse unempfindlicher ist und so geringe Expressionsunterschiede, wie sie für die unterschiedlichen 5-HTTLPR-Allele beschrieben sind, mittels einer sensitiven Real Time PCR besser nachweisbar sind.

4.3.2 5-HTT-Expression in humanem post mortem Hirngewebe

McLaughlin et al. untersuchten 1996 die Expression von Serotonintransporter mRNA im Gebiet des dorsalen und medianen Raphekernes in humanem post mortem Gehirn durch *in situ* Hybridisierung.⁹⁸ Bei der Analyse der Ergebnisse von vier gesunden Kontrollpersonen fanden sie die Expressionsraten in den beiden mesencephalen Raphekernen unterschiedlich verteilt; im Nucleus raphe dorsalis wurde eine deutlich höhere Expressionsrate als im Nucleus raphe medianus detektiert. Auch die vorliegenden Ergebnisse zeigten eine höhere Expression im Bereich des Nucleus raphe dorsalis im Vergleich zum Nucleus raphe medianus. Mittels *in situ* Hybridisierung analysierten auch Little und Kollegen 1998 im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie die 5-HTT mRNA Expression in post mortem Gehirnen von 17 Individuen mit chronischem Kokainabusus

und von 21 Kontrollprobanden. Sie überprüften die Expressionswerte auf eine Assoziation zum 5-HTTLPR-Genotyp und fanden in Nucleus raphe dorsalis und Nucleus raphe medianus signifikant höhere Expressionswerte beim LL-Genotyp als bei Vorliegen von LS- bzw SS-Genotyp. Sie beschrieben somit eine Dominanz des S-Allels gegenüber dem L-Allel von 5-HTTLPR.²⁹ Die in dieser Arbeit gewonnenen Microarray Ergebnisse des Nucleus raphe dorsalis bestätigten die signifikant höhere Expression von 5-HTT bei Vorliegen des LL-Genotyps. Sie wiesen jedoch erneut eher auf eine Kodominanz der beiden 5-HTTLPR-Allele hin. Diese Ergebnisse stellen nach bestem Wissen die erste Bestätigung der Ergebnisse von Little et al. seit 1998 an humanem post mortem Hirngewebe dar. Gleichzeitig sind sie als Hinweis dafür zu sehen, dass sich die genotypenabhängige Expression des Serotonintransporters 5-HTT nur in einem sehr begrenzten, für den Serotoninmetabolismus entscheidenden, Hirnareal findet. In der Analyse der Microarray-Daten des Nucleus Raphe medianus wurden bei ~85% der Proben ‚present calls‘ und damit eine 5-HTT-Expression beobachtet. Es zeigte sich jedoch weder eine Korrelation zu den Expressionswerten des Nucleus raphe dorsalis noch wurde ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und der 5-HTT-Expression gefunden. Es ist möglich, dass sich dies durch den geringeren Anteil serotonerger Neurone in diesem Kernkomplex oder eine spezifische Expressionsregulation erklären lässt. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Raphekerne weisen darauf hin, dass ein Vergleich verschiedener Hirnregionen in der Analyse von Expressionsdaten sinnvoll ist. Dass die 5-HTT-Expression spezifisch für bestimmte Hirnregionen ist, wurde sehr deutlich durch die Tatsache, dass von allen untersuchten Hirnregionen nur in diesen beiden Raphekerne überhaupt 5-HTT-mRNA aufzufinden war. Diese Ergebnisse sind auch konkordant zu Bildgebungsstudien.³⁰ Als limitierender Faktor dieser Untersuchung ist eindeutig die relativ geringe Probenzahl anzusehen. Es ist in diesem Zusammenhang zu beachten, dass bei der Analyse des Nucleus raphe medianus auf Grund von ‚absent calls‘ drei Proben von weiteren Analysen ausgenommen werden mussten und die ohnehin schon sehr kleinen Stichprobe weiter einschränkte. Es ist zudem möglich, dass es im Rahmen der Microarray-Analyse zu Ungenauigkeiten in der Messung der mRNA-Level gekommen ist. Derartige Fehler wirken sich insbesondere dann aus, wenn das Kollektiv klein ist und die Expressionsunterschiede der verschiedenen Allelträger zudem gering sind. Es ist

folglich nicht auszuschließen, dass sich die unterschiedlichen Analyseergebnisse aus dem Gebiet des Nucleus raphe dosalis und medianus auf diesen Effekt zurückführen lassen, auch wenn eine hirregionenspezifische Expression angenommen wird. Die Vermutung, dass sich ein Zusammenhang zwischen 5-HTTLPR und 5-HTT-Expression nur in dem sehr begrenzten Hirnareal des Nucleus raphe dorsalis findet, deckt sich auch mit den Ergebnissen mehrerer Studien, die in weiteren Hirngebieten keinen Zusammenhang zwischen 5-HTTLPR und 5-HTT fanden. So berichteten mehrere Gruppen durch *in vivo* Bildgebungsstudien keine Assoziation zwischen 5-HTTLPR und 5-HTT-Verfügbarkeit im Präfrontalen Cortex, im Thalamus und Hypothalamus detektiert zu haben.^{99,100,101}

Little et al. beschrieben in ihrer Analyse von Hirnproben einen Einfluss von Suchterkrankungen auf die Verfügbarkeit von Serotonintransporterbindungsstellen, nicht jedoch auf die Höhe der 5-HTT mRNA-Level, die sich allein abhängig vom 5-HTTLPR-Genotyp zeigten.²⁹ Dennoch ist auch in dieser Untersuchung die Heterogenität innerhalb der Stichprobe zu beachten und als weiterer limitierender Faktor zu bewerten. So wurden mit den Hirnproben des Pritzker Kollektivs Proben von Menschen mit psychiatrischen Erkrankungen des affektiven Formenkreises sowie von gesunden Kontrollprobanden analysiert. Ein Einfluss der psychiatrischen Grunderkrankung und auch der jeweiligen pharmakologischen Therapie auf die hier erhaltenen Ergebnisse ist nicht auszuschließen. Das G-Allel von rs25531 fand sich in der Untersuchung der Pritzker Proben nur in zwei (Nucleus raphe dorsalis) bzw. einer der analysierten Proben (Nucleus raphe medianus). Diese geringe Anzahl erwies sich nicht als ausreichend für eine Aussage über einen vermeintlich expressionsmindernden Effekt. Die Gruppierung des L_G-Allels zum S-Allel führte in der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und 5-HTT-Expression jedoch in beiden Raphekernen zu einer geringeren statistischen Signifikanz im Vergleich zur alleinigen Analyse des 5-HTTLPR-Genotyps. Die hier dargestellten Ergebnisse können als weiterer Hinweis dafür gewertet werden, dass sich in dem spezifischen Kerngebiet des Nucleus raphe dorsalis eine Assoziation zwischen 5-HTTLPR-Genotyp und 5-HTT-Expression findet. Zur weiteren Charakterisierung der Stärke dieses Effektes ist die Untersuchung einer größeren Stichprobe vonnöten.

4.4 Schlussfolgerungen

In den Assoziationsanalysen dieser Arbeit ist stets der biallele (L versus S) 5-HTTLPR-Genotyp im direkten Vergleich mit dem triallelen (L_A versus L_G oder S) Locus unter Berücksichtigung von rs25531 analysiert worden. Nicht in allen Untersuchungen führte die zusätzliche Genotypisierung von rs25531 zu einer statistisch signifikanteren Assoziation als die Analyse von 5-HTTLPR allein. Damit konnte die ursprüngliche Hypothese nicht bewiesen werden. Es kann postuliert werden, dass der Effekt von rs25531 eventuell nicht so groß ist wie zunächst anhand der ersten Arbeiten vermutet. Auch Stein et al. beschrieben in einer aktuellen Publikation keinen wesentlichen Unterschied zwischen der herkömmlichen biallelen und der triallelen Klassifikation von 5-HTTLPR gefunden zu haben.⁹⁵ Es ist jedoch auch zu beachten, dass im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis der durch Caspi erstmals beschriebenen Gen x Umweltinteraktion nur durch die zusätzliche Genotypisierung von rs25531 mit statistischer Signifikanz gelang.⁴⁴ Es ist als eher unwahrscheinlich anzunehmen, dass die in der Vergangenheit in der Literatur für 5-HTTLPR gefundenen diskrepanten Ergebnisse allein auf der biallelen und nicht triallelen Analyse beruhen. Dass dies in der Vergangenheit ein Element war, welches die inkonsistente Replizierung von 5-HTTLPR in Assoziationsanalysen mitbestimmte, ist jedoch weiterhin anzunehmen. Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich folgern, dass die zusätzliche Genotypisierung des SNPs rs25531 auch in zukünftigen Assoziationsanalysen des In/Del-Polymorphismus 5-HTTLPR mittels der hier etablierten Genotypisierungsmethode zu empfehlen ist, insbesondere wenn es sich um Bevölkerungsgruppen wie Afroamerikaner handelt, in denen das L- bzw. L_G -Allel häufiger ist.

In dieser Arbeit fand sich im Rahmen der 5-HTT-Expressionsanalyse bei Lymphoblastoidzellen kein statistisch signifikanter Unterschied der Expression bei Trägern von 5-HTTLPR L- und S-Allel. Der durch Hu et al. beschriebene expressionsmindernde Effekt des G-Allels des SNPs rs25531 konnte in dieser Arbeit in Lymphoblastoidzellen folglich nicht bestätigt werden.⁴⁹ Es wurde jedoch vermutet, dass die ohnehin als gering beschriebenen Expressionsunterschiede mittels der Chipanalyse nicht erfasst wurden, da sich durchaus ein Trend einer höheren Expression des L-Allels gegenüber dem S-Allel

erkennen ließ. Folgerung lässt sich, dass die Verwendung der Microarray-Analyse im Einzelfall zu prüfen ist und für einzelne, besonders genaue Expressionsanalysen den anderen Methoden wie Real time PCR oder *in situ* Hybridisierung der Vorzug zu geben ist. Bei der Untersuchung von post mortem Hirngewebe fand sich bei Trägern des L-Allels von 5-HTTLPR eine signifikant höhere 5-HTT-Expression im Kerngebiet des Nucleus raphe dorsalis als bei denen des S-Allels. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Bildgebungsstudien, wobei der direkte Nachweis in Hirngewebe bisher nur selten gelang.^{29,}
³⁰ Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden 5-HTT-Expressionsanalysen in post mortem Hirngewebe der beiden Raphekerne mittels *in situ* Hybridisierung bei einer größeren Stichprobe initiiert.

5 Zusammenfassung

Der serotonergen Neurotransmission kommt in der Ätiopathogenese depressionsrelevanter Phänotypen eine Schlüsselrolle zu. So ist es nicht verwunderlich, dass die psychiatrische Forschung einen Fokus auf das Gen legt, das den Serotonintransporter (5-HTT, genetischer Locus *SLC6A4*, codiert. Der Insertions/Deletionspolymorphismus 5-HTTLPR, lokalisiert in der Promoterregion, wurde herkömmlich in zwei Allelformen unterteilt: ein langes Allel (L), bestehend aus 16 Repeats und ein kurzes Allel (S) mit 14 Repeats.²⁶ Untersuchungen zeigten eine Assoziation des S-Allels mit einer weniger effizienten Transkription von 5-HTT.²⁸ Weiter wurden bei Individuen mit S-Allel höhere Werte des Angst-assoziierten Persönlichkeitsmerkmals Neurotizismus im Vergleich zu Individuen, homozygot für das L-Allel, gefunden.²⁶ Eine konkordante Assoziation wurde auch zwischen Vorliegen des S-Allels und einer erhöhten Vulnerabilität für Major Depression, insbesondere im Kontext einer Gen x Umwelt-Interaktion nach Erfahrung stressvoller Lebensereignisse, beschrieben.⁴⁴ Die Studienlage zeigte sich jedoch in den vergangenen Jahren inkonsistent.^{36,37,38,39,40,41,42} Einige Autoren berichteten, die gefundenen Assoziationen nicht replizieren zu können. Hu et al. beschrieben 2006 einen zusätzlichen funktionalen A→G SNP rs25531, der eine Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors AP2 generiere, was in einer expressionsmindernden Wirkung von 5-HTT resultiere.⁴⁹ Folglich sei nicht eine biallele (L versus S), sondern eine triallele (L_A versus L_G oder S) Klassifizierung des Locus 5-HTTLPR und somit eine Überprüfung der bisherigen Forschungsergebnisse erforderlich.

In dieser Arbeit erfolgte zunächst eine weitere Charakterisierung des SNPs rs25531. Anders als in der Arbeit von Hu wurde der SNP nach den Ergebnissen einer DNA-Sequenzierung nicht im In/Del Bereich von 5-HTTLPR, sondern in Übereinstimmung mit Kraft und Wendland et al. 18 bp ‚upstream‘ lokalisiert.^{50,51} Folglich stellt sich der Locus 5-HTTLPR sogar als quatioalleler Locus mit den Allelen L_A, L_G, S_A und S_G dar. Die Frequenz des S_G-Allels war mit 0.002 jedoch zu gering, um eine funktionelle Charakterisierung vornehmen zu können. Deshalb wurden Träger des S_G-Allels von weiteren Analysen ausgeschlossen und der Locus als triallelisch behandelt. Die Genotypisierung von 5-

HTTLPR und rs25531 erfolgte mittels einer PCR- und RFLP-Analyse, deren Validität durch DNA-Sequenzierung von Stichproben sowie Vorliegen des Hardy-Weinberg-Equilibriums bestätigt wurde. Erfolgreich genotypisiert werden konnten 1796 Individuen, zugehörig zu sechs Studien, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

In den Assoziationsanalysen des Locus 5-HTTLPR mit Neurotizismus und der Untersuchung auf eine Gen x Umwelt-Interaktion im Sinne einer Moderation des Einflusses stressvoller Lebensereignisse auf die Vulnerabilität für Major Depression durch 5-HTTLPR, wurde stets der biallele 5-HTTLPR-Genotyp im direkten Vergleich mit dem triallelen Locus unter Berücksichtigung von rs25531 analysiert. Ein Einfluss der Genotypisierung von rs25531 war allein in der Analyse der Gen x Umwelt-Interaktion gegeben, die sich in der triallelen nicht jedoch der biallelen Analyse grenzwertig signifikant darstellte. In einer der Assoziationsanalysen des 5-HTTLPR-Genotyps zur Höhe der Neurotizismuswerte stellte sich das Verhältnis genau umgekehrt dar. Schlussfolgern ließ sich, dass die Diskrepanzen, die sich in der Vergangenheit in Assoziationsanalysen des Locus 5-HTTLPR mit dem Persönlichkeitsmerkmal Neurotizismus fanden, nicht allein durch die zusätzliche Genotypisierung des funktionalen SNPs rs25531 erklären lassen. Insgesamt erklärt der 5-HTTLPR-Polymorphismus nur etwa 4-5% der genetischen Varianz im Spektrum des Merkmals Neurotizismus, wodurch diese Untersuchungen artefaktanfällig sind.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag in einer Microarray-Expressionsanalyse des Serotonintransporters 5-HTT. Nur wenige Studien beschäftigten sich in der Vergangenheit mit den 5-HTT-Expressionsniveaus in humanem post mortem Hirngewebe.²⁹ In dieser Arbeit erfolgte eine Expressionsanalyse an Gewebeproben der mesencephal gelegenen Kernkomplexe des Nucleus raphe dorsalis und Nucleus raphe medianus, die Somata serotonerger Neuronen enthalten und von wo aus serotonerge Fasern in andere Hirnregionen projizieren. Bei der Untersuchung des Nucleus raphe dorsalis zeigte sich bei 23 Individuen eine signifikant höhere 5-HTT-Expression bei Vorliegen des LL-Genotyps gegenüber LS- und SS-Genotyp ($p=0.02$ bzw. 0.005 nach lin. Regression). Die Ergebnisse bestärken die Annahme, dass nicht nur in Lymphoblastoidzellen, sondern auch in einer für den Serotoninmetabolismus entscheidenden Hirnregion eine 5-HTTLPR abhängige 5-HTT-Expression existent ist. Dies könnte auch die hier gefundenen Zusammenhänge des 5-HTTLPR-Polymorphismus mit Neurotizismus und Major Depression verständlich machen.

6 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
bp	Basenpaar
BP	Bipolare Störung
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
D'	D-Prime
DIGS	Diagnostisches Instrument für Genetische Studien
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM III-R	Diagnostisches und Statistisches Handbuch Psychischer Störungen der American Psychiatric Association in dritter, revidierter Auflage
DSM-IV	Diagnostisches und Statistisches Handbuch Psychischer Störungen der American Psychiatric Association in vierter Auflage
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alia
FIGS	Familieninterview für genetische Studien
G	Guanin
G1 - Generation	Parental-, Elterngeneration
G2 - Generation	1. Filial-, 1. Tochtergeneration
HAM-D	Hamilton Skala = Hamilton rating scale for depression
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium

ICD-10	Internationales Klassifikationssystem der Krankheiten in zehnter Edition
In/Del	Insertions/Deletions-Polymorphismus
kb	Kilobase
lin.	lineare
LD	„Linkage Disequilibrium“ = Kopplungsungleichgewicht
MAO-A	Monoaminoxidase Typ-A
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MDD	Major Depression Disorder
min	Minute
mM	Millimol
µl	Mikroliter
MLS	Michigan Longitudinal Studie
mmol	Millimol
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
nmol	Nanomol
NEO-FFI	NEO-Fünf-Faktoren-Inventar
NEO-PI	NEO-Persönlichkeits-Inventar
NEO-PI-R	NEO-Persönlichkeits-Inventar-Revidiert
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
p	p-Wert
PCR	„Polymerase Chain Reaction“ = Polymerase-Kettenreaktion
pM	Picomol
r ²	Bestimmtheitsmaß
RDC	„Research Diagnostic Criteria“
RefSeq	Referenz Sequenz
RFLP	Restriktions Fragment Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
S.	Seite

Schiz	Schizophrenie
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
<i>SLC6A4</i>	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4 = Serotonintransporter (alternative Bezeichnung SERT, 5-HTT)
SERT	Serotonintransporter (alternative Bezeichnung <i>SLC6A4</i> , 5-HTT)
SNP	‚Single Nucleotide Polymorphism‘ = Einzelnukleotidpolymorphismus
SSRI	‚Selective Serotonin Reuptake Inhibitor‘ = Serotonin- Wiederaufnahmehemmer
Tab.	Tabelle
TDT	‚Transmission Disequilibrium Test‘
TM	Transmembransegment
U	‚Unit(s)‘ = Einheit(en)
vgl.	vergleiche
WHO	‚World Health Organization‘ = Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
5-HT	Serotonin
5-HTT	Serotonintransporter (alternative Bezeichnung <i>SLC6A4</i> , SERT)
5-HTTLPR	‚Serotonin Transporter Linked Polymorphic Region‘

7 Abbildungsverzeichnis

7.1 Abbildungen

- Abb. 1: Strukturformel Serotonin (S. 6)
- Abb. 2: 5-HTT - Schematische Darstellung des humanen Serotonintransporters (*nach* Murphy und Lesch¹⁰²) (S. 8)
- Abb. 3: Humanes Serotonintransporter Gen (*nach* Heils et al.¹⁰³) (S. 9)
- Abb. 4: Trialleler Locus 5-HTTLPR - 5-HTT Expression (*nach* Hu et al.⁴⁹) (S. 13)
- Abb. 5: Grenzen der Insertion/Deletion von 5-HTTLPR und Lokalisation von rs25531 (*nach* Wendland et al.⁵⁰) (S. 13)
- Abb. 6: Schematische Darstellung der Microarray-Technologie (*nach* <http://cnx.org/content/m12387/latest>; Stand: 15. März 2009 10.00 Uhr) (S. 28)
- Abb. 7: Bialleles Genotypisierungsergebnis des Locus 5-HTTLPR (S. 32)
- Abb. 8: Präferentielle S-Allel-Amplifikation (S. 33)
- Abb. 9: 5-HTTLPR-PCR mit ‚whole genome‘ amplifizierten DNA-Proben (S. 33)
- Abb. 10: Tri- bzw. quattoallele Genotypisierungsergebnis (S. 34)
- Abb. 11: DNA-Sequenzierungsergebnis (S. 35)
- Abb. 12: Berechnung Kopplungsungleichgewicht (LD) von rs25531 und 5-HTTLPR (S. 39)
- Abb. 13: MLS G1-Generation: Prüfung auf Assoziation Genotyp – Mittlerer Neurotizismuswert (NEO-PI-R-Wert) bei 260 Individuen. (S. 41)
- Abb. 14: MLS G1: Einfluss des Geschlechts auf die Höhe des mittleren Neurotizismuswertes (S. 42)
- Abb. 15: Alkoholabusus – Neurotizismus (S. 43)
- Abb. 16a: 5-HTTLPR - Alkoholabusus – Neurotizismus (S. 44)
- Abb. 16b: „Kombinierter“ Genotyp – Alkoholabusus - Neurotizismus (S. 44)
- Abb. 17: MLS G2-Generation: Prüfung auf Assoziation Genotyp - Mittlerer Neurotizismuswert (NEO-PI-R-Wert) bei 230 Individuen. (S. 46)

- Abb. 18: Tecumseh Studie: Prüfung auf Assoziation Genotyp – Mittlerer Neurotizismuswert bei 316 Individuen. (S. 47)
- Abb. 19: Gruppiertes Genotyp – Neurotizismus (S. 48)
- Abb. 20: MLS und Tecumseh Studie: Prüfung auf Assoziation Genotyp – Mittlerer Neurotizismuswert bei 788 Individuen. (S. 49)
- Abb. 21: Alkoholismusstudie: Prüfung auf Assoziation Genotyp – Mittlerer Offenheitswert bei 140 Individuen. (S. 50)
- Abb. 22: MLS-G1: Verlauf der mittleren Hamilton-Depressionswerte von 223 Probanden über die Erhebungsphasen 1-6 der Studie. (S. 55)
- Abb. 23a: MLS-G1: Hamiltonwert - familiärer Stressindex - 5-HTTLPR (S. 56)
- Abb. 23b: MLS-G1: Hamiltonwert - familiärer Stressindex - „Kombinierter“ Genotyp (S. 57)
- Abb. 24: Bipolar Studie: Prüfung auf Assoziation Genotyp – 5-HTT-Expression in Lymphoblastoidzellen. (S. 61)
- Abb. 25: Pritzker Projekt: Prüfung auf Assoziation: Genotyp – 5-HTT-Expression im Nucleus raphe dorsalis bei 23 Gewebeproben. (S. 63)
- Abb. 26: Pritzker Projekt: Prüfung auf Assoziation: Genotyp – 5-HTT-Expression im Nucleus raphe medianus bei 21 Gewebeproben. (S. 65)

7.2 Tabellen

- Tab. 1: Acht Phasen der Michigan Longitudinal Studie (S. 19)
- Tab. 2: Übersicht aller erhobenen Genotypisierungsergebnisse (S. 36)
- Tab. 3: Genotypen- und Allelfrequenz von 5-HTTLPR und rs25531 in unterschiedlichen Populationen (S. 38)
- Tab. 4a: Diagnose * 5-HTTLPR-Genotyp Kreuztabelle ($p = 0.493$) (S. 51)
- Tab. 4b: Diagnose * „Kombinierter“ Genotyp Kreuztabelle ($p = 0.96$) (S. 52)
- Tab. 5a: Diagnose * 5-HTTLPR-Genotyp Kreuztabelle ($p = 0.102$) (S. 53)
- Tab. 5b: Diagnose * „Kombinierter“ Genotyp Kreuztabelle ($p = 0.147$) (S. 53)
- Tab. 6a: Diagnose * 5-HTTLPR-Genotyp Kreuztabelle ($p = 0.259$ log. Regression)

- (S. 54)
- Tab. 6b: Diagnose * „Kombinierter“ Genotyp Kreuztabelle ($p = 0.327$ log. Regression)
(S. 54)
- Tab. 7a: 5-HTTLPR: ANOVA-Analyse; abhängige Variable: Mittlerer Hamiltonwert
(Quadratwurzel) (S. 57)
- Tab. 7b: „Kombinierter“ Genotyp: ANOVA-Analyse; abhängige Variable: Mittlerer
Hamiltonwert t5 (Quadratwurzel) (S. 58)
- Tab. 8a: 5-HTTLPR: ANOVA-Analyse; abhängige Variable: Mittlerer Hamiltonwert t4
(Quadratwurzel) (S. 59)
- Tab. 8b: „Kombinierter“ Genotyp: ANOVA-Analyse; abhängige Variable: Mittlerer
Hamiltonwert t4 (Quadratwurzel) (S. 60)
- Tab. 9: Statistische Beziehung zwischen 5-HTT-Expression und Genotyp unter
Einbeziehung der Kovariaten Diagnose und Geschlecht (S. 62)

8 Literaturverzeichnis

- 1 Fox Keller, Evelyn: Century of the gene, Harvard University Press, Cambridge, (2000)
- 2 Sklar P: Linkage analysis in psychiatric disorders: the emerging picture, Annu Rev Genomics Human Genetics, (2002) 3 371-413
- 3 Venter J.C et al. : The sequence of the human genome, Science. (2001) Feb 16;291(5507):1304-51. Erratum in: Science (2001) Jun 5;292 (5523):1838
- 4 Landes et al.: Initial sequencing of the human genome, Nature. (2001) Feb 15;409(6822):860-921. Erratum in: Nature 2001 Aug 2;412(6846):565. Nature (2001) Jun 7;411(6838):720
- 5 Altshuler D, Daly MJ, Lander ES: Genetic mapping in human disease, Science (2008) 322:881-888
- 6 McCrae RR, John OP: An introduction to the five-factor model and its applications, J Pers (1992) 60 175-215
- 7 Costa PT Jr, McCrae RR: Stability and change in personality assessment: the revised NEO Personality Inventory in the year 2000, J Pers Assess. (1997) Feb;68(1):86-94
- 8 Akiskal HS et al.: Bipolar outcome in in the course of depressive illness. Phenomenologic, familial and pharmacologic predictors, J Affect Disord. (1983) 5 115-28
- 9 Nystrom S, Lindegard B: Depression: Predisposing factors, Acta Psychiatr Scand (1975) 51 77-87
- 10 Cloninger CR. A systematic method for clinical description and classification of personality variants. Arch Gen Psychiatry (1987); 44:573-588.
- 11 Cloninger, C. R.; Svrakic, D. M.; Przybeck, T. R.: A psychobiological model of temperament and character. Arch Gen Psychiatry (1993), 50: 975-990.

- 12 De Fruyt F, Van De Wiele L, Van Heerigan C: Cloninger's psychobiological model of temperament and character and the five-factor model of personality. *Pers Individual Differences* (2000) 29:441–452.
- 13 Loehlin JC: Partitioning environmental and genetic contributions to behavioral development. *Am Psychol.* (1989) Okt;44(10):1285-92.
- 14 Möller HJ, Laux G, Deister A: *Psychiatrie und Psychotherapie, Duale Reihe – Thieme, Stuttgart* (2005) S.83
- 15 Hamilton M: The Hamilton Depression Rating Scale, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* (1960) 23 56-62
- 16 Sullivan PF et al.: Genetic Epidemiology of Major Depression: Review and Meta-Analysis, *Am J Psychiatry* (2000) 157: 1552–1562
- 17 Smoller F, Finn, C : Family, Twin and Adoption Studies of Bipolar Disorder, *American Journal of Medical Genetics Part C, Semin. Med. Genet.* (2003) 123C:48–58
- 18 Nielsen J, Homma A, Bertelsen A.: Cytogenetic investigation in twins with manic-depressive disorders (22 monozygotic and 27 dizygotic twin pairs), *Br. J Psychiatry*, (1977) Apr;130:352-4
- 19 Saunders EH, Scott LJ, McInnis MG, Burmeister M.. Familiality and Diagnostic Patterns of Subphenotypes in the National Institutes of Mental Health Bipolar Sample, *Am J Med Genet Part B* (2007) 147B 1: 18-26
- 20 Stöber G et al.: Susceptibility for schizophrenia is not influenced by a functional insertion/deletion variant in the promoter of the serotonin transporter gene, *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* (1998) 248 : 82–86
- 21 Kendler KS et al.: The Roscommon Family Study: I. Methods, diagnosis of probands and risk of schizophrenia in relatives. *Arch Gen Psychiatry* (1993) 50:527-540
- 22 Kendler KS: The genetic epidemiology of psychiatric disorders: a current perspective, *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* (1997) 32:5 11
- 23 Kendler KS et al.: Illicit Psychoactive Substance Use, Heavy Use, Abuse, And Dependence in a US Population-Based Sample of Male Twins, *Arch Gen Psychiatry* (2000) 57: 261-269

- 24 Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban und Fischer, 9.Auflage, München (2005), S. 213 ff
- 25 Lesch KP, Balling U, Gross J, Strauss K, Wolozin BL, Murphy DL, Riederer P. : Organization of the human serotonin transporter gene. *J Neural Transm Gen Sect.* (1994) 95(2):157-62
- 26 Lesch, Klaus-Peter, Dietmar Bengel, Armin Heils, Sue Z. Sabol, Benjamin D. Greenberg, Susanne Petri, Jonathan Benjamin, Clemens R. Muller, Dean Hamer, and Dennis L. Murphy: Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the Serotonin transporter gene regulatory region. *Science* (1996) 274.n5292 : 1527(5)
- 27 Ramamoorthy S, Bauman AL, Moore KR, Han H, Yang-Feng T, Chang AS, Ganapathy V, Blakely RD: Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1993) 90(6):2542-6
- 28 Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP.: Allelic Variation of Human Serotonin Transporter Gene Expression. *Journal of Neurochemistry* (1996) 66 (6) , 2621–2624
- 29 Little KY, McLaughlin DP, Zhang L, Livermore CS, Dalack GW, McFinton PR, DelProposto ZS, Hill E, Cassin BJ, Watson SJ, Cook EH.: Cocaine, Ethanol, and Genotype Effects on Human Midbrain Serotonin Transporter Binding Sites and mRNA Levels, *Am J Psychiatry.* (1998) 155(2):207-13.
- 30 Heinz A, Jones DW, Mazzanti C, Goldman D, Ragan P, Hommer D, Linnoila M, Weinberger DR.: A relationship between serotonin transporter genotype and in vivo protein expression and alcohol neurotoxicity. *Biol Psychiatry.* (2000)1;47(7):643-9.
- 31 Lim JE, Papp A, Pinsonneault J, Sadée W, Saffen D.: Allelic expression of serotonin transporter (SERT) mRNA in human pons: lack of correlation with the polymorphism SERTLPR. *Mol Psychiatry.* (2006) 11(7):649-62.
- 32 Shioe K, Ichimiya T, Suhara T, Takano A, Sudo Y, Yasuno F, Hirano M, Shinohara M, Kagami M, Okubo Y, Nankai M, Kanba S.. No association between

- genotype of the promoter region of serotonin transporter gene and serotonin transporter binding in human brain measured by PET. *Synapse* (2003) 48: 184-188.
- 33 van Dyck CH, Malison RT, Staley JK, Jacobsen LK, Seibyl JP, Laruelle M, Baldwin RM, Innis RB, Gelernter J. Central serotonin transporter availability measured with [¹²³I]{beta}-CIT SPECT in relation to serotonin transporter genotype. *Am J Psychiatry* (2004). 161(3): 525-531
- 34 Gelernter J, Kranzler H, Cubells JF: Serotonin transporter protein (SLC6A4) Allele and haplotype frequencies and linkage disequilibria in African- and European-American and Japanese populations and in alcohol-dependent subjects *Hum Genet.* (1997);101(2):243-6
- 35 Nakamura M, Ueno S, Sano A, Tanabe H.: The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. *Mol Psychiatry.* (2000) 5(1):32-8.
- 36 Nakamura T, Muramatsu T, Ono Y, Matsushita S, Higuchi S, Mizushima H, Yoshimura K, Kanba S, Asai M.: Serotonin transporter gene regulatory region polymorphism and anxiety-related traits in the Japanese. *Am J Med Genet.* 1997 Sep 19;74(5):544-5.
- 37 Gelernter J, Kranzler H, Coccaro EF, Siever LJ, New AS. Serotonin transporter protein gene polymorphism and personality measures in African American and European American subjects. *Am J Psychiatry.* (1998) 155(10):1332-8.
- 38 Greenberg BD, Li Q, Lucas FR, Hu S, Sirota LA, Benjamin J, Lesch KP, Hamer D, Murphy DL. Association between the serotonin transporter promoter polymorphism and personality traits in a primarily female population sample. *Am J Med Genet.* (2000) 3;96(2):202-16.
- 39 Sen S, Burmeister M, Ghosh D. Meta-analysis of the association between a serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) and anxiety-related personality traits. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* (2004) 127(1):85-9.
- 40 Schinka JA, Busch RM, Robichaux-Keene N: A meta-analysis of the association between the serotonin transporter gene polymorphism (5-HTTLPR) and trait anxiety. *Mol Psychiatry.* (2004) 9(2):197-202.

- 41 Munafò MR, Clark T, Flint J: Does measurement instrument moderate the association between the serotonin transporter gene and anxiety-related personality traits? A meta-analysis. *Mol Psychiatry*. (2005) 10(4):415-9. Review.
- 42 Munafò MR, Freimer NB, Ng W, Ophoff R, Veijola J, Miettunen J, Järvelin MR, Taanila A, Flint J: 5-HTTLPR genotype and anxiety-related personality traits: a meta-analysis and new data. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. (2009) 5;150B(2):271-81.
- 43 Collier DA, Stöber G, Li T, Heils A, Catalano M, Di Bella D, Arranz MJ, Murray RM, Vallada HP, Bengel D, Müller CR, Roberts GW, Smeraldi E, Kirov G, Sham P, Lesch KP. A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: possible role in susceptibility to affective disorders. *Mol. Psychiatry* (1996) 1(6):453-60
- 44 Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* (2003) 18;301(5631):386-9.
- 45 Risch N, Herrel, R, Lehner T, Liang KY, Eaves L, Hoh J, Griem A, Kovacs M, Ott J, Merikangas KR: Interaction Between the Serotonin Transporter Gene (5-HTTLPR), Stressful Life Events, and Risk of Depression. *JAMA* (2009) 301, 2462-2471
- 46 Feinn R, Nellissery M, Kranzler HR. Meta-analysis of the association of a functional serotonin transporter promoter polymorphism with alcohol dependence. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. (2005) 5;133(1):79-84.
- 47 Kaufman J, Yang BZ, Douglas-Palumberi H, Crouse-Artus M, Lipschitz D, Krystal JH, Gelernter J. Genetic and environmental predictors of early alcohol use. *Biol Psychiatry* (2007) 1;61(11):1228-34.
- 48 Bengel D, Greenberg BD, Corá-Locatelli G, Altemus M, Heils A, Li Q, Murphy DL. Association of the serotonin transporter promoter regulatory region polymorphism and obsessive-compulsive disorder. *Mol Psychiatry*. (1999) 4(5):463-6

- 49 Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, Greenberg BD, Xu K, Arnold PD, Richter MA, Kennedy JL, Murphy DL, Goldman D. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet.* (2006) 78(5):815-26.
- 50 Wendland JR, Martin BJ, Kruse MR, Lesch KP, Murphy DL. Simultaneous genotyping of four functional loci of human SLC6A4, with a reappraisal of 5-HTTLPR and rs25531. *Mol Psychiatry.* (2006) 11(3):224-6.
- 51 Kraft JB, Slager SL, McGrath PJ, Hamilton SP. Sequence analysis of the serotonin transporter and associations with antidepressant response. *Biol Psychiatry.* (2005) 58(5):374-81
- 52 Feighner JP, Robins E, Guze SB, Woodruff RA Jr, Winokur G, Munoz R. Diagnostic criteria for use in psychiatric research. *Arch Gen Psychiatry.* (1972) 26(1):57-63.
- 53 Nurnberger JI Jr, Blehar MC, Kaufmann CA, York-Cooler C, Simpson SG, Harkavy-Friedman J, Severe JB, Malaspina D, Reich T. Diagnostic interview for genetic studies. Rationale, unique features, and training. NIMH Genetics Initiative. *Arch Gen Psychiatry.* (1994) 51(11):849-59
- 54 American Psychiatric Association, 1987 American Psychiatric Association, Diagnostic and statistical manual of mental disorders (Third Edition, Revised), American Psychiatric Press, Washington, DC (1987)
- 55 Spitzer R. L., Endicott, J., Robins, E., Research Diagnostic Criteria (RDC) for a Selected Group of Functional Disorders (3rd ed.). New York State Psychiatric Institute, (1978).
- 56 McInnis MG, Dick DM, Willour VL. et al.: Genome-wide scan and conditional analysis in bipolar disorder: evidence for genomic interaction in the National Institute of Mental Health genetics initiative bipolar pedigrees. *Biol Psychiatry.* (2003) 1;54(11):1265-73.
- 57 Zandi PP, Willour VL, Huo Y, Chellis J, Potash JB, MacKinnon DF, Simpson SG, McMahon FJ, Gershon E, Reich T, Foroud T, Nurnberger J Jr, DePaulo JR Jr, McInnis MG; National Institute of Mental Health Genetics Initiative Bipolar Group. Genome scan of a second wave of NIMH genetics initiative bipolar pedigrees:

- chromosomes 2, 11, 13, 14, and X. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* (2003) 15;119(1):69-76.
- 58 Steinmiller CL, Greenwald M.: Factors associated with nonmedical use of prescription opioids among heroin-abusing research volunteers. *Exp Clin Psychopharmacol.* (2007) 15(5):492-500.
- 59 Buselmaier, Tariverdian: *Humangenetik HWE*, Springer, 4. Auflage (2007), S.367 ff
- 60 Sen S, Burmeister M: Hardy-Weinberg analysis of a large set of published association studies reveals genotyping error and a deficit of heterozygotes across multiple loci. *Hum Genomics.* (2008) Sep;3(1):36-52.
- 61 Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR: Merlin—rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees, *Nat Genet* (2002) 30:97-101
- 62 Lewontin R.: The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics* (1964) 49:49–67.
- 63 Hill W, Robertson A: Linkage disequilibrium in finite populations. *Theor. Appl. Genet.* (1968) 38:226–331.
- 64 Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics.* (2005) 21(2):263-5.
- 65 Kaiser R, Tremblay PB, Roots I, Brockmüller J.: Validity of PCR with emphasis on variable number of tandem repeat analysis. *Clin Biochem.* (2002);35(1):49-56.
- 66 Yonan AL, Palmer AA, Gilliam TC.: Hardy-Weinberg disequilibrium identified genotyping error of the serotonin transporter (SLC6A4) promoter polymorphism. *Psychiatr Genet.* (2006) 16(1):31-4.
- 67 Sakai K, Nakamura M, Ueno S, Sano A, Sakai N, Shirai Y, Saito N. The silencer activity of the novel human serotonin transporter linked polymorphic regions. *Neurosci Lett.* (2002) 12;327(1):13-6.
- 68 Costa PT, McCrae RR: Revised NEO Personality Inventory (NEO PI-R) and NEO Five Factor Inventory. (1992). Professional Manual. Odessa, Florida: Psychological Assessment Resources.

- 69 Hu X, Oroszi G, Chun J, Smith TL, Goldman D, Schuckit MA: An expanded evaluation of the relationship of four alleles to the level of response to alcohol and the alcoholism risk. *Alcohol Clin Exp Res.* (2005) 29(1):8-16.
- 70 Kramer MF, Coen DM.: Enzymatic amplification of DNA by PCR: standard procedures and optimization. *Curr Protoc Immunol.* (2001) Chapter 10:Unit 10.20.
- 71 Nagamine CM, Chan K, Lau YF, A PCR artifact: generation of heteroduplexes. *Am J Hum Genet.* (1990) 46(1):183-4.
- 72 Bouchard C, Perusse L, Leblanc C.: Using MZ twins in experimental research to test for the presence of a genotype-environment interaction effect, *Acta Genet Med Gamellol* (1990) 39 85-9
- 73 Gottesman I, Gould T: The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions, *Am J Psychiatry* (2003) 160 636-45
- 74 Ball D, Hill L, Freeman B, Eley TC, Strelau J, Riemann R, Spinath FM, Angleitner A, Plomin R.: The serotonin transporter gene and peer-rated neuroticism. *Neuroreport.* (1997) 24;8(5):1301-4.
- 75 Stoltenberg SF, Twitchell GR, Hanna GL, Cook EH, Fitzgerald HE, Zucker RA, Little KY.: Serotonin transporter promoter polymorphism, peripheral indexes of serotonin function, and personality measures in families with alcoholism. *Am J Med Genet.* (2002) 8;114(2):230-4.
- 76 Umekage T, Tochigi M, Marui T et al.: Serotonin transporter-linked promoter region polymorphism and personality traits in a Japanese population. *Neurosci Lett.* (2003) 30;337(1):13-6.
- 77 Hirschhorn JN, Lohmueller K, Byrne E, Hirschhorn K. A comprehensive review of genetic association studies *Genet Med* (2002) 4 45-61
- 78 Ropers HH, New perspectives for the elucidation of genetic disorders. *Am J Hum Genet* (2007) 81: 199-207
- 79 Jonassaint CR, Siegler IC, Barefoot JC, Edwards CL, Williams RB: Low Life Course Socioeconomic Status (SES) is Associated with Negative NEO PI-R Personality Patterns. *Int J Behav Med.* (2009) Dec 12. [Epub ahead of print]
- 80 Spielman RS, Ewens WJ. The TDT and other family-based tests for linkage disequilibrium and association. *Am J Hum Genet.* (1996);59(5):983-9.

- 81 Hanna GL, Himle JA, Curtis GC et al.: Serotonin transporter and seasonal variation in blood serotonin in families with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychopharmacology* (1998) 18:102-111)
- 82 Melke J, Landén M, Baghei F et al.: Serotonin transporter gene polymorphisms are associated with anxiety-related personality traits in women, *Am J Med Genet* (2001) 105 (5): 458-63)
- 83 Sen S, Villafuerte S, Nesse et al.: Serotonin Transporter and GABA (A) $\alpha 6$ Receptor Variants are associated with neuroticism: suggestion of an interaction, *Biologica IPsychiatry* (2004) Volume 55, Issue 3, 244-249
- 84 Ioannidis JP, Ntzani EE, Trikalinos TA, Contopoulos-Ioannidis DG. Replication validity of genetic association studies. *Nature Genetics* (2001) 29(3):306-9.
- 85 Flory JD, Manuck SB, Ferrell RE et al.: Neuroticism is not associated with the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism, (1999) *Mol Psychiatry* 4 93-6
- 86 Malouff JM, Thorsteinsson EB, Rooke SE, Schutte NS. Alcohol involvement and the Five-Factor model of personality: a meta-analysis. *J Drug Educ.* (2007) 37(3):277-94.)
- 87 Hauser J, Leszczyńska A, Samochowiec J, Czerski PM, Ostapowicz A, Chlopocka M, Horodnicki J, Rybakowski JK: Association analysis of the insertion/deletion polymorphism in serotonin transporter gene in patients with affective disorder. *Eur Psychiatry.* (2003) 18(3):129-32.
- 88 Lasky-Su JA, Faraone SV, Glatt SJ, Tsuang MT: Meta-analysis of the association between two polymorphisms in the serotonin transporter gene and affective disorder, *Am. J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* (2005) 133B(1):110-5.)
- 89 Craddock N, Davé S, Greening J: Association studies of bipolar disorder, *Bipolar Disord.* (2001) (6):284-98.
- 90 Grabe HJ, Lange M, Wolff B, Völzke H, et al.: Mental and physical distress is modulated by a polymorphism in the 5-HT transporter gene interacting with social stressors and chronic disease burden. *Mol Psychiatry.* (2005) 10(2):220-4
- 91 Jacobs N, Kenis G, Peeters F, Derom C, Vlietinck R, van Os J: Stress-related negative affectivity and genetically altered serotonin transporter function:

- evidence of synergism in shaping risk of depression. *Arch Gen Psychiatry*. (2006) 63(9):989-96.
- 92 Kendler KS, Kuhn JW, Vittum J, Prescott CA, Riley B.: The interaction of stressful life events and a serotonin transporter polymorphism in the prediction of episodes of major depression: a replication. *Arch Gen Psychiatry*. (2005) 62(5):529-35.
- 93 Gillespie NA, Whitfield JB, Williams B et al.: The relationship between stressful life events, the serotonin transporter (5-HTTLPR) genotype and major depression. *Psychol Med*. (2005) 35(1):101-11
- 94 Surtees PG, Wainwright NW, Willis-Owen SA et al.: Social adversity, the serotonin transporter (5-HTTLPR) polymorphism and major depressive disorder. *Biol Psychiatry* (2006) 1;59(3):224-9.
- 95 Stein MB, Schork NJ, Gelernter J : Gene-by-Environment (Serotonin Transporter and Childhood Maltreatment) Interaction for Anxiety Sensitivity, an Intermediate Phenotype for Anxiety Disorders) *Neuropsychopharmacology*. (2008) 33(2):312-9.
- 96 Hranilovic D, Stefulj J, Schwab S et al.: Serotonin transporter promoter and intron 2 polymorphisms: relationship between allelic variants and gene expression. *Biol Psychiatry*. (2004) 55(11):1090-4.
- 97 Bradley SL, Dodelzon K, Sandhu HK, Philibert RA. Relationship of serotonin transporter gene polymorphisms and haplotypes to mRNA transcription. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. (2005) 136B(1):58-61.
- 98 McLaughlin DP, Little KY, López JF, Watson SJ.: Expression of serotonin transporter mRNA in human brainstem raphe nuclei. *Neuropsychopharmacology*. (1996) (5):523-9.
- 99 Mann JJ, Huang YY, Underwood MD, Kassir SA et al.: A serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) and prefrontal cortical binding in major depression and suicide. *Arch Gen Psychiatry*. (2000) 57(8):729-38.
- 100 Willeit M, Stastny J, Pirker W et al.: No evidence for in vivo regulation of midbrain serotonin transporter availability by serotonin transporter promoter gene polymorphism. *Biol Psychiatr*.(2001) 1;50(1):8-12.

- 101 Shioe K, Ichimiya T, Suhara T: No association between genotype of the promoter region of serotonin transporter gene and serotonin transporter binding in human brain measured by PET. *Synapse*. (2003) 15;48(4):184-8.
- 102 Murphy DL, Lesch KP: Targeting the murine serotonin transporter: insights into human neurobiology. *Nat Rev Neurosci*. (2008) 9(2):85-96.
- 103 Heils A, Mössner R, Lesch KP: The human serotonin transporter gene polymorphism--basic research and clinical implications. *J Neural Transm*. (1997) 104(10):1005-14.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Margit Burmeister, Ann Arbor und Herrn Prof. Dr. Karl Sperling, Berlin.

Frau Prof. Burmeister danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen, die spannenden Diskussionen und Denkanstöße und die hervorragende Betreuung.

Herrn Prof. Sperling danke ich für die Möglichkeit, den experimentellen Teil meiner Dissertation in den USA durchführen zu können und für die kontinuierliche Begleitung meiner Arbeit von Berlin aus.

Frau Elzbieta Sliwerska und Frau Dr. Sandra Villafuerte danke ich für die Hilfestellung im Labor und die vielen konstruktiven Diskussionen. Beim gesamten „Burmeister Lab“ möchte ich mich für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die unvergesslichen Erinnerungen an meine Aufenthalte in Ann Arbor bedanken.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke herzlich für die Förderung meiner Promotion durch ein Auslandsstipendium.

9.2 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9.3 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Kathrin Gels, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Untersuchungen der tri-/quatroallelen Serotonintransporter-Promoter-Region (5-HTTLPR) auf Assoziation mit depressions-relevanten Phänotypen‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“