

---

### **3 MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Vorstellung und Planung der Untersuchung**

Die folgende Untersuchung wurde im Labor für Klinische Psychophysiologie in der Psychiatrischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin durchgeführt. Die Untersuchung wurde der Ethikkommission des Universitätsklinikums Benjamin Franklin der Freien Universität Berlin vorgestellt und von dieser zugelassen. Insgesamt wurden 185 gesunde Personen, die durch Zeitungsannoncen aus der Berliner Bevölkerung rekrutiert wurden, in die Untersuchung einbezogen. Es wurde jedem Probanden eine Aufwandsentschädigung von 50,- DM bezahlt. Die Untersuchung bestand aus einem Termin und alle Probanden unterzeichneten nach einer einführenden Aufklärung über den Untersuchungsablauf eine Einverständniserklärung, damit mit ihrer Einwilligung ihre Daten für die Auswertung verwendet werden konnten.

#### **3.2 Beschreibung der Stichprobe**

##### **3.2.1 Rekrutierung**

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte über Anzeigen in den großen Berliner Tageszeitungen „Die Morgenpost“, „Der Tagesspiegel“ und „Die Berliner Zeitung“. Aus mehreren hundert Bewerbern wurde am Telefon durch ein standardisiertes Interview und unter Berücksichtigung bestimmter Auswahlkriterien eine Auswahl getroffen. Vor Beginn der Untersuchung wurde mit Ausnahme eines Probanden bei allen ein kurzes psychiatrisches Interview (SCID, Structured Clinical Interview für DSM-IV, Sheehan et al., 1998) von einem Facharzt der Klinik durchgeführt um die bereits getroffene Auswahl zu bestätigen. Hierbei wurden vor allem psychiatrische Erkrankungen (Achse-1 oder Achse-2-Störungen) ausgeschlossen. Bei einem Probanden konnte aus organisatorischen Gründen der SCID nicht durchgeführt werden.

##### **3.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien**

- Hörstörungen
- Psychiatrische Erkrankungen: Achse-1- oder Achse-2-Störungen
- Psychiatrische Erkrankungen (Achse-1) bei Verwandten ersten Grades
- Unbehandelte Schilddrüsenfunktionsstörungen
- Krebserkrankungen mit Radiotherapie

- Akute oder chronische Migräne
- Chronische Schmerzzustände
- Neurologische Erkrankungen (Morbus Parkinson, Epilepsie)
- Anamnestisch Kopfverletzungen mit Bewusstseinsverlust, Schädel-Hirn-Trauma
- Medikamentenkonsum: frühere oder aktuelle Einnahme psychotroper Substanzen oder von chronischen Schmerzmedikamenten
- Frühere oder aktuelle Alkoholkrankheit
- Drogenkonsum, gelegentlicher Genuss von Haschisch (1x/ Woche) wurde akzeptiert

### 3.2.3 Präsentation der Stichprobe

Insgesamt wurden 185 gesunde Personen im Alter zwischen 20 und 75 Jahren für die Untersuchung rekrutiert. Davon waren 96 Männer und 89 Frauen. Der Altersdurchschnitt der Probanden lag bei 39.3 Jahren (Standardabweichung  $SD \pm 13.4$ ). Es gab keine signifikanten Altersunterschiede zwischen Frauen (Altersdurchschnitt = 38.8 Jahre  $\pm 3.6$  SD) und Männern (Altersdurchschnitt = 39.6 Jahre  $\pm 13.2$  SD). Bei der Überprüfung der Altersverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest (KSA) ergab sich kein Hinweis auf eine deutliche Abweichung von der Normalverteilung ( $Z = 1.176$ ,  $p = 0.126$ ). Bezüglich des Bildungsniveaus erfolgte eine Unterteilung in Probanden mit Volks- oder Hauptschulabschluss (13%), Probanden mit mittlerer Reife (32%), Probanden mit Abitur (37%) und Probanden mit Fachhochschulabschluss (9%). 1% der Probanden hat andere Institutionen besucht, 8% der Probanden machte keine Angaben. Alle Probanden waren europäischer Herkunft.

### 3.3 Untersuchungsablauf

Die Untersuchung wurde bei fast allen Probanden gemäß nachfolgendem Algorithmus durchgeführt und dauerte etwa 2.5 bis 3 Stunden. Zuerst wurden die Probanden ausführlich über den Inhalt und die Risiken der Untersuchung aufgeklärt und bekamen eine Einverständniserklärung zur Unterschrift vorgelegt. Nach der Aufklärung wurde das bereits erwähnte psychiatrische Interview in Form des Mini-SCID`s durchgeführt. Das Interview dauerte etwa zwanzig Minuten. Danach wurden die Probanden gebeten, einen demographischen Fragebogen, drei Persönlichkeitsinventare (SSS-V, BIS-Version 10, NEO-FFI) und einen Händigkeitstest (Edinburgh-Händigkeitsfragebogen)

auszufüllen. Die Persönlichkeitsfragebögen wurden den Probanden in pseudorandomisierter Reihenfolge vorgelegt und im Rahmen anderer Studien erhoben. Nach dem Ausfüllen der Fragebögen erfolgte die EEG-Ableitung mit Ableitung der AEP. Danach wurde den Probanden ein STAI-Persönlichkeitsinventar vorgelegt. Abschließend erfolgte die Blutentnahme.

### **3.3.1 Ableitung der akustisch evozierten Potentiale**

Zur Ableitung des EEG wurden 32 Elektroden nach dem erweiterten 10/20-System abgeleitet. Den Probanden wurde dem Kopfumfang entsprechend eine passende Elektrodenhaube angezogen. Die Elektroden A1 und A2 wurden zusätzlich auf dem rechten und linken Mastoid angebracht und als Kontrolle für Augenbewegungen wurde EOG 1cm neben dem linken Auge angebracht. Die Cz-Elektrode diente als Referenzelektrode und eine 2cm rostral von der Fz-Elektrode befindliche Elektrode wurde als Erde verwendet. Aufnahmeprogramm war der „BrainVision Datamanager 0.91“. Für die Ableitung wurde der Verstärker „SynAmps Modell 5083“ bei einer Abtastrate von 250Hz verwendet. Vor dem Beginn der Ableitung wurden die Impedanz aller Elektroden überprüft und unter 5k $\Omega$  gehalten.

Vor der Ableitung der AEP wurde ein zehn Minuten dauerndes EEG unter Ruhebedingungen abgeleitet, währenddessen die Probanden auch einschlafen durften. Im Anschluss daran erfolgte die Ableitung der AEP bei künstlichem Licht und mit geöffneten Augen. Als Stimulusmaterial wurden Sinustöne in einer Frequenz von 1000Hz verwendet. Der lauteste Ton konnte auf Grund der vorhandenen Hardwareausstattung nicht als reiner Sinuston abgespielt werden. Die Töne wurden den Probanden über einen Kopfhörer präsentiert. Sie hatten eine Länge von 40ms (inklusive 10ms Anstiegs- und Fallzeit). Die Intensitäten der fünf Töne betragen 79dB, 87.5dB, 96dB, 104.5dB und 113dB (durch einen PC-Stimulator mit Creative Labs Soundblaster 16). Für jede Stimulusintensität wurden bei der Untersuchung 100 Töne abgespielt. Insgesamt wurden somit 500 Töne bei einem Interstimulusintervall (Intervall zwischen zwei Tönen) von 1800ms bis 2240ms in pseudorandomisierter Reihenfolge präsentiert. Ohne Unterbrechung dauerte die Ableitung der AEP siebzehn Minuten. Vor Darbietung des Stimulusmaterials wurden die Probanden instruiert, den Tönen keine besondere Beachtung zu schenken und möglichst wenig mit den Augen zu blinzeln, um okuläre Artefakte in der Ableitung zu vermeiden. Um Muskelartefakte zu vermeiden, wurden sie

außerdem angewiesen, sich möglichst nicht zu bewegen. Während der Ableitung saßen die Probanden in halb liegender Haltung in einem bequemen Sessel mit Armlehnen und betrachteten ein Poster mit einem Sonnenblumenmotiv, das an der gegenüberliegenden Wand angebracht war. Das EEG-Gerät inklusive Steuer-PC befand sich im Nebenraum. Die ableitende Person überwachte die Vigilanz der Probanden während der zehnminütigen Ableitung des Ruhe-EEG's und intervenierte im Falle von im EEG sichtbaren Veränderungen, die auf Schläfrigkeit hindeuteten. Im Anschluss an die Ableitung der AEP erfolgte noch die Ableitung der P300 im Rahmen einer anderen Studie.

### **3.3.2 Berechnung der Lautstärkeabhängigkeit**

Die EEG-Daten wurden während der Aufnahme mit einer Abtastrate von 250Hz und einem analogen Bandpassfilter (0.16 – 50Hz) gesammelt. Mit dem „BrainVision Analyzer 1.0.2“ wurden die aufgezeichneten EEG-Rohdaten zunächst auf Mittelreferenz umgerechnet und anschließend digital gefiltert (Tiefpassfilter 20Hz und Hochpassfilter 1Hz, 24dB/ Oktave Roll-off). Für den Auswertebereich der einzelnen Segmente wurde ein Zeitintervall von 350ms Prästimulus bis 800ms Poststimulus festgelegt. Nach diesem Segmentieren der Daten wurden, um kurzzeitige Gewöhnungseffekte aus der Analyse auszuschließen, die ersten fünf Reizantworten entfernt. Danach folgte eine „baseline correction“ für das Prästimulusintervall von -350ms bis 0ms. Zur Artefaktbereinigung wurden die Segmente mit okulären, muskulären und Bewegungsartefakten aus der Auswertung entfernt. Ein Segment wurde als Artefakt markiert, wenn bei einer der 32 Elektroden eine Aktivität (Amplitudenauslenkung) größer als  $\pm 100\mu\text{V}$  gemessen wurde.

Die gefilterten und artefaktbereinigten Segmente wurden anschließend getrennt und für jede Lautstärkenintensität und Elektrode gemittelt. Als Kriterium für die Mindestanzahl artefaktfreier Segmente wurde zuvor die Anzahl 30 festgelegt. Es wurden nur Ableitungen verwendet, die das Kriterium 30 artefaktfreier Segmente für alle fünf Lautstärken erfüllen konnten. Alle Ableitungen erfüllten diese Bedingung, so dass kein Proband aus diesem Grund aus der Studie ausgeschlossen werden musste.

Dann wurden für jede Lautstärke die N1- und P2-Peaks halbautomatisch festgelegt. Die N1 wurde als der negativste Punkt im Poststimulusintervall zwischen 50-150ms definiert, die P2 entsprechend als höchster Punkt im Poststimulusintervall zwischen 100 und 250ms an der Cz-Elektrode. Die LA wurde als lineare Regressionsgerade durch die

Amplituden zu den verschiedenen Stimulusintensitäten berechnet. Dies wurde für jeden einzelnen Probanden in der Annahme ausgeführt, dass bei jedem Probanden eine annähernd lineare Beziehung zwischen der Reizintensität und der Höhe der Amplitude besteht. Die Steigung der berechneten Regressionsgeraden dient als Maß für den Zusammenhang zwischen Stimulusintensität und den evozierten Potentialen, wobei die Stimulusintensität als unabhängige und die N1/P2-Komponente als abhängige Variable dargestellt wurde. Die LA wird in  $\mu\text{V}/ 8,5\text{dB SPL}$  (Sound Pressure Level) ausgedrückt und wurde bei der Cz-Elektrode berechnet.

### **3.4 Genotypisierung**

Jedem Probanden wurden 20ml Vollblut entnommen, die zur Extraktion der DNA und der Bestimmung des 5-HTTLPR in das Labor der Klinischen Neurobiologie der Freien Universität Berlin an Herrn Prof. Dr. Rommelspacher weitergegeben wurden.

#### **3.4.1 Extraktion der DNA aus Vollblut**

Die DNA wurde aus Vollblut nach folgendem Arbeitsschema extrahiert:

- (1) Erylyse: 20ml EDTA-Blut wurden mit 30ml Erylyse-Puffer gemischt, 4 Minuten stengelassen und dann bei Raumtemperatur 5 Minuten mit 1300G (4400 Umdrehungen/ min.) zentrifugiert (Varifuge). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und verworfen.
- (2) Zell-Lyse: Das Pellet wurde mit 3ml Kernlyse –Puffer gemischt.
- (3) Deproteinisierung: Zugabe von 0.75ml Natriumperchlorat (5mmol/ l) und etwa 10-15mal per Hand umgeschüttelt.
- (4) Extraktion: Zugabe von 4ml eiskaltem Chloroform ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) und 20mal per Hand umgeschüttelt. Danach wurde 5 Minuten bei 1300G und Raumtemperatur in der Varifuge zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde ohne Interphase in ein neues Röhrchen abpipettiert.
- (5) Präzipitieren der DNA: Der wässrige Überstand wurde mit etwa gleichem Volumen eiskalten Isopropanols ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) gemischt und umgeschüttelt.
- (6) Pelletierung der DNA: Der DNA-Faden wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bei 10000G 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert und 1-2mal mit 800 $\mu\text{l}$  Ethanol gewaschen und danach noch einmal 3 Minuten bei 10000G (13000 Umdrehungen/ min.) zentrifugiert. Das Ethanol

wurde dekantiert und das DNA-Pellet ca. 20 Minuten im Heizblock bei 37°C getrocknet.

(7) Lösen der DNA: Das Pellet wurde je nach Größe in 1 bis 1.5ml TE-Puffer (pH = 8.0) über Nacht im Heizblock gelöst.

(8) Photometrische Messung der Konzentration: Die photometrische Messung erfolgte bei 260, 280 und 320nm.

Lösungen für DNA-Extraktion:

Erylyse-Puffer: 109.5g Sachcharose, 5ml MgCl<sub>2</sub>, 10ml Triton X 100, 10ml Tris-HCl (1mmol/l; pH = 8)

Kernlyse-Puffer: 40ml Tris-HCl (1mmol/l; pH = 8), 12ml Na<sub>2</sub>EDTA (0.5mmol/l), 15ml NaCl (1mmol/l)

Natriumperchlorat: 35.21 NaClO<sub>4</sub> ad 50ml Sterilfiltration

TE-Puffer: 1.21g Tris-Base, 0.37g Na<sub>2</sub>EDTA in deionisiertem Wasser gelöst, mit Salzsäure auf pH = 8.0 eingestellt und auf 1000ml aufgefüllt und autoklaviert.

### 3.4.2 Bestimmung des 5-HTT Polymorphismus durch PCR

Der zweiallelige Polymorphismus in der 5'-Regulatorregion des 5-HTT-Gens wurde durch PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) mit oligonucleotiden Primern DeIF (5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3') und DeIR (5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3') amplifiziert. Die PCR-Reaktionen beinhalteten 100ng genomische DNA, 10pmol jedes Primers NH<sub>4</sub>-Puffer, 200µmol dATP, dTTP, dCTP und dGTP und 1 Einheit Taq-Polymerase (Eppendorf, bezogen von Invitex) in einem Volumen von 21µl. Die Bedingungen der PCR-Zyklen waren folgende: die initiale Denaturierung für 3 Minuten bei 98°C; weitere 35 Zyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 1 Minute „touch down annealing“ bei 63°C, 1 Minute Elongation bei 72°C; die endgültige Elongation für 10 Minuten bei 72°C. Die PCR wurde in einem Perkin-Elmer 9600 Cycler durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte wurden in einem 2.5% Agarosegel in 1mal TBE (Tris + Borat + EDTA) mit 0.05mg/ml Ethidiumbromid bei 60 Volt einlaufen gelassen (10 Minuten) und bei 150 Volt aufgetrennt und danach mit Polaroid fotografiert. Die Länge der Fragmente wurde durch den Vergleich mit internationalen molekularen Längenstandards bestimmt (100 Basenpaar Leiter). Das Fragment des zweialleligen Polymorphismus in der 5'-Regulatorregion des 5-HTT-Gens mit 484bp wurde als kurzes Allel (s) bestimmt und das 528bp als langes Allel (l).

---

### 3.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm SPSS 10.0 für Windows durchgeführt. Es erfolgte zunächst die deskriptive Statistik der Daten und dann die statistische Prüfung der Hypothese mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA) und der darauffolgenden Post-Hoc-Analyse (Scheffe´-Prozedur). Mittelwerte wurden jeweils mit Standardabweichung (Mittelwerte  $\pm$  SD) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt. Beim Kolmogorov-Smirnov-Test zur Überprüfung der Normalverteilung eines Merkmals wurde das Signifikanzniveau wegen der Größe der Stichprobe auf  $p < 0,01$  festgelegt. Zur Prüfung der Frage, ob das Alter Einfluss auf die LA hat, wurde ein Student-T-Test verwendet. Zur Überprüfung einfacher Zusammenhänge wurde die Korrelation berechnet.