

**Aus der
Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Herr Prof. Dr. med. H.-J. Möller

**Identifikation neuer Kandidatengene für suizidales
Verhalten durch Microarrayversuche**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Andreas Thalmeier

aus
Kempten

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.Doz. Dr. D. Rujescu

Mitberichterstatter: Prof. Dr. T. Bronisch

Priv.Doz. Dr. E.M. Grasbon-Frodl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Dan Rujescu

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2007

„Derjenige, der sich heute in einem Anfall von Melancholie tötet, würde sich gewünscht haben zu leben, wenn er nur eine Woche gewartet hätte.“

Voltaire

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
1.1. Suizidales Verhalten.....	4
1.1.1. Definition	4
1.1.2. Epidemiologie.....	5
1.1.3. Risikofaktoren	9
1.2. Neurobiologie und Genetik des Suizids.....	12
1.2.1. Neurobiologie	12
1.2.2. Neuroanatomie.....	13
1.2.3. Klassische Genetik.....	14
1.2.4. Populationsgenetik.....	17
1.2.5. Assoziationsstudien	18
1.2.6. Kopplungsstudien.....	20
1.3. Genexpressionsanalysen	21
1.3.1. <i>Post mortem</i> Studien.....	21
1.3.2. Technik der Microarrays.....	23
1.3.3. Möglichkeiten der Microarrays	28
1.3.4. Publierte Microarraystudien zu suizidalem Verhalten	29
1.3.5. Genexpressionsstudien zu suizidalem Verhalten.....	31
1.4. Ziel der Arbeit.....	34
2. Material und Methoden.....	35
2.1. Material	35
2.1.1. Studienkollektiv	35
2.1.2. <i>Post mortem</i> Gewebe	35
2.1.3. Reagenzien.....	36
2.1.4. Verbrauchsmaterial	37
2.1.5. Oligonucleotide	37
2.1.6. Geräte	39
2.1.7. Software.....	39
2.2. Methoden	40
2.2.1. Messung des pH-Werts.....	40
2.2.2. Aufbereitung der Nukleinsäuren.....	40
2.2.3. Microarrayexperimente	43
2.2.4. Quantitative RT-PCR	48

2.3.	Auswertung der Daten.....	50
2.3.1.	Normalisierung der Arraydaten	50
2.3.2.	Differentielle Genexpressionsanalyse	51
2.3.3.	Qualitätskontrolle der Microarrays.....	53
2.3.4.	Data Mining.....	54
2.3.5.	Auswertung der quantitativen RT-PCR	55
3.	Ergebnisse	57
3.1.	Studienkollektiv	57
3.1.1.	Demographische Daten	57
3.1.2.	Gruppenvergleich.....	58
3.1.3.	RNA-Extraktion und Gehaltbestimmung	58
3.1.4.	Qualität und Integrität der RNA	59
3.2.	Ergebnisse der Microarrayversuche.....	60
3.2.1.	Replikationsversuche	60
3.2.2.	Auswahlkriterien.....	62
3.2.3.	Mittelwertsvergleich durch die AnEx Software	63
3.2.4.	Gene Expression Analysis Suite	67
3.2.5.	Vergleich der AnEx und der GEPAS-Analyse	68
3.2.6.	Klassifizierung nach den Gene Ontology Kategorien	68
3.2.7.	Gene der signifikanten Kategorien	69
3.2.8.	Zytogenetische Lokalisation der Transkripte	72
3.3.	Ergebnisse der Validierungsversuche	73
3.3.1.	Expressionsstabilität der internen Kontrollgene	73
3.3.2.	Ergebnisse der Validierungsversuche.....	74
3.3.3.	Zusammenfassung der Validierungsversuche	80
4.	Diskussion	82
4.1.	Microarrayexperimente und Validierungsversuche.....	82
4.1.1.	Probandekollektiv.....	82
4.1.2.	RNA-Qualität.....	84
4.1.3.	Microarrays	85
4.1.4.	Normalisierung, Daten-Filterung und Statistik.....	86
4.1.5.	Quantitative RT-PCR	87
4.2.	Interpretation der Ergebnisse	88
4.2.1.	t-Test und GEPAS-Auswertung.....	89

4.2.2.	Ergebnisse der Validierungsversuche	89
4.2.3.	Signifikant differentiell exprimierte Gene	90
4.2.4.	Signifikante biologische Kategorien	92
4.3.	Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur	92
4.3.1.	Vergleich mit publizierten Microarraystudien.....	92
4.3.2.	Vergleich mit Genexpressionsstudien	95
4.3.3.	Verknüpfung der Resultate mit Kopplungsstudien	96
4.4.	Ausblick.....	97
5.	Zusammenfassung.....	99
6.	Literaturverzeichnis	100
7.	Anhang.....	124
7.1.	Danksagung	124
7.2.	Abkürzungsverzeichnis	125
7.3.	Publikationen.....	126
7.4.	Lebenslauf.....	127

1. Einleitung

1.1. Suizidales Verhalten

1.1.1. Definition

Der englische Arzt und Philosoph Sir Thomas Browne verwendete im Jahr 1642 als erster die lateinische Form des Wortes Suizid in seiner 'Religio medici', um zwischen dem Mord an einer anderen Person und der Selbsttötung zu unterscheiden (Minois, 1999). Der Begriff Suizid setzt sich zusammen aus den lateinischen Worten *sui* (sich) und *caedere* (töten, erschlagen, erlegen). In der folgenden Zeit verbreitete sich der neu geprägte Begriff von England über Frankreich in weitere Teile Europas und ist heute allgemein gebräuchlich.

Der weiter gefasste Term suizidales Verhalten umfasst im Gegensatz dazu verschiedene Verhaltensweisen und reicht von Suizidgedanken, der Entwicklung von Suizidplänen, über Suizidversuche bis hin zum vollendeten Suizid. Suizidale Gedanken können allgemeiner Natur sein und aus einem Nachdenken über den eigenen Tod oder Todeswünschen bestehen; sie können aber auch die konkrete Vorstellungen einer Handlung beinhalten, wie die Person sich selbst das Leben nehmen könnte. Die weit verbreitete Definition des Begriffs 'Suizidversuch' stammt von einer Arbeitsgruppe der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und wurde zuerst auf Englisch publiziert und als 'Parasuizid' bezeichnet (Platt et al, 1992). Dabei wird als Suizidversuch eine Handlung mit nichttödlichem Ausgang bezeichnet, die ohne Intervention von dritter Seite eine Selbstschädigung bewirken würde. In dieser Definition sind auch Suizidversuche mit appellativem oder manipulativem Charakter eingeschlossen, bei denen vor allem der Wunsch nach einer Zäsur oder einer Veränderung der Situation zum Ausdruck kommt (Antretter et al, 2002). Als Suizid wird schließlich die absichtliche Selbstschädigung mit Todesfolge bezeichnet (Kidd, 2003). Insgesamt existiert im Bereich der psychiatrischen Forschung auf diesem Gebiet aber bis heute keine allgemein gültige und anerkannte Nomenklatur. Ein aktueller Vorschlag dafür stützt sich auf die Kombination dreier entscheidender Komponenten suizidalen Verhaltens: Todesgedanken, Handlung und Tod als Ergebnis der Handlung (Marusic, 2004). Bei einem vollendeten Suizid sind dabei im Gegensatz zu Unfällen oder Suizidversuchen alle 3 Komponenten vorhanden. Dieses Modell einer Nomenklatur ist besonders nützlich, weil es die Möglichkeit

bietet, klar zwischen vollendetem Suizid, Suizidversuchen, Suizidgedanken und anderen Verhaltensweisen ohne Todeswunsch zu unterscheiden.

Tabelle 1: Einteilung selbstzerstörender Verhaltensweisen

	Todesgedanken	Handlung	Tod
Vollendeter Suizid	ja	ja	ja
Suizidversuch	ja	ja	nein
Suizidgedanken	ja	nein	nein
Tod ohne Suizid	nein	nein	ja
Absichtliche Selbstverletzung	nein	ja	nein
Absichtliche Selbstverletzung mit Todesfolge	nein	ja	ja
Euthanasie	ja	nein	ja
Suizidfreier Zustand	nein	nein	nein

Einteilung nach Marusic, 2004

1.1.2. Epidemiologie

1.1.2.1. Suizide

Nach Schätzungen der WHO starben im Jahr 2000 weltweit insgesamt 815.000 Menschen durch Suizid, was einer globalen Suizidrate von 14 Personen pro 100.000 Einwohner pro Jahr entspricht (De Leo et al, 2002).

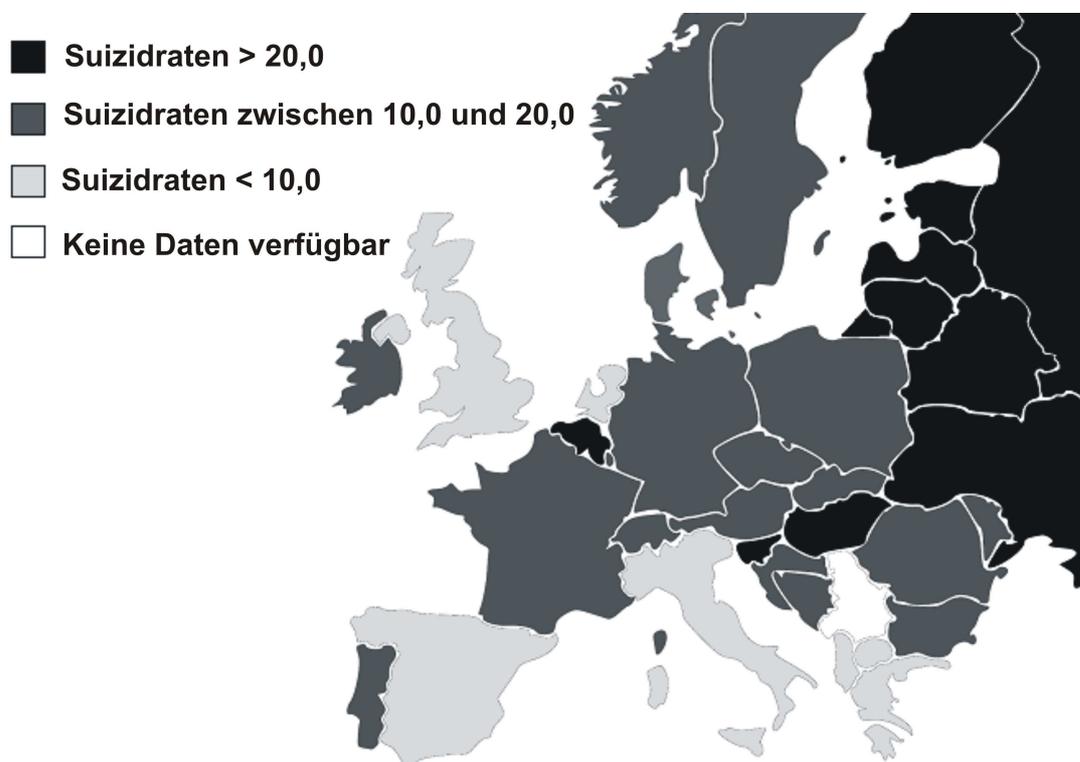


Abbildung 1: Suizidraten in Europa

Suizidraten in Europa pro 100.000 Einwohnern pro Jahr. Quelle: Weltgesundheitsorganisation

Die Suizidraten weisen dabei beträchtliche Unterschiede auf, und reichen von weniger als 10/100.000 Einwohner in Ländern wie Griechenland und Italien bis hin zu mehr als 20/100.000 Einwohner in vielen osteuropäischen Ländern (siehe Abbildung 1). Die Suizidrate für Deutschland lag 2004 bei 13/100.000 Einwohner, und damit im internationalen Mittelfeld.

Die Anzahl der Suizide in Deutschland sank nach Angaben des Statistischen Bundesamtes in den vergangenen 20 Jahren um fast 40 % von 17.571 im Jahr 1985 (BRD und DDR zusammen) bis auf 10.733 im Jahr 2004. Das Ausmaß dieser Zahlen wird durch einen Vergleich mit den Verkehrsunfällen besser ersichtlich. Im Straßenverkehr starben im Jahr 2004 nach offiziellen Angaben 5.927 Personen. Damit war die Zahl der Suizidopfer wie auch schon in den Jahren davor wiederum deutlich höher als die Zahl der Verkehrstoten. Von den 10.733 Personen, die sich im Jahr 2004 selbst das Leben nahmen, waren 7.939 Männer und 2.794 Frauen; damit liegt das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Suizidopfern 2004 bei 2,8 zu 1.

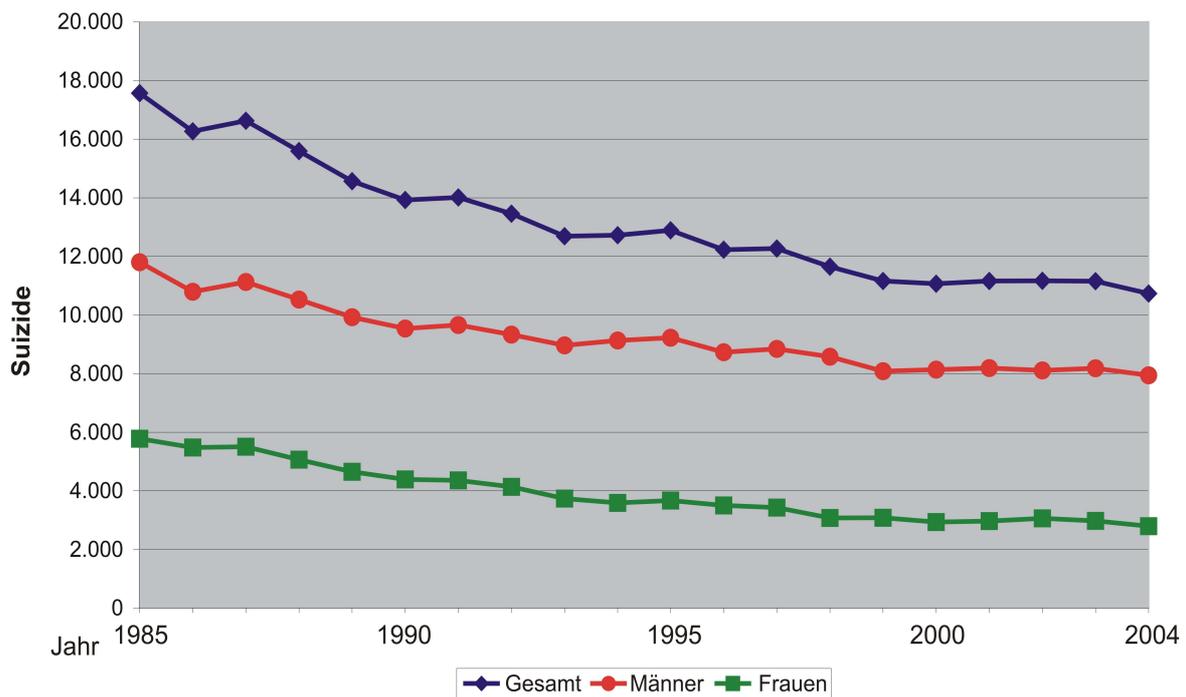


Abbildung 2: Suizidstatistik für Gesamtdeutschland 1985 bis 2004

Quelle: Statistisches Bundesamt

Insgesamt dürften die offiziellen Statistiken die tatsächliche Anzahl der Suizide deutlich unterschätzen, da viele Suizide nicht als solche erkannt werden und in der Todesursachenstatistik in den Rubriken 'Verkehrsunfälle', 'Drogentote' oder

‘unklare Todesursachen’ geführt werden (Langlois und Morrison, 2002). Neben diesen nicht erkannten Suiziden wird darüber hinaus in manchen Fällen durch Dritte absichtlich eine natürliche Todesursache genannt. Dies geschieht oft durch Familienangehörige, die eine Stigmatisierung des Verstorbenen und der gesamten Familie vermeiden wollen; ebenso können versicherungsrechtliche oder religiöse Gründe eine Rolle spielen (De Leo et al, 2002). Eine englische Studie ermittelte, dass die offiziellen Suizidstatistiken für manche der untersuchten Regionen um bis zu 40% zu niedrig sind (Cooper und Milroy, 1995). Auch die Schätzungen der Suizidraten anderer Länder bergen eine große Unsicherheit. Die publizierten Suizidraten für China schwanken zum Beispiel zwischen 18,3 und 30,0 pro 100.000 Einwohner und Jahr (Ji et al, 2001).

1.1.2.2. Suizidversuche

Bisher gibt es nur aus wenigen Ländern verlässliche Angaben zur Häufigkeit von Suizidversuchen, da diese nur schwer erfasst werden können. Nur eine Minderheit der betroffenen Personen sucht nach einem Suizidversuch einen Arzt oder ein Krankenhaus auf, um sich medizinisch oder psychologisch betreuen zu lassen, während die Mehrheit aller Suizidversuche unerkannt bleibt (Diekstra und Garnefski, 1995; Kjoller und Helweg-Larsen, 2000). Die Angabe der Suizidversuchsraten erfolgt in der vorliegenden Arbeit gemäß der allgemeinen Definition immer in Suizidversuchen pro Jahr pro 100.000 Einwohner. Eine große, multizentrische Studie in dreizehn europäischen Ländern ermittelte durchschnittliche Suizidversuchsraten von 136 für die männliche Bevölkerung und 186 für Frauen (Schmidtke et al, 1996). Anders als bei den Suiziden lagen die Raten der Suizidversuche bei den Frauen in allen Zentren mit Ausnahme von Helsinki höher als bei den Männern. Deutschland lag bei den ermittelten Suizidversuchsraten im europäischen Mittelfeld, und für den Großraum Würzburg wurden Raten von 66 für Männer und 102 für Frauen ermittelt (Schmidtke et al, 1996). Die höchsten Raten für Suizidversuche wurden dabei in den jüngeren Altersgruppen beobachtet, während die niedrigsten Raten bei den Personen über 55 Jahre zu finden waren. Bei den verwendeten Methoden überwogen die nonviolente Methoden, vor allem Intoxikationen. Diese Beobachtungen stehen ebenfalls in Gegensatz zu den Suiziden, bei welchen die höchsten Raten bei den ältesten Personen zu finden sind. Darüber hinaus überwiegen bei den Suiziden violente Methoden wie Erhängen oder stumpfe Gewalt. Neuere Schätzungen für das Jahr 1996 gehen von

Suizidversuchsraten von 147 bei Frauen und 122 bei Männern aus (Schmidtke et al, 1998). Insgesamt gehen diese Berechnungen von mehr als 110.000 Suizidversuchen für das Jahr 1996 in Deutschland aus.

1.1.2.3. Suizidmethoden

Bei den Suizidmethoden wird zwischen violenten oder harten Methoden wie Erschießen, Erhängen oder dem Sturz aus großer Höhe und nonviolenten oder weichen Methoden wie Intoxikationen mit Medikamenten und anderen Substanzen unterschieden (Asberg et al, 1976). Die Wahl der Suizidmethode wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, wie dem Geschlecht der Person, einer möglichen psychiatrischen Erkrankung, aber auch von der Verfügbarkeit der Methode. In den Vereinigten Staaten von Amerika, wo ein großer Teil der Bevölkerung Zugang zu Feuerwaffen hat, ist Suizid durch Erschießen die häufigste Methode (Shenassa et al, 2003). Bei den Suizidversuchen dominieren hingegen eindeutig die Intoxikationen, die eine viel geringere Letalität aufweisen als violente Methoden (Shenassa et al, 2003). So liegt die Letalität in dieser Untersuchung bei 96,5 % im Falle der Verwendung von Feuerwaffen, 90,4 % bei Erhängen oder Ersticken, 74,0 % bei der Anwendung stumpfer Gewalt und bei nur 6,5 % bei Vergiftungen. Durch die Einschränkung der Verfügbarkeit der Suizidmethoden ergibt sich dadurch ein universeller und wirkungsvoller Ansatz zur Suizidprävention. Erfolgreiche Beispiele dieses Ansatzes sind die Detoxifikation von Haushaltsgas (Lester, 1990), die Kontrolle des Verkaufs von Pestiziden (Ohberg et al, 1995), die bauliche Absicherung von Brücken und Gebäuden (Beautrais, 2001), strengere Waffengesetze (Bridges und Kunselman, 2004) oder die Einschränkung der Verwendung von Barbituraten (Carlsten et al, 1996).

In Deutschland ist im Gegensatz zu den USA der Suizid durch Erhängen, Strangulation oder Ersticken die mit Abstand häufigste Suizidmethode bei beiden Geschlechtern, gefolgt von Vergiftungen und dem Suizid durch stumpfe Gewalt (Wiesner, 2004). Zwischen den Geschlechtern besteht dabei ein deutlicher Unterschied, was die Wahl der Suizidmethode angeht. Frauen bevorzugen im Vergleich zu Männern eher weiche Methoden wie Vergiftungen (25,7 % versus 12,3 %), während der Gebrauch von Feuerwaffen und Explosivstoffen bei Frauen eine untergeordnete Rolle spielt (1,2 % versus 7,6 %; Wiesner, 2004).

1.1.3. Risikofaktoren

In epidemiologischen und psychologischen Studien wurden konstant einige Hauptrisikofaktoren für suizidales Verhalten identifiziert. Die Prädiktion von Suiziden anhand der Risikofaktoren ist aber aufgrund der geringen Basisraten und einem hohen Prozentsatz an falsch-positiven Vorhersagen nach wie vor nur sehr eingeschränkt möglich. Trotzdem ist die Kenntnis von typischen Risikofaktoren für suizidales Verhalten wichtig, um Hochrisikopatienten rechtzeitig zu identifizieren und eventuell Gegenmaßnahmen ergreifen zu können.

1.1.3.1. Soziodemografische Faktoren

Der vielleicht wichtigste Faktor im persönlichen sozialen Umfeld ist die Familie, die soziale, emotionale und finanzielle Unterstützung bieten kann. Verheiratete Personen haben allgemein die niedrigsten Suizidraten im Vergleich zu geschiedenen oder verwitweten Personen, deren Raten zwei bis dreifach höher liegen (Kreitman, 1988; Maris, 1997). Aber nicht nur familiäre Bindungen besitzen einen protektiven Effekt, sondern auch allgemeine soziale Kontakte zu Freunden, Arbeitskollegen oder Nachbarn. So haben mehrere Studien gezeigt, dass Suizidenten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung durchschnittlich weniger solche Bindungen besitzen (Heikkinen et al, 1995; Kreitman, 1988; Maris, 1997).

Arbeitslosigkeit ist ebenfalls ein Risikofaktor für Suizidversuche und Suizide, und arbeitslose Personen sterben zwei bis drei mal häufiger durch Suizid als Personen mit fester Anstellung (Kposowa, 2001; Blakely et al, 2003).

Zu den Gruppen mit einem erhöhten Suizidrisiko gehören außerdem Personen in Haft (Fazel et al, 2005), Personen mit Konflikten der sexuellen Identität (Fergusson et al, 1999) oder Migranten, die nach dem Ortswechsel im Vergleich zu ihrer Heimat oft weniger soziale Unterstützung erfahren (Ponizovsky et al, 1999).

1.1.3.2. Persönlichkeitsmerkmale

Studien, die das Verhältnis von Persönlichkeitsmerkmalen und suizidalem Verhalten untersuchen, werden meist für Suizidversuche durchgeführt, da die Erhebung von entsprechenden Daten bei Suizidenten nur longitudinal und durch methodisch schwierige psychologische Autopsien möglich ist. Personen mit Suizidversuchen erzielen dabei auf verschiedenen Skalen durchschnittlich höhere Werte für aggressives und impulsives Verhalten (Mann et al, 1999; Kausch, 2003; Brent et al, 2003; Oquendo et al, 2004). Dies ist auch für die neurobiologische Suizidforschung

von großem Interesse, da eine Neigung zu aggressivem und impulsivem Verhalten zum Teil auch genetisch bedingt ist (Coccaro et al, 1994; Seroczynski et al, 1999). Weitere Risikofaktoren für suizidales Verhalten sind ein erhöhtes Maß an Neurotizismus (Maser et al, 2002; Fergusson et al, 2003; Roy, 2003) und Hoffnungslosigkeit (Kingree et al, 1999; Malone et al, 2000; Van Heeringen et al, 2003). In schizophrenen Patienten ist Hoffnungslosigkeit sogar der stärkste Prädiktor für suizidales Verhalten (Kim et al, 2003).

1.1.3.3. Psychiatrische Krankheiten

Die Anwesenheit einer psychiatrischen Krankheit ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für suizidales Verhalten. Retrospektive Studien haben gezeigt, dass ungefähr 90 % aller Suizidenten zum Zeitpunkt des Todes an einer psychiatrischen Krankheit leiden (Arsenault-Lapierre et al, 2004; Bertolote et al, 2004). Die meisten Suizide erfolgen dabei im Zusammenhang mit affektiven Störungen, gefolgt von Suchterkrankungen, psychotischen Störungen und Persönlichkeitsstörungen. Bei affektiven Störungen ist das Lebenszeitrisko für Suizid stark erhöht und beträgt schätzungsweise 10 bis 15 % (Blair-West et al, 1997; Wulsin et al, 1999). Eine umfassende Metaanalyse aus dem Jahr 1997 zeigt, dass die Mortalitätsraten durch Suizide bei allen untersuchten neurologischen und psychiatrischen Krankheiten mit Ausnahme von Demenz und mentaler Retardierung erhöht sind (Harris und Barraclough, 1997). Die gepoolte Risikoberechnung demonstrierte ein durchschnittlich dreifach erhöhtes Suizidrisiko bei neurologischen Erkrankungen und ein um den Faktor elf erhöhtes Risiko bei psychiatrischen Krankheiten.

1.1.3.4. Suchterkrankungen

In den meisten westlichen Ländern konsumieren mindestens 90 % aller Personen zu irgendeinem Zeitpunkt ihres Lebens Alkohol. Schätzungen gehen davon aus, dass circa 10 % aller Männer und 3-5 % aller Frauen aus dieser Gruppe eine Alkoholabhängigkeit entwickeln und zusätzlich 5-10 % aller Personen in beiden Geschlechtern Alkoholmissbrauch betreiben (Sher, 2004). Eine große Metaanalyse errechnete unter Berücksichtigung von 27 Studien, dass ungefähr 7 % aller Alkoholiker durch Suizid sterben (Inskip et al, 1998). Im Vergleich zur Normalbevölkerung haben Alkoholiker ein beinahe sechsfach höheres Risiko, durch Suizid zu sterben (Harris und Barraclough, 1997). Außerdem besteht bei suizidalem

Verhalten eine hohe Komorbidität mit affektiven Erkrankungen, die ebenfalls das Suizidrisiko stark erhöhen (Henriksson et al, 1993).

Die Suizidmortalität bei Personen mit Substanzmissbrauch und Drogenabhängigkeit ist im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ebenfalls stark erhöht. So haben Personen mit Opioidabhängigkeit ein um den Faktor 14 erhöhtes Suizidrisiko, während der Missbrauch von Sedativa, Hypnotika und Anxiolytika das Suizidrisiko sogar um den Faktor 20 steigert (Harris und Barraclough, 1997).

Der Konsum von Zigaretten ist ebenfalls mit erhöhten Suizidraten assoziiert. Vier große Studien mit einer Gesamtzahl von beinahe 500.000 untersuchten Rauchern zeigten alle eine Korrelation der Suizidraten mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag (Doll et al, 1980; Smith et al, 1992; Tverdal et al, 1993; Doll et al, 1994). Das Rauchen von Zigaretten scheint aber nicht ursächlich für die Suizide verantwortlich zu sein, sondern ist eher mit Komorbiditäten wie Alkoholmissbrauch und Persönlichkeitsstörungen assoziiert (Doll et al, 1994).

1.1.3.5. Negative Lebensereignisse

Negative Lebensereignisse können der entscheidende Auslöser sein, der eine Person dazu bewegt, sich das Leben zu nehmen. Der wichtigste Faktor ist dabei scheinbar nicht das Ereignis als solches, sondern vielmehr die Art und Weise, wie die betroffene Person das Ereignis wahrnimmt und damit umgeht. Entsprechend veranlagte Personen haben eine begrenzte Kapazität, Probleme zu lösen, und tendieren dazu, auf solche unerwünschten und negativen Ereignisse mit Hoffnungslosigkeit, Ärger oder Angst zu reagieren. Eine umfassende finnische Studie mit mehr als 1000 Suizidenten fand bei mehr als 80 % der untersuchten Personen aktuelle, negative Lebensereignisse (Heikkinen et al, 1994). Die häufigsten Probleme betrafen die Arbeit, Familienstreit, körperliche Krankheiten, finanzielle Probleme, Arbeitslosigkeit, Trennungen, Tod eines Familienmitglieds oder eine Kombination aus mehreren Problemen. Eine Untersuchung aus dem Jahr 2006 korrespondiert gut mit den Ergebnissen von Heikkinen und Kollegen und fand bei ungefähr 80 % aller untersuchten Suizidenten ein aktuelles, negatives Lebensereignis (Kolves et al, 2006a). Eine genauere Analyse der Faktoren zeigte auch hier, dass weniger die Anzahl der Ereignisse wichtig für die Entstehung suizidalen Verhaltens zu sein scheint, als viel mehr die Bedeutung des Ereignisses für die betroffene Person und deren Disposition.

1.2. Neurobiologie und Genetik des Suizids

1.2.1. Neurobiologie

Eine wichtige Studie aus dem Jahr 1976 erbrachte erste Hinweise auf Veränderungen der serotonergen Neurotransmission bei Personen mit suizidalem Verhalten (Asberg et al, 1976). Die Untersuchung der Liquorspiegel an 5-Hydroxy-Indol-Essigsäure (5-HIES), einem Serotonin-Metaboliten, bei 68 depressiven Patienten zeigte bei 20 Personen erniedrigten Spiegel unter 15 ng/ml. Die Patienten in dieser Gruppe versuchten dabei signifikant häufiger, sich das Leben zu nehmen, als die Patienten mit höheren 5-HIES-Spiegel, und verwendeten violentere Methoden. Zwei der Patienten mit erniedrigten 5-HIES-Spiegeln begingen Suizid, aber keiner der 48 Personen aus der anderen Gruppe. Die Korrelation zwischen suizidalem Verhalten und erniedrigten Liquorspiegeln an 5-Hydroxy-Indol-Essigsäure konnte in den folgenden Jahren mehrfach bestätigt werden (Agren, 1980; Traskman et al, 1981; Banki et al, 1984; Mann und Malone, 1997). Die Untersuchung der 5-HIES-Liquorspiegel in anderen Patientenkollektiven zeigte darüber hinaus, dass erniedrigte Spiegel nicht nur spezifisch mit suizidalem Verhalten assoziiert sind, sondern allgemein mit impulsiv-aggressivem Verhalten. Dies wurde gezeigt für Mörder (Linnoila et al, 1983), Personen mit Borderline Persönlichkeitsstörung (Gardner et al, 1990) und Patienten verschiedener Diagnosen (Stanley et al, 2000). Auch *post mortem* und autoradiografische Studien deuten auf Veränderungen im serotonergen System bei Suizidopfern hin. So zeigten zwei Untersuchungen im präfrontalen Cortex von Suizidenten eine verringerte Anzahl an Serotonin-Transporter-Bindungsstellen (Austin et al, 2002; Mann et al, 2000), und eine erhöhte Anzahl an postsynaptischen 5-HT_{1A}- und 5-HT_{2A}-Rezeptoren im PFC und Hippocampus von Suizidenten (Arango et al, 1995; Pandey et al, 2002). Diese Befunde deuten insgesamt auf eine serotonerge Hypofunktion bei suizidalen Personen hin, und werden durch die Ergebnisse des Fenfluramin-Challenge-Tests noch weiter gestützt. Durch die Gabe des serotonergen Agonisten Fenfluramin wird bei Versuchstieren und gesunden Probanden eine dosisabhängige Ausschüttung von Prolaktin ausgelöst (Quattrone et al, 1983). Dadurch ist der Fenfluramin-Challenge-Test eine zuverlässige Methode zu Bestimmung der zentralen serotonergen Aktivität. In einer Gruppe von 41 depressiven Patienten mit Suizidversuchen in der Vorgeschichte zeigten die Patienten mit violenteren Suizidmethoden eine signifikant erniedrigte Prolaktin-Ausschüttung nach der Gabe

von Fenfluramin (Mann et al, 1995). Eine weitere Studie fand eine signifikant verminderte Fenfluramin-Response bei depressiven Patienten mit Suizidversuch in der Vorgeschichte, und zwar sowohl im Vergleich zu gesunden Kontrollen, als auch zu depressiven Patienten ohne Suizidversuch (Correa et al, 2000).

Insgesamt wurden diese Einzelbefunde in der Serotonin-Hypothese des Suizids zusammengefasst (Mann, 1998). Diese Hypothese postuliert ein serotonerges Defizit im präfrontalen Cortex von Suizidenten, welches zu einer verminderten Inhibition von impulsiv-aggressivem Verhalten führt und somit eine Prädisposition für suizidales Verhalten darstellt.

1.2.2. Neuroanatomie

Erste Hinweise auf die Bedeutung des frontalen Cortex für die Persönlichkeit des Menschen sowie für die Regulation von Sozialverhalten und Aggression sind seit der spektakulären Verletzung des Phineas Gage bekannt (Harlow, 1848; Damasio et al, 1994; Neylan, 1999). Nach der Penetration des Schädelknochens und der Verletzung der Frontallappen durch eine Metallstange zeigte Gage eine starke Veränderung seiner Persönlichkeit und seiner Emotionen. Der am weitesten stirnwärts gelegene Teil der frontalen Hirnregion wird als präfrontaler Cortex bezeichnet und gilt als Sitz des Bewusstseins und der Persönlichkeit des Menschen. Eine Untersuchung von 279 Vietnamveteranen, die im Einsatz Kopfverletzungen erlitten hatten, ermittelte ein höheres Risiko für aggressives und violentes Verhalten bei Personen mit Läsionen im Bereich des ventromedial frontalen und temporalen Cortex (Grafman et al, 1996). Bildgebende Verfahren erbrachten ähnliche Befunde und zeigten eine verminderte Perfusion frontaler Bereiche bei Gewalttätern (Soderstrom et al, 2000; Müller et al, 2001). In einer eindrucksvollen Studie mit gesunden Probanden genügte die bloße Vorstellung aggressiven Verhaltens aus, um die Aktivität des präfrontalen Cortex zu vermindern (Pietrini et al, 2000). Eine genauere Einteilung des präfrontalen Cortex unterscheidet den über den Augenhöhlen (Orbita) gelegenen orbitofrontalen Anteil sowie einen medialen und einen dorsolateralen Anteil. Der orbitofrontale Cortex (OFC) besteht aus den Brodmann Areas (BA) 11 und 47 sowie aus dem ventralen Anteil der BA10 (Kringelbach und Rolls, 2004) und besitzt Projektionen aus wichtigen limbischen Regionen wie dem Gyrus Cinguli, der Amygdala und dem mesolimbischen System. Neben den genannten Regionen ist auch der OFC an der Entstehung und Verarbeitung von Emotionen beteiligt (Kringelbach und Rolls, 2004). Personen mit

Läsionen des orbitofrontalen Cortex sind nicht dazu fähig, positive oder negative Verhaltenskonsequenzen vorauszusehen, und gehen im Vergleich zu Kontrollpersonen mehr Risiken ein (Bechara et al, 1994). Der OFC scheint auch an der Entstehung ethischer und moralischer Vorstellungen beteiligt zu sein, da Patienten, die in frühester Jugend eine Schädigung dieser Region erlitten haben, ein schwer dissoziales Verhalten ohne Einsicht oder Gewissensbisse zeigen (Anderson et al, 1999). Eine aktuelle Studie untersuchte verschiedene psychologische Parameter bei Personen mit Läsionen des OFC im Vergleich zu Patienten mit Läsionen anderer Hirnareale und zu Kontrollpersonen. Die OFC-Patienten zeigten dabei eine erhöhte Impulsivität sowie eine veränderte Zeitwahrnehmung und berichteten sowohl im Vergleich zu den Non-OFC Patienten als auch zu den Kontrollen signifikant häufiger von subjektivem Ärger (Berlin et al, 2004). Zusammenfassend deuten verschiedenster Studien auf eine Assoziation zwischen einer Dysfunktion des orbitofrontalen Cortex und dem Auftreten von impulsivem, aggressivem Verhalten hin (Brower und Price, 2001). Aus diesem Grund ist der OFC eine wichtige Kandidatenregion für suizidales Verhalten, welches ebenfalls mit einer erhöhten Impulsivität assoziiert ist (Mann et al, 1999; Brodsky et al, 2001; Brezo et al, 2006). Insgesamt korrelieren diese Ergebnisse gut mit den weiter oben genannten Befunden aus dem serotonergen System, die ebenfalls auf eine Dysfunktion des frontalen Cortex hindeuten. Die Veränderungen der Aktivität der serotonergen Projektionen im orbitofrontalen Cortex könnten dadurch die Entstehung von suizidalem Verhalten in Krisensituationen begünstigen (Jollant et al, 2005).

1.2.3. Klassische Genetik

1.2.3.1. Familienstudien

Die familiäre Aggregation suizidalen Verhaltens wurde in der Vergangenheit immer wieder beobachtet und führte schon früh zu der Annahme einer genetischen Komponente. Die Familie des Autors und Nobelpreisträgers Ernest Hemingway stellt ein prominentes Beispiel dar. Das Thema Suizid zieht sich wie ein roter Faden durch das Leben von Ernest Hemingway, der sich am 2. Juli 1961 im Alter von 61 Jahren mit einer Schusswaffe selbst das Leben nahm. Neben ihm selbst starben schon sein Vater vor ihm, zwei Geschwister und eine Enkelin durch Suizid, sodass insgesamt 5 Mitglieder der Familie Hemingway durch die eigene Hand aus dem Leben schieden

(Wepner, 2006). Ernest Hemingway litt, wie auch andere Mitglieder seiner Familie, an schweren Depressionen und Schlafstörungen (Reynolds, 1985). Außerdem hatte er schwerwiegende Alkoholprobleme und entwickelte im höheren Alter psychotische Symptome (Yalom und Yalom, 1971), sodass bei Ernest Hemingway mehrere Risikofaktoren vorhanden waren. Das Phänomen der familiären Häufung suizidalen Verhaltens wurde in einer großen Metaanalyse von 21 Studien mit den Daten von insgesamt fast 25.000 Suizidenten und ihren Angehörigen untersucht. Diese Untersuchung errechnete ein gepooltes relatives Suizidrisiko von 5,01 für die Familienangehörigen der suizidalen Probanden, verglichen mit der Kontrollgruppe (Baldessarini und Hennen, 2004). Anders formuliert begehen die Verwandten ersten und zweiten Grades von suizidalen Personen im Vergleich zu Kontrollpersonen fünf mal so häufig selbst einen Suizid oder Suizidversuch. Selbst eine zweite, sehr viel strengere Schätzung basierend auf einem Regressionsmodell mit Gewichtung je nach Studiengröße ergab ein relatives Suizidrisiko von 2,86. Ein Nachteil der Familienstudien besteht sicherlich darin, dass die Einflüsse von Umwelt und genetisch bedingter Ursachen an dem untersuchten Verhalten nicht unterschieden werden können.

1.2.3.2. Zwillingsstudien

Gemeinsam aufwachsende Zwillinge teilen dieselbe Umgebung und erfahren dadurch auch ähnliche Umwelteinflüsse. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Familienstudien ist es dadurch bei Zwillingsstudien möglich, die Anteile von genetischen Ursachen und Umweltfaktoren an einem Verhalten oder einer Krankheit abzuschätzen. Genetische Zwillingsstudien zu Suizidalität vergleichen die Konkordanzraten von monozygoten und dizygoten Zwillingen in Hinblick auf das untersuchte Verhalten. Diese Methodik ist gut dazu geeignet, spezifische genetische Ursachen von dem Einfluss einer geteilten Umwelt zu trennen. Eine große australische Studie untersuchte die Konkordanzraten von insgesamt 2.737 Zwillingspaaren in Bezug auf Suizidversuche und korrigierte für den Einfluss von psychiatrischen Krankheiten auf das Suizidrisiko (Statham et al, 1998). Trotz dieser Korrektur ergab die Analyse eine vierfach höhere Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen im Vergleich zu den dizygoten Zwillingen. Dies lässt die Existenz einer unabhängigen genetischen Komponente für suizidales Verhalten vermuten, die getrennt von der Vererbung psychiatrischer Krankheiten weitergegeben wird. Insgesamt schätzten die Autoren die genetische Komponente bei suizidalem

Verhalten auf beträchtliche 45 %. Eine aktuelle Übersichtsarbeit zu Zwillings-, Adoptions- und Familienstudien bestätigt die Existenz einer von psychiatrischen Krankheiten unabhängigen genetischen Komponente suizidalen Verhaltens (Brent und Mann, 2005). Eine vietnamesische Studie verwendete die Daten eines militärischen Personenregisters mit insgesamt 3.372 Zwillingspaaren und errechnete ebenfalls signifikant höhere Konkordanzraten für suizidales Verhalten bei monozygoten Zwillingen (Fu et al, 2002). Diese Untersuchung schätzte den genetischen Anteil bei Suizidversuchen mit 17 % deutlich niedriger als die weiter oben erwähnte Analyse von Statham und Kollegen.

1.2.3.3. Adoptionsstudien

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung des Anteils von genetischen Ursachen und Umwelteinflüssen auf ein Verhalten besteht in der Durchführung von Adoptionsstudien. Früh adoptierte Kinder teilen mit ihren Adoptionsfamilien die gemeinsame Umwelt, nicht jedoch deren genetische Ausstattung. Ähnlichkeiten zwischen den Adoptivkindern und ihren biologischen Eltern kommen dagegen durch genetische Faktoren zustande. Bisher wurden drei Adoptionsstudien zu suizidalem Verhalten durchgeführt, die alle dieselben Daten eines dänischen Adoptionsregisters aus Kopenhagen und Umgebung verwendeten (Kety et al, 1968; Schulsinger et al, 1979; Wender et al, 1986). Die klassische Studie von Schulsinger und Kollegen definierte 57 adoptierte Suizidenten als 'Index-Fälle' und verglich diese Gruppe mit ebenfalls adoptierten Kontrollen, die keine Anzeichen einer psychiatrischen Krankheit zeigten und keine Unterschiede in allen wichtigen Kovariablen aufwiesen. Die Studie ermittelte eine Suizidrate von 4,46 % bei den biologischen Verwandten der Index-Fälle, im Vergleich zu einer Rate von nur 0,74 % bei den biologischen Verwandten der Kontrollen.

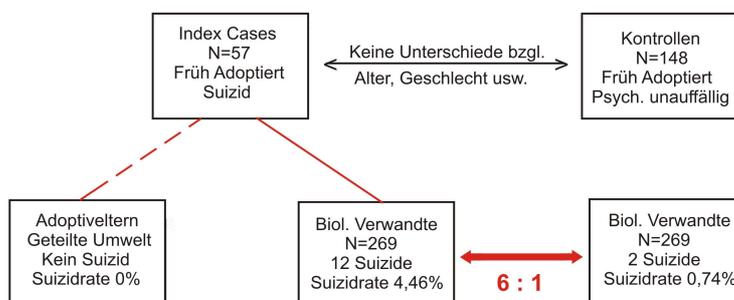


Abbildung 3: Adoptionsstudie von Schulsinger et al, 1979

Im Vergleich zu den Kontrollen war die Suizidrate bei den berücksichtigten Eltern, Geschwistern und Halbgeschwistern damit signifikant um den Faktor 6,03 erhöht. Darüber hinaus wurde in keiner der Adoptivfamilien der Index-Fälle ein Suizid beobachtet.

1.2.4. Populationsgenetik

Hinweise darauf, dass suizidales Verhalten auch durch den sozialen und kulturellen Hintergrund einer Population beeinflusst wird, kommen aus populationsgenetischen Untersuchungen. So konnten Sainsbury und Barraclough schon 1968 zeigen, dass die Suizidneigung unter Einwanderern dem Muster des Heimatlandes folgt (Sainsbury und Barraclough, 1969). In einer neueren Untersuchung wurden für die Suizidraten verschiedener Einwanderergruppen in Australien und für die Suizidraten der Geburtsländer der Immigranten Rangfolgen gebildet und miteinander verglichen (Burvill, 1998). Diese Studie ermittelte eine signifikante Korrelation zwischen diesen beiden Rangfolgen der Suizidraten.

Für eine genetische Prädisposition suizidalen Verhaltens spricht auch die Beobachtung, dass die Suizidraten in 17 industrialisierten Ländern signifikant negativ mit dem Anteil an Personen mit Blutgruppe 0 korrelieren (Lester, 1987). Nationen mit einem prozentual höheren Anteil an Personen mit dieser Blutgruppe zeigen im Vergleich mit den anderen Ländern niedrigere Suizidraten.

In Ungarn und Finnland liegen die Suizidraten mit mehr als 25 Suiziden pro 100.000 Einwohnern pro Jahr deutlich über dem europäischen Durchschnitt. Beide Völker teilen in etwa denselben Anteil an europäischen (90 %) und uralischen (10 %) Genen (Cavalli-Sforza et al, 1994). Dies lässt vermuten, dass die erhöhte Suszeptibilität für suizidales Verhalten durch eine gemeinsame genetische Ausstattung beider Volksgruppen verursacht wird (Kondrichin, 1995). Markiert man auf einer Europa-Karte alle Nationen mit Suizidraten von mehr als 20/100.000 Einwohnern, so ergibt sich eine J-förmige Kurve von Slovenien über Österreich, Ungarn, Ukraine, Weißrussland, Russland, Estland, Lettland und Litauen bis nach Finnland (Marusic und Farmer, 2001). Dieses Muster könnte durch ähnliche Anteile an finnischen und uralischen Genen in den genannten Populationen zustande kommen, und stützt die These, dass eine genetische Prädisposition die Suizidraten dieser Länder beeinflusst haben könnte (Marusic, 2005).

1.2.5. Assoziationsstudien

Die Stärke von Assoziationsstudien bei der Untersuchung von komplexen und polygenen Phänomenen liegt in der Möglichkeit, auch Suszeptibilitätsgene mit geringen Effekten zu identifizieren. Zusätzlich sind Assoziationsstudien im Gegensatz zu Kopplungsstudien nicht auf die Identifizierung von hinreichend vielen von der Krankheit betroffenen Familien angewiesen. Ein Nachteil dieser Studien liegt dagegen darin, dass sie auf biologischen Hypothesen basieren und deswegen nur bereits bekannte Kandidatengene untersucht werden können. Aufgrund ihrer Häufigkeit im humanen Genom werden bei Assoziationsstudien meist Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) untersucht, die im Schnitt alle 1000 Basen zu finden sind. Dazu werden retrospektiv die Verteilungen der Allele im Fall-Kontroll-Design zwischen einer Gruppe von Kranken und einer Kontrollgruppe verglichen. Aus der Kombination mehrerer Allele ergeben sich sogenannte Haplotypen, die ebenfalls verwendet werden können. Die positive Assoziation eines Polymorphismus mit einer Krankheit liefert dabei noch keinen Beweis für eine kausale Relation, sondern lediglich eine Bestätigung der Hypothese. Ein ursächlicher Zusammenhang kann zum Beispiel durch die Aufklärung der funktionellen Bedeutung des Polymorphismus gezeigt werden.

In der vergangenen Dekade wurden vor allem biologische Kandidatengene der verschiedenen Neurotransmittersysteme untersucht, die sich aus ersten Erkenntnissen der Neurobiologie suizidalen Verhaltens und daraus abgeleiteter Hypothesen ergaben. Nach den Ergebnissen von Marie Asberg und Kollegen im Jahr 1976 standen vor allem serotonerge Gene im Zentrum der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit, neben dem adrenergen und dopaminergen System (Rujescu et al, 2006). Insgesamt handelt es sich bei suizidalem Verhalten um ein sehr komplexes Geschehen, welches durch ein Zusammenspiel von Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren beeinflusst wird. Die Prädisposition einer Person wird dabei sehr wahrscheinlich durch multiple genetische Faktoren bestimmt, und die Überschreitung des individuellen Schwellenwerts in einer Lebensphase kann sich als Suizid manifestieren (McGuffin et al, 2001).

Der Serotonin-Transporter ist durch die Wiederaufnahme des Neurotransmitters entscheidend an der serotonergen Signaltransduktion beteiligt. Bisher wurden zahlreiche Studien im Zusammenhang mit suizidalem Verhalten durchgeführt, die in zwei Meta-Analysen summiert worden sind. Die erste Analyse von Anguelova und

Kollegen ergab eine signifikante Assoziation dieses Gens mit suizidalem Verhalten (Anguelova et al, 2003). Eine aktuellere Studie konnte zwar keinen Zusammenhang mit suizidalem Verhalten allgemein zeigen, dafür aber eine Assoziation des untersuchten Polymorphismus mit violentem Suizid sowie mit Suizidversuch innerhalb einheitlicher diagnostischer Gruppen (Lin und Tsai, 2004).

Die erste Meta-Analyse genetischer Studien zur Tryptophan-Hydroxylase fand keine Hinweise für eine Bedeutung der untersuchten Polymorphismen für die Ätiologie suizidalen Verhaltens (Lalovic und Turecki, 2002). Eine nachfolgende Meta-Analyse erbrachte jedoch positive Befunde und zeigte eine signifikante Assoziation eines intronischen SNPs mit suizidalem Verhalten (Rujescu et al, 2003a), was von einer weiteren Überprüfung der vorhandenen Daten bestätigt werden konnte (Bellivier et al, 2004).

Die Catecholamin-O-Methyltransferase (COMT), das Hauptenzym des Metabolismus von Dopamin und Noradrenalin, ist aufgrund seiner Funktion ein potenzielles Kandidatengen für psychiatrische Krankheiten (Lachman et al, 1996). In verschiedenen Studien wurde eine Assoziation des low-activity L-Allels mit violentem Verhalten bei schizophrenen Patienten berichtet (Kotler et al, 1999; Strous et al, 2003; Koen et al, 2004). Untersuchungen im Kontext suizidalen Verhaltens fanden das L-Allel signifikant häufiger bei Personen mit Suizidversuch (Nolan et al, 2000) und vollendetem Suizid (Ono et al, 2004). Die Assoziation mit violentem Suizidversuch konnte in einer weiteren Studie mit 149 Suizidenten und 328 Kontrollen gezeigt werden (Rujescu et al, 2003b). Insgesamt deuten die aktuellen Daten darauf hin, dass COMT eine wichtige Rolle bei der Entstehung von aggressivem und violentem Verhalten spielt (Bilder et al, 2004). Neben diesen gut belegten Befunden wurden vereinzelt weitere positive Ergebnisse veröffentlicht, die in Tabelle 2 im Überblick zusammengefasst werden.

Tabelle 2: Auswahl positiver Assoziationsstudien

Gen	Symbol	Autoren	Bemerkung
14-3-3 Epsilon	<i>YWHAE</i>	Yanagi et al, 2005	
Angiotensin Converting Enzym	<i>ACE</i>	Hishimoto et al, 2006	Bei Männern
Cholecystokinin	<i>CCK</i>	Shindo et al, 2005	Bei Männern
Monoaminoxidase A	<i>MAOA</i>	Du et al, 2002	
Neurotrophin-Rezeptor p75(NTR)	<i>NGFR</i>	Kunugi et al, 2004	
Spermidine/Spermine N ¹ -Acetyltransferase	<i>SSAT</i>	Sequeira et al, 2006	+ Expression
Tryptophan-Hydroxylase 2	<i>TPH2</i>	Zill et al, 2004	
Wolfram Syndrom 1 Gen	<i>WFS1</i>	Sequeira et al, 2003	

1.2.6. Kopplungsstudien

Kopplungsstudien sind, im Gegensatz zu Assoziationsstudien, nicht auf biologische Hypothesen angewiesen. Dadurch besteht die Möglichkeit zur genomweiten Identifikation von chromosomalen Regionen, in denen prädisponierende Gene für die zu untersuchende Krankheit lokalisiert sind. Dazu wird in Kopplungsanalysen getestet, ob innerhalb einer Familie ein Markerallel überzufällig häufig zusammen mit der Krankheit vererbt wird.

Die erste publizierte Kopplungsanalyse zu suizidalem Verhalten verwendete ein Probandenkollektiv von Alkoholikern und deren Familienangehörigen der 'Collaborative Study on the Genetics of Alcoholism' (COGA; Hesselbrock et al, 2004). Das Lebenszeitrisiko, an Suizid zu sterben, wird für alkoholabhängige Personen auf ungefähr 7 % geschätzt (Inskip et al, 1998). Eine aktuelle Studie fand bei 10% aller untersuchten Suizidenten einen Alkoholmissbrauch und bei 51 % aller Fälle eine Alkoholabhängigkeit (Kolves et al, 2006b). In der Kopplungsstudie wurden das qualitative Merkmal 'Suizidversuche' bei den betroffenen Geschwisterpaaren und das quantitative Merkmal 'Suizidalität' bei allen Paaren untersucht. Nur der Phänotyp 'Suizidversuch' zeigte eine genomweit signifikante Kopplung mit einem maximalen LOD-Score für den Marker D2S1790 auf Chromosom 2. Die Marker D3S2398 und D1S1602 erbrachten Hinweise auf ein mögliches Linkage mit dem quantitativen Merkmal Suizidalität.

Eine weiterer, genomweiter Linkage-Scan untersuchte 389 hochinformativ Marker im Kontext affektiver Erkrankungen auf eine mögliche Kopplung mit dem Phänotyp Suizidversuch bei 81 Familien (Zubenko et al, 2004). Insgesamt identifizierte diese Studie sechs chromosomale Regionen mit signifikanten LOD-Werten (2p12, 5q31-q33, 6q12, 8p22-p21, 11q25 und Xq25-26.1), in denen möglicherweise Suszeptibilitätsgene für suizidales Verhalten lokalisiert sind. Eine aktuelle Untersuchung von Cheng und Kollegen wurde mit einem Kollektiv von bipolaren Patienten und deren Familienangehörigen aus 154 Familien mit insgesamt 1060 Personen durchgeführt (Cheng et al, 2006). Diese Studie untersuchte dabei sowohl eine mögliche Kopplung von Genloci mit dem Phänotyp der bipolaren Störung, als auch mit den additiven Kriterien Suizidversuch, Suizid, Psychose und Angststörung. Genomweites, signifikantes Linkage für den Phänotyp 'Suizid' zeigte der Marker D6S2436 in der chromosomalen Region 6q25.2; ein mögliches Linkage für die Endophänotypen 'Suizid' und 'Suizidversuche' wurde für vier weitere Loci

beobachtet (2q24.1, 4p16.1, 6q24.3 und 10q25.3). Der Phänotyp Suizid scheint dabei im Vergleich mit den Suizidversuchen eine stärkere genetische Grundlage zu besitzen, da vier der insgesamt fünf Loci Linkage zu dieser schwersten Form suizidalen Verhaltens zeigten.

Tabelle 3: Kandidatenregionen für suizidales Verhalten

Lokus	Region	Phänotyp	Kontext	Autoren
D2S1790	2p11	Suizidversuch	Alkoholismus	Hesselbrock et al, 2004
D2S1777	2p12	Suizidversuch	Affektive Störungen	Zubenko et al, 2004
D5S1480	5q31-q33	Suizidversuch	Affektive Störungen	Zubenko et al, 2004
D6S1053	6q12	Suizidversuch	Affektive Störungen	Zubenko et al, 2004
D8S1145	8p22-p21	Suizidversuch	Affektive Störungen	Zubenko et al, 2004
D11S968	11q25	Suizidversuch	Affektive Störungen	Zubenko et al, 2004
DXS1047	Xq25-26.1	Suizidversuch	Affektive Störungen	Zubenko et al, 2004
D6S2436	6q25.2	Suizid	Bipolare Störung	Cheng et al, 2006

Die klassischen serotonergen Kandidatengene wie die Tryptophan-Hydroxylase (TPH), der Serotonin-Transporter oder die Gene der verschiedenen Serotonin-Rezeptoren liegen alle außerhalb der oben genannten Kandidatenregionen aus den Kopplungsstudien.

1.3. Genexpressionsanalysen

1.3.1. *Post mortem* Studien

Die Verwendung von humaner RNA aus *post mortem* Hirngewebe in der Psychiatrie hat durch die Entwicklung der quantitativen RT-PCR und der Microarraytechnologie in den letzten Jahren stark zugenommen. Die Replizierbarkeit der Ergebnisse wird dabei ganz entscheidend durch die Qualität der Gewebeproben und damit der RNA beeinflusst.

1.3.1.1. Agonale Faktoren

Die Qualität der RNA wird durch eine Vielzahl an Faktoren wie Probandenalter, Geschlecht, Gewebe-pH, *post mortem* Intervall (PMI) und agonale Faktoren bestimmt (Konradi, 2005). Eine umfangreiche Studie aus dem Jahr 2004 untersuchte die Genexpression in jeweils drei Hirnregionen von 20 psychiatrischen Patienten und 20 Kontrollen und fand systematische Expressionsunterschiede, die unabhängig von der Diagnose mit den agonalen Faktoren korrelierten (Li et al, 2004). Die Autoren teilten die Probanden aufgrund ähnlicher Genexpressionsmuster in zwei Typen ein, und es zeigte sich eine starke Korrelation dieser Zuordnung mit dem pH-Wert des

Hirngewebes. Personen des Typs 1 starben relativ schnell durch Unfälle, Suizid oder kardiale Ursachen und hatten im Allgemeinen normale pH-Werte. Die Personen des Typs 2 durchlitten im Gegensatz dazu verlängerte agonale Phasen mit Atemstillstand, Multiorganversagen oder Koma und zeigten erniedrigte pH-Werte, die wahrscheinlich durch eine Hypoxie des Gewebes und nachfolgende Acidose entstanden. Lange agonale Phasen führten insgesamt zu einer systematischen Upregulation von Transkripten des Immunsystems, der Stressantwort, der Transkriptionskontrolle und der Apoptose sowie einer Downregulation von Transkripten des Energiemetabolismus und der Proteolyse. Li und Kollegen postulierten, dass die Expressionsunterschiede zwischen beiden Gruppen sowohl durch die schnellere Degradation der RNA bei erniedrigten pH-Werten als auch durch systematische Transkriptionsänderungen als Folge der terminalen Umstände des Todes entstanden sein könnten. Aus diesen Gründen empfehlen die Autoren ein Matchen der Probanden bei Genexpressionsversuchen nach agonalen Faktoren und pH-Wert des Gewebes.

In einer weiteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe wurde der Einfluss verschiedener agonaler Faktoren wie Koma, Hypoxie, Pyrexie, Dehydratation oder Kopfverletzungen auf die Qualität der RNA untersucht. Diese Studie zeigte, dass die genannten Faktoren die Qualität der RNA stärker beeinflussen als *post mortem* Faktoren wie das *post mortem* Intervall oder die Lagerzeit des Gewebes im Ultratiefkühlschrank bei unter 80 ° Celsius (Tomita et al, 2004).

1.3.1.2. *Post mortem* Faktoren

Im Vergleich zu den agonalen Faktoren scheinen die *post mortem* Faktoren weniger Einfluss auf die Qualität der RNA zu haben (Tomita et al, 2004). Die Überprüfung der Integrität und Genexpression der RNA bei neun Alzheimer-Patienten und zehn Kontrollen mit geringen PMIs unter zwölf Stunden zeigte keinerlei Anhaltspunkte für eine Degradation der RNA (Cummings et al, 2001). Die Isolierung von intakter und biologisch aktiver mRNA wurde von vielen Autoren auch nach mehr als 72 Stunden *post mortem* berichtet (Perett et al, 1988; Barton et al, 1993; Leonard et al, 1993; Johnston et al, 1997; Schramm et al, 1999; Yasojima et al, 2001; Bahn et al, 2001). Speziell das Hirngewebe ist durch die Lage innerhalb des Schädelknochens und die Blut-Hirn-Schranke gut geschützt, und Nukleinsäuren sind im Vergleich zu den meisten Neuropeptiden erstaunlich stabil (Hynd et al, 2003). Hinsichtlich der Empfindlichkeit der verschiedenen mRNA-Spezies gegenüber dem Gewebe-pH

bestehen Unterschiede, weswegen ein Matchen der Gruppen nach pH-Wert für Genexpressionsstudien mit Autopsiematerial sinnvoll ist (Hynd et al, 2003).

1.3.1.3. RNA Qualität

Der Vergleich verschiedener Methoden der cDNA-Generierung aus *post mortem* Material zeigte die Überlegenheit der RNA-Isolierung mithilfe der Säulenextraktion gegenüber der Flüssigextraktion (Miller und Yolken, 2003). Die Extraktion mittels einer Silikamembran ermöglicht einen DNase-Verdau auf der Säule ohne einen nennenswerten Verlust an RNA und verhindert eine Kontamination mit genomischer DNA, die bei hochsensitiven Methoden wie der quantitativen RT-PCR zu einer starken Beeinflussung der Ergebnisse führen kann. Die mittels Säulen extrahierte RNA zeigte außerdem eine erhöhte Stabilität durch die bessere Abtrennung von RNasen und Riboenzymen im Vergleich zur Flüssigextraktion.

Die Standardmethode der Qualitätsbestimmung von RNA ist die Bestimmung des Quotienten der Absorption bei 260 und 280 nm (Glasel, 1995). Gelelektrophoretische Verfahren erlauben eine genauere Beurteilung der RNA-Integrität durch die Bestimmung der Anteile an 18S- und 28S-ribosomaler RNA. Optimale RNA zeigt dabei klar definierte 28S- und 18S-Peaks im Verhältnis von 1,5 bis 2 zu 1 ohne Anzeichen einer Degradation durch große Nebenpeaks (Mimmack et al, 2004). Eine systematische Untersuchung des Einflusses von Degradationsprozessen auf die Ergebnisse von Microarrayversuchen zeigte, dass auch die Verwendung von RNA mit 28S/18S-ratios von 0,5 noch reproduzierbare Ergebnisse liefert (Schoor et al, 2003). Diese moderate Degradation der RNA konnte durch die Verwendung höherer Normalisierungsfaktoren ausgeglichen werden, wodurch die Anzahl der signifikant differentiell exprimierten Gene sich nicht veränderte.

1.3.2. Technik der Microarrays

1.3.2.1. Grundlagen

Die Technik der Microarrays basiert auf dem zentralen Dogma der Molekularbiologie, welches besagt, dass die genetische Information in Form der DNA gespeichert, bei der Transkription in mRNA umgeschrieben und schließlich bei der Translation in Protein übersetzt wird. Microarrayexperimente bestimmen simultan die Expression mehrerer tausend Gene in einem Experiment. Die Abbildung 4 zeigt schematisch das Grundprinzip der Microarraytechnik.

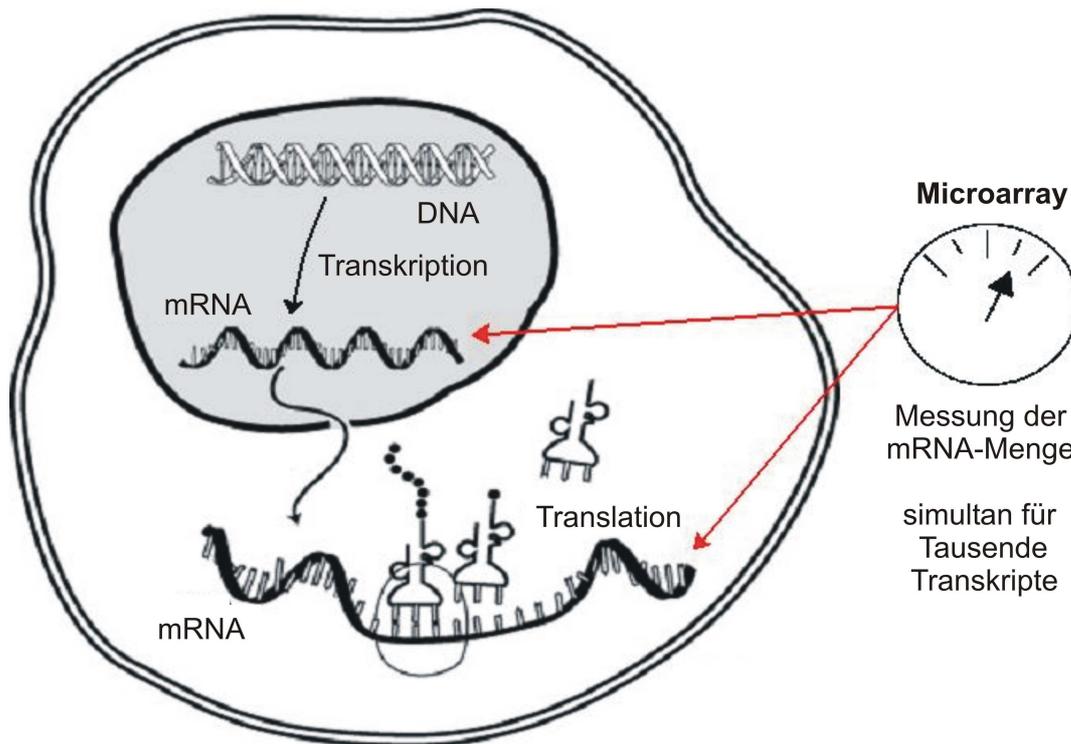


Abbildung 4: Grundprinzip der Microarrays

Ähnlich wie bei den experimentellen Vorgängern der Microarrays, den Northern-Blots, werden die Transkripte dabei durch genspezifische Oligonucleotid- oder cDNA-Sonden gebunden und detektiert. Bei Microarrays sind dabei Tausende bis Zehntausende solcher spezifischer Sonden auf einer festen Trägeroberfläche aus verschiedenen Materialien wie zum Beispiel Glas fixiert, und jede Sonde entspricht einem Hybridisierungsexperiment (Schena et al, 1995). Wegen der exakten Anordnung von Tausenden von Oligonucleotiden auf engstem Raum auf einer festen Trägeroberfläche werden diese Experimente als Microarrays oder, in Anlehnung an die Computertechnik, als Genchips bezeichnet.

1.3.2.2. Experimentelle Vorgehensweise

Ein typischer Versuchsablauf beinhaltet die Isolierung der mRNA aus Gewebe, die Transkription zu cDNA oder cRNA, das Labeling der Produkte mit einem Marker und die Hybridisierung auf den Microarray. Die Markermoleküle dienen der Quantifizierung der Transkriptmengen. Neben Radioisotopen (Gress et al, 1992) und Fluoreszenzfarbstoffen (Schena et al, 1995) wird auch Biotin als Marker verwendet, welches später mit Streptavidin-Cy3 detektiert werden kann. Nach dem Labeling

wird die Probe in einem Hybridisierungspuffer gelöst und auf den Array aufgebracht. Dort finden die spezifische Hybridisierung der Sonden mit den komplementären Zielsequenzen und die anschließende Entfernung ungebundener Nukleinsäuren durch stringentes Waschen statt. Im Falle einer Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen werden diese mithilfe eines Lasers zur Emission angeregt, und die erzeugten Hybridisierungssignale durch hochauflösende Scanner oder Digitalkameras gemessen. Als Ergebnis wird für jeden Array ein Bild generiert, welches die Signalintensitäten aller Sonden über die gesamte Fläche beinhaltet. Die vom Scanner erzeugten Bilder werden mit spezieller Software ausgewertet, um die Signale jedes Spots zu quantifizieren. Die Stärke des Hybridisierungssignals einer Sonde repräsentiert dabei die Menge des entsprechenden Transkripts in der Probe. Die resultierenden Bilddateien mit den Signalintensitäten der einzelnen Sonden werden nach dem experimentellen Teil der Versuche normalisiert, um die Vergleichbarkeit der Arrays zu gewährleisten und mögliche Artefakte und systemische Fehler zu eliminieren.

1.3.2.3. Auswertung der Arrays

Die Ermittlung der signifikant differentiell exprimierten Transkripte erfolgt durch den Vergleich der Expressionswerte der Fallgruppe mit der Kontrollgruppe. Bei kommerziellen Arrays werden die Daten meist mit einer vom Hersteller entwickelten Software ausgewertet, aber es existiert alternativ auch die Möglichkeit der Auswertung unter Verwendung von öffentlich verfügbaren Programmen wie der 'R-Package' von Bioconductor (www.bioconductor.org; Gentleman et al, 2004). Die einfachste Definition einer differentiellen Genexpression liegt in der Festlegung eines Schwellenwertes für das Verhältnis der Signalintensitäten verschiedener Proben (Schena et al, 1996). Die Angabe der differentiellen Genexpression erfolgt oft nach logarithmischer Transformation der Daten mit der Basis 2, um eine Symmetrie der Daten und damit eine bessere Vergleichbarkeit herzustellen. Ebenfalls symmetrisch und außerdem sehr anschaulich das korrigierte Verhältnis der Genexpression, welches im Englischen als Fold-Change (FC) bezeichnet wird. Positive FC-Werte zeigen eine Überexpression des Transkripts in der Fallgruppe an, während negative Werte *vice versa* eine schwächere Expression bedeuten.

Da diese Methode die Varianz der Expressionswerte unberücksichtigt lässt und keine Aussagen über die Signifikanz der Werte macht, werden aber inzwischen statistische Testverfahren bevorzugt. Bei der Ermittlung signifikant differentiell

exprimierter Gene werden häufig der parametrische t-Test oder Abwandlungen desselben verwendet, die eine Normalverteilung der Daten voraussetzen.

Bei verteilungsunabhängigen, nicht-parametrischen Tests wie dem Mann-Whitney-Test oder dem Wilcoxon-Test werden dagegen quantitative Werte durch Rangfolgen oder Wahr-Falsch-Zuordnungen ersetzt, aus denen die Prüfstatistik berechnet wird. Da sie nicht das Vorliegen einer Normalverteilung voraussetzen, können sie auch bei nicht-normalverteilten Daten eingesetzt werden.

Bei allen statistischen Testverfahren ist die Angabe des gewählten Signifikanzniveaus α notwendig. Das Signifikanzniveau gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit des Tests an, die bei einem typischen $\alpha = 0,05$ genau 5 % beträgt. Durch die hohe Anzahl der simultanen Genexpressionsbestimmungen bei Microarrayexperimenten ergibt sich das Problem des multiplen Testens. Die Nullhypothese bei Arrayversuchen besagt, dass die untersuchten Gene in beiden Gruppen gleich stark exprimiert sind. Bei der Überprüfung von 10.000 Genen und einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ werden 500 Nullhypothesen fälschlicherweise abgelehnt, d.h. man würde 500 Gene als differentiell exprimiert deklarieren, die es tatsächlich nicht sind, und damit 500 falsch-positive Ergebnisse erhalten. In Microarraystudien wird aus diesem Grund meist für multiples Testen korrigiert, indem das gewählte Signifikanzniveau durch Korrekturen angepasst wird. Durch die Bonferroni-Korrektur ist eine einfache, aber auch sehr strenge Korrektur möglich, indem das Signifikanzniveau mit der Anzahl der durchgeführten Tests multipliziert wird. In dem eben genannten Beispiel entspricht ein konventionelles Signifikanzniveau von $\alpha = 0,000005$ einem Bonferroni-korrigiertem Niveau von $\alpha = 0,05$. Diese strenge Korrektur hat allerdings auch zur Folge, dass viele tatsächlich differentiell exprimierte Gene nicht detektiert werden, d.h. die Anzahl der falsch-negativen Ergebnisse steigt. Als alternative Korrekturmethode für multiples Testen sind die Konzepte der False Discovery Rate (FDR) oder der q-Wert entwickelt worden, die weniger streng vorgehen (Benjamini und Hochberg, 2000; Storey und Tibshirani, 2003).

1.3.2.4. Explorative Datenanalyse

Ein wichtiger Schritt ist die explorative Datenanalyse zur Identifizierung und Visualisierung von Mustern und Strukturen innerhalb der Daten, zum Beispiel durch Clustering (Tsai et al, 2006). Beim Clustering werden Transkripte mit ähnlichen Expressionsmustern über verschiedene Proben hierarchisch gruppiert, oder aber die

Proben selbst werden aufgrund der Expressionsmuster geordnet. Gene, die durch die Krankheit differentiell exprimiert sind, sollten deswegen beim Clustering zwischen der Kontrollgruppe und der Fallgruppe unterscheiden lassen (Konradi, 2005). Das Clustering kann auch zur Qualitätskontrolle von Replikaten benutzt werden, die beim Clustering zusammen gruppiert werden sollten.

Eine weitere nützliche Analysemethode ist die Einteilung der differentiell exprimierten Transkripte anhand ihrer Funktion, Lokalisation oder Proteinklasse. Diese Methoden identifizieren biologische Pathways mit überzufällig häufig vielen Genen, die in der Fallgruppe reguliert sind und die dadurch an der Entstehung der Krankheit beteiligt sein könnten. Die Einteilung der Gene erfolgt dabei häufig nach den Kriterien des Gene Ontology (GO) Konsortiums (Ashburner et al, 2000) oder anhand der Kyoto-Enzyklopädie der Gene und Genome (Kanehisa et al, 2004). Dadurch ist es möglich, funktionelle Bereiche und Pathways zu identifizieren, die möglicherweise in die Ätiologie der Suizidalität impliziert sind.

1.3.2.5. Validierung der Ergebnisse

Durch die simultane Bestimmung der Genexpression tausender Transkripte erhöht sich die Wahrscheinlichkeit falsch-positiver Ergebnisse aufgrund der hohen Anzahl der getesteten Hypothesen. Ebenso können technische Fehler, Kreuzhybridisierungen auf den Arrays oder Fehler bei der Probenamplifikation und beim Labeling die Ergebnisse verfälschen. Aus diesen Gründen ist neben einer Korrektur für multiples Testen ebenso eine Validierung der Ergebnisse unbedingt notwendig, um zu verlässlichen Resultaten zu kommen (Mirnics und Pevsner, 2004). Die Validierung sollte mit unabhängigen Methoden, wie der quantitativen Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR), Northern Blots oder *in situ* Hybridisierungen erfolgen. Die qRT-PCR gilt als Goldstandard der Genexpressionsmessung und ist wegen der Schnelligkeit der Methode, dem geringen Materialverbrauch und den relativ geringen Kosten weit verbreitet (Chuaqui et al, 2002). Bei Northern Blots werden die mRNAs zuerst elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran übertragen (englisch 'blotting') und können anschließend mit spezifischen Oligonucleotidsonden markiert werden. Northern Blots bieten eine gute Möglichkeit zur Überprüfung einzelner Ergebnisse und zeigen eine hohe Übereinstimmung mit den Arrays (Taniguchi et al, 2001). *In situ* Hybridisierungen ermöglichen im Gegensatz zu den vorher genannten Methoden auch die genaue Lokalisation der Genexpressionsänderungen (Mirnics und Pevsner,

2004). Dies kann beispielsweise durch die Anfärbung der mRNA mit markierten Sonden in Gewebe-Dünnschnitten erfolgen.

1.3.3. Möglichkeiten der Microarrays

Suizidales Verhalten entsteht durch ein komplexes Zusammenspiel von Umwelteinflüssen, psychiatrischen Krankheiten und genetischen Faktoren und stellt damit eine besondere Herausforderung für die neurobiologische Forschung dar. Ein aktuelles 'Stress-Veranlagungs-Modell' postuliert, dass suizidales Verhalten als Reaktion auf belastende Situationen entsteht und dass die Wahrscheinlichkeit dafür durch die genetische Veranlagung einer Person bestimmt wird (Mann, 2003). Wichtige Faktoren dabei sind auch Charaktermerkmale wie Impulsivität und Aggressivität, die zum Teil durch den serotonergen Input im präfrontalen Cortex beeinflusst werden. Am wahrscheinlichsten ist ein polygener Erbgang, bei dem verschiedene Suszeptibilitätsgene mit jeweils kleinen Effekten zu einem erhöhten Risiko beitragen (Brunner und Bronisch, 2002). Bei den sogenannten Genom-Screens werden alle humanen Gene hinsichtlich einer möglichen Implikation für die untersuchte Krankheit überprüft. Dies kann durch Microarrays erfolgen, mit deren Hilfe simultan die Expression des gesamten Genoms in einem Experiment bestimmt werden kann. Dabei erfolgt die Messung der Transkriptmengen in *post mortem* Hirngewebe von Suizidenten im Vergleich zu Kontrollpersonen, um durch mögliche Unterschiede in der Genexpression erste Hinweise auf interessante Kandidatengene zu erhalten. Die gefundenen Differenzen können sowohl spezifisch für ein Symptom als auch spezifisch für die Krankheit selbst sein (Konradi, 2005). In Bezug auf suizidales Verhalten bedeutet dies, dass sehr wahrscheinlich kein einzelnes, universales Suizid-Gen existiert, sondern dass die gefundenen Gene mit einzelnen Risikofaktoren, wie zum Beispiel impulsivem Verhalten oder einer Neigung zu affektiven Krankheiten, assoziiert sind. Die Implikation der Gene für die Entstehung der untersuchten Krankheit kann anschließend durch genetische Assoziationsstudien weiter belegt werden, wie es im Fall des *YWHAZ*-Gens für suizidales Verhalten (Yanagi et al, 2005) oder von *RGS4* für die Schizophrenie (Mirnics et al, 2001; Chowdari et al, 2002; Morris et al, 2004; Williams et al, 2004) erfolgt ist. Insgesamt sind Microarraystudien neben Kopplungsstudien ein ergänzender und vielversprechender Ansatz, um neue und bisher unbekannte Kandidatengene für suizidales Verhalten zu identifizieren.

1.3.4. Publierte Microarraystudien zu suizidalem Verhalten

Die erste veröffentlichte Microarraystudie zu suizidalem Verhalten verwendete *post mortem* Hirngewebe aus dem dorsolateralen (Brodmann Area 9) und ventralem präfrontalen Cortex (Brodmann Area 47) von 19 depressiven Suizidopfern und 19 psychiatrisch unauffälligen Kontrollen (Sibille et al, 2004). Alle Personen der Suizidgruppe hatten eine Lebenszeitdiagnose einer depressiven Störung nach DSM-III-R und starben durch eine violente Suizidmethode. Die Kontrollen wurden nach Alter, Geschlecht, PMI und Ethnizität gematcht, hatten keine psychiatrische Störung der Achse I und starben plötzlich ohne verlängerte agonale Phase. Die Messung der Expression von 22.000 Transkripten mit Affymetrix U133A Microarrays und anschließende statistische Auswertung durch einen Mittelwertsvergleich mit Benjamini-Hochberg-Korrektur (Benjamini und Hochberg, 2000) für multiples Testen erbrachte keine Hinweise auf differentiell exprimierte Gene. Die nachfolgende Validierung der Arraydaten für 15 Gene durch quantitative Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion zeigte eine gute Übereinstimmung der beiden Methoden, und auch die Überprüfung der Expression typischer Kandidatengene (Serotonin-Rezeptoren, Alpha-adrenerge Rezeptoren, Neurotrophine, CRH-System) fand minimale, nichtsignifikante Expressionsunterschiede im Bereich vom $-1,1$ bis $+1,1$. Ein paarweiser Vergleich der Arraydaten für je zwei Samples und eine Analyse der Genexpressionsmuster brachte keine Hinweise auf mögliche Subgruppen innerhalb des Probandenkollektivs. Die abschließende funktionelle Analyse der Daten anhand der Gene Ontology Klassifikation der Gene und Genprodukte (Ashburner et al, 2000) zeigte keine Hinweise auf eine gemeinsame Dysregulation bestimmter biologischer oder funktioneller Gengruppen bei den depressiven Suizidopfern. Die Autoren folgerten, dass die Pathophysiologie des Suizids möglicherweise nicht zu größeren Änderungen einzelner Transkriptmengen führt, oder dass vorhandene Genexpressionsunterschiede eventuell in anderen Regionen lokalisiert sein könnten. Außerdem wurden post-transkriptionelle Modifikationen wie RNA-Splicing oder Veränderungen auf der Proteinebene durch die verwendeten Affymetrix U133A Microarray nicht erfasst.

Eine weitere Microarraystudie mit RNA aus dem orbitofrontalen Cortex (BA 11) von sechs depressiven Suizidenten und sechs Kontrollen untersuchte die Genexpression von mehr als 39.000 Transkripten mithilfe des Affymetrix Human Genom U133 Chip Sets, bestehend aus dem U133A- und U133B-Array (Gwadry et al, 2005). Die

Identifikation der Genexpressionsunterschiede erfolgte durch einen ungepaarten t-Test und eine Permutationsanalyse, die nicht auf der Annahme normalverteilter Daten beruht. Bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ und einem Fold-Change von mindestens 1,3 wurden insgesamt 292 differentiell exprimierte Transkripte identifiziert, davon waren 218 in der Suizidgruppe schwächer und 73 stärker exprimiert. Die Genexpression des 5-HT_{2A}-Rezeptors war in der Gruppe der depressiven Suizidenten 1,8-fach erhöht. Da die Veröffentlichung von Gwady und Kollegen vor allem als Demonstration der Möglichkeiten und Problematiken von Microarrayversuchen diente, wurden darüber hinaus keine weiteren Ergebnisse explizit genannt.

Eine sehr umfangreiche, nordamerikanische Studie verwendete ebenfalls das Affymetrix Human Genom U133 Chip Set zur differentiellen Genexpressionsanalyse in 3 verschiedenen Hirnregionen, namentlich dem orbitalen (BA11), dorsolateral präfrontalen (BA8/9) und motorischen Cortex (BA4), bei sechzehn depressiven Suizidopfern, acht Suizidenten ohne Depression und zwölf nichtpsychiatrischen Kontrollen (Sequeira et al, 2006). Bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ erfüllten insgesamt 375 Gene im orbitofrontalen Cortex das Cut-off-Kriterium eines Fold-Changes von mindestens 1,3. Von diesen 375 Genen waren 275 bei den depressiven Suizidenten im Vergleich zu den Kontrollen dysreguliert, während 84 Gene bei den nicht-depressiven Suizidenten differentiell exprimiert waren. Auch zwischen den beiden Suizidgruppen bestanden Expressionsunterschiede bei 101 Transkripten. Eine Analyse über alle drei untersuchten Hirnregionen zeigte, dass 26 Gene in mindestens zwei Regionen differentiell exprimiert waren, und eines dieser Gene, namentlich *SSAT*, war in allen drei Regionen signifikant herunterreguliert. Dieses Ergebnis konnte auch mit qRT-PCR-Experimenten validiert werden, und eine immunhistochemische Konfirmation bestätigte dies ebenso auf Proteinebene.

Die Lokalisation des *SSAT*-Gens außerhalb der pseudoautosomalen Region auf dem X-Chromosom ermöglichte eine direkte Untersuchung der Auswirkung von allelischen Varianten auf die Genexpression bei den hemizygoten, männlichen Probanden. Der *SSAT*-342A/C-Polymorphismus hatte einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression, und Personen mit dem *SSAT*-342A-Allel zeigten höhere Expressionslevel. Eine zusätzliche Genotypisierung der DNA von 181 männlichen Suizidopfern und 80 Kontrollen erbrachte eine protektive Wirkung dieser Variante, die bei den Suizidenten signifikant weniger häufig gefunden wurde.

Eine aktuelle japanische Microarraystudie führte zuerst eine Genexpressionsanalyse mit *post mortem* Gewebe aus der Amygdala von vier Suizidenten, zwei nichtpsychiatrischen Kontrollen und zusätzlich der gepoolten mRNA von 70 weiteren Kontrollen durch (Yanagi et al, 2005). Insgesamt 11 von 12.000 untersuchten Transkripten waren sowohl im Vergleich zu der gepoolten mRNA-Probe als auch im Vergleich zu den zwei Kontrollen differentiell exprimiert, darunter *14-3-3-ε* (alias *YWHAZ*), welches in der Suizidgruppe signifikant höhere mRNA-Level zeigte. Die Ergebnisse auf RNA-Ebene konnten durch Immunoblots auf Proteinebene bestätigt werden. Eine anschließende Genotypisierung von drei häufigen Single Nucleotide Polymorphismen in einem Probandenkollektiv von 185 Suizidenten und 359 Kontrollen zeigte eine signifikante Assoziation von zwei Allelen mit vollendetem Suizid, die allerdings durch Bonferroni-Korrektur für multiples Testen verschwand. Eine Untersuchung der Genexpression im dorsolateralen präfrontalen Cortex (BA9 und BA46) und anterioren Gyrus Cinguli (BA24) bei neun Patienten mit einer Major Depression, sieben Patienten mit bipolarer Störung und sieben Kontrollen zeigte bei beiden Patientengruppen Veränderungen im glutamatergen und GABA-ergen System. Da einige Patienten aus beiden Gruppen durch Suizid starben, führten die Autoren auch eine Analyse der Daten bezüglich suizidalen Verhaltens durch und verglichen die Genexpression der Suizidgruppe mit der Kontrollgruppe (Choudary et al, 2005). Unabhängig von der psychiatrischen Diagnose zeigten die Suizidenten im anterioren Gyrus Cinguli eine signifikant niedrigere Expression der Transkripte für die GABA_A-Rezeptoruntereinheiten *GABRA1* und *GABRB3*.

1.3.5. Genexpressionsstudien zu suizidalem Verhalten

Die Mehrzahl der bisher publizierten Genexpressionsstudien mit *post mortem* Hirngewebe aus dem frontalen Cortex von Suizidenten verwendete die Brodmann Areas neun und zehn. Zwei Studien ermittelten die Genexpression verschiedener Transkripte mittels histochemischer *in situ* Hybridisierung und autoradiografischer Detektion der radioaktiv gelabelten Oligonucleotid-Sonden (Bachus et al, 1997; Caberlotto und Hurd, 2001), während alle anderen Untersuchungen die mRNA-Mengen mithilfe der quantitativen RT-PCR bestimmten.

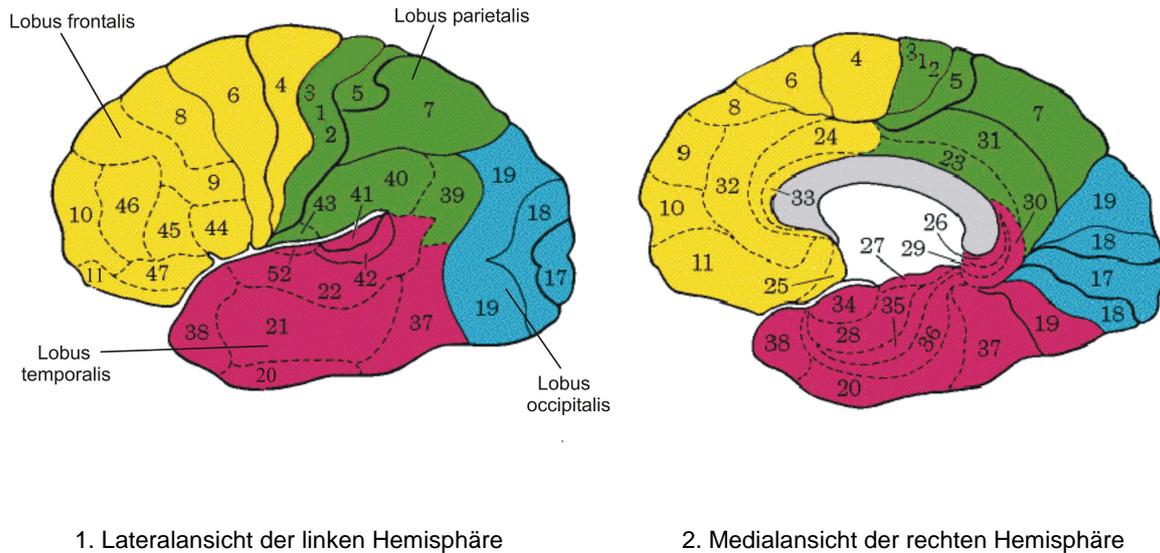


Abbildung 5: Einteilung des Cortex nach Brodmann

Die Bestimmung der mRNA-Level der Tryptophan-Hydroxylase 2 (*TPH2*) im präfrontalen Cortex bei 23 Suizidenten und 23 Kontrollen zeigte keine Unterschiede der Transkriptmengen zwischen den beiden Gruppen (De Luca et al, 2006). Diese zweite Isoform der Tryptophan-Hydroxylase wurde erst vor wenigen Jahren entdeckt (Walther et al, 2003) und ist aufgrund ihrer Bedeutung in der neuronalen Serotonin-Biosynthese von großem Interesse für die Suizidforschung. Die serotonergen Neuronen sind in den Raphe-Kernen des Hirnstamms lokalisiert (Tork, 1990) und besitzen Projektionsbahnen in alle Hirnregionen inklusive des präfrontalen Cortex (Wilson und Molliver, 1991). Eine aktuelle Untersuchung der Genexpression von *TPH2* in den dorsalen und medianen Raphekernen von elf gematchten Suizid-Kontroll-Paaren fand signifikant höhere Mengen an *TPH2*-mRNA in der Suizidgruppe (Bach-Mizrachi et al, 2006).

Insgesamt betrachtet handelt es sich bei den Ergebnissen der Genexpressionsstudien zu suizidalem Verhalten meist noch um Einzelergebnisse, deren Bedeutung für die Pathophysiologie noch nicht funktionell erklärbar sind. Repliziert werden konnte die signifikant erhöhte Expression des 5-HT_{2A}-Rezeptors, die sowohl von einer Microarraystudie als auch von zwei Genexpressionsstudien berichtet worden ist (Pandey et al, 2002; Escriba et al, 2004; Gwady et al, 2005). Diese Hochregulation des 5-HT_{2A}-Rezeptors im präfrontalen Cortex korreliert mit der Serotonin-Hypothese und könnte kompensatorisch durch die niedrige serotonerge Aktivität bei suizidalen Personen bedingt sein (Mann, 2003).

Die Tabelle 4 fasst die signifikanten Ergebnisse der bisher publizierten Genexpressionsstudien zu suizidalem Verhalten im Überblick zusammen, die *post mortem* Hirngewebe aus dem frontalen Cortex verwendet haben.

Tabelle 4: Genexpressionsstudien im frontalen Cortex

Publikation	Kollektiv	Hirnregionen	Gen	Expression
Bachus et al, 1997	Nichtpsychotische Suizidenten	BA9	<i>CCK</i>	Erhöhung
Dwivedi et al, 2001	Suizidenten mit affektiver Störung	BA9 und BA10	<i>MAPK1</i>	Erniedrigung
			<i>MAPK3</i>	Erniedrigung
Caberlotto und Hurd, 2001	Suizidenten, div. Diagnosen	BA9 und BA46, Signifikanz in Layer IV	<i>NPY2R</i>	Erhöhung
Dwivedi et al, 2002	Suizidenten, div. Diagnosen	BA8/9	<i>GNAI2</i>	Erniedrigung
			<i>GNAL</i>	Erniedrigung
			<i>GNAS</i>	Erhöhung
Pandey et al, 2002	Jugendliche Suizidenten	BA8/9	<i>HTR2A</i>	Erhöhung
Dwivedi et al, 2003a	Suizidenten, div. Diagnosen	BA9	<i>CREB1</i>	Erniedrigung
Dwivedi et al, 2003b	Suizidenten, div. Diagnosen	BA9	<i>BDNF</i>	Erniedrigung
			<i>NTRK2</i>	Erniedrigung
Dwivedi et al, 2004	Suizidenten mit affektiver Störung	BA9	<i>PRKAR2B</i>	Erniedrigung
			<i>PRKACB</i>	Erniedrigung
Escriba et al, 2004	Suizidenten mit v.a. affektiver Störung	BA9	<i>ADRA2A</i>	Erhöhung
			<i>HTR1A</i>	Erhöhung
			<i>HTR2A</i>	Erhöhung
			<i>OPRM1</i>	Erhöhung
Merali et al, 2004	Suizidenten mit affektiver Störung	BA10	<i>CRHR1</i>	Erniedrigung
			<i>GABRA1</i>	Erniedrigung
			<i>GABRA3</i>	Erniedrigung
			<i>GABRA4</i>	Erniedrigung
			<i>GABRD</i>	Erniedrigung
Pandey et al, 2004	Jugendliche Suizidenten	BA9	<i>PRKCA</i>	Erniedrigung
			<i>PRKCB1</i>	Erniedrigung
			<i>PRKCG</i>	Erniedrigung
Sherrin et al, 2004	Suizidenten ohne psychiatrische Diag.	Präfrontaler Cortex	<i>CCKBR</i>	Erhöhung
Dwivedi et al, 2005	Suizidenten, div. Diagnosen	BA9	<i>NTF5</i>	Erniedrigung
Pandey et al, 2005	Jugendliche Suizidenten	BA9	<i>PRKAR1A</i>	Erniedrigung
			<i>PRKAR1B</i>	Erniedrigung
Dwivedi et al, 2006	Suizidenten mit affektiver Störung	BA9	<i>RAP1A</i>	Erniedrigung

1.4. Ziel der Arbeit

Suizidales Verhalten entsteht durch ein sehr komplexes Zusammenspiel von Umwelteinflüssen, genetischen Faktoren und der Interaktion zwischen beiden (Balazic und Marusic, 2005). Als gesichert gilt die Bedeutung des serotonergen Systems, und Ergebnisse aus neurochemischen, *post mortem*-, genetischen- und Imaging-Studien deuten auf ein serotonerges Defizit im präfrontalen Cortex von Suizidenten hin, welches die Wahrscheinlichkeit von suizidalem Verhalten in Stresssituationen erhöht (Mann, 2003). Obwohl es sich sehr wahrscheinlich um einen polygenen Erbgang mit mehreren Genen handelt, die jeweils nur einen kleinen Einfluss haben, sind bisher nur wenig Suszeptibilitätsgene für suizidales Verhalten bekannt.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation neuer Kandidatengene für suizidales Verhalten durch die Ermittlung signifikant differentiell exprimierter Gene im orbitofrontalen Cortex von Suizidenten. Dazu wurde eine Microarrayanalyse mit RNA aus *post mortem* Hirngewebe von Suizidenten und Kontrollen durchgeführt. Neben der Ermittlung einzelner, differentiell exprimierter Gene lag ein weiteres Augenmerk der Arbeit auf der Ermittlung von funktionellen Gengruppen und Pathways, die bei der Entstehung des untersuchten Verhaltens von Bedeutung sein könnten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Studienkollektiv

Das *post mortem* Hirngewebe stammte aus dem Institut für Rechtsmedizin und der Klinik für Psychiatrie der Johann-Wolfgang-Goethe Universität in Frankfurt am Main. Insgesamt stand Gewebe von 94 Suizidopfern und 26 Kontrollpersonen, die eines natürlichen Todes gestorben waren, für die Versuche zur Verfügung. Das Alter der Personen aus beiden Gruppen lag zum Zeitpunkt des Todes zwischen 19 und 86 Jahren, das *post mortem* Intervall zwischen 4 und 240 Stunden. 19 der insgesamt 26 Kontrollprobanden, und damit der weitaus größte Teil dieser Gruppe, verstarb durch Herzkreislaufversagen oder Herzinfarkt. Bei den Suizidenten starben 42 durch Erhängen, 22 durch Intoxikationen, 14 durch stumpfe Gewalt, 11 durch Schusswunden und 5 durch andere Methoden.

Aufgrund der geringeren Anzahl an Kontrollen wurden zuerst 10 Hirne aus dieser Gruppe für die Versuche ausgewählt. Anschließend wurde eine Gruppe von 11 Suizidenten so gematcht, dass sich beide Gruppen in wichtigen Kovariablen wie Gewebe-pH-Wert, *post mortem* Intervall, Alter und Geschlecht nicht signifikant unterschieden.

2.1.2. *Post mortem* Gewebe

Die Präparation der *post mortem* Hirne erfolgte in Zusammenarbeit mit der Universität Würzburg und der Universität Frankfurt. Dabei wurde stets auf Trockeneis oder Kryoplaten gearbeitet, um eine Degradation des Gewebes zu vermeiden. Sterile Unterlagen, Handschuhe sowie mit Natronlauge desinfizierte Skalpell und Spatel verhinderten eine Kontamination durch RNasen. Die Präparatoren selbst trugen als Vorsichtsmaßnahme im Umgang mit dem potenziell infektiösen Material Schürzen, Mundschutz und Laborbrillen. Die Hirne wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Ultratiefkühlschrank gelagert, und nach der Entnahme wurde das Gewebe auf eine gekühlte Präparationsplatte gelegt. Anhand einer festgelegten Reihenfolge wurden zunächst die Cortices präpariert und danach Frontalschnitte angefertigt, um die Basalganglien und weitere intracerebral liegende Strukturen zu entnehmen. Zur Präparation des orbitofrontalen Cortex wurde an der Unterseite des Frontallappens in longitudinaler Richtung lateral corticales Gewebe abgeschält. Nach der

Präparation wurden alle gewonnenen Strukturen in Polyethylenbeutel verpackt, beschriftet und in Ultratiefkühlschränken bei -80 °C gelagert.

2.1.3. Reagenzien

Tabelle 5: Chemikalien, Enzyme und Reagenzien

Name	Hersteller
Agarose NEEO Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
BioArrayHigh Yield RNA Transcript Labeling	Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, USA
Chloroform für die Molekularbiologie	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
DNase I, RNase-frei	Qiagen, Hilden
Ethanol Rotipuram p.a.	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung 10 mg/ml	Bio Rad, München
Natronlauge 1-normal	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Random Hexamer Primer	Applied Biosystems, Foster City, USA
RNA Ladder, High Range	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
RNase Away	Molecular BioProducts, Inc., San Diego, USA
RNase Inhibitor	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Salzsäure 1-normal	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Superscript II Choice System	Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersburg; USA
Super Script II Reverse Transkriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
T7-(dT)24 Primer	Genset Corp., La Jolla, USA
Wasser für die Molekularbiologie	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim

Sämtliche selbst hergestellte Puffer dieser Arbeit wurden, falls nicht anders vermerkt, mit destilliertem Wasser angesetzt.

Tabelle 6: Pufferlösungen

Pufferlösungen	Hersteller / Zusammensetzung
pH 4,01 Pufferlösung HI7004	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
pH 7,01 Pufferlösung HI7007	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
pH 10,01 Pufferlösung HI7010	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
0,5-fach TBE-Puffer	5,400 g Tris-Base 2,750 g Borsäure 0,375 g Na ₂ EDTA Aqua dest. ad 100,0 ml
TE-Puffer	2,42 g Tris-Base 0,74 g Na ₂ EDTA Aqua dest. ad 2000,0 ml pH 7,5

2.1.4. Verbrauchsmaterial

Tabelle 7: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Abdecktücher Steril Secu Drape 45 x 75 cm	Sengewald Klinikprodukte GmbH, Rohrdorf
Einmalhandschuhe Semper Care Nitril	Semperit Ges.m.b.H., Wien, Österreich
Einmalhandschuhe Semper Care Edition	Semperit Ges.m.b.H., Wien, Österreich
Eppendorf Tubes PP 1,5 ml und 2,0 ml	Josef Peske, Aindling
Falcon Tubes 15 ml und 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Parafilm Laboratory Film „M“	American National Can, Greenwich, USA
PCR Softstrips 0,2 ml farblos	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
PCR Strip Tubes 0,1 ml für die qRT-PCR	Corbett Research, Sydney, Australien
Pipettenspitzen RNase-frei	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Biosphere Quality Tips (1000 µl, 200 µl, 10 µl)	
Mundschutzmasken Roeko Protecta Quick	Coltène/Whaledent GmbH + Co. KG, Langenau
Skalpelle No.11 zum Einmalgebrauch	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Trockeneis	TKD Distribution GmbH, München

2.1.5. Oligonucleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonucleotide wurden von der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe) synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert. Durch Rekonstitution mit einer entsprechenden Menge TE-Puffer wurden die Primer-Stammlösungen mit einer Konzentration von jeweils 100 pmol/µl hergestellt. Für die qRT-PCR wurden Aliquots der Stammlösungen mit RNase-freiem Wasser um den Faktor 10 verdünnt und bei –20 °C gelagert. Das Primerdesign erfolgte mithilfe der webbasierten Software Primer3 des Whitehead Institute for Biomedical Research (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Tabelle 8: Einstellungen in Primer 3

Kriterium	Einstellung
Source Sequence	Copypaste der gewünschten Gensequenz
Excluded Regions	Ausschluss von polymorphen Regionen in der Sequenz
Product Size Range	50-150
Primer Size	Min. 19 Opt. 20 Max. 24
Primer Tm	Min. 58 Opt. 59 Max. 60
Max Tm Difference	1
Max 3´ Self Complementarity	1.00
Max Poly-X	3

Da die qRT-PCR eine sehr empfindliche Methode der Genexpressionsmessung darstellt, ist das Design optimaler Primer unerlässlich für erfolgreiche Validierungsversuche (Mimmack et al, 2004). Alle Primerpaare wurden so gewählt, dass die Produkte eine ideale Länge von 50 bis 150 Basenpaaren hatten und die Schmelztemperaturen der beiden Primer eine möglichst geringe Differenz unter 1 °C aufwiesen. Die in diesem Programm verwendeten Grundeinstellungen sind in Tabelle 8 aufgeführt. Die dort genannten Kriterien waren dabei keine absoluten Werte, sondern Idealwerte. Im Falle einer erfolglosen initialen Primersuche wurde eine zweite Suche mit weniger strengen Parametern angeschlossen. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Primer, Produktlängen und Annealing-Temperaturen der qRT-PCR

Gen	Primer vorwärts Sequenz 5'-3'	Primer rückwärts Sequenz 5'-3'	Produkt [bp]	Temp. [°C]
<i>ACTB</i>	ACCCAGCACAATGAAGATCAA	AGTACTTGCGCTCAGGAGGA	50	61
<i>AMPH</i>	GGCTTTCTCTACAAGGTGGAA	CCCTTTGTAAGGTAAGTTCATCAG	73	59
<i>CDCA7L</i>	ATCTGGAGAGCTTACAAAAGGAG	GGTATGCATGTCTTGTGGAGT	101	59
<i>CDH12</i>	CAAGCCAGGACAGATAATTCAG	GCCTCAGGTGATAATCTAAAGGA	93	59
<i>CDH22</i>	GTCGTCAGAGAAACCATGAGG	CGGGTCACAGCCACTTCT	77	62
<i>CHGB</i>	CCAAGTCCTGAAGACGAGTAGA	GCATCAGCTGGGTCTCTTAAC	102	63
<i>EFEMP1</i>	GGAGCAGTGCCTAGACATAGA	GGCAATAAAATGAGCCTGGT	86	59
<i>GAPDH</i>	AACAGCGACACCCACTCCT	TGCTGTAGCCAAATTCGTTG	106	61
<i>K-ALPHA-1</i>	TCTGGTTAGATTGTTTTCACTTGG	AATGACTTTACTTTGAGATATGATGGA	87	60
<i>MLC1</i>	GATCCTAGTGGCCTGCTTTC	AGGACCTCCACCAGACACTT	81	59
<i>MYR8</i>	CACACCACTCAGGTAATCCATC	TCCTCCAGTCCAAGAGTTCC	79	60
<i>PCDHB5</i>	TCTACGCTCTCCAGCCCTAC	GCAAATCATCCTACCGTTGTC	102	60
<i>PENK</i>	AACTTCCTGGCTTGCCTAAT	GAGGAAGCTCTGGTTTGGAC	103	60
<i>POLR2A</i>	AGACCGGCTATAAGGTGGAA	CTGCCGGTTGAAGATAACAA	62	59
<i>PTPRR</i>	ACAGCCTAAGGCAGATTTTGT	AATGTCTTCAGCAGCTCATCC	120	60
<i>RPL13A</i>	TGCTGTTGTACACAGGGTATTCT	CCTGTAACCCCTTGGTTGTG	70	61
<i>S100A13</i>	GTCACCACCTTCTTCACCTT	CCCACATCCTTGAGCAGA	113	60
<i>SCN2B</i>	AGGAGATGTTCCCTCCAGTTCC	GTTTCTCAGCATCACCGACA	119	61
<i>UBC</i>	GTTGAGCCCAGTGACACCA	TCCAGCAAAGATCAGCCTCT	93	61
<i>ZFP36</i>	CCATCTACGAGAGCCTCCTG	GACTCAGTCCCTCCATGGTC	70	59

Zur Vermeidung der Amplifikation von unerwünschten PCR-Produkten wurden mit dem Programm SNPper (<http://snpper.chip.org/bio/snpper-enter>) die Exon-Exon-Grenzen der Transkripte identifiziert und ein Primer je Primerpaar über einen Übergang gelegt. Weiterhin wurden alle Sequenzen vermieden, die zur Bildung von Hairpin-Loops, Homo-Dimeren oder Hetero-Dimeren neigten. Die möglichen Primerpaare wurden dazu mit der Oligo-Analyzer 3.0 Website

(<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>) analysiert. Die Spezifität der Primer wurde abschließend durch die Software Nucleotide-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) überprüft.

2.1.6. Geräte

Tabelle 10: Geräte

Geräte	Typ	Hersteller
Analysenwaage	Ohaus Explorer E10645	Ohaus Corporation, Pine Brook, USA
Dampfsterilisator	Varioklav Sterilisator 500E	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Eagle Eye II	Stratagene Eagle Eye II	Stratagene, La Jolla, USA
Eismaschine	Scotsman AF-10	Frimont S.p.a., Mailand, Italien
Elektrophoresekammern	Wide Mini-Sub Cell GT	Bio Rad GmbH, München
Geldokumentation	Video Copy Processor P68E	Mitsubishi Electric Corp., Tokyo, Japan
Kühlschrank	Bosch Economic Cooler	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5402	Eppendorf GmbH, Hamburg
Laborwaage	Precisa 1620C	Precisa Instruments AG, Dietikon, Schweiz
pH-Meter	Analog pH-Meter CG711	Schott Geräte GmbH, Hofheim
Pipetten	Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg
Real-Time Thermocycler	Rotor Gene 2000	Corbett Research, Sydney, Australien
Spannungsquelle	Bio Rad Power Pac 300	Bio Rad GmbH, München
Thermocycler	Eppendorf Mastercycler	Eppendorf GmbH, Hamburg
Thermocycler	MJ Tetrad	MJ Research, Cambridge, USA
Tiefkühlschrank -20 °C	Bosch Economic	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415C	Eppendorf GmbH, Hamburg
Trockenschrank	Heraeus SUT 6200	Heraeus Instruments, Hanau
Ultra-Tiefkühlschrank	Innova U725-86 Freezer	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Ultra-Turrax	Ultra Turrax T25	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Vakuum-Trockenschrank	Heraeus VTR 5036	Heraeus Instruments, Hanau
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA

2.1.7. Software

Für die Auswertung der Arrays wurde zuerst die von Illumina entwickelte und bereitgestellte AnEx-Software verwendet. Die alternative Analyse erfolgte mit der Internet-basierten Gene Expression Analysis Suite GEPAS. Die Auswertung der quantitativen RT-PCR wurde mithilfe der 'Rotor Gene 4.6'-Software und der 'Statistical Package for Social Sciences' Version 12.0.1 durchgeführt. Daneben kamen noch weitere Datenbanken und Anwendungen zum Gebrauch, die in Tabelle 11 aufgeführt sind.

Tabelle 11: Software

Anwendung	Software	Hersteller / Internetadresse
Arrayanalyse	AnEx Version 1.3.0.7.	Illumina, Inc., San Diego, USA
Arrayanalyse GEPAS	GEPAS v3.0 T-Rex	http://t-rex.bioinfo.cipf.es/cgi-bin/t-rex.cgi
Bildverarbeitung	Corel Draw 10	Corel Corp., Ottawa, Kanada
Gensequenzssuche	NCBI Entrez Gene	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi
Markierung der Exons	SNPper	http://snpper.chip.org/bio/snpper-enter
Pathwayanalyse	Webgestalt	http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/
Primeranalyse	Oligo Analyzer 3.0	http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx
Primerdesign	Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
Primerspezifität	BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Auswertung qRT-PCR	Rotor Gene 4.6	Corbett Research, Sydney, Australien
Statistische Auswertung	SPSS 12.0.1	SPSS Inc., Chicago, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Messung des pH-Werts

Die pH-Messung erfolgte mit einem pH-Meter CG711 mit Einstabmeßelektrode, welches vor den Messungen mit standardisierten pH-Pufferlösungen kalibriert wurde. Das destillierte Wasser für die Homogenisierung der Gewebeproben wurde zuerst mit 200 mg KCl leitfähig gemacht und dann mit 0,1-N Natronlauge und 0,1-N Salzsäure auf pH 7,0 eingestellt. Für die pH-Messung wurde jeweils circa 500 mg gefrorener Cortex in ein Falcon-Röhrchen mit 1,5 ml Aqua dest. gegeben. Das Gewebe wurde anschließend unverzüglich mit dem Ultra-Turrax bei 20.000 U/min für circa 20 Sekunden homogenisiert und der pH-Wert durch Eintauchen der Glaselektrode bestimmt.

2.2.2. Aufbereitung der Nukleinsäuren

2.2.2.1. RNA-Extraktion

Die Isolierung der RNA aus den Gewebeproben erfolgte unter Verwendung des RNeasy Lipid Tissue Kits der Firma Qiagen unter leichter Abwandlung des vom Hersteller angegebenen Protokolls. Dieses Reagenzien-Set ist speziell für die Extraktion von RNA aus fettreichem Gewebe, wie es das Gehirn darstellt, entwickelt worden. Der verwendete Qiazol Lysis Puffer enthält Phenol und Guanidin-Thiocyanat.

Tabelle 12: Inhalt des RNeasy Lipid Tissue Kit

RNeasy Lipid Tissue Kit	Funktion
Collection Tubes	Elution und Lagerung der RNA
Puffer RW1	Waschpuffer
Puffer RPE	Waschpuffer
Qiazol Lysis Reagenz	Lyse des Gewebes
RNase-freies Wasser	Eluent
RNeasy Mini Spin Columns	selektive Bindung der RNA
Zusätzliche Materialien	Funktion
Chloroform	Phasentrennung
DNase	Verdau kontaminierender genomischer DNA
RNase Away	Inaktivierung kontaminierender RNasen

Vor Beginn der Extraktion wurden alle Flächen mit RNase Away gewischt, um eine mögliche Kontamination durch RNasen zu vermeiden. Es wurden nur sterile (Skalpelle, Handschuhe) oder frisch sterilisierte (Alufolie, Eppendorf Tubes) Einmalartikel verwendet. Die Gewebeproben wurden aus dem Ultra-Tiefkühlschrank entnommen und, noch in Tüten verpackt, fünf Minuten auf Nasseis gelagert. Es wurde von jeder Probe ein circa 75 mg schweres Stückchen Gewebe mit einem Einmalskalpell auf steriler Alufolie geschnitten, in ein tariertes Eppendorf-Tube überführt und auf der Analysenwaage abgewogen. Direkt im Anschluss an das Schneiden und Wiegen wurden die Proben unverzüglich zurück in den Ultra-Tiefkühlschrank gebracht, um ein Antauen der Proben und eine damit mögliche Degradation zu vermeiden.

Vor der eigentlichen RNA-Extraktion und zwischen den einzelnen Proben wurde der Ultra-Turrax mit Ethanol und RNase Away gespült. Anschließend wurden die geschnittenen Gewebestückchen aus dem Ultra-Tiefkühlschrank entnommen, in ein 15 ml Falcon-Tube mit 1000 µl Qiazol-Lysis Reagenz versetzt und bei einer Drehzahl von 25.000 U/min 20 Sekunden homogenisiert. Zur vollständigen Lyse und Dissoziation der Nukleoproteinkomplexe wurden die homogenisierten Proben anschließend 10 Minuten auf Nasseis inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde gevortext und 15 Minuten bei 4° C und 15.000 U/min zentrifugiert. Die entstehende oberste, wässrige Phase enthielt die RNA und wurde vorsichtig abpipettiert, um keine DNA aus der Interphase zu verschleppen. Diese wässrige Lösung wurde dann über eine RNeasy Mini Column zentrifugiert; dabei wurde die enthaltene RNA von der Silika-Membran gebunden. Nach einem Waschschrift

erfolgte anschließend der Verdau von eventuell vorhandener genomischer DNA durch direkte Zugabe von aliquotierter DNase auf die Silika-Membran und 15-minütige Inkubation. Nach drei Waschschrritten zur Entfernung der DNase erfolgte abschließend die Elution der RNA mit insgesamt 80 µl RNase-freiem Wasser in ein Eppendorfgefäß.

2.2.2.2. Photometrische Gehaltsbestimmung

Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch UV-photometrische Bestimmung der Absorption bei 260 nm mit einem GeneQuant Photometer. Dazu wurden 2 µl der Lösung mit 98 µl TE-Puffer verdünnt und gegen reinen TE-Puffer als Referenz gemessen. Die Reinheit der RNA kann durch Ermittlung des Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm (OD 260 nm/OD 280 nm) abgeschätzt werden. Reine RNA besitzt bei einem pH-Wert von 7,5 einen A260/A280-Quotienten zwischen 1,9 und 2,1 (Wilfinger et al, 1997).

Nach der photometrischen Gehaltsbestimmung wurde jeweils 1 µg RNA für die Gelelektrophorese entnommen und die restliche RNA-Lösung bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3. RNA-Gelelektrophorese

Die Integrität der RNA wurde durch Elektrophorese der Lösung in 1 %-igen ethidiumbromidhaltigen Agarosegelen (m/V) überprüft. Ein jeweils 1 µg RNA entsprechendes Volumen Lösung wurde mit 2 µl Loading-Dye versetzt und mit Wasser auf 15 µl ergänzt. Die Auftrennung erfolgte in 0,5 x - TBE-Puffer bei 100 V für 40 Minuten. Die Gele wurden mit dem Stratagene Eagle Eye II detektiert, mit dem Video Copy Processor P68E dokumentiert und digital auf einem angeschlossenen PC gespeichert. Proben guter Qualität zeigten deutliche, klar sichtbare Banden ribosomaler 18S- und 28S-RNA.

2.2.2.4. Qualitätskontrolle mit dem Agilent-Bioanalyser

Anschließend an die Gelchromatographie wurden alle Proben mit Zeichen von stärkerer Degradation ausgeschlossen und die verbleibenden Proben mittels eines Agilent 2100 Bioanalyser untersucht. Dabei wurde die totale RNA unter Verwendung von RNA 6000 Nano LabChips kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und detektiert. Anhand der resultierenden Elektropherogramme wurden die Mengen an 18S und 28S-RNA quantifiziert und die RNA-Qualität beurteilt.

2.2.3. Microarrayexperimente

2.2.3.1. Überblick

Die Untersuchung erfolgte im Fall-Kontroll-Design und basierte auf dem Vergleich der Genexpression der Transkripte zwischen den beiden Gruppen. Das Matchen erfolgte unter besonderer Berücksichtigung der wichtigen Kovariablen pH-Wert, Alter der Personen, Geschlecht sowie *post mortem* Intervall. Nach Auswahl von zehn Kontrollen und elf Suizidenten wurde mRNA aus dem orbitofrontalen Cortex extrahiert und die Expression von mehr als 23.000 Transkripten durch Microarrayversuche ermittelt. Die Bestimmung der differentiellen Genexpression mittels eines Gruppenvergleichs dient zur Identifizierung neuer Kandidatengene für suizidales Verhalten, die möglicherweise an der Ätiologie des Suizids beteiligt sein könnten. Die Validierung ausgewählter Ergebnisse erfolgte mit der quantitativen RT-PCR mit Real-Time Detektion als zweiter, unabhängiger Methode. Anschließend an die Analysen auf der Ebene einzelner Gene erfolgte eine Überprüfung der Daten hinsichtlich signifikanter biologischer Funktionskreise und Pathways, aus denen überzufällig häufig viele Gene in der Suizidgruppe differentiell exprimiert waren. Ein Vergleich der Ergebnisse mit publizierten Untersuchungen diente der abschließenden Beurteilung und Einordnung der Resultate.

2.2.3.2. Bead Chip-Technologie

Die Experimente wurden mit kommerziell erhältlichen Sentrix HumanRef-8 Bead Chips der Firma Illumina (San Diego, USA) durchgeführt, welche die Expression von mehr als 23.000 NCBI Reference Sequence Transkripten messen. Der englische Begriff Bead bezeichnet die künstlichen Kügelchen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 3,0 μm , die auf der angeätzten Silikonoberfläche eines Glaträgers, des sogenannten 'Chips' gebunden sind. An jedem genspezifischen Beadtyp sind circa 30.000 gleichartige, synthetische Oligonucleotid-Sonden vorhanden, die spezifisch ein Transkript binden können (Steemers und Gunderson, 2005). Diese Sonden bestehen aus einer 23 Basen langen 'Adresse', die zur Überprüfung des Beadtyps dient, und aus der 50 Basen langen, genspezifischen Sonde (Dickinson und Craumer, 2003). Jeder Beadtyp selbst ist durch absichtliches Oversampling im Durchschnitt 30 mal pro Array vorhanden; diese Redundanz erhöht die Präzision und Robustheit der Expressionsmessung und damit insgesamt die Messgenauigkeit. Durch die

genannten Faktoren besitzt der Sentrix HumanRef-8 Array eine ausreichende Genauigkeit, um Genexpressionsänderungen des Faktors 1,3 mit einem Konfidenzintervall von 95 % detektieren zu können (Kuhn et al, 2004). Durch die geringen Dimensionen der Beads ist es möglich, acht einzelne Arrays zusammen auf einem Glasträger unterzubringen (Abbildung 6).

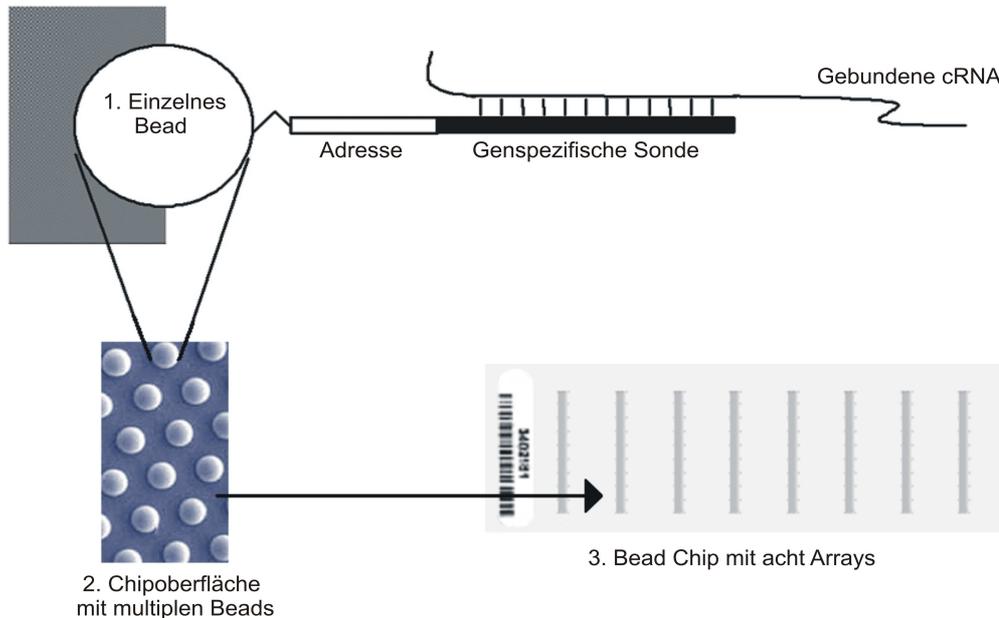


Abbildung 6: Aufbau der Bead Chips

Ein experimenteller Vergleich der Illumina Plattform mit dem Affymetrix HG-U133 plus 2.0 Array zeigte eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse, insbesondere für die als differentiell deklarierten Gene (Barnes et al, 2005).

2.2.3.3. Synthese der cRNA

Die Synthese der cRNA erfolgte in Zusammenarbeit mit der Firma Illumina unter Verwendung des Illumina-Amp-Kits (Ambion Inc., Woodward, USA).

Die Abbildung 7 gibt einen schematischen Überblick über die RNA-Aufbereitung. Im ersten Schritt diente die mRNA als Vorlage zur Synthese von Einzelstrang-cDNA durch eine Reverse Transkription mit T7-Oligo-dT-Primern. Nach Abbau der mRNA wurde der zweite, komplementäre cDNA-Strang durch eine DNA-Polymerase gebildet. Ein zwischengeschalteter Reinigungsschritt entfernte Primer, Enzyme, Salze und RNA-Reste; dadurch wurden Störungen der nachfolgenden Reaktionen vermieden. In der eigentlichen *in vitro* Transkription wurden dann multiple cRNA-

Kopien unter Verwendung der doppelsträngigen cDNA als Vorlage synthetisiert. Dieser Schritt beinhaltet die Amplifikation und das Labeling der entstehenden cRNA in einem. Abschließend diente ein weiterer Reinigungsschritt zur Entfernung von überschüssigen Nucleotidtriphosphaten, Salzen, Enzymen und anorganischem Phosphat.

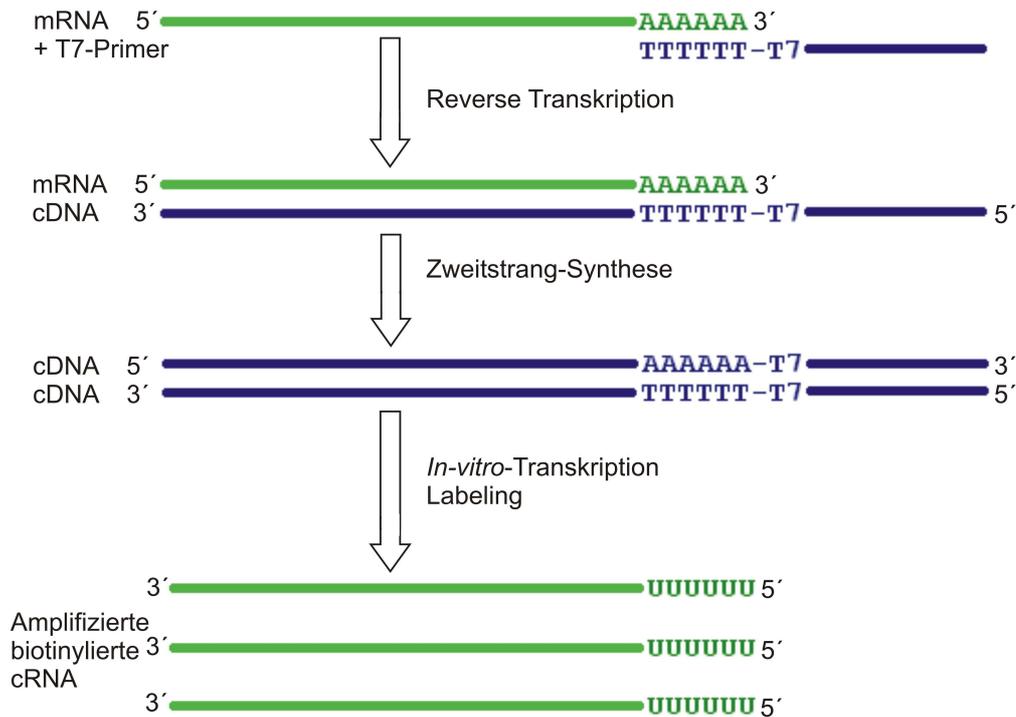


Abbildung 7: Schematischer Ablauf der RNA-Aufbereitung

2.2.3.4. Experimentelles Layout

Die 21 RNA-Proben wurden auf vier Bead Chips mit je acht einzelnen Microarrays verteilt. Auf jedem Bead Chip wurde zusätzlich je eine Referenz-RNA aufgetragen, welche zur Kontrolle der Microarrayversuche diente. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Versuche wurden die Proben Kon A, Kon G, Suz G und Suz I als Labelingreplikate sowie Suz K als Hybridisierungsreplikat zwei mal hybridisiert. Insgesamt ergibt sich so eine Gesamtzahl von 30 hybridisierten Proben bei zwei freibleibenden Arrays.

Die Proben für die Labelingreplikate wurden in je zwei Tubes aliquotiert und in separaten Ansätzen prozessiert. Diese technische Replikation diente zur

Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Amplifikation und des Labelings der RNA. Durch die Replikate erhöhte sich die Gesamtzahl der Proben auf 30, sodass alle weiter unten aufgeführten Mastermixe mit einem Sicherheitsaufschlag versehen und für 34 Proben kalkuliert wurden.

Tabelle 13: Experimentelles Layout und Technische Replikate

Array	Bead Chip A	Bead Chip B	Bead Chip C	Bead Chip D
1	KON A LR	KON D	KON G	KON I
2	KON B	KON E	KON H	KON K
3	KON C	KON F	SUZ G	SUZ I
4	SUZ A	SUZ D	SUZ H	SUZ K
5	SUZ B	SUZ E	KON G LR	SUZ I LR
6	SUZ C	SUZ F	SUZ G LR	-
7	KON A	SUZ K HR	SUZ L	-
8	Referenz-RNA	Referenz-RNA	Referenz-RNA	Referenz-RNA

LR = Labelingreplikate; HR = Hybridisierungsreplikate

Die Probe Suz K wurde als Hybridisierungsreplikate nach dem Labeling auf zwei verschiedenen Bead Chips analysiert, um den Einfluss der Hybridisierung auf die Ergebnisse und die Reproduzierbarkeit der Versuche zu überprüfen.

2.2.3.5. Erststrang-Synthese

Für die Erststrang-Synthese wurden jeweils 100 ng totale RNA in PCR-Tubes vorgelegt, mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 11,0 µl aufgefüllt und 9,0 µl Mastermix addiert (Tabelle 14).

Tabelle 14: Mastermix für die Erststrang-Synthese

Reagenz	Menge für 1 Reaktion [µl]	Gesamtmenge [µl]
T7 Oligo(dT)-Primer	1,0	34,0
10-fach First Strand Puffer	2,0	68,0
dNTP Mix	4,0	136,0
RNase Inhibitor	1,0	34,0
Array Script Reverse Transkriptase	1,0	34,0
Summe	9,0	306,0
RNA (100 ng vorgelegt)	11,0	-

2.2.3.6. Zweitstrang-Synthese

Während dieses Reaktionsschrittes erfolgte simultan der Abbau der mRNA durch RNase H sowie die Synthese des zweiten DNA-Strangs durch die DNA-Polymerase.

In jedes Tube mit 20 µl Reaktionslösung aus der Erstrang-Synthese wurden 80 µl Mastermix gegeben und bei 16 °C für 2 Stunden inkubiert.

Tabelle 15: Mastermix für die Zweitstrang-Synthese

Reagenz	Menge für 1 Reaktion [µl]	Gesamtmenge [µl]
Wasser	63,0	2142,0
10-fach Second Strand Puffer	10,0	340,0
dNTP Mix	4,0	136,0
DNA Polymerase	2,0	68,0
RNase H	1,0	34,0
Summe	80,0	2720,0

2.2.3.7. *In vitro* Transkription und Labeling

Nach einem Waschschrift wurden die Proben im nächsten Schritt *in vitro* transkribiert und gleichzeitig mit Biotin markiert. Dies erfolgte durch die Zugabe von Biotin-16-UTP, welches in der Reaktion stöchiometrisch anstelle von UTP inkorporiert wurde. Die Reaktion erfolgte über Nacht für 16 Stunden bei 37 °C.

Tabelle 16: Mastermix für die *in vitro* Transkription mit Labeling

Reagenz	Menge für 1 Reaktion [µl]	Gesamtmenge [µl]
Biotin-16-UTP	3,75	127,5
T7-ATP	1,0	34,0
T7-CTP	1,0	34,0
T7-GTP	1,0	34,0
T7-UTP	0,5	17,0
T7-10-fach Reaktionspuffer	1,0	34,0
T7 Enzymmix	1,0	34,0
Wasser	0,75	25,5
Summe	10,0	340,0

Abschließend wurde die erhaltene cRNA über eine RNeasy Mini Spin Column der Firma Qiagen zentrifugiert, mehrfach gewaschen und schließlich mit 100 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

2.2.3.8. Hybridisierung der Arrays

Die 21 Proben sowie die vier Labelingreplikate und das Hybridisierungsreplikate wurden auf vier Bead Chips mit je acht einzelnen Arrays aufgeteilt. Darüber hinaus wurde auf jedem Chip eine universale Referenz-RNA hybridisiert, die zur globalen Überprüfung der Arrayversuche diente. Insgesamt wurden so 30 Einzelarrays durchgeführt.

Von jeder Probe wurden 28,0 µl cRNA-Lösung auf den entsprechenden Array pipettiert, im Hybridisierungssofen plaziert und bei 55 °C für 20 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden zuerst ungebundene cRNAs durch stringentes Waschen restlos entfernt. Anschließend erfolgte die Färbung der an die Arraysonden gebundenen cRNAs durch Zugabe von Streptavidin-Cy3. Das aus Streptomyces-Arten isolierte Streptavidin besitzt eine hohe Affinität zu Biotin und bildet mit diesem einen hochstabilen Komplex (Chaiet und Wolf, 1964). Dadurch kann die biotinylierte cRNA spezifisch detektiert werden.

2.2.3.9. Scannen der Microarrays

Das Scannen der Microarrays erfolgte direkt im Anschluss an die Hybridisierung unter Verwendung eines BeadArray Readers mit einer Auflösung von ~0,8 µm. Der BeadArray Reader wurde über die Sentrix Scan Software gesteuert, und alle Arraybilder wurden automatisch registriert und auf Festplatte gespeichert.

2.2.4. Quantitative RT-PCR

2.2.4.1. Synthese der cDNA für die qRT-PCR

Die cDNA-Synthese für die qRT-PCR erfolgte mit je 1,0 µg totaler RNA unter Verwendung der Superscript II Reversen Transkriptase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und Random Hexamer Primern (Applied Biosystems, Foster City, USA). Ein systematischer Vergleich verschiedener Methoden für die Reverse Transkription zeigte, dass die Verwendung von Random Hexamer Priming zu den besten Ergebnissen in der nachfolgenden qRT-PCR führt (Miller und Yolken, 2003). Zuerst wurde die RNA in PCR-Stripes vorgelegt und mit RNase-freiem Wasser ad 6,0 µl ergänzt. Dann wurde der Mastermix pipettiert und jeweils 14,0 µl zu jedem Reaktionsansatz addiert. Die Inkubation erfolgte in einem Eppendorf Mastercycler nach folgendem Programm:

- 10 Minuten / 25 °C (Anlagerung der Primer)
- 50 Minuten / 42 °C (Reverse Transkription)
- 15 Minuten / 70 °C (Inaktivierung der Enzyme)
- 4 °C (Aufbewahrung)

Zusätzlich zu den 21 in den Arrays verwendeten Proben wurden noch 13 weitere Proben zur Erstellung einer Standardkurve revers transkribiert. Die Proben für die Standardkurve stammten ebenfalls aus dem orbitofrontalen Cortex von Suizidenten und Kontrollen, und die RNA wurde wie unter 2.2.3. beschrieben extrahiert. Die

Standardlösungen dienten später zur relativen Quantifizierung der Transkriptmengen in der qRT-PCR. Der Mastermix wurde mit einem Sicherheitsaufschlag für 40 Reaktionen berechnet.

Tabelle 17: Mastermix für die Reverse Transkription und Inkubationsschema

Reagenz	Menge für 1 Reaktion [μ l]	Gesamtmenge [μ l]
5-fach RT-Puffer	4,0	160,0
DTT	2,0	80,0
dNTP-Mix	1,0	40,0
Random Hexamer Primer	1,0	40,0
Superscript II Reverse Transkriptase	1,0	40,0
RNase Inhibitor	0,5	20,0
RNase-freies Wasser	4,5	160,0
Summe	14,0	560,0
Totale RNA (vorgelegt)	6,0 μ l	-

Nach der Reversen Transkription wurden die 21 Proben aus den Microarrays 1:50 mit PCR-Wasser verdünnt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Konzentration der resultierenden cDNA-Lösungen betrug dadurch $1\text{ ng}/\mu\text{l}$, bezogen auf die in der Reversen Transkription eingesetzte Menge an totaler RNA.

Zur Herstellung der Standardlösungen für die qRT-PCR wurden die entsprechenden Proben gepoolt und die resultierende Stammlösung wurde mit Aqua dest. auf Konzentrationen von $10\text{ ng}/\mu\text{l}$, $3\text{ ng}/\mu\text{l}$, $1\text{ ng}/\mu\text{l}$, $0,3\text{ ng}/\mu\text{l}$ und $0,1\text{ ng}/\mu\text{l}$ verdünnt. Dadurch wurde ein Konzentrationsbereich von zwei Zehnerpotenzen durch die Verwendung von fünf Standardlösungen abgedeckt.

2.2.4.2. Durchführung der qRT-PCR

Die qRT-PCR wurde mit einem Rotorgene 2000 Real Time Thermocycler (Corbett Research, Australien) und dem Absolute qPCR SYBR Green Mix (Abgene, Hamburg) durchgeführt. Die Detektion der entstehenden PCR-Produkte erfolgte durch den Cyaninfluoreszenzfarbstoff Sybr-Green II, der in doppelsträngige DNA interkaliert und nur in diesem Zustand zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Der Rotorgene 2000 besitzt 72 Probenplätze, sodass alle Proben doppelt bestimmt werden konnten. Die Standardlösungen wurden zur Erhöhung der Messgenauigkeit in Triplikaten eingesetzt.

Pro 25 µl Reaktionsansatz wurden je 10,0 µg RNA, 10,0 pmol Primer forward, 10,0 pmol Primer reverse sowie 12,5 µl Abgene 2-fach Puffer eingesetzt. Die PCR-Bedingungen sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Bedingungen der qRT-PCR

Schritt	Funktion	Temperatur	Dauer
1.	Initiale Denaturierung und Aktivierung der Polymerase	95 °C	15 Min.
2.	2-Schritt Cycling		
	Denaturierung	95 °C	15 Sek.
	Annealing & Extension	60 °C	60 Sek.
	Fluoreszenzmessung bei 510 nm		
	40 Zyklen		
3.	Schmelzkurvenbestimmung	60 – 99 °C	

Die Spezifität der Reaktion wurde durch die Schmelzkurvenanalyse bestimmt. Nur Experimente mit einem Hauptpeak ohne Nebenprodukte wurden für die weitere Auswertung berücksichtigt.

2.3. Auswertung der Daten

2.3.1. Normalisierung der Arraydaten

Die Auswertung und Normalisierung der gescannten Arraybilder erfolgte mithilfe der Illumina AnEx Software in der Version 1.3.0.7. Diese Software verwendet zur Analyse der Experimente die Rohdaten, also die auf dem Rechner gespeicherten Arraybilder mit den Signalintensitäten der einzelnen Sonden. Zuerst wurden eine Kontrollgruppe und eine Suizidgruppe definiert und alle Proben entsprechend zugeordnet. Nach Auswahl der gewünschten Normalisierungsmethode, dem statistischen Modell und dem Speicherort erfolgte die Analyse der Daten und die Speicherung der Ergebnisse in Form einer Excel-CSV-Datei.

2.3.1.1. Hintergrund-Subtraktion

Zuerst wurde eine Hintergrund-Subtraktion durchgeführt, bei der ein konstanter Wert von allen Signalintensitäten abgezogen wurde. In jedem Array sind mehrere Sonden enthalten, die als Negativkontrollen dienen. Diese Sonden enthalten Sequenzen, die mit keiner humanen mRNA hybridisieren und so ein verlässliches Maß für das Rauschen darstellen. Das Hintergrundsignal entsteht durch unspezifische Hybridisierungen, unspezifisches Farbstoffsignal und Ungenauigkeiten des

Scanners. Die Applikation dieser Normalisierungsmethode verbessert insbesondere die Bestimmung von Expressionsunterschieden bei schwach exprimierten Genen.

2.3.1.2. Globale Normalisierung

Anschließend an die Hintergrund-Subtraktion wurde eine globale Normalisierung durchgeführt. Dabei wurden die Durchschnittsintensitäten der einzelnen Arrays auf ein gemeinsames Niveau adjustiert. Diese Methode ist besonders geeignet für genomweite Expressionsbestimmungen, bei denen eine große Anzahl von Transkripten untersucht wird und die einzelnen Proben aus dem gleichen Gewebe stammen. Die globale Normalisierung verbesserte die Qualität der Daten und die Vergleichbarkeit der Daten zwischen den einzelnen Arrays.

2.3.2. Differentielle Genexpressionsanalyse

2.3.2.1. Überblick

Die Analyse der differentiellen Genexpression ermittelte, ob und in welchem Umfang Transkripte in der Suizidgruppe schwächer oder stärker exprimiert waren. Als Referenzgruppe diente die Kontrollgruppe aus allen zehn Proben. Als statistisches Modell zur Berechnung der differentiellen Genexpression diente ein t-Test unter Annahme der Varianzgleichheit zwischen den Arrays. Die Ausgabe der Ergebnisse durch AnEx erfolgte dabei in Tabellenform im Excel-CSV-Format wie in Tabelle 19 schematisch dargestellt. Dabei dort aus Platzgründen nur die Werte für die Suizidgruppe dargestellt. Bei den Originaltabellen sind zusätzlich rechts anschließend die Werte der Kontrollgruppe vorhanden. Es sind jeweils die Extremwerte der Signalintensitäten für jedes Gen sowie die Mittelwerte beider Gruppen angegeben.

Tabelle 19: Ergebnis einer differentiellen Genexpressionsanalyse

AnEx version 1.3.0.7 ^{*1} Normalization = average Array Content = 11188230_100CP_MAGE-ML.xml Error Model = t-test DateTime = 03.04.2006 15:42										
TargetID ^{*2}	MIN ^{*3} Suizid	AVG ^{*4} Suizid	MAX ^{*5} Suizid	N ^{*6} Arrays	Array ^{*7} STDEV	Bead ^{*8} STDEV	AVG N ^{*9} Beads	Det ^{*10} Score	Diff ^{*11} Score	Con. ^{*12}
GI_10047089-S	117,2	209,0	333,6	11	66,3	15,4	29	1,00	16,5	1
GI_10047091-S	13655,3	15794,9	17574,7	11	1201,7	451,3	30	1,00	13,0	1
GI_10047093-S	448,6	553,1	723,9	11	75,2	34,4	21	1,00	-5,2	1
GI_10092668-S	-32,7	-15,1	9,2	11	12,2	8,1	24	0,09	-1,2	1
GI_10047097-S	1054,2	1338,5	2013,2	11	280,9	47,5	29	1,00	6,1	1
GI_10047099-S	280,4	416,1	514,0	11	65,7	19,5	36	1,00	-9,4	1
GI_10047103-S	3318,7	3672,4	4083,1	11	234,2	124,0	24	1,00	12,0	1
GI_10047105-S	35,4	87,8	146,9	11	35,0	17,5	22	1,00	1,4	1
GI_10047115-S	1534,9	2399,9	2949,3	11	399,8	87,2	29	1,00	12,2	1
GI_10047117-S	-14,7	13,9	34,8	11	14,3	8,8	31	0,86	-14,8	1

^{*1} Allgemeine Informationen zur Software, Normalisierung, statistischem Modell und Datum

^{*2} Identifikation des Gens anhand einer GI-Nummer

^{*3} Kleinstes Signal des Gens in der Gruppe

^{*4} Durchschnittswert des Gens in der Gruppe

^{*5} Größtes Signal des Gens in der Gruppe

^{*6} Anzahl der Arrays in der Gruppe

^{*7} Standardabweichung der Variabilität von Array zu Array in der Gruppe

^{*8} Durchschnittswert der Gruppe für die Standardabw. von Bead zu Bead innerhalb der Arrays

^{*9} Durchschnittliche Anzahl an Beads für diesen Beadtyp

^{*10} (1 - p-Wert) für die Detektion des Gensignals

^{*11} Maß für die differentielle Genexpression

^{*12} Maß der Übereinstimmung bei mehreren Sonden pro Gen

2.3.2.2. Detection Score

Durch unspezifische Hybridisierungen und Fluoreszenzsignale sowie den Scannerbackground entsteht auch ohne die Anwesenheit von gebundener cRNA ein allgemeines Hintergrundsignal, das auch als Background oder Rauschen bezeichnet wird. Bei gering exprimierten Genen mit extrem schwachen Signalintensitäten kann deswegen nur schwer zwischen echtem Signal und dem unspezifischen Rauschen unterschieden werden. Der von der AnEx Software errechnete Detection Score ist ein Maß dafür, inwiefern sich das Signal einer Sonde vom unspezifischen Hintergrundsignal der Negativkontrollen unterscheiden lässt.

Für jedes Signal wird zuerst ein p-Wert für die Unterscheidbarkeit vom unspezifischen Background errechnet. Der Detection Score wird anschließend durch die Subtraktion dieses p-Werts von 1,0 gebildet. Hohe Detection Scores nahe 1,0 zeigen dadurch signifikant detektierbare Signale an. Für alle weiteren Auswertungen wurden nur Gene mit einem Detection Score von mindestens 0,99 eingeschlossen, deren Signal also mit $p \leq 0,01$ signifikant vom unspezifischen Rauschen unterscheidbar war.

2.3.2.3. Differential Expression Score

Die Wahrscheinlichkeit einer differentiellen Genexpression in der Suizidgruppe, bezogen auf die Kontrollgruppe, wird durch den absoluten Wert des Differential Expression Score (DiffScore) ausgedrückt. Positive Werte deuten auf eine stärkere Genexpression in der Suizidgruppe hin, negative Werte auf eine schwächere Expression, während die absolute Höhe des DiffScores ein Maß für die Signifikanz der differentiellen Genexpression darstellt. Der DiffScore lässt sich mit folgender Beziehung in einen üblichen p-Wert konvertieren:

Tabelle 20: Konvertierung DiffScore / p-Wert

Umrechnung p-Wert/DiffScore	Beispiele	
$p = e^{-((\text{DiffScore} + 0,0083) - 4,3438)}$	DiffScore	p-Wert
	13 / -13	0,05
	20 / -20	0,01
	23 / -23	0,005
	30 / -30	0,001
	33 / -33	0,0005

Bei der Analyse der differentiellen Genexpression und der Einteilung nach biologischer Funktion wurden vor allem Gene mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ verwendet. Bei der Validierung der Ergebnisse durch die qRT-PCR wurden dagegen auch funktionell besonders interessante Transkripte mit schwächeren p-Werten berücksichtigt. Für den Vergleich der Ergebnisse mit publizierten Expressionsstudien wurden alle Gene mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ eingeschlossen.

2.3.3. Qualitätskontrolle der Microarrays

Die Qualität der Microarrayversuche wurde zum einen durch mehrere technische Replikate überprüft. Die Probe Suz K wurde zur Kontrolle der Qualität der Arrays selbst auf zwei verschiedenen Bead Chips hybridisiert, um die Reproduzierbarkeit

der Ergebnisse auf unterschiedlichen Arrays zu überprüfen. Die Genauigkeit und Qualität der *in vitro* Transkription und des Labelings wurde durch vier Labelingreplikate überprüft. Dazu wurden die Proben Kon A, Kon G, Suz G und Suz M jeweils in zwei verschiedenen Reaktionsansätzen transkribiert und mit Biotin markiert. Die Auswertung der Replikate erfolgte durch Erstellung von Scatterplots, bei denen die Ergebnisse dieser Versuche grafisch dargestellt wurden, und durch die Berechnung der Korrelationskoeffizienten.

2.3.4. Data Mining

2.3.4.1. Klassifikation der identifizierten Gene nach biologischer Funktion

Eine systematische Klassifikation der signifikant differentiell exprimierten Transkripte anhand der biologischen Funktion ermöglicht eine bessere Interpretation der Ergebnisse. Das Gene Ontology Konsortium (<http://geneontology.org>) organisiert Gene in hierarchischen Kategorien anhand ihrer molekularen Funktion, zellulären Lokalisation oder anhand des biologischen Prozesses, in den sie involviert sind. Dabei kann ein Gen in mehrere Kategorien und verschiedenen hierarchischen Ebenen eingeteilt werden (Harris et al, 2004).

Alle Gene mit einem p-Wert $\leq 0,01$ und einem Expressionsunterschied von mindestens 1,3 wurden in diese Analysen eingeschlossen und mit dem webbasierten Gene Set Analysis Toolkit überprüft. Diese Sammlung verschiedener Module ermöglicht die Annotation, Visualisierung und Analyse von Microarraydaten und ist unter <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt> im Internet zugänglich (Zhang et al, 2005). Die identifizierten Gene wurden zuerst anhand ihrer biologischen Funktion in Gruppen eingeteilt und diese in einer hierarchischen Baumstruktur visualisiert. Unter Verwendung eines hypergeometrischen Tests und des humanen Genoms als Referenz-Genset wurden anschließend signifikant überrepräsentierte Kategorien identifiziert, die überzufällig viele Transkripte enthielten.

2.3.4.2. Unabhängige Analyse mit Benjamini-Hochberg-Korrektur

Zur Überprüfung der Ergebnisse der AnEx-Analyse wurden alle Transkripte mit einer Expressionsänderung $\geq 1,3$ und einem Detection Score $\geq 0,99$ mit dem T-Rex Modul der Gene Expression Profile Analysis Suite (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>; Vaquerizas et al, 2005) ein zweites Mal analysiert. Zusätzlich zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene errechnete dieses Modul außerdem die False Discovery Rate wie von Benjamini und Hochberg beschrieben (Benjamini und Hochberg, 2000). Der

Vergleich dieser Auswertung mit der unter 2.3.2.1. beschriebenen Analyse ermöglichte die bessere Einschätzung der Validität der Analysen.

2.3.4.3. Zytogenetische Zuordnung der identifizierten Transkripte

Die zytogenetische Lokalisation aller signifikant differentiell exprimierten Gene mit $p \leq 0,01$ wurde mithilfe der WebGestalt-Software ermittelt und grafisch dargestellt (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>; Zhang et al, 2005). Dies diente vor allem zur Visualisierung der Lage der identifizierten Gene und zur Verknüpfung dieser Informationen mit Linkage-Studien aus der Literatur.

2.3.5. Auswertung der quantitativen RT-PCR

2.3.5.1. Methodik der Genexpressionsmessung

Die Auswertung der qRT-PCR erfolgte semiquantitativ unter Verwendung einer Standardkurve mit der Rotor Gene 4.6 Software. Als Maß für die Kopienzahl der Transkripte wurde der „Cycle Threshold“ C_T bestimmt, d.h. der Zyklus der PCR, bei dem die Fluoreszenzintensität der Reaktion einen Schwellenwert überschreitet. Der C_T -Wert ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration des Transkriptes. Die Rotor Gene 4.6 Software erstellt dabei automatisch eine Regressionsgerade und errechnet die Messwerte anhand der ermittelten Funktion. Für alle weiteren Analysen wurde der Mittelwert aus den Duplikatbestimmungen verwendet; zusätzlich wurden vor allem bei schwach exprimierten Genen in einigen Fällen mehrere Läufe durchgeführt und der Gesamtmittelwert aus allen Läufen ermittelt.

2.3.5.2. Normalisierung und Auswertung der quantitativen RT-PCR

Die Expression von häufig verwendeten internen Kontrollgenen zeigte in einer systematischen Untersuchung beträchtliche interindividuelle Schwankungen (Suzuki et al, 2000). Aus diesem Grund erfolgte die Normalisierung der Daten aus der qRT-PCR unter Verwendung multipler interner Kontrollgene. Dazu wurde zuerst die Expressionsstabilität der sechs häufig verwendeten Gene *ACTB*, *GAPDH*, *K-ALPHA-1*, *POLR2A*, *RPL13A* und *UBC* mithilfe des Programms geNorm bestimmt und die vier stabilsten Gene aus dieser Gruppe identifiziert (Vandesompele et al, 2002). Durch geometrisches Mitteln der Werte der besten internen Kontrollgene wurde anschließend ein Normalisierungsfaktor errechnet. Diese Methode ist weitaus robuster als die Normalisierung über nur ein internes Kontrollgen und weniger

anfällig für Ausreißer. Durch die Verwendung von Kontrollgenen aus verschiedenen funktionellen Klassen wurde zusätzlich die Möglichkeit einer Koregulation minimiert. Die normalisierten Expressionswerte der Gene wurden anschließend in die statistische Software SPSS 12.0.1 (SPSS Inc., Chicago, USA) übertragen. Die Testung auf differentielle Genexpression erfolgte durch einen Vergleich der Expressionsmittelwerte beider Gruppen mithilfe eines ungepaarten t-Tests.

3. Ergebnisse

3.1. Studienkollektiv

3.1.1. Demographische Daten

Aus der Hirnbank mit über 150 Subjekten wurde *post mortem* Gewebe von insgesamt elf Suizidenten und zehn Kontrollen für die Microarrayversuche ausgewählt. Die demographischen Daten aller Probanden sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Demographische Daten der Probanden

Proband	Alter	Geschlecht	pH-Wert	PMI [h]	Todesursache	
Kon A	71	W	6.55	48	Pankreatitis	
Kon B	55	M	6.45	70	Herzinfarkt	
Kon C	59	M	6.80	48	HKV	
Kon D	65	M	7.00	87	Herzinfarkt	
Kon E	53	W	6.75	67	Herzinfarkt	
Kon F	72	M	6.40	60	HKV	
Kon G	48	M	6.95	48	Herzinfarkt	
Kon H	83	W	6.75	99	HKV	
Kon I	58	M	6.65	92	HKV	
Kon K	77	M	6.80	76	Aneurysma	
Proband	Alter	Geschlecht	pH-Wert	PMI [h]	Todesursache	Psychiatrische Auffälligkeiten
Suz A	63	W	6.65	52	Fenstersturz	Depression
Suz B	48	M	6.60	48	Erhängen	
Suz C	64	M	6.75	13	Pulsaderschnitt	
Suz D	59	M	6.90	72	Erhängen	Depression
Suz E	38	W	6.80	66	Erhängen	
Suz F	60	M	6.70	92	Erhängen	Depression, Alkoholproblem
Suz G	40	M	6.85	76	Erhängen	Depression
Suz H	81	W	6.65	69	Pulsaderschnitt	Depression
Suz I	57	M	6.70	97	Erhängen	Psychosoziale Belastung durch Schulden
Suz K	66	M	6.85	48	Erhängen	Depression
Suz L	33	M	6.70	24	Erhängen	Haftstrafe

Die Kontrollgruppe bestand aus sieben Männern und drei Frauen, die zu Lebzeiten psychiatrisch unauffällig waren und im Alter zwischen 48 und 83 Jahren an einer natürlichen Ursache starben. Neun der zehn Kontrollen starben relativ schnell durch Herz-Kreislaufversagen oder Herzinfarkt und damit ohne verlängerte agonale Phase, während eine Kontrollperson an einer hämorrhagisch-nekrotischen Pankreatitis

starb. Für die Suizidgruppe wurden acht Männer und drei Frauen im Alter zwischen 33 und 81 Jahren sorgfältig ausgewählt, die alle durch violenten Suizid nach der Einteilung von Asberg und Kollegen starben (Asberg et al, 1976). Durch diese Auswahl wurde der relativ heterogene Phänotyp 'suizidales Verhalten' etwas eingegrenzt, um die Suche nach gemeinsamen genetischen Grundlagen zu vereinfachen. Das Verhalten 'violenter Suizid' ist aber immer noch sehr komplex und entspricht keinem Endophänotyp nach dem klassischen Konzept (Gottesman und Gould, 2003). Insgesamt acht Suizidenten erhängten sich selbst, eine Person starb durch einen Sturz aus großer Höhe und zwei Personen eröffneten sich die Pulsadern und starben durch Verbluten.

3.1.2. Gruppenvergleich

Ein Gruppenvergleich aller wichtigen Kovariablen zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich pH-Wert, Alter und *post mortem* Intervall.

Tabelle 22: Kovariablen

	Gruppe	Mittelwert	Std.Abw.	Std.Fehler	Signifikanz
pH-Wert	Suizidenten	6,74	0,10	0,03	0,66
	Kontrollen	6,71	0,20	0,06	
Alter	Suizidenten	55,4	14,3	4,30	0,14
	Kontrollen	64,1	11,4	3,59	
PMI [h]	Suizidenten	59,7	26,0	7,84	0,34
	Kontrollen	69,5	18,9	5,96	

Die wichtigste Kovariable für das Matchen der Gruppen war der pH-Wert des Gewebes, da dieser den größten Einfluss auf die RNA-Qualität und Integrität zu haben scheint (Hynd et al, 2003; Li et al, 2004). Die Mittelwerte beider Gruppen lagen hier mit 6,74 versus 6,71 sehr nahe beisammen und zeigten nur eine geringe Standardabweichung. Der Mittelwertsvergleich für die Kovariablen Alter und PMI zeigte ebenso keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

3.1.3. RNA-Extraktion und Gehaltbestimmung

Die Ausbeute an RNA bei der Extraktion korrelierte vor allem mit der eingesetzten Menge an Hirngewebe. Die Verwendung des RNeasy-Lipid-Tissue-Kits erbrachte gute Ausbeuten zwischen 14 und 39 µg Gesamtmenge RNA bei Nukleinsäure-Konzentrationen zwischen 170 ng/µl und 490 ng/µl. Das Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 280 nm lag zwischen 1,87 und 2,11, und damit genau in dem Bereich, der eine gute RNA-Qualität anzeigt (Wang, 2005).

Tabelle 23: Ergebnisse der photometrischen Gehaltbestimmung

Proband	Einwaage [mg]	Konz. RNA [ng/ μ l]	Ratio A260 / A280 nm	Gesamtmenge RNA [μ g]
Kon A	69,0	326,9	2,05	26,2
Kon B	66,0	256,8	1,96	20,5
Kon C	97,4	285,7	1,90	22,9
Kon D	66,0	248,1	1,93	19,8
Kon E	68,9	353,1	2,11	28,2
Kon F	88,9	362,6	1,99	29,0
Kon G	97,4	490,2	1,98	39,2
Kon H	91,0	354,4	1,94	28,4
Kon I	109,0	427,7	1,96	34,2
Kon K	66,3	282,4	2,04	22,6
Suz A	65,2	324,9	2,08	26,0
Suz B	78,0	317,9	1,87	25,4
Suz C	83,7	242,2	2,06	19,4
Suz D	63,3	258,1	2,02	20,6
Suz E	83,0	284,4	1,93	22,8
Suz F	79,0	268,1	1,96	21,4
Suz G	82,0	356,9	1,97	28,6
Suz H	60,0	176,7	1,95	14,1
Suz I	98,0	393,7	1,97	31,5
Suz K	78,7	301,3	2,02	24,1
Suz L	77,8	362,5	1,98	29,0

3.1.4. Qualität und Integrität der RNA

Direkt im Anschluss an die RNA-Extraktion wurden jeweils 1 μ g RNA durch Agarose-Gelelektrophorese einer ersten Qualitätskontrolle unterzogen.

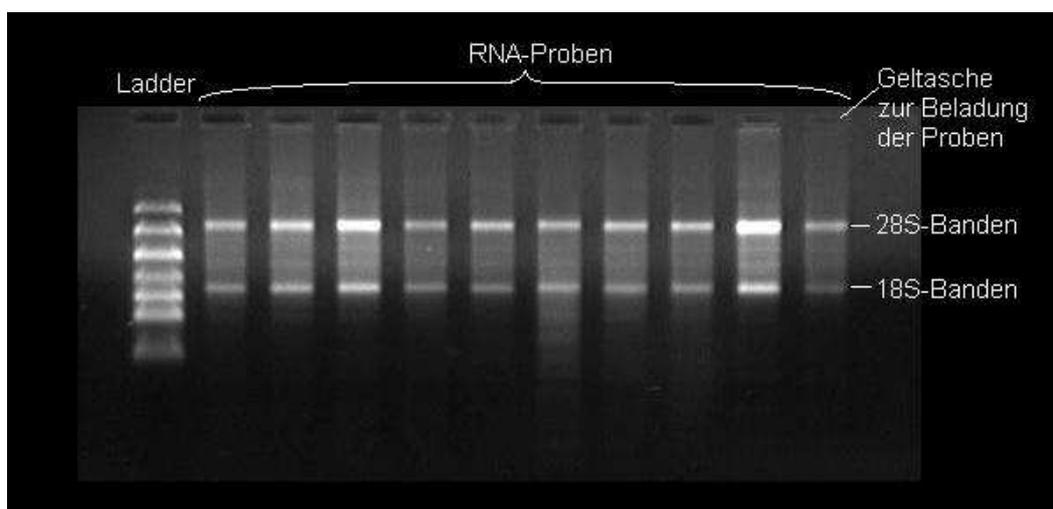


Abbildung 8: RNA-Gelelektrophorese

Alle RNA-Proben zeigten dabei deutlich sichtbare 18S- und 28S-Banden ohne Anzeichen einer stärkeren Degradation und mit einer deutlich höheren Intensität der 28S-Bande im Vergleich zur 18S-Bande.

Eine genauere Untersuchung der Proben erfolgte anschließend mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer, der durch den weitgehend automatisierten Prozessablauf sehr genaue und reproduzierbare Daten liefert. Das durchschnittliche Flächenverhältnis der 18S- und 28S-Peaks aller Proben betrug 1,57. Damit waren die verwendeten RNA-Proben von ausreichend guter Qualität für die erfolgreiche Durchführung von Microarrayexperimenten (Schoor et al, 2003). In den Elektropherogrammen wurden keine Zeichen einer stärkeren Degradation beobachtet. Das Elektropherogramm einer typischen RNA-Probe ist in Abbildung 9 exemplarisch dargestellt.

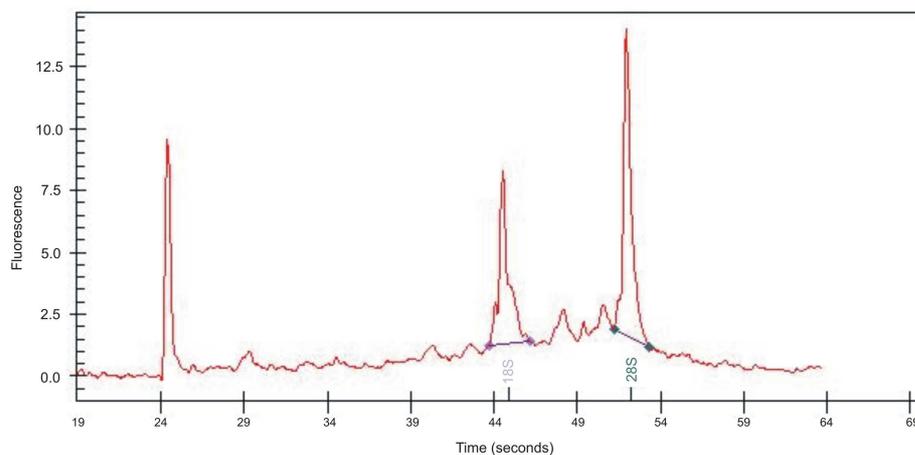


Abbildung 9: Elektropherogramm der RNA Kon I

3.2. Ergebnisse der Microarrayversuche

3.2.1. Replikationsversuche

3.2.1.1. Hybridisierungsreplikat

Die Probe Suz K wurde wie unter Punkt 2.2.3.4. dargestellt als technisches Hybridisierungsreplikat auf zwei verschiedenen Bead Chips hybridisiert, um die Reproduzierbarkeit der Versuche auf dieser Ebene zu ermitteln. Dabei wurde diese Probe auf Bead Chip B an Position B07 und auf Bead Chip D an Position D04 hybridisiert. Die Abbildung 10 zeigt den Scatterplot der Signalintensitäten aller Transkripte dieser zwei Microarrays.

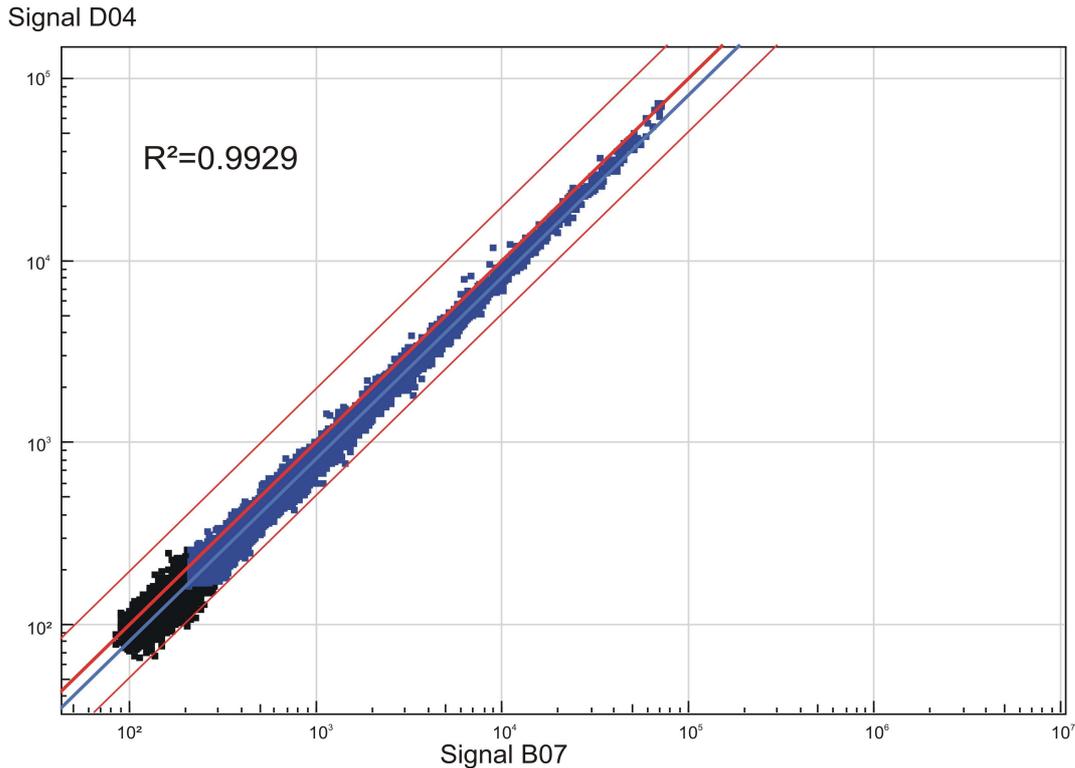


Abbildung 10: Scatterplot des Hybridisierungsreplikates der Probe Suz K

Mit der gelabelten Probe Suz K wurden zwei verschiedene Microarrays auf separaten Bead Chips durchgeführt, einmal auf Chip B an Position B07 und als Replikat auf Chip D an Position D04. Die Grafik zeigt einen Scatterplot der Signalintensitäten aller Transkripte von Array B07 gegen D04. Alle Signale, die sich bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ signifikant vom Hintergrundrauschen unterschieden, sind blau dargestellt.

Der Regressionskoeffizient dieser technischen Replikation betrug $R^2=0,9929$, d.h. die Wiederholung der Hybridisierung zeigte eine gute Übereinstimmung mit der Originalhybridisierung.

3.2.1.2. Labelingreplikate

Bei der Durchführung der Labelingreplikate wurden die Proben Kon A, Kon G, Suz G und Suz I in jeweils zwei separaten Reaktionen *in vitro* transkribiert und dabei mit Biotin markiert. Im Gegensatz zu den Hybridisierungsreplikaten wurden bei diesen Versuchen beide Proben, also Original und Replikat, anschließend auf einem Bead Chip hybridisiert, um Einflüsse außerhalb des Labelings so gering wie möglich zu halten. Die Abbildung 11 zeigt den Scatterplot der Signalintensitäten der Probe Kon G, die auf Bead Chip C an den Positionen C01 und C05 hybridisiert worden ist.

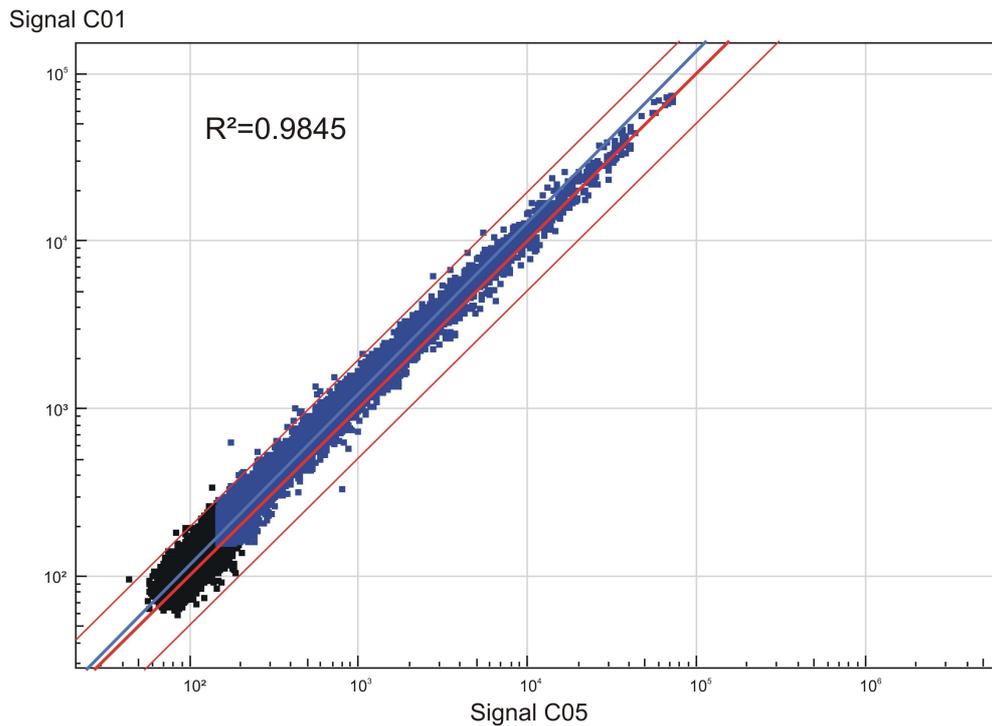


Abbildung 11: Scatterplot des Labelingreplikats Kon G

Dargestellt ist der Scatterplot der Signalintensitäten von Array C05 gegen Array C01. Auf beiden Arrays die in zwei separaten Reaktionsansätzen gelabelte Probe Kon G hybridisiert. Blau dargestellt sind alle Gene mit einem Detection Score mit $p \leq 0,01$.

Die Labelingreplikate zeigten eine gute bis moderate Korrelation mit einem durchschnittlichen Koeffizienten von $R^2=0,9852$ und damit insgesamt einen etwas größeren Fehler als das unter 3.2.1.1. beschriebene Hybridisierungsreplikat.

3.2.2. Auswahlkriterien

Die Fluoreszenzintensitäten aller 24.114 unterschiedlichen Beadtypen wurden mithilfe der Illumina-spezifischen Software AnEx ausgewertet. Insgesamt waren die Signale von 15.656 Beadtypen über alle Arrays bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ klar detektierbar und wurden in die weiteren Analysen eingeschlossen. Die Verwendung von Oligonucleotid-Sonden und multiplen Messungen für jedes Transkript ermöglicht es, Expressionsunterschiede ab dem Faktor 1,3 sicher zu bestimmen (Dickinson und Craumer, 2003). Aus diesem Grund wurden alle Gene in die weiteren Analysen eingeschlossen, deren Transkriptmengen sich bei einem Detection Score von mindestens 0,99 um den Faktor 1,3 unterschieden. Insgesamt 1.589 Gene erfüllten diese beiden Kriterien.

3.2.3. Mittelwertsvergleich durch die AnEx Software

Die Analyse der differentiellen Genexpression durch einen Mittelwertsvergleich über einen unabhängigen t-Test identifizierte 588 Gene mit einem Fold-Change von mindestens 1,3 in beide Richtungen bei dem schwächsten Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$; 124 Gene erfüllten das nächst strengere Kriterium von $p \leq 0,01$. Die Ergebnisse des initialen t-Tests sind in Tabelle 24 im Überblick dargestellt.

Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse je nach p-Wert und Fold-Change

Fold-Change	p-Wert			
	$p \leq 0,05$	$p \leq 0,01$	$p \leq 0,005$	$p \leq 0,001$
$\geq \pm 1,3$	588	124	57	9
$\geq \pm 1,6$	136	32	15	3
$\geq \pm 1,8$	49	11	4	1
$\geq \pm 2,0$	21	3	1	-

Die große Mehrzahl der identifizierten Gene zeigte dabei relativ geringe Expressionsunterschiede mit einem Fold-Change von weniger als 1,6, und selbst bei dem schwächsten Signifikanzniveau zeigten nur 21 Gene einen Unterschied zwischen den Transkriptmengen um mehr als den Faktor 2,0 (Tabelle 25).

Tabelle 25: Gene mit Fold-Change $\geq 2,0$ und $p < 0,05$.

Gensymbol	p-Wert	FC	Genname
<i>KLF4</i>	0,011	-3,69	Kruppel-like factor 4
<i>DDX17</i>	0,039	-3,02	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17
<i>ZFP36</i>	0,037	-2,98	Zinc finger protein 36, C3H type, homolog (mouse)
<i>RFX4</i>	0,031	-2,52	Regulatory factor X, 4
<i>CLDN10</i>	0,039	-2,36	Claudin 10
<i>ZFP36L2</i>	0,006	-2,23	Zinc finger protein 36, C3H type-like 2
<i>SERPINB1</i>	0,019	-2,22	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1
<i>EFEMP1</i>	0,020	-2,21	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
<i>CDC42EP1</i>	0,031	-2,18	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1
<i>CDH19</i>	0,032	-2,16	Cadherin 19, type 2
<i>SLC39A12</i>	0,038	-2,12	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 12
<i>MT1G</i>	0,011	-2,00	Metallothionein 1G
<i>LONRF2</i>	0,006	+2,06	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2
<i>SLC6A15</i>	0,045	+2,15	Solute carrier family 6, member 15
<i>GLIPR1</i>	0,011	+2,30	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)
<i>SH2D1B</i>	0,012	+2,37	SH2 domain containing 1B
<i>NMU</i>	0,035	+2,63	Neuromedin U
<i>ITGB1BP1</i>	0,005	+2,66	Integrin beta 1 binding protein 1
<i>C20orf151</i>	0,045	+2,72	Chromosome 20 open reading frame 151
<i>PENK</i>	0,019	+2,77	Proenkephalin
<i>KL</i>	0,015	+2,92	Klotho

Diese relativ geringen Expressionsunterschiede der meisten Gene wurden auch schon bei anderen Microarrayexperimenten zur Erforschung psychiatrischer Krankheiten beobachtet (Konradi, 2005). Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ waren 59 der insgesamt 124 Gene in der Suizidgruppe im Vergleich zu den Kontrollen schwächer exprimiert. Die p-Werte und Expressionsunterschiede dieser 59 Gene sind in Tabelle 26 mit aufsteigenden p-Werten gelistet.

Tabelle 26: Unterexprimierte Gene mit Fold-Change $\leq -1,3$ und $p < 0,01$.

Gensymbol	p-Wert	FC	Genname
<i>GPR30</i>	0,0002	-1,39	G protein-coupled receptor 30
<i>PSMB9</i>	0,0003	-1,64	Proteasome subunit, beta type, 9
<i>LPP</i>	0,0005	-1,84	LIM domain cont. preferred translocation partner in lipoma
<i>TMEM8</i>	0,0008	-1,43	Transmembrane protein 8
<i>SLC12A7</i>	0,0009	-1,35	Solute carrier family 12, member 7
<i>CDCA7L</i>	0,0010	-1,55	Cell division cycle associated 7-like
<i>ABHD4</i>	0,0016	-1,40	Abhydrolase domain containing 4
<i>BZRP</i>	0,0019	-1,35	Benzodiazapine receptor, peripheral
<i>EHD4</i>	0,0020	-1,89	EH-domain containing 4
<i>EFEMP2</i>	0,0020	-1,40	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2
<i>ID3</i>	0,0021	-1,54	Inhibitor of DNA binding 3, dom. neg. helix-loop-helix protein
<i>IGFBP7</i>	0,0025	-1,51	Insulin-like growth factor binding protein 7
<i>PGCP</i>	0,0025	-1,51	Plasma glutamate carboxypeptidase
<i>CTBS</i>	0,0027	-1,35	Chitobiase, di-N-acetyl-
<i>HLA-B</i>	0,0028	-1,50	Major histocompatibility complex, class I, B
<i>GOLGA8B</i>	0,0033	-1,35	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 8B
<i>IQGAP1</i>	0,0035	-1,40	IQ motif containing GTPase activating protein 1
<i>PPT2</i>	0,0035	-1,31	Palmitoyl-protein thioesterase 2
<i>NG2</i>	0,0037	-1,44	Neuroglobin
<i>S100A13</i>	0,0038	-1,43	S100 calcium binding protein A13
<i>PHF16</i>	0,0039	-1,32	PHD finger protein 16
<i>FLJ23049</i>	0,0041	-1,55	Hypothetical protein FLJ23049
<i>TMEM123</i>	0,0043	-1,55	Transmembrane protein 123
<i>YAP1</i>	0,0046	-1,70	Yes-associated protein 1, 65kDa
<i>PSMB8</i>	0,0048	-1,62	Proteasome subunit, beta type, 8
<i>LOC146177</i>	0,0049	-1,67	Hypothetical protein LOC146177
<i>VWA1</i>	0,0049	-1,56	Von Willebrand factor A domain containing 1
<i>ISG20</i>	0,0052	-1,68	Interferon stimulated exonuclease gene 20kDa
<i>CWF19L2</i>	0,0053	-1,32	CWF19-like 2, cell cycle control (S. pombe)
<i>ADAMTS1</i>	0,0054	-1,93	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1
<i>CSRP1</i>	0,0055	-1,56	Cysteine and glycine-rich protein 1
<i>PKN1</i>	0,0055	-1,44	Protein kinase N1
<i>ARHGAP17</i>	0,0056	-1,31	Rho GTPase activating protein 17
<i>MT1F</i>	0,0056	-1,85	Metallothionein 1F (functional)
<i>PDLIM3</i>	0,0057	-1,34	PDZ and LIM domain 3
<i>LGALS3</i>	0,0058	-1,78	Lectin, galactoside-binding, soluble, 3

<i>PCDHB5</i>	0,0060	-1,33	Protocadherin beta 5
<i>HEY2</i>	0,0060	-1,67	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 2
<i>HYI</i>	0,0060	-1,30	Hydroxypyruvate isomerase homolog
<i>PLSCR4</i>	0,0061	-1,81	Phospholipid scramblase 4
<i>CGNL1</i>	0,0062	-1,40	Cingulin-like 1
<i>ZFP36L2</i>	0,0062	-2,23	Zinc finger protein 36, C3H type-like 2
<i>HERC5</i>	0,0063	-1,95	Hect domain and RLD 5
<i>CD248</i>	0,0064	-1,53	CD248 antigen, endosialin
<i>ENOSF1</i>	0,0065	-1,44	Enolase superfamily member 1
<i>BCKDHB</i>	0,0068	-1,32	Branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypept.
<i>PDGFRB</i>	0,0070	-1,52	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
<i>CMKOR1</i>	0,0071	-1,49	Chemokine orphan receptor 1
<i>BDP1</i>	0,0075	-1,35	B double prime 1, subunit of RNA polymerase III TIF IIIB
<i>CRYL1</i>	0,0075	-1,37	Crystallin, lambda 1
<i>B2M</i>	0,0077	-1,36	Beta-2-microglobulin
<i>GNG11</i>	0,0079	-1,33	Guanine nucleotide binding protein, gamma 11
<i>STAT1</i>	0,0081	-1,32	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
<i>EMILIN2</i>	0,0083	-1,52	Elastin microfibril interfacier 2
<i>MYSM1</i>	0,0085	-1,61	Myb-like, SWIRM and MPN domains 1
<i>PHKG1</i>	0,0085	-1,47	Phosphorylase kinase, gamma 1 (muscle)
<i>ALDH2</i>	0,0089	-1,36	Aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)
<i>PHGDH</i>	0,0092	-1,48	Phosphoglycerate dehydrogenase
<i>MDK</i>	0,0092	-1,38	Midkine, neurite growth-promoting factor 2

Bei insgesamt 65 Genen wurden bei den Suizidenten dagegen signifikant größere Transkriptmengen detektiert.

Tabelle 27: Überexprimierte Gene mit Fold-Change $\geq +1,3$ und $p < 0,01$.

Gensymbol	p-Wert	FC	Genname
<i>WDR39</i>	0,0003	+1,46	WD repeat domain 39
<i>FLJ37440</i>	0,0009	+1,66	Hypothetical Protein FLJ37440
<i>C20orf28</i>	0,0009	+1,52	Chromosome 20 open reading frame 28
<i>MGC33530</i>	0,0012	+1,92	Hypothetical protein MGC33530
<i>CPLX2</i>	0,0020	+1,79	Complexin 2
<i>ISLR2</i>	0,0021	+1,37	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat 2
<i>SRGAP2</i>	0,0024	+1,37	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2
<i>PTPN3</i>	0,0024	+1,48	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3
<i>PAQR9</i>	0,0025	+1,61	Progesterin and adipoQ receptor family member IX
<i>COX7A1</i>	0,0030	+1,44	Cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 1
<i>TFB2M</i>	0,0032	+1,32	Transcription factor B2, mitochondrial
<i>RP11-54H7.1</i>	0,0032	+1,42	Myosin heavy chain Myr 8
<i>RASD1</i>	0,0033	+1,39	RAS, dexamethasone-induced 1
<i>ARMC7</i>	0,0034	+1,30	Armadillo repeat containing 7
<i>FLJ34208</i>	0,0034	+1,60	Hypothetical Gen supported by AK091527
<i>UBPH</i>	0,0034	+1,35	Ubiquitin-binding protein homolog
<i>TBN</i>	0,0035	+1,50	Taube nuss homolog (mouse)
<i>PRO0149</i>	0,0035	+1,30	PRO0149 protein

<i>SLC16A14</i>	0,0039	+1,43	Solute carrier family 16, member 14
<i>MRPL24</i>	0,0039	+1,32	Mitochondrial ribosomal protein L24
<i>NDUFB3</i>	0,0039	+1,75	NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex, 3
<i>NELL1</i>	0,0039	+1,68	NEL-like 1 (chicken)
<i>FLJ30838</i>	0,0041	+1,35	Hypothetical gee supported by AL832565
<i>TIPRL</i>	0,0042	+1,51	TIP41, TOR signalling pathway regulator-like (<i>S. cerevisiae</i>)
<i>GRIK1</i>	0,0044	+1,53	Glutamate receptor, ionotropic, kainate 1
<i>SCN2B</i>	0,0045	+1,39	Sodium channel, voltage-gated, type II, beta
<i>THOC3</i>	0,0045	+1,36	THO complex 3
<i>ITGB1BP1</i>	0,0046	+2,66	Integrin beta 1 binding protein 1
<i>TRAF3</i>	0,0049	+1,66	TNF receptor-associated factor 3
<i>STK16</i>	0,0049	+1,32	Serine/threonine kinase 16
<i>CDH12</i>	0,0054	+1,49	Cadherin 12, type 2 (N-cadherin 2)
<i>NRBF2</i>	0,0055	+1,38	Nuclear receptor binding factor 2
<i>CLEC4G</i>	0,0056	+1,58	C-type lectin superfamily 4, member G
<i>CKAP2</i>	0,0059	+1,54	Cytoskeleton associated protein 2
<i>DLX1</i>	0,0060	+1,45	Distal-less homeobox 1
<i>KHK</i>	0,0060	+1,31	Ketohexokinase
<i>LONRF2</i>	0,0062	+2,06	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2
<i>VIP</i>	0,0067	+1,74	Vasoactive intestinal peptide
<i>IGF1</i>	0,0067	+1,91	Insulin-like growth factor 1
<i>PAXIP1</i>	0,0070	+1,59	PAX interacting protein 1
<i>CLYBL</i>	0,0070	+1,37	Citrate lyase beta like
<i>NPTX1</i>	0,0074	+1,62	Neuronal pentraxin I
<i>NPM3</i>	0,0074	+1,35	Nucleophosmin/Nucleoplasmin, 3
<i>SIRT4</i>	0,0078	+1,39	Sirtuin 4
<i>CYB5R4</i>	0,0079	+1,31	Cytochrome b5 reductase 4
<i>CHGB</i>	0,0079	+1,40	Chromogranin B
<i>NRIP3</i>	0,0079	+1,41	Nuclear receptor interacting protein 3
<i>STARD3NL</i>	0,0081	+1,35	STARD3 N-terminal like
<i>PANK1</i>	0,0082	+1,47	Pantothenate kinase 1
<i>NPAS1</i>	0,0082	+1,30	Neuronal PAS domain protein 1
<i>CIAPIN1</i>	0,0083	+1,38	Cytokine induced apoptosis inhibitor 1
<i>ASS</i>	0,0083	+1,41	Argininosuccinate synthetase
<i>CKS2</i>	0,0085	+1,58	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
<i>LACTB</i>	0,0085	+1,39	Lactamase, beta
<i>HS6ST2</i>	0,0085	+1,61	Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2
<i>COCH</i>	0,0086	+1,34	Coagulation factor C homolog, cochlin
<i>AMPH</i>	0,0088	+1,42	Amphiphysin
<i>MSC</i>	0,0088	+1,72	Musculin
<i>FGF12</i>	0,0091	+1,35	Fibroblast growth factor 12
<i>SLC10A4</i>	0,0093	+1,67	solute carrier family 10, member 4
<i>CDH22</i>	0,0095	+1,55	Cadherin-like 22
<i>OLFM1</i>	0,0097	+1,60	Olfactomedin 1
<i>SLC35B4</i>	0,0097	+1,37	Solute carrier family 35, member B4
<i>HSPA4</i>	0,0098	+1,54	Heat shock 70kDa protein 4
<i>CA8</i>	0,0099	+1,39	Carbonic anhydrase VIII

3.2.4. Gene Expression Analysis Suite

Die unabhängige Analyse der Daten mit der webbasierten Anwendung T-Rex der 'Gene Expression Profile Analysis Suite' GEPAS (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>; Vaquerizas et al, 2005) lieferte im Vergleich mit der AnEx-Auswertung nahezu identische Ergebnisse und deklarierte bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ insgesamt 117 Transkripte als differentiell exprimiert.

In der Abbildung 12 sind die Genexpressionswerte aller 117 signifikanten Gene in einem Grid-Image im Überblick dargestellt. Jede Spalte entspricht dabei einer Probe, und jede Zeile einem Gen. Die Daten der Kontrollen sind in den ersten zehn Spalten von links aus dargestellt, rechts davon die Werte der Suizidenten. Blau markierte Felder entsprechen einer Expression unter dem Mittelwert aller Proben, während rote Felder eine Überexpression darstellen. Die bei den Suizidenten überwiegend blau dargestellten Gene in der oberen Hälfte sind im Vergleich zur Kontrollgruppe schwächer exprimiert, während die überwiegend rot markierten Gene in der unteren Hälfte der Grafik hochreguliert sind.

Die Software generiert mithilfe eines implementierten Algorithmus gleichzeitig die False Discovery Rate (Benjamini und Hochberg, 2000), die bei unseren Daten bei 0,12 lag.

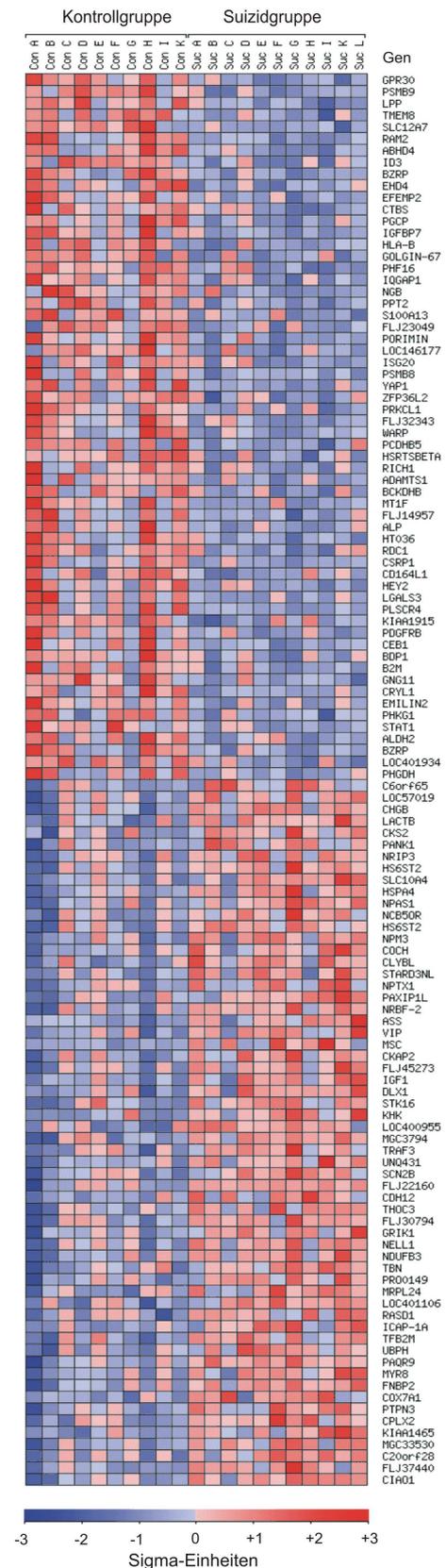


Abbildung 12: Grid-Image

Die Rate der falsch-positiven Ergebnisse liegt demnach ungefähr bei 12 Prozent, d.h. 14 der insgesamt 117 identifizierten Transkripte sind schätzungsweise betroffen.

3.2.5. Vergleich der AnEx und der GEPAS-Analyse

Insgesamt wurden von dem ungepaarten t-Test durch AnEx 124 Transkripte mit einem Fold-Change $\geq 1,3$ und einem Signifikanzniveau von $p = 0,01$ als differentiell exprimiert gefunden, während die Auswertung mithilfe der Gene Expression Analysis Suite (GEPAS) 117 Gene dieselben Kriterien erfüllten. Beide Anwendungen zeigten dabei eine große Übereinstimmung der Ergebnisse, und insgesamt 115 Gene wurden durch beide Analysen gemeinsam als signifikant differentiell exprimiert errechnet. Für neun Gene aus der AnEx-Gruppe kalkulierte die T-Rex-Analyse p-Werte zwischen 0,0101 und 0,0118, und damit wurde die Signifikanz für das gewählte Niveau nur knapp verfehlt. Umgekehrt identifizierte die T-Rex-Auswertung zwei zusätzliche Transkripte, die in der AnEx-Analyse p-Werte knapp über 0,01 erreichten. Die Überschneidung der Ergebnisse ist in Abbildung 13 grafisch dargestellt.

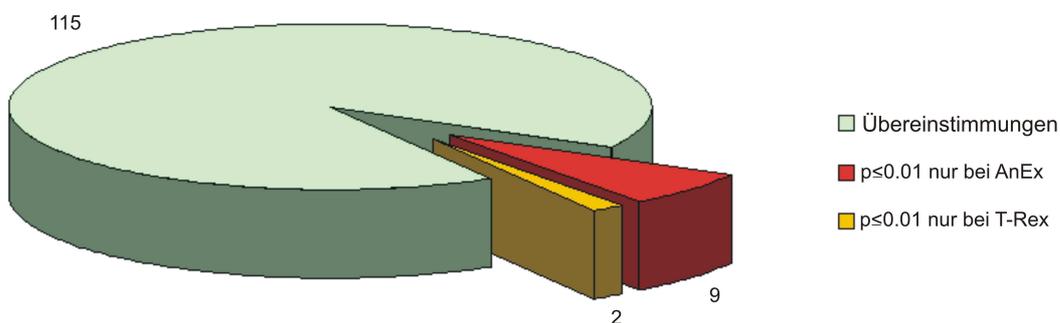


Abbildung 13: Übereinstimmung der AnEx- und der T-Rex-Analyse

Grafisch dargestellt ist jeweils die Anzahl der Gene, die je nach Auswertungssoftware ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ erreichten. 115 Gene waren nach beiden Analysen signifikant differentiell exprimiert. Neun Gene erreichten nur bei AnEx dieses Niveau, während dieselben Gene bei der T-Rex-Analyse p-Werte zwischen 0,0101 und 0,0118 hatten. Umgekehrt identifizierte T-Rex zwei Transkripte als differentiell exprimiert, für welche die AnEx-Software p-Werte von 0,0103 beziehungsweise 0,0105 kalkulierte.

3.2.6. Klassifizierung nach den Gene Ontology Kategorien

Neben der Identifizierung einzelner differentiell exprimierter Gene ist die Einordnung der komplexen Ergebnisse in einen biologischen Zusammenhang eine wichtige Aufgabe bei Microarrayversuchen, die eine große Menge an Daten in einem

Experiment generieren. Dabei steht vor allem die Frage nach biologischen Pathways oder funktionellen Gruppen im Vordergrund (Konradi, 2005).

Die Klassifikation der 124 Transkripte aus der AnEx-Auswertung nach den Gene Ontology Kriterien und Überprüfung der einzelnen Klassen durch einen hypergeometrischen Test zeigte, dass insgesamt vier GO-Kategorien der Ebene fünf überzufällig häufig viele Gene enthielten. Die betroffenen Kategorien sind 'Entwicklung des ZNS', 'Homophile Zelladhäsion', 'Regulation der Zellproliferation' und 'Transmission von Nervenimpulsen', denen alleine 18 der 124 Transkripte zugeordnet werden konnten.

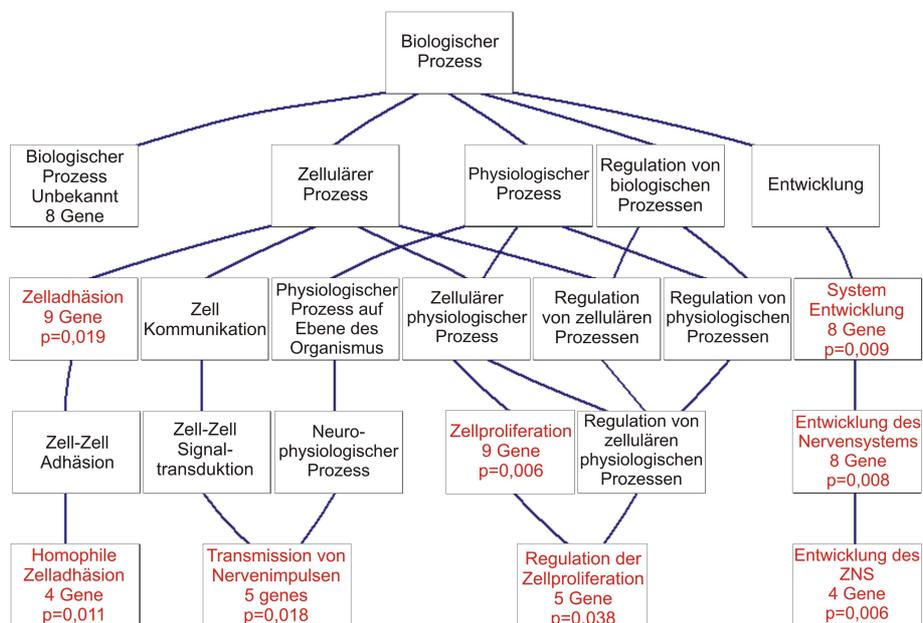


Abbildung 14: Signifikante Gene Ontology Kategorien

Alle signifikanten Gene Ontology Kategorien sind in der Abbildung rot dargestellt, die Anzahl der zugeordneten Gene und p-Werte des hypergeometrischen Tests sind unter der jeweiligen Kategorie aufgeführt.

3.2.7. Gene der signifikanten Kategorien

3.2.7.1. Entwicklung des zentralen Nervensystems

Die vier Gene *GRIK1*, *NPAS1*, *NPTX1* und *PHGDH* gehören auf der Ebene ihrer biologischen Funktion zur GO-Kategorie 'Entwicklung des zentralen Nervensystems'. Rein zufällig wäre unter den 124 signifikant differentiell exprimierten

Transkripten nur ein Gen aus dieser Kategorie zu erwarten gewesen, aber tatsächlich wurden vier signifikant differentiell exprimierte Gene diesem biologischen Funktionskreis zugeordnet. Die mithilfe dieser Daten durch den hypergeometrischen Tests kalkulierte 'ratio of enrichment' beträgt 5,5, das heißt es wurden rein statistisch 5,5 mal mehr Gene dieser Kategorie zugeordnet als erwartet. Das *GRIK1*-Gen codiert für eine Untereinheit des ionotropen Glutamat-Rezeptors vom Kainat-Subtyp. Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter zur schnellen Erregungsleitung im ZNS. Neuere Hypothesen postulieren Störungen der Synapsenbildung und der Neurogenese als mögliche Ursachen für die Entstehung mentaler Krankheiten (Peled, 2005). Entwicklungsstörungen des zentralen Nervensystems werden auch bei der Pathophysiologie der Schizophrenie intensiv diskutiert (Kamiya et al, 2005; Rapoport et al, 2005; Schmidt-Kastner et al, 2006).

3.2.7.2. Homophile Zelladhäsion

Der Kategorie 'homophile Zelladhäsion' wurden die Cadherine *CDH12* und *CDH22*, das Protocadherin beta 5 (*PCDHB5*) sowie das Matrix-Protein *EFEMP2* zugeordnet, obwohl statistisch nur ein Transkript dieser Klasse zu erwarten gewesen wäre. Die relative Anreicherung dieser GO-Kategorie besitzt einen p-Wert von 0,011. Cadherine ('Calciumabhängige Adherine') sind transmembranäre Proteine mit zentraler Bedeutung für die Morphogenese während der Embryonalentwicklung (Gumbiner, 2005). Durch die Bindung gleichartiger Cadherine benachbarter Zellen wird die Zell-Zell-Adhäsion über einen homophilen Kontakt hergestellt. Im Rahmen von mehreren Kopplungsstudien wurden bisher einige Kandidatenregionen für Schizophrenie identifiziert, in denen auch verschiedene Mitglieder der Cadherin-Superfamilie lokalisiert sind (Yagi und Takeichi, 2000). Aufgrund dieser Befunde wird eine Rolle der Cadherine bei der Entwicklung der Schizophrenie vermutet (Gross et al, 2003). In der Embryonalentwicklung sind Zelladhäsionsproteine an der Synapsenbildung und der Migration von Nervenzellen beteiligt (Uchida et al, 1996; Geisbrecht und Montell, 2002). Im adulten Organismus sind verschiedene Zelladhäsionsproteine in die Regulation der synaptischen Konnektivität und die Plastizität des ZNS involviert (Murase et al, 2002; Togashi et al, 2002). In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass spezifische Cadherine an der Entwicklung und normalen Funktion des Hippocampus beteiligt sind, und defiziente Mäuse zeigten Veränderungen ihres Verhaltens mit veränderten Angstreaktionen (Manabe et al, 2000).

3.2.7.3. Regulation der Zellproliferation

Mit fünf zugeordneten Genen (*ADAMTS1*, *IGF1*, *IGFBP7*, *VIP*, *WDR39*) zeigt auch die Kategorie 'Regulation der Zellproliferation' ein signifikantes Enrichment um den Faktor 2,7. Die Zellproliferation im ZNS spielt eine wichtige Rolle bei der synaptischen Plastizität. Psychopharmaka aus der Gruppe der atypischen Neuroleptika sowie einige Antidepressiva zeigen einen signifikanten Einfluss auf die adulte Neurogenese (Thome und Eisch, 2005), weswegen auch der Regulation der Zellproliferation eine besondere Beachtung bei der Untersuchung psychiatrischer Krankheiten zukommt.

3.2.7.4. Transmission von Nervenimpulsen

Insgesamt fünf Transkripte, namentlich *AMPH*, *GRIK1*, *NPTX1*, *PCDHB5* und *SCN2B*, wurden der biologischen Funktion 'Transmission von Nervenimpulsen' zugeordnet. Die schon weiter oben genannten Gene *GRIK1* und *NPTX1* gehören gleichzeitig der GO-Kategorie 'Entwicklung des zentralen Nervensystems' an, da die GO-Zuordnungen nicht exklusiv sind und ein Gen in mehrere biologische Pathways involviert sein kann. Ebenso ist das Protocadherin beta 5 (*PCDHB5*) in den GO-Kategorien 'Transmission von Nervenimpulsen' und 'homophile Zelladhäsion' enthalten. Die korrekte Signaltransduktion innerhalb des zentralen Nervensystems ist eine integrale Voraussetzung für eine störungsfreie Funktion des Organismus.

Tabelle 28: Signifikante Gene Ontology Kategorien

GO Kategorie	Gene	Beobachtet ¹	Erwartet ²	p-Wert
Entwicklung des zentralen Nervensystems	<i>GRIK1</i> , <i>NPAS1</i> , <i>NPTX1</i> , <i>PHGDH</i>	4	0,73	0,006
Homophile Zelladhäsion	<i>CDH12</i> , <i>CDH22</i> , <i>EFEMP2</i> , <i>PCDHB5</i>	4	0,87	0,011
Regulation der Zellproliferation	<i>ADAMTS1</i> , <i>IGF1</i> , <i>IGFBP7</i> , <i>VIP</i> , <i>WDR39</i>	5	1,85	0,038
Transmission von Nervenimpulsen	<i>AMPH</i> , <i>GRIK1</i> , <i>NPTX1</i> , <i>PCDHB5</i> , <i>SCN2B</i>	5	1,52	0,018

¹Anzahl der signifikanten Gene der entsprechenden GO-Kategorie

²Anzahl der Gene, die rein zufällig in dieser Kategorie zu erwarten wären

Eine Störung verschiedener Signalkaskaden im ZNS wird bei einigen psychiatrischen Krankheiten als mitverursachender Faktor vermutet (Manji et al, 2003). Diese Hypothese stützt sich vor allem auf die Wirkungsweise verschiedener

Psychopharmaka im ZNS und auf die wichtige Rolle von Signalkaskaden bei der Funktion von Neurotransmittern, Neuropeptiden und Neurohormonen.

3.2.8. Zytogenetische Lokalisation der Transkripte

Die zytogenetische Lokalisation aller 124 Gene mit einem p-Wert $\leq 0,01$ und einem Fold-Change von mindestens 1,3 wurde mithilfe der GEPAS-Anwendung identifiziert und grafisch dargestellt.

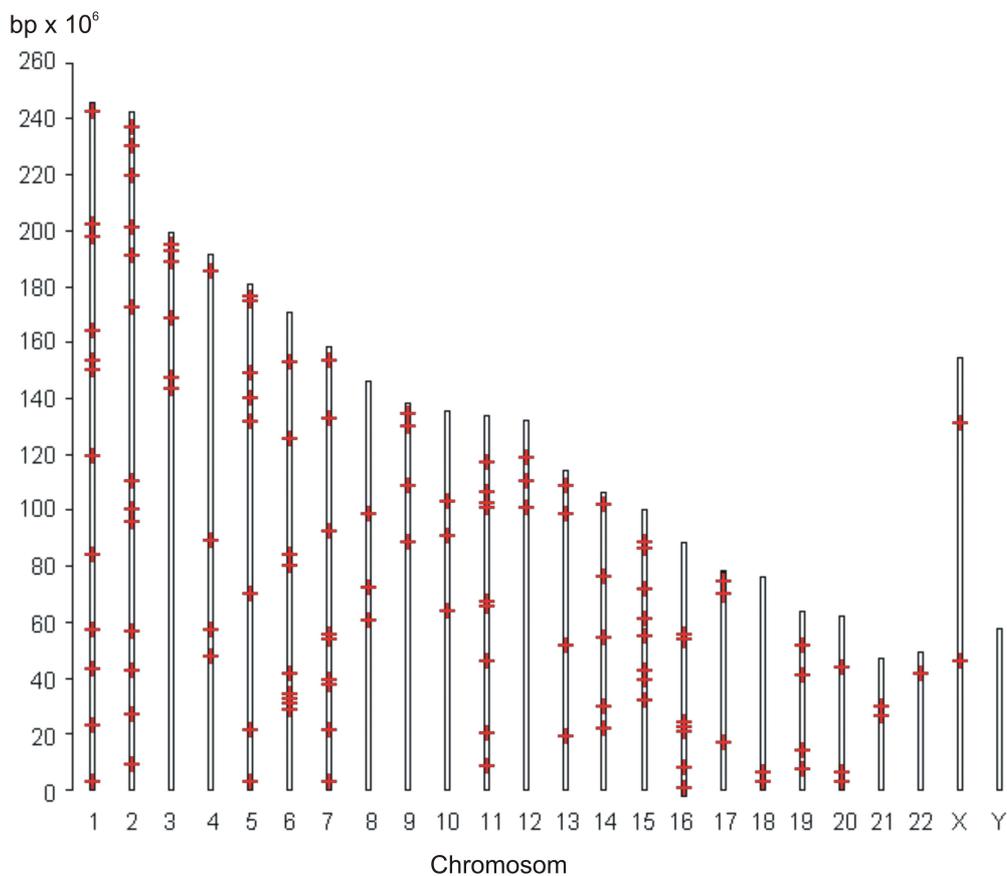


Abbildung 15: Lokalisation der Transkripte

Schematische Darstellung der zytogenetischen Lokalisation aller Transkripte mit $p \leq 0,01$ und $FC \geq 1,3$; jeder Querstrich in einem Kreuz entspricht einem Genlocus.

Die Genloci von Transkripten, bei denen diese automatische Annotation nicht funktionierte, wurden einzeln in der NCBI-Datenbank ermittelt und in der Grafik eingezeichnet. Alleine 25 Transkripte liegen auf den beiden größten humanen Chromosomen 1 und 2, während auf den kleinsten Chromosomen 21 und 22 zusammen nur drei Gene lokalisiert sind. Auf dem männlichen

Geschlechtschromosom wurde kein differentiell exprimiertes Gen identifiziert, während zwei Gene auf dem X-Chromosom liegen.

3.3. Ergebnisse der Validierungsversuche

3.3.1. Expressionsstabilität der internen Kontrollgene

Durch die simultane Bestimmung der Expression tausender Gene in einem Experiment und die Überprüfung multipler Hypothesen ist bei Microarrayversuchen die Rate falsch-positiver Ergebnisse relativ hoch. Aus diesem Grund ist die Überprüfung der Resultate durch eine unabhängige Methode wie der quantitativen Real-Time-PCR unbedingt notwendig.

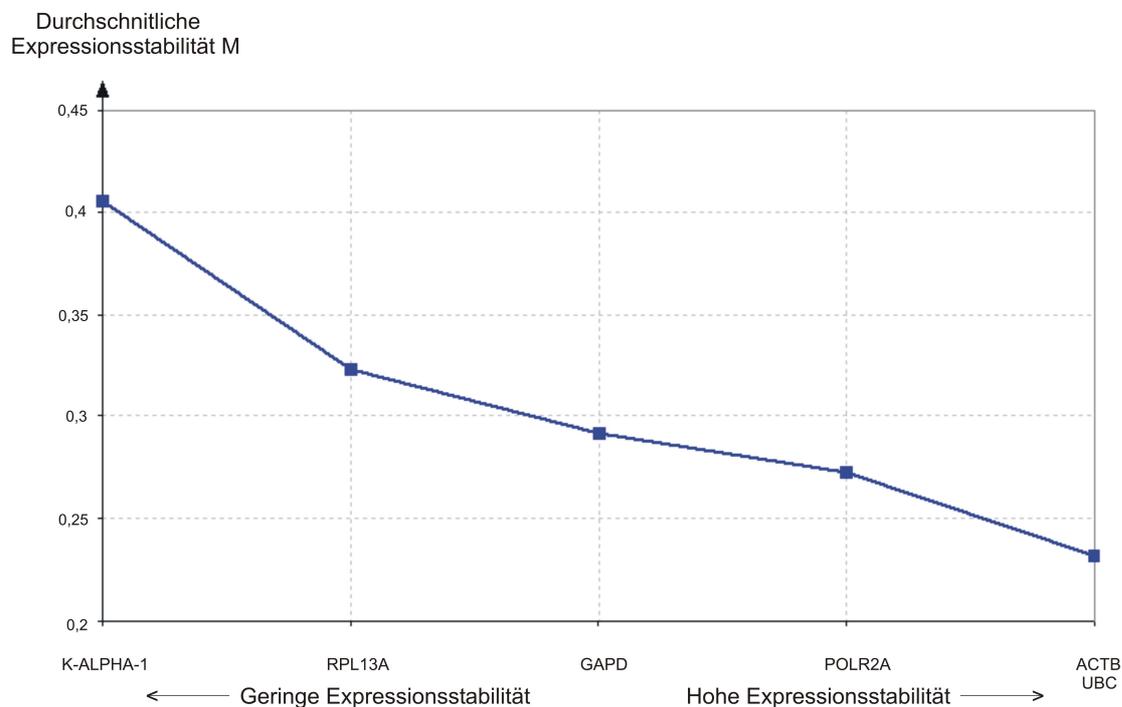


Abbildung 16: Expressionsstabilität der internen Kontrollgene

Dargestellt sind die durchschnittlichen Werte der Expressionsstabilität M aller verbleibender Kontrollgene während der schrittweise Eliminierung der am wenigsten stabilen Transkripte durch die Visual Basic Anwendung GeNorm. Niedrige Werte für M indizieren eine dabei eine hohe Expressionsstabilität. Die Gene *ACTB* und *UBC* sind über alle Proben sehr gleichmäßig exprimiert, während das am wenigsten stabile Transkript *K-ALPHA-1* die größten Schwankungen der Transkriptmengen zwischen den einzelnen Proben zeigt.

Für die Normalisierung der Daten aus der qRT-PCR wurde zuerst die Expression der sechs internen Kontrollgene *ACTB*, *GAPDH*, *POLR2A*, *RPL13A*, *K-ALPHA-1* und *UBC* bestimmt. Die genannten Gene zeigten eine relativ hohe Expressionsstabilität über alle untersuchten 21 Proben. Die stabilsten Gene waren *ACTB* und *UBC*,

während *K-ALPHA-1* (alias Tubulin alpha) die höchsten Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Proben zeigte (Abbildung 16).

Zur Kalkulation der Normalisierungsfaktoren wurden die Expressionswerte der vier stabilsten internen Kontrollgene *ACTB*, *GAPDH*, *POLR2A* und *UBC* verwendet, da die zusätzliche Verwendung der Daten von *RPL13A* oder *K-ALPHA-1* zu keiner Verbesserung der Faktoren führte.

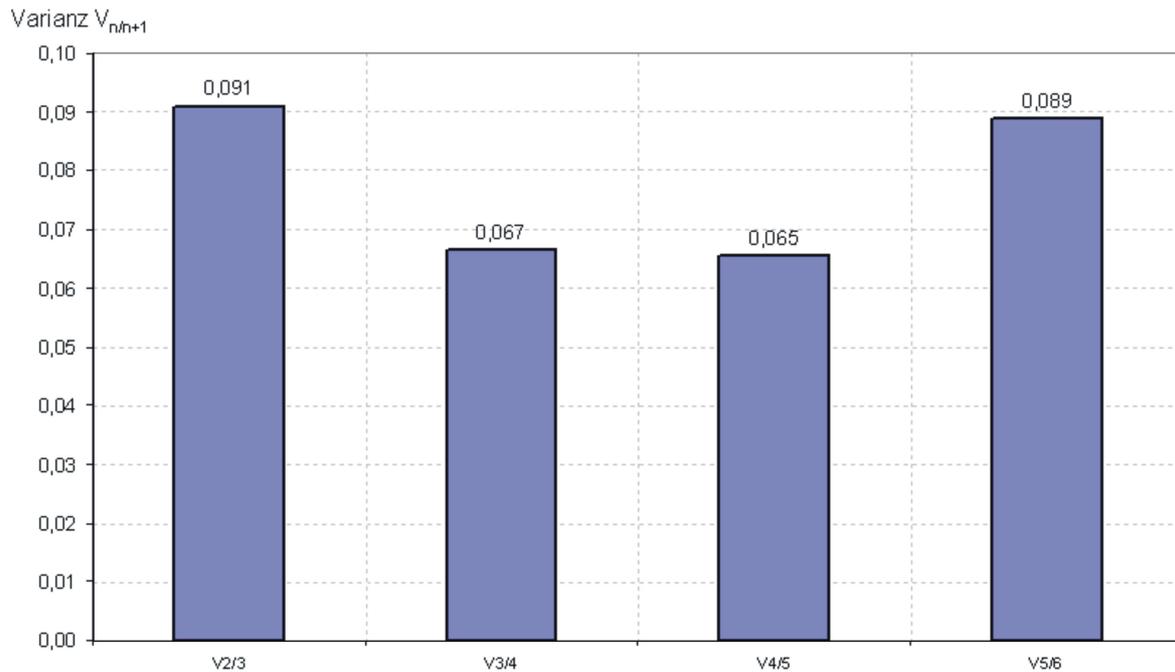


Abbildung 17: Bestimmung der optimalen Anzahl der internen Kontrollgenen

Dargestellt ist die paarweise Varianz $V_{n/n+1}$ bei schrittweiser Addition aller Internen Kontrollgene bei der Berechnung der Normalisierungsfaktoren. Die Kalkulation der Faktoren erfolgte unter Berücksichtigung der Expressionsdaten aller 21 RNA-Proben. Die Einbeziehung des 5. Kontrollgens *RPL13A* erbrachte keine deutliche Verbesserung der errechneten Normalisierungsfaktoren, sodass die 4 stabilsten Gene *ACTB*, *GAPDH*, *POLR2A* und *UBC* für die Kalkulation verwendet wurden.

3.3.2. Ergebnisse der Validierungsversuche

3.3.2.1. Ergebnisse für Gene mit Fold-Change $\geq \pm 2,0$ und $p \leq 0,05$

Initial wurden die Gene *EFEMP1*, *KLF4*, *PENK* und *ZFP36* (siehe Tabelle 25) überprüft, die alle in den Arrays einen Fold-Change größer 2,0 bei p-Werten zwischen 0,01 und 0,05 aufwiesen. Diese Transkripte wurden vor allem aufgrund der großen Expressionsunterschiede für die ersten qRT-PCR-Versuche ausgewählt, ohne einen besonderen Bezug zu psychiatrischen Krankheiten oder suizidalem

Verhalten zu haben. Die Richtung der Expressionsänderung konnte durch die qRT-PCR für alle vier Transkripte bestätigt werden, und die Ergebnisse für *EFEMP1* und *ZFP36* belegten einen signifikanten Unterschied der Transkriptmengen zwischen beiden untersuchten Probandengruppen.

Tabelle 29: Ergebnisse der initialen Validierung

Gensymbol	Genname	FC Array	p-Value Array	FC PCR	p-Wert PCR
EFEMP1	EGF-containing fibulin-like EMP 1	-2,21	0,020	-2,52	0,021
KLF4	Kruppel like factor 4	-3,69	0,011	-2,57	0,063
PENK	Proenkephalin	+2,77	0,019	+2,10	0,118
ZFP36	Zinc finger protein 36, C3H type, homolog	-2,17	0,037	-1,89	0,048

Die Genexpression für PENK erreichte nur einen nicht-signifikanten p-Wert von 0,118, während KLF4 einen deutlichen Trend zur Signifikanz mit $p = 0,063$ zeigte.

3.3.2.2. Ergebnisse für Transkripte mit Fold-Change $\geq \pm 1,3$ und $p \leq 0,01$

Anschließend wurde die Genexpression von einigen Transkripten mit p-Werten $\leq 0,01$ und $FC \geq 1,3$ aus den Tabellen 26 und 27 durch qRT-PCR-Versuche überprüft. Aus den insgesamt 124 Genen, die diese Kriterien erfüllten, wurden neun Transkripte ausgewählt, die aufgrund ihrer Funktion oder von Literaturberichten besonders interessant für suizidales Verhalten sind. Die interessanten Befunde zu den Genen werden im folgenden vorgestellt, um den möglichen Bezug zu suizidalem Verhalten, psychiatrischen Krankheiten oder relevanten Charaktermerkmalen zu erläutern.

Das Protein Amphiphysin ist an der zytoplasmatischen Oberfläche von synaptischen Vesikeln lokalisiert und wird in vielen Neuronen exprimiert (Yamamoto et al, 1995). Amphiphysin Knock-out-Mäuse entwickeln sich normal und sind fertil; zeigen im Gegensatz zum Wildtyp aber Störungen im Recycling synaptischer Vesikel und eine erhöhte Mortalität aufgrund von cerebralen Anfällen (Di Paolo et al, 2002). Darüber hinaus haben diese Mäusen kognitive Defizite mit einer signifikanten Beeinträchtigung der Lernfähigkeit in verschiedenen Tiermodellen. Insgesamt deuten diese Befunde auf eine kritische Rolle von Amphiphysin für höhere Hirnfunktionen hin.

Das Cadherin 12 (alias neuronales Cadherin 2) gehört zur Gruppe der Calcium-abhängigen Zelladhäsionsproteine, die eine wichtige Rolle bei der Morphogenese und Zellmigration während der Entwicklung des Nervensystems spielen (Taniguchi et

al, 2006). Im Tierversuch konnte das Cadherin 12 ab der ersten postnatalen Woche detektiert werden; die Mengen an *CDH12*-mRNA stiegen anschließend bis auf den adulten Level an (Selig et al, 1997). Da in diesem Zeitraum auch ein starkes Wachstum der Neuriten sowie die Synaptogenese stattfinden, könnte das Cadherin 12 in die Entwicklung des ZNS involviert sein (Selig et al, 1997).

Das Cadherin-like 22 Protein ist ebenfalls ein Mitglied der Cadherin Superfamilie. Bisher sind nur wenige Daten über die Funktion dieses Gens beim Menschen bekannt. Das orthologe Gen der Ratte wird von Embryonen ab dem 15. Tag bis in die postnatale Periode exprimiert und ist an der Calciumabhängigen Zelladhäsion beteiligt (Sugimoto et al, 1996). *CDH22* ist bei adulten Ratten auch in der Hypophyse detektierbar und spielt durch die Regulation der Zell-Zell-Adhäsion möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des ZNS und neuroendokriner Organe.

Die Subfamilie der Protocadherine besitzt auf extrazellulärer Seite ebenfalls Cadherin-typische Domänen, interagiert auf der zytoplasmatischen Seite im Vergleich mit den klassischen Cadherinen aber mit anderen Proteinen (Gumbiner, 2005). Protocadherine wie *PCDHB5* werden vor allem im ZNS exprimiert und scheinen, wie die klassischen Cadherine, eine wichtige Rolle bei der Hirnentwicklung zu spielen (Yagi und Takeichi, 2000; Frank und Kemler, 2002). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Gene *CDH12*, *CDH22* sowie *PCDHB5* für die Validierung mittels qRT-PCR-Versuchen ausgewählt.

Die Struktur des stark sauren Peptids Chromogranin B (CHGB) wurde durch die Isolation eines cDNA-Klons aus einer Phäochromozytom-Zelllinie aufgeklärt (Benedum et al, 1987). Chromogranin B wird zusammen mit Neurotransmittern oder Peptidhormonen in den sekretorischen Vesikeln von neuroendokrinen Zellen und Neuronen gespeichert (Taupenot et al, 2003). Chromogranin B ist an der Regulation der Aufnahme sowie der Exocytose der genannten Botenstoffe beteiligt, und nimmt dadurch eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion im ZNS ein. Die Ergebnisse mehrerer Studien deuten auf eine mögliche Bedeutung von Chromogranin B für die Ätiologie der Schizophrenie hin. Eine Untersuchung der Spiegel an Chromogranin B im Cerebrospinalfluid zeigte bei schizophrenen Patienten signifikant erniedrigte Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe (Landen et al, 1999). Das *CHGB*-Gen liegt außerdem in einer durch eine Kopplungsstudie identifizierten Kandidatenregion für Schizophrenie (Kitao et al, 2000). Zwei nachfolgende Assoziationsstudien untersuchten die Allelverteilung einiger *CHGB*-

Polymorphismen und fanden signifikante Unterschiede zwischen schizophrenen Patienten und Kontrollen (Zhang et al, 2002; Iijima et al, 2004).

Der Transkriptionsfaktor *CDCA7L* konnte durch das Screening einer humanen cDNA-Bibliothek geklont und isoliert werden (Chen et al, 2005). Das *CDCA7L*-Protein bindet an die SP1-Bindungsstelle im Promotorbereich des Monoaminoxidase-A-Gens und hemmt sowohl dessen Expression als auch die enzymatische Aktivität der Monoaminoxidase A (MAO-A). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Inhibition mit dem Grad der Proteinexpression von *CDCA7L* korreliert (Chen et al, 2005). Die Monoaminoxidase A selbst ist eines der wichtigsten Enzyme im oxidativen Metabolismus von Dopamin, Noradrenalin und Serotonin. *MAO-A* Knock-out-Mäuse besitzen erhöhte Mengen der genannten Neurotransmitter im ZNS und neigen zu aggressivem Verhalten (Shih et al, 1999). Personen mit einer kompletten *MAO-A*-Defizienz durch Punktmutationen zeigen eine gestörte Regulation impulsiv-aggressiven Verhaltens (Brunner et al, 1993). Zwei Untersuchungen genetischer Polymorphismen fanden signifikante Assoziationen der Monoaminoxidase A mit suizidalem Verhalten (Ho et al, 2000; Du et al, 2002). Aufgrund der Assoziation von *MAO-A* mit Aggressivität und Suizidalität und der Regulation dieses Gens durch das *CDCA7L*-Protein ist auch dieser Transkriptionsfaktor für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse.

Die *MYR8*-mRNA wird vor allem in neuronalem Gewebe, aber auch in Herz, Testis und Ovarien exprimiert (Nagase et al, 1998). Das orthologe Gen der Ratte kann in ähnlicher Weise vor allem in multiplen Regionen des ZNS, in der Herzmuskulatur und der Skelettmuskulatur detektiert werden (Patel et al, 2001). Die mRNA-Level im Neocortex erreichen in den ersten beiden postnatalen Wochen die höchsten Werte, und damit in einem Zeitraum mit ausgeprägter neuronaler Zellmigration und axonalem Wachstum. Die Autoren vermuten aus diesem Grund eine Regulation der *MYR8*-Genexpression während der Entwicklung des ZNS (Patel et al, 2001).

Das *S100A13* Gen codiert für ein heterodimeres Protein aus der Familie der S100 Proteine. Das *S100A13* Protein besitzt zwei EF-Hand Calcium-bindende Domänen und ist zusammen mit anderen S100-Proteinen in einem Cluster auf Chromosom 1q21 lokalisiert (Wicki et al, 1996). Eine genomweite Linkage Studie mit 22 hochbelasteten Familien identifizierte diese Region als Kandidatenregion für Schizophrenie und zeigte eine signifikante Kopplung auf 1q21-22 (Brzustowicz et al., 2000). Das *S100A13* Protein scheint in die Entwicklung des zentralen

Nervensystems involviert zu sein, da es im fetalen Hippocampus und temporalen Cortex zu entsprechenden Zeitpunkten exprimiert wird (Chan et al, 2003).

Das auf Chromosom 11q23 gelegene Gen *SCN2B* codiert für die Untereinheit 2-beta eines spannungsabhängigen Natriumkanals (SCN = Sodium Channel; Eubanks et al, 1997). *SCN2B*-Knock-out-Mäuse zeigten eine weitgehend normale Entwicklung des ZNS, aber eine reduzierte Anzahl an Natriumkanälen sowie eine erhöhte Anfälligkeit für cerebrale Anfälle (Chen et al, 2002). Das *SCN2B*-Protein scheint in die Regulation der Natriumkanal-Dichte und der Erregbarkeit der Neuronen involviert zu sein.

Alle oben genannten Gene sind aufgrund ihrer Funktion oder Vorergebnissen aus publizierten Studien besonders interessant für suizidales Verhalten. Es handelt sich dabei insbesondere um Gene, die an der neuronalen Signaltransduktion und der Entwicklung des ZNS beteiligt sind, aber auch um Transkripte, die durch Studien mit psychiatrischen Krankheiten oder charakterlichen Merkmalen wie einer erhöhten Aggressivität in Verbindung gebracht worden sind.

Die Expression der genannten Gene wurde durch unabhängige qRT-PCR Versuche erneut bestimmt und mit den Resultaten der Microarrays verglichen. Die Richtung der Expressionsänderung konnte dabei für *AMPH*, *CDCA7L*, *CDH12*, *CDH22*, *CHGB*, *MYR8*, *PCDHB5*, *S100A13* und *SCN2B* bestätigt werden. Die Ergebnisse der Arrays und der qRT-PCR führten nur im Falle des Gens für Chromogranin B zu einem Widerspruch. Die Ergebnisse der Validierungsversuche sind in Tabelle 30 im Überblick dargestellt.

Tabelle 30: Ergebnisse der Validierung von 9 Genen mit $FC \geq \pm 1,3$ und $p \leq 0,01$

Gensymbol	Genname	FC Array	p-Value Array	FC PCR	p-Wert PCR
<i>AMPH</i>	Amphiphysin	+1,42	0,009	+1,09	0,431
<i>CDCA7L</i>	Cell division cycle associated 7-like	-1,55	0,001	-1,46	0,010
<i>CDH12</i>	Cadherin 12, type 2	+1,49	0,005	+1,32	0,031
<i>CDH22</i>	Cadherin-like 22	+1,55	0,010	+1,01	0,942
<i>CHGB</i>	Chromogranin B	+1,40	0,008	-1,06	0,503
<i>MYR8</i>	Myosin heavy chain (Alias RP11-54H7.1)	+1,42	0,003	+1,09	0,305
<i>PCDHB5</i>	Protocadherin beta 5	-1,33	0,006	-1,27	0,017
<i>S100A13</i>	S100 calcium binding protein A13	-1,43	0,004	-1,55	0,001
<i>SCN2B</i>	Sodium channel, voltage gated II beta	+1,39	0,004	+1,22	0,028

Die Transkripte *CDCA7L*, *CDH12*, *PCDHB5*, *S100A13* und *SCN2B* waren auch nach den Ergebnissen der qRT-PCR in der Suizidgruppe signifikant differentiell exprimiert.

Zusammenfassend konnten die Arrayergebnisse für fünf der neun untersuchten Transkripte durch die qRT-PCR vollständig bestätigt werden. Bei acht der neun Gene konnte die Richtung der Expressionsänderung in den qRT-PCR-Experimenten repliziert werden.

3.3.2.3. Zusätzliche Validierungen

Zusätzlich wurde die Expression der Gene *CRH*, *MLC1* und *PTPRR* durch qRT-PCR bestimmt, die in den Microarrays zwar p-Werte $> 0,01$ aufwiesen, aber aufgrund von Vorberichten oder ihrer Funktion wiederum besonders interessant für suizidales Verhalten waren.

Verschiedene Befunde deuten auf eine Dysregulation des Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Systems (HHN-System) bei affektiven Störungen und bei Suizidenten hin (Lester, 1992; Coryell und Schlessler, 2001; Pfennig et al, 2005). Suizidales Verhalten scheint insgesamt mit einer Überaktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse assoziiert zu sein (Mann, 2003). Eine aktuelle Studie berichtet erhöhte Proteinspiegeln des Corticotropin-Releasing Hormons CRH in *post mortem* Gewebe von Suizidenten (Merali et al, 2004). Die *CRH*-mRNA zeigte bei den Suizidenten in den durchgeführten Microarrayversuchen eine Expressionserhöhung um den Faktor 1,62 bei einem p-Wert von 0,042. Die Bestimmung der Transkriptmengen mittels qRT-PCR belegte ebenfalls eine Überexpression bei den Suizidenten, die aber mit einem Fold-Change von 1,16 deutlich geringer und nicht signifikant ausfiel.

Mutationen im *MLC1*-Gen sind ursächlich für die Megaloenzephalische Leukoenzephalopathie mit subcorticalen Zysten, einer erblichen neurologischen Krankheit mit Störungen der Myelinfunktion (Leegwater et al, 2002; Boor et al, 2005). Zwei voneinander unabhängige Untersuchungen belegen die Assoziation von Polymorphismen im *MLC1*-Gen mit der katatonen Schizophrenie (Meyer et al, 2001; Verma et al, 2005). Die Studie von Verma und Kollegen fand darüber hinaus sowohl in der familienbasierten Analyse als auch im Fall-Kontroll-Design eine signifikante Assoziation des *MLC1*-Gens mit bipolar-affektiven Störungen. Die Bestimmung der Transkriptmengen im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierte in der untersuchten Stichprobe einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit einer um den Faktor 1,56-fach schwächeren Expression in der Suizidgruppe bei den qRT-PCR-Versuchen.

Der Protein-Tyrosin-Phosphatase Rezeptor R (PTPRR) gehört zu einer Gruppe von Phosphatasen, die spezifisch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) inaktivieren (Eswaran et al, 2006). Eine *post mortem* Studie mit Gewebe aus dem präfrontalen Cortex von depressiven Suizidenten zeigte eine signifikant geringere Genexpression der MAP-Kinase 1 und MAP-Kinase 3 (Dwivedi et al, 2001). Die Transkription des orthologen Gens der Ratte wird durch den Nervenwachstumsfaktor NGF um ein Vielfaches gesteigert (Sharma und Lombroso, 1995). Dieses Protein ist neben anderen Neurotrophenin möglicherweise ebenfalls in die Ätiologie suizidalen Verhaltens involviert, wie eine weitere *post mortem* Untersuchung vermuten lässt (Dwivedi et al, 2003b). Aus diesen Gründen haben wir die Genexpression von *PTPRR* in der vorliegenden Arbeit ebenfalls validiert. Die Suizidgruppe zeigte in den qRT-PCR-Versuchen eine um den Faktor +1,47 signifikant höhere Menge an *PTPRR*-mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe.

3.3.3. Zusammenfassung der Validierungsversuche

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Microarrayversuche und der qRT-PCR eine gute Übereinstimmung. Die Richtung der Genexpressionsänderung konnte bei 14 von 15 untersuchten Genen bestätigt werden. Die neun in Tabelle 31 zusammengefassten Transkripte zeigten auch in der qRT-PCR eine signifikant differentielle Genexpression in der Suizidgruppe.

Tabelle 31: Differentiell exprimierte Transkripte

Gensymbol	Funktion	FC PCR	p-Wert PCR
<i>CDCA7L</i>	Cell division cycle associated 7-like	-1,46	0,010
<i>CDH12</i>	Cadherin 12, type 2	+1,32	0,031
<i>EFEMP1</i>	EGF-containing fibulin-like EMP 1	-2,52	0,021
<i>MLC1</i>	Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1	-1,56	0,042
<i>PCDHB5</i>	Protocadherin beta 5	-1,27	0,017
<i>PTPRR</i>	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	+1,47	0,043
<i>S100A13</i>	S100 calcium binding protein A13	-1,55	0,001
<i>SCN2B</i>	Sodium channel, voltage gated II beta	+1,22	0,028
<i>ZFP36</i>	Zinc finger protein 36, C3H type, homolog	-1,89	0,048

Die Ergebnisse der Validierungsversuche sind in Abbildung 18 im Überblick grafisch dargestellt. Die Richtung der Genexpressionsänderung stimmte in allen Fällen mit Ausnahme von *CHGB* für beide Methoden überein.

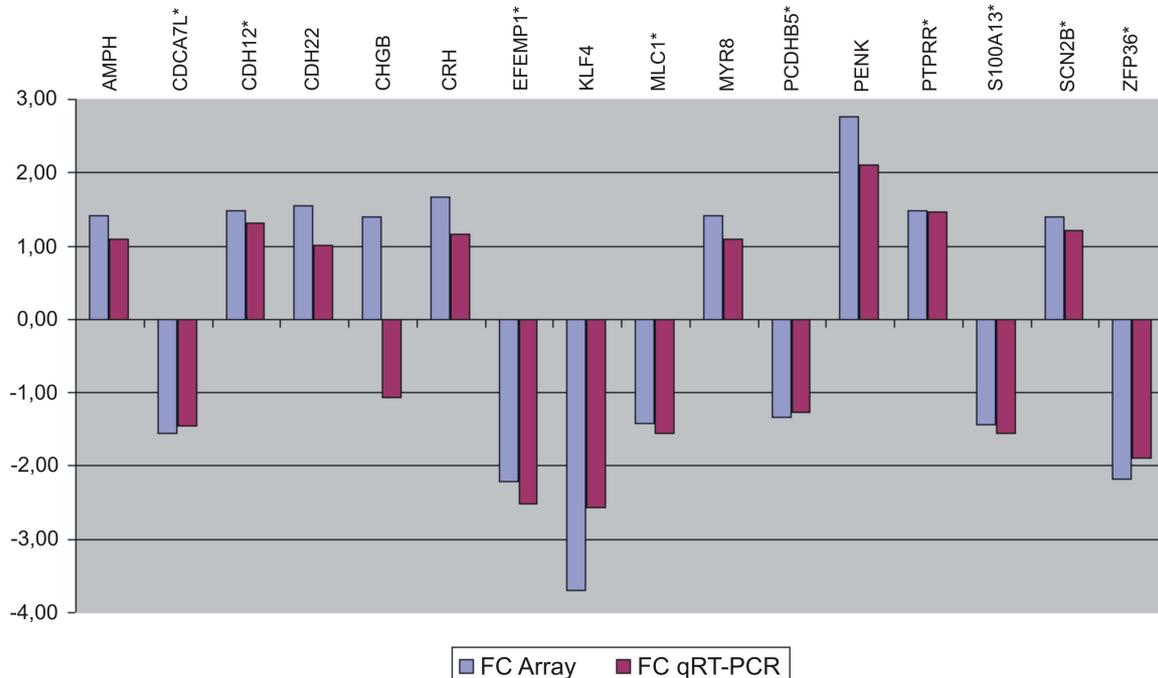


Abbildung 18: Vergleich der Ergebnisse Microarray – quantitative RT-PCR

Dargestellt sind die Expressionsunterschiede der einzelnen Transkripte aus den Microarrayexperimenten (linke Balken) und der qRT-PCR (rechte Balken). Bei allen Genen bis auf *CHGB* stimmte die Richtung der Expressionsänderung überein; signifikant differentielle Transkriptmengen bei $p \leq 0,05$ in der qRT-PCR sind mit einem hochgestellten * hinter dem Gennamen gekennzeichnet.

Die neun in Tabelle 31 aufgeführten und in der Abbildung 18 mit einem Stern markierten Gene zeigten im *post mortem* orbitofrontalen Cortex der Suizidenten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant unterschiedliche Transkriptmengen.

4. Diskussion

4.1. Microarrayexperimente und Validierungsversuche

4.1.1. Probandekollektiv

Die demographischen Informationen über die Kontrollen und Suizidenten stammen aus den Angaben verschiedener Behörden und sind als verlässlich anzusehen. Die Sektionen erfolgten bei allen Suizidenten auf behördliche Anordnung. Darüber hinaus wurden, soweit möglich, psychologischen Autopsien durch einen erfahrenen Psychiater durchgeführt, um Angaben zu Psychopathologie der Personen zu Lebzeiten zu erhalten. Dazu erfolgte zum einen die Befragung der Angehörigen der Verstorbenen, sowie außerdem die Auswertung vorhandener Krankenakten. Insgesamt sechs der elf Suizidenten litten zu Lebzeiten an depressiven Störungen, während bei einer Person Alkoholprobleme vorlagen. Dies entspricht in etwa den Ergebnissen zweier aktueller Meta-Analysen, welche die psychiatrischen Diagnosen bei insgesamt fast 20.000 Suizidenten untersuchten (Bertolote et al, 2004; Arsenault-Lapierre et al, 2004). In beiden Studien stellten affektive Erkrankungen mit jeweils circa 40 % den größten Anteil aller Diagnosen, vor Suchterkrankungen, psychotischen Erkrankungen und Persönlichkeitsstörungen. Durch den hohen Anteil an Personen mit affektiven Störungen in der Suizidgruppe ist es denkbar, dass die beobachteten Genexpressionsänderungen zum Teil mit dieser Krankheit assoziiert sind und nicht mit dem suizidalen Verhalten selbst. Aus diesem Grund sollten die identifizierten Gene ebenso als mögliche Kandidatengene für affektive Störungen in Betracht gezogen werden.

Es wird aber vermutet, dass die Neigung zu suizidalem Verhalten zumindest teilweise unabhängig von psychiatrischen Krankheiten vererbt wird (Brent und Mann, 2005). Für die vorliegende Untersuchung wurden nur Personen eingeschlossen, die durch violenten Suizid starben. Dadurch ist die Gruppe der Suizidenten relativ homogen, was die Identifizierung gemeinsamer genetischer Faktoren für suizidales Verhalten erleichtert. Das Gehirn ist das komplexeste aller menschlichen Organe, und Verhalten kann als ´phänotypischer Output des ZNS´ definiert werden (Gottesman und Gould, 2003). Suizidales Verhalten stellt einen sehr komplexen, kontinuierlichen Phänotyp dar und reicht von Suizidgedanken über Suizidversuche bis hin zu vollendetem Suizid als schwerster Form des

Verhaltens. Die Ätiologie ist dabei multifaktoriell und wird durch genetische Faktoren und Umwelteinflüsse determiniert. Die Einschränkung der Fallgruppe auf Personen, die durch violenten Suizid starben, vereinfacht die Identifizierung gemeinsamer genetischer Ursachen durch eine Reduktion der Komplexität des untersuchten Verhaltens. Auf neuropsychologischer Ebene entspricht dies einer erhöhten Neigung zu Aggressivität und violentem Verhalten.

Die Erforschung der genetischen Ursachen suizidalen Verhaltens wird durch die große Heterogenität dieses Phänomens stark erschwert. Die Verwendung von Endophänotypen könnte die Identifizierung von Suszeptibilitäts-Genen vereinfachen, die an der Ätiologie des Suizids beteiligt sind. Endophänotypen sind über die Zeit stabile, genetisch determinierte biologische Krankheitskorrelate, bei denen eine größere Nähe zu einzelnen Genen postuliert wird (Gottesman und Gould, 2003). Diese Strategie hat bei der Erforschung der genetischen Ursachen der Schizophrenie oder des Alkoholismus bereits zu Erfolgen in molekulargenetischen Untersuchungen geführt. Ideale Endophänotypen sind dabei zeitstabile, erbliche Krankheitsmarker, die in der Bevölkerung mit dem Auftreten der Krankheit assoziiert sind und in Familien ebenso wie die Krankheit co-segregiert werden. Psychiatrische Erkrankungen setzen sich dabei theoretisch aus einer bestimmten Anzahl von Endophänotypen zusammen, die im Idealfall jeweils von einem Gen verursacht werden.

Das Matchen der Probanden erfolgte unter Berücksichtigung der wichtigen Kovariablen pH-Wert, Alter, Geschlecht und PMI. Neben diesen Kriterien hat aber auch der Lebensstil einer Person einen Einfluss auf das Expressionsprofil (Mirnics und Pevsner, 2004). Es ist aufgrund der hohen Anzahl an Kovariablen und der begrenzten Verfügbarkeit von *post mortem* Gewebe aber nahezu unmöglich, bei der Durchführung von Microarraystudien auch die Lebensumstände der Probanden zu berücksichtigen. Eine Ausnahme stellt das Rauchen dar, welches durch die Befragung der Angehörigen und Berücksichtigung beim Matchen relativ einfach berücksichtigt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde dies nicht durchgeführt, da für das Probandenkollektiv die entsprechenden Angaben zum Zeitpunkt der Datenerfassung nicht erhoben worden sind und eine nachträgliche Erhebung mit einem großen organisatorischen Aufwand verbunden gewesen wäre.

4.1.2. RNA-Qualität

Da beide Probandengruppen hinsichtlich der wichtigen Kovariablen wie pH-Wert, Alter der Personen und PMI keine signifikanten Unterschiede aufweisen, ist eine Verfälschung der Ergebnisse durch einen Einfluss dieser Faktoren unwahrscheinlich. Vor allem der pH-Wert als wichtigstes Kriterium für die Qualität und Integrität der RNA unterschied sich im Mittelwertsvergleich zwischen beiden Gruppen nur minimal und lag bei den Suizidenten bei $6,74 \pm 0,10$, bei den Kontrollen bei $6,71 \pm 0,20$. Die Extraktion von qualitativ hochwertiger und wenig degradierter RNA ist eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Durchführung von Microarrayversuchen.

In diesem Zusammenhang sind die teils hohen *post mortem* Intervalle einiger Suizidenten und Kontrollen zu berücksichtigen, die durchschnittlich bei $55,4 \pm 14,3$ beziehungsweise $64,1 \pm 11,4$ lagen. Nukleinsäuren sind *post mortem* deutlich stabiler als die meisten Neuropeptide und Katecholamine, obgleich einzelne Ausnahmen dieser Regel existieren (Hynd et al, 2003). Die Isolierung von biologisch aktiver und intakter mRNA wurde von verschiedenen Autoren nach Zeiträumen von bis zu vier Tagen berichtet (Perett et al, 1988; Barton et al, 1993; Leonard et al, 1993; Johnston et al, 1997; Schramm et al, 1999; Yasojima et al, 2001; Bahn et al, 2001). Aus diesem Grund wurden auch Personen mit höheren PMI-Werten eingeschlossen und die Qualität der RNA mit verschiedenen Methoden stringent geprüft.

Die Extraktion der RNA erfolgte darüber hinaus nach einem optimierten Protokoll mit zusätzlichem DNA-Verdau, um Kontaminationen mit genomischer DNA vor allem in Hinblick auf die empfindliche qRT-PCR auszuschließen. Das verwendete RNeasy Lipid Tissue Kit ist speziell für die RNA-Extraktion aus Gewebe mit einem hohen Fettanteil, wie es auch Hirngewebe darstellt, konzipiert. Diese Kit basiert auf einer Extraktionssäule und liefert durch die bessere Abtrennung von RNasen und Riboenzymen bessere RNA-Qualitäten und stabilere Produkte als die klassische Flüssigextraktion mit Trizol (Miller und Yolken, 2003). Die Verwendung von RNase-freien Tubes und Pipettenspitzen sowie die Behandlung der Arbeitsflächen mit der RNase-inaktivierenden Lösung RNase Away verminderte zusätzlich eine mögliche Degradation der extrahierten RNA durch ubiquitär vorhandene RNasen.

Eine erste Qualitätskontrolle der extrahierten RNA erfolgte durch die photometrische Bestimmung des Absorptionsverhältnisses $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$

und die Agarose-Gelelektrophorese. Hier wurden nur Proben für die weiteren Untersuchungen eingeschlossen, die ein Absorptionsverhältnis zwischen 1,8 und 2,1 sowie klar erkennbare 18S- und 28S-Banden zeigten. Proben mit deutlich erkennbaren Degradationsprodukten wurden frühzeitig ausgeschlossen. Anschliessend wurde für alle verbliebenen Proben mithilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers analysiert. Die für die Microarrays verwendeten Proben zeigten in dieser Untersuchung deutlich sichtbare und kaum degradierte 18S- und 28S-Peaks als Zeichen qualitativ hochwertiger RNA.

4.1.3. Microarrays

Wichtige Parameter für die Qualität von Microarrayexperimenten sind die Akkuratheit und die Präzision der Ergebnisse. Unter der Präzision einer Messung versteht man den Grad der Übereinstimmung wiederholter Messungen der gleichen Probe, während die Akkuratheit die Abweichung zwischen gemessenem und tatsächlichem Wert oder einem Referenzwert bezeichnet. Je kleiner die Genexpressionsunterschiede sind, die detektiert werden sollen, desto größer müssen die Akkuratheit und die Präzision der Differenzwerte sein.

Jeder Beadtyp hybridisiert aufgrund der genspezifischen Sonden nur ein bestimmtes Transkript und ist in jedem Array im Durchschnitt 30 mal vorhanden. Durch diese interne technische Replikation der Genexpressionsmessung besitzen die verwendeten Sentrix HumanRef-8 Bead Chips eine sehr hohe Präzision und Reproduzierbarkeit mit einer Standardabweichung von Array zu Array unter 10% (Kuhn et al, 2004). Diese wurde in der vorliegenden Arbeit durch das Ergebnis des Hybridisierungsreplikats bestätigt, für welches ein Regressionskoeffizient von $R^2=0,9929$ ermittelt. Die hohe Übereinstimmung der Resultate der Hybridisierung der Probe Suz K auf zwei verschiedenen Bead Chips zeigt, dass aus der Verwendung von verschiedenen Arrays nur eine sehr geringe Fehlerrate resultiert. Die Inkorporation von Biotin während der *in vitro* Transkription der RNA und die anschließende Markierung der RNA mit Streptavidin-Cy3 zeigten eine deutlich geringere Reproduzierbarkeit. Der durchschnittliche Regressionskoeffizient aller drei Labelingreplikate lag mit einem R^2 -Wert von 0,9852 unter dem Wert des Hybridisierungsreplikats. Die *in vitro* Transkription mithilfe eines T7-Promotor-Systems ist damit eine der Haupt-Fehlerquellen bei der Durchführung von Microarrays. Diese Methode ist aber trotzdem sehr verbreitet, da die Menge der eingesetzten RNA stark durch eine T7-Transkription stark vermindert werden kann.

Die ist aufgrund der geringen Verfügbarkeit von RNA aus Biopsien oder bei *post mortem* Studien wie im vorliegenden Fall ein großer Vorteil. Durch die Verwendung von standardisierten Reaktionsbedingungen konnte dieser Reaktionsschritt für alle Proben relativ homogen und gleichmäßig effektiv durchgeführt werden. Das Labeling mit Biotin-Streptavidin bietet darüber hinaus gegenüber den ebenfalls verbreiteten Arrayexperimenten mit zwei Farbstoffen den Vorteil der Vergleichbarkeit ohne Korrekturverfahren für unterschiedliche Labeling-effizienzen oder die Notwendigkeit des 'dye-swaps' (Konradi et al, 2005).

Durch das Vorhandensein mehrerer Beads pro Beadtyp an verschiedenen Stellen des Chips kann die Standardabweichung der Signalintensitäten herangezogen werden, um die Qualität der Versuche zu beurteilen. Die durchschnittliche Standardabweichung der Genexpressionswerte betrug für alle Beadtypen 5,34 % und belegt damit die sehr hohe Präzision der verwendeten Arrays.

4.1.4. Normalisierung, Daten-Filterung und Statistik

Die Ergebnisse von Microarrayexperimenten können von äußeren Faktoren wie beispielsweise RNA-Qualität, Enzymaktivität bei der *in vitro* Transkription oder Hybridisierungstemperatur beeinflusst werden. Neben der Standardisierung der Versuchsbedingungen im experimentellen Teil der Untersuchungen dient die anschließende Normalisierung der Daten dazu, mögliche Unterschiede der Reaktionsbedingungen zu minimieren oder ganz auszugleichen. Die Normalisierung der hier vorliegenden Daten erfolgte mit der AnEx 1.3.0.7. Software, die von der Firma Illumina speziell für die verwendeten Sentrix Bead Chips entwickelt worden ist.

Durch den Abzug des durch die Negativkontrollen ermittelten Hintergrundsignals von allen Genexpressionswerten wurde der Einfluss von unspezifischen Hybridisierungen, unspezifischem Farbstoff-Signal und Scanner-Background eliminiert. Dies verbesserte insbesondere die Verlässlichkeit der Daten bei Transkripten mit schwachen Signalintensitäten und verringerte die Anzahl der falsch-positiven Resultate.

Lokale Schwankungen der Hybridisierungsbedingungen wurden bei den verwendeten Sentrix Bead Chips durch die internen technischen Replikationen mit mehreren Messungen pro Transkript automatisch ausgeglichen. Die Vergleichbarkeit der einzelnen Arrays wurde durch die globale Normalisierung der Daten gewährleistet, bei der die durchschnittliche Signalintensität aller Arrays auf

ein Niveau adjustiert wurde. Diese Methode ist sehr gut für den Vergleich ähnlicher Proben bei einer hohen Anzahl von Genexpressionsmessungen wie im vorliegenden Fall geeignet.

In alle weiteren Analysen wurden nur Gene berücksichtigt, die über alle Proben einen Detection Score von mindestens 0,99 zeigten. Mit diesem Kriterium wurde die Anzahl der falsch-positiven Ergebnisse weiter gesenkt, da die Genexpressionssignale bei diesem Signifikanzniveau von $p = 0,01$ eindeutig vom unspezifischen Hintergrundrauschen unterscheidbar waren.

Durch den Ausschluss aller Gene mit einem Fold-Change $< 1,3$ für die anschließenden Analysen wurde die Zahl der getesteten Nullhypothesen weiter verringert und so die Rate an falsch-positiven Ergebnissen weiter gesenkt. Die Auswahl dieses Kriteriums erfolgte dabei aufgrund der weiter oben erwähnten Präzision der verwendeten Illumina Sentrix HumanRef-8 Bead Chips, die Expressionsunterschiede ab diesem Faktor mit einer ausreichenden Zuverlässigkeit nachweisen können (Dickinson und Craumer, 2003).

4.1.5. Quantitative RT-PCR

Für die Beurteilung der Verlässlichkeit der generierten Arraydaten wurden die Expressionsdaten ausgewählter Gene mit einer unabhängigen Methode, der qRT-PCR, validiert. Die Vorteile dieser Methode liegen vor allem in der Schnelligkeit, mit der einzelne Analysen durchgeführt werden können, und in dem relativ geringen Materialverbrauch. Deswegen eignet sich diese Methode besonders zur Validierung ausgewählter Ergebnisse von Microarrayuntersuchungen und ermöglicht die schnelle Bestätigung der Hypothesen. Darüber hinaus liefert diese Technik bei korrekter Anwendung sehr zuverlässige Resultate. Die qRT-PCR ist aus den genannten Gründen die am häufigsten zur Validierung von Genexpressionsdaten aus Arrayversuchen verwendete Methode (Chuaqui et al, 2003). Für die qRT-PCR-Versuche der vorliegenden Arbeit wurde von jeder Probe ein Aliquot der für die Arrays extrahierten RNA transkribiert. Dadurch wurden für die Microarrays und die Validierungsversuche exakt dieselben RNA-Chargen verwendet. Im Unterschied zu den Arrays erfolgte das Priming für die qRT-PCR aber nicht mit Oligo-dT-Primern, sondern mit Random-Hexamer-Primern. Random Hexamer Primer binden im Gegensatz zu den Oligo-dT-Primer zufällig an beliebigen Stellen innerhalb der mRNA und sind dadurch nicht auf das Vorhandensein intakter Poly-A-Sequenzen angewiesen (Miller und Yolken, 2003).

Diese Priming-Methode ist etwas robuster als die Verwendung von Oligo-dT-Primern, da insbesondere die Poly-A-Sequenzen einer enzymatischen Degradation unterliegen.

Die Normalisierung der qRT-PCR unter Verwendung der Expressionsdaten von mehreren internen Kontrollgenen hat gegenüber anderen Methoden mehrere Vorteile. Die Auswahl von nur einem Kontrollgen ist sehr kritisch zu bewerten, da bei allen bisher gebräuchlichen Kontrollgenen beträchtliche interindividuelle Schwankungen der Expression beobachtet wurden (Suzuki et al, 2000). Die Normalisierung gegen die Gesamtmasse an RNA ist ebenfalls nicht optimal, da diese nicht immer repräsentativ für die mRNA ist und zum großen Teil aus ribosomaler RNA besteht. Die ribosomale RNA wird darüber hinaus ebenso wie die 18S- und 28S-RNA oftmals durch die Aufbereitung der RNA entfernt und kommt im Vergleich zur mRNA in sehr viel größeren Mengen vor, was die Analyse der Daten erschwert (Vandesompele et al, 2002). Die Errechnung der Normalisierungsfaktoren für die qRT-PCR erfolgte in der vorliegenden Arbeit unter Verwendung der vier stabilsten internen Kontrollgene aus verschiedenen funktionellen Klassen über alle Proben. Dadurch war es möglich, den Großteil der unspezifischen Varianz der Genexpression zu korrigieren. Diese Vorgehensweise kommt außerdem der globalen Normalisierung der Arraydaten im Vergleich zu den anderen Normalisierungsmethoden für die qRT-PCR am nächsten, und bietet sich deswegen besonders für die Validierung der Microarraydaten an.

4.2. Interpretation der Ergebnisse

Das Ziel von molekulargenetischen Untersuchungen ist die Aufklärung der genetischen Ursachen und der Pathophysiologie von erblichen Krankheiten. Suizidales Verhalten als sehr komplexes Phänomen wird sowohl durch Umwelteinflüsse als auch durch multiple genetische Faktoren beeinflusst. Die Untersuchung der Genexpression in der vorliegenden Arbeit identifizierte signifikante Unterschiede der Transkriptmengen verschiedener Gene zwischen der Kontroll- und der Suizidgruppe. Microarrays ermöglichen die simultane Messung der Expression von Tausenden von Transkripten in einem Experiment. Aus diesem Grund sind Arraystudien besonders dafür geeignet, neue Kandidatengene für komplexe Krankheiten zu identifizieren. Der Vorteil des multiplen Testens von

tausenden Hypothesen in einem Experiment führt gleichzeitig zu dem Nachteil der möglichen Generierung von falsch-positiven Ergebnissen.

4.2.1. t-Test und GEPAS-Auswertung

Die initiale Analyse der Microarraydaten identifizierte je nach gewähltem p-Wert und Fold-Change-Niveau eine unterschiedliche Anzahl an differentiell exprimierten Transkripten. Das Cut-off-Kriterium eines Genexpressionsunterschiedes von mindestens 1,3-fach wird aufgrund der Präzision und Genauigkeit der verwendeten Bead Chips von der Firma Illumina empfohlen und ist auch in Anwendungsstudien beschrieben worden (Dickinson und Craumer, 2003; Kuhn et al, 2004). Das Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ wurde gewählt, um die Rate an falsch-positiven Ergebnissen möglichst gering zu halten.

4.2.2. Ergebnisse der Validierungsversuche

Die initiale Validierung der Genexpression der vier Transkripte *EFEMP1*, *KLF4*, *PENK* und *ZFP36* mit einem FC > 2,0 bei p-Werten zwischen 0,01 und 0,05 bestätigte die Richtung der Expressionsänderung in allen vier Fällen, während nur zwei Ergebnisse auch in der qRT-PCR Signifikanz erreichten. Bei Berücksichtigung aller Gene mit einem p-Wert $\leq 0,01$ konnte die Richtung der Expressionsänderung in acht von neun Fällen bestätigt werden. Fünf der neun Transkripte aus dieser Gruppe zeigten auch nach den Ergebnissen der qRT-PCR eine signifikant differentielle Genexpression, was einer Fehlerrate von 44 % entspricht. Diese empirisch ermittelte Fehlermenge ist dabei deutlich höher als die mit der Gene Expression Analysis Suite ermittelte False Discovery Rate von 12 %. Dies resultiert zum Teil daraus, dass einige Fehler wie unspezifische Oligonucleotide, Kreuz- und Fehlhybridisierungen mathematisch nicht erfasst werden können und nicht in der kalkulierten FDR enthalten sind. Die Abweichung der beiden Fehlerraten könnte auch durch eine zufällig nicht-repräsentativ gewählte Stichprobe für die Validierung verursacht worden sein. In diesem Fall wäre die errechnete FDR von 0,12 korrekt, während die Ergebnisse der qRT-PCR nicht der tatsächlichen Datenqualität entsprechen würden.

Die hohe Fehlerrate aufgrund schwacher Signalintensitäten könnte durch eine Erhöhung der eingesetzten RNA-Menge eventuell verringert werden. Die hohe Komplexität von Microarrayversuchen und die Vielzahl der Einflussfaktoren macht einer nachträgliche Fehlersuche allerdings sehr schwer und spekulativ.

Insgesamt zeigte sich anhand der qRT-PCR-Versuche, dass eine hoher Fold-Change nicht das einzige Kriterium für eine erfolgreiche Validierung der Expressionsdaten ist. Von den Genen mit einem Fold-Change größer 2,0 in den Arrays zeigten nur die Hälfte auch in der qRT-PCR eine signifikant differentielle Genexpression. Im Gegensatz dazu konnten bei den neun anschließend überprüften Transkripten 56 % der Resultate bestätigt werden, obwohl diese Gene in den Arrays nur einen durchschnittlichen Fold-Change von 1,44 hatten. Insgesamt stimmten die Ergebnisse der Microarrays und der qRT-PCR-Versuche gut überein.

4.2.3. Signifikant differentiell exprimierte Gene

Die unter Punkt 3.3.3. erwähnten neun Gene, die auch in der qRT-PCR signifikant differentiell exprimiert waren, sind aufgrund der Validierung der Ergebnisse sehr vielversprechende neue Kandidatengene für suizidales Verhalten.

Die Gene *ZFP36* und *EFEMP1* zeigten in den Arrays hohe Expressionsunterschiede mit einem Fold-Change größer 2,0 und wurden aus diesem Grund für die initialen Validierungsversuche ausgewählt. Damit konnte die Qualität der Arrayversuche sehr schnell mit einer unabhängigen Methode überprüft und eingeschätzt werden.

Die geringere Genexpression des Transkriptionsfaktors *CDCA7L* bei den Suizidenten lässt aufgrund der Ergebnisse von Chen und Kollegen eine stärkere Expression des *MAO-A*-Transkripts sowie eine stärkere enzymatische Aktivität des *MAO-A*-Proteins erwarten. In Tierversuchen und Assoziationsstudien wurde dagegen beobachtet, dass aggressives Verhalten mit einer verminderten Aktivität des *MAO-A*-Enzyms assoziiert ist (Brunner et al, 1993; Shih et al, 1999). Die Arrayergebnisse in Bezug auf *CDCA7L* lassen sich in diesem Zusammenhang nur schwer interpretieren, da bei den Suizidenten rein hypothetisch erhöhte Mengen an *CDCA7L*-Transkript zu erwarten gewesen wären. Aufgrund des Nachweises einer Assoziation von Polymorphismen im *MAO-A*-Gen mit suizidalem Verhalten und der Regulation von *MAO-A* durch *CDCA7L* ist dieser Transkriptionsfaktor ein Kandidatengen für suizidales Verhalten. Das *MAO-A*-Gen selbst zeigte in den Microarrayversuchen keine signifikanten Expressionsunterschiede.

Die drei Cadherine *CDH12*, *CDH22* und *PCDHB5* waren in den Arrayversuchen alle signifikant differentiell exprimiert und erreichten p-Werte kleiner 0,01. Die Ergebnisse für *CDH12* und *PCDHB5* konnten durch die qRT-PCR-Experimente

bestätigt werden, während *CDH22* bei dieser Methode kein signifikantes Ergebnis erreichte. Die beiden erstgenannten Cadherine sind aufgrund ihrer Bedeutung bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems interessante neue Kandidatengene für suizidales Verhalten. Sowohl *CDH12* als auch *PCDHB5* sind in den für die Hirnentwicklung kritischen Zeiträumen exprimiert und spielen möglicherweise eine Rolle bei der Migration von Nervenzellen, axonalem Wachstum und der Synaptogenese (Selig et al, 1997; Frank und Kemler, 2002). In ähnlicher Weise wird das S100A13-Protein während der Entwicklung und Reifung des ZNS exprimiert, was für eine Beteiligung während dieser Vorgänge spricht (Chan et al, 2003). Störungen der Gehirnentwicklung aufgrund genetischer Faktoren werden auch im Zusammenhang mit der Pathophysiologie der Schizophrenie diskutiert (Rapoport et al, 2005). Diese genetischen Effekte interagieren dabei auch mit Umwelteinflüssen und führen so möglicherweise zu den prämorbidem kognitiven Defiziten und Verhaltensänderungen, die bei schizophrenen Patienten beobachtet werden können. Auch für das *MLC1*-Gen existieren erste Befunde, die eine mögliche Implikation für die Ätiologie psychiatrischer Krankheiten belegen, und zwar sowohl für Schizophrenien, als auch für bipolar-affektive Erkrankungen (Meyer et al, 2001; Verma et al, 2005). Das Vorhandensein einer psychiatrischen Krankheit ist einer der Hauptrisikofaktoren für suizidales Verhalten, und bei ungefähr 90 % aller Suizidenten ist zu Lebzeiten eine entsprechende Störung diagnostizierbar (Arsenault-Lapierre et al, 2004; Bertolote et al, 2004).

SCN2B codiert für eine Untereinheit eines spannungsabhängigen Natriumkanals, der aufgrund seiner Funktion an der Signaltransduktion und normalen Funktion des ZNS beteiligt ist. Durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde das *SCN2B*-Gen auf 11q23 lokalisiert; Mutationen in dieser Region führen interessanterweise zu Störungen der Myelinisierung und neurologischen Defiziten (Eubanks et al, 1997).

Das PTPRR-Protein inaktiviert zusammen mit anderen Phosphatasen spezifisch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, für die wiederum bei Suizidenten Veränderungen der Genexpression nachgewiesen worden sind (Dwivedi et al, 2001). Aus diesem Grund scheint auch für das PTPRR-Gen selbst eine Implikation für die Entstehung suizidalen Verhaltens denkbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle weiter oben genannten Gene aufgrund der differentiellen Expression in der Suizidgruppe potenzielle Kandidatengene für suizidales Verhalten sind. Die Befunde der vorliegenden Arbeit

sind erste Hinweise auf eine mögliche Bedeutung dieser Gene, die in ergänzenden Experimenten noch genauer untersucht werden sollten. Dazu bieten sich vor allem die Bestimmung der Expression auf Proteinlevel sowie die Untersuchung der Gene in Assoziationsstudien im Fall-Kontroll Design an.

4.2.4. Signifikante biologische Kategorien

Die biologischen Funktionskreise ´Entwicklung des zentralen Nervensystems´, ´Homophile Zelladhäsion´ und ´Transmission von Nervenimpulsen´ sind alle von entscheidender Bedeutung für die physiologische Funktion des ZNS. Für die Zelladhäsionsproteine wurde aufgrund der Ergebnisse verschiedener Kopplungsstudien eine mögliche Bedeutung für die Ätiologie der Schizophrenie diskutiert (Yagi und Takeichi, 2000; Gross et al, 2003). Ebenso wird von manchen Autoren eine Entwicklungsstörung des zentralen Nervensystems als eine der möglichen Ursachen der Schizophrenie vermutet (Kamiya et al, 2005; Rapoport et al, 2005; Schmidt-Kastner et al, 2006). Aufgrund dieser Bedeutung der Cadherine für die physiologische Entwicklung des zentralen Nervensystems und die normale Funktion ist eine Bedeutung dieser Proteine für die Entstehung suizidalen Verhaltens denkbar. Ähnlich verhält es sich mit den biologischen Kategorien ´Homophile Zelladhäsion´ und ´Transmission von Nervenimpulsen´, die ebenfalls von entscheidender Bedeutung für die normale Funktion des ZNS sind.

4.3. Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur

4.3.1. Vergleich mit publizierten Microarraystudien

Der Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den unter 1.3.4. bisher veröffentlichten Arbeiten ist aufgrund der teilweise unterschiedlichen Methodik der Studien und anderer Hirnregionen nur eingeschränkt aussagekräftig. Die Analyse von Sibille et al fand im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit keine signifikant differentiell exprimierten Transkripte (Sibille et al, 2004). Eine Pathway-Analyse erbrachte keine Hinweise auf eine Dysregulation einzelner biologischer Funktionskreise, und auch die nachfolgende Überprüfung bereits bekannter Kandidatengene für suizidales Verhalten zeigte keine signifikanten Expressionsunterschiede. Die Autoren folgerten, dass die Pathophysiologie des Suizids möglicherweise nicht zu großen Veränderungen der Transkription führt, oder dass diese in anderen corticalen oder subcorticalen Regionen lokalisiert sein

könnten. Weiterhin könnten post-transkriptionelle Modifikationen wie RNA-Splicing oder Veränderungen auf der Proteinebene an der Ätiologie des Suizids beteiligt sein, die durch den Affymetrix U133A Microarray nicht erfasst werden.

Alle Suizidenten der Studie von Sibille und Kollegen hatten eine Lebenszeitdiagnose einer depressiven Störung, während dies in der vorliegenden Arbeit nur bei 6 Suizidenten zutraf. Zweitens erfolgte das Matchen der beiden Gruppen bei der genannten Untersuchung nicht unter Berücksichtigung des pH-Werts, der aber von entscheidender Bedeutung für die Stabilität der RNA ist (Hynd et al, 2003; Li et al, 2004). Dies könnte die divergenten Ergebnisse, zumindest zum Teil, erklären. Sibille und Kollegen verwendeten weiterhin mit den Affymetrix U133A Human Genom Microarrays die Arraytechnologie eines anderen Herstellers. Dies dürfte allerdings keinen großen Einfluss auf die Ergebnisse haben, da ein systematischer Vergleich der Resultate von Affymetrix- und Illumina-Microarrays in einer Studie eine große Übereinstimmung zeigte (Barnes et al, 2005).

Die weiter oben ebenfalls beschriebene Veröffentlichung von Gwady und Kollegen beschreibt vor allem die Möglichkeiten von Genexpressionsstudien mit *post mortem* Hirngewebe und geht deswegen vor allem auf die Methodik, Auswertung und Aussagekraft dieser Technik ein (Gwady et al, 2005). Diese Studie identifizierte 292 Gene mit einem Fold-Change von mindestens 1,3 bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$. Im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit identifizierte die Untersuchung von Gwady und Kollegen damit mehr als doppelt so viele signifikant differentiell exprimierte Transkripte und steht damit ebenfalls im Widerspruch zu der Arbeit von Sibille und Kollegen. Auf der Ebene einzelner Gene wurde mit Ausnahme des Serotonin-Rezeptors vom Subtyp 2A (*5-HTR2A*) keine Ergebnisse publiziert. Das *5-HTR2A*-Gen war bei den Suizidenten mit einem Fold-Change von +1,8 ($p = 0,00063$) stark hochreguliert. In der vorliegenden Arbeit wurde für diesen Serotonin-Rezeptor ein nicht-signifikanter Fold-Change von +1,10 bei einem p-Wert von 0,172 beobachtet. Die dritte unter Punkt 1.3.4. erwähnte Studie identifizierte das *SSAT*-Gen als vielversprechendes neues Kandidatengen für suizidales Verhalten (Sequeira et al, 2006). Die Expressionsanalyse wurde mit dem Affymetrix Human Genom U133 Chipset durchgeführt und verwendete neben anderen Regionen wie die hier vorliegende Arbeit RNA aus dem orbitofrontalen Cortex (BA11) von Suizidenten und Kontrollen. Das *SSAT*-Gen war bei der Studie von Sequeira et al im OFC beider Suizid-Subgruppen im Vergleich zu den

Kontrollen um den Faktor 1,4 schwächer exprimiert. Interessanterweise zeigte das *SSAT* auch in der vorliegenden Microarrayuntersuchung eine um den Faktor 1,3 schwächere Expression in der Suizidgruppe. Die Signifikanz wurde hier mit einem p-Wert von $p = 0,052$ knapp verfehlt. Noch auffälliger ist die Übereinstimmung der Ergebnisse in Bezug auf 33 weitere Transkripte, die laut Sequeira und Kollegen in beiden Subgruppen signifikant differentiell exprimiert waren. Ein Vergleich dieser 33 Gene mit allen Genen, die in der vorliegenden Arbeit bei einem p-Wert $\leq 0,05$ differentiell exprimiert waren, zeigte eine Überschneidung der Ergebnisse für 5 Gene (*ATP6V0E*, *CDC42EP4*, *CKLFSF6*, *CTSH* und *RBP1*). Für *SEMA4F* und *SYT13* wurden in der vorliegenden Arbeit kleine Fold-Changes von jeweils +1,2 bei p-Werten $\leq 0,05$ errechnet. Der Vergleich der Ergebnisse für den orbitofrontalen Cortex ist in Tabelle 32 zusammengefasst.

Tabelle 32: Überschneidungen mit Sequeira et al 2006

Gensymbol	Genname	Ergebnisse von Sequeira et al		Ergebnisse dieser Arbeit	
		FC DSuz ¹	FC Suz ²	FC Array ³	p-Wert Array ⁴
<i>ATP6V0E</i>	ATPase, H+-transporting, lysosomal V0e	-1,5	-1,3	-1,3	0,026
<i>CDC42EP4</i>	CDC42 effector protein 4	-1,6	-1,5	-1,7	0,025
<i>CKLFSF6</i>	Chemokine-like factor superfamily 6	-1,4	-1,5	-1,3	0,038
<i>CTSH</i>	Cathepsin H	-1,9	-1,7	-1,4	0,016
<i>RBP1</i>	Retinol binding protein 1, cellular	-1,8	-1,7	-1,6	0,014
<i>SEMA4F</i>	Semaphorin 4F	+1,4	+1,4	+1,2	0,044
<i>SYT13</i>	Synaptotagmin 13	+1,5	+1,3	+1,2	0,011

In dieser Tabelle sind alle Gene aufgelistet, die sowohl bei der Untersuchung von Sequeira et al als auch in der vorliegenden Arbeit signifikant differentiell exprimiert waren

¹ Fold-Change des betreffenden Gens in der Gruppe der depressiven Suizidenten (DSuz)

² Fold-Change des betreffenden Gens in der Gruppe der Suizidenten ohne Depression (Suz)

³ Fold-Change des Gens in der vorliegenden Arbeit

⁴ p-Wert des Gens in den durchgeführten Microarrays

Die Transkripte *SEMA4F* und *SYT13* sind aufgrund der geringen Expressionsunterschiede nicht in der weiter oben beschriebenen Auswertung der Arrays enthalten, die nur Gene mit Fold-Changes $\geq 1,3$ berücksichtigt.

Die Untersuchung von Yanagi et al (2005) kann aufgrund der Extraktion der RNA aus *post mortem* Amygdala-Gewebe nur unter Vorbehalt mit der vorliegenden Arbeit verglichen werden. Die Expression der 14-3-3- ϵ -mRNA (alias *YWHAE*) zeigte in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Unterschied im orbitofrontalen Cortex der untersuchten Proben.

Die Microarraystudie mit bipolaren Patienten belegt eine von der psychiatrischen Diagnose unabhängige Hochregulation der GABA_A-Rezeptoruntereinheiten *GABRA1* und *GABRB3* im anterioren Gyrus Cinguli der untersuchten Suizidenten (Choudary et al, 2005). Die stärkere Expression der *GABRA1*-Untereinheit konnte in dieser Arbeit ebenso für den orbitofrontalen Cortex des untersuchten Samples nachgewiesen werden, die einen Fold-Change von +1,44 bei einem p-Wert von 0,044 zeigte. Im Falle der *GABRB3* wurde ein Fold-Change von +1,17 bei einem p-Wert von 0,145 detektiert.

Insgesamt belegt vor allem die Untersuchung von Sequeira und Kollegen die Nützlichkeit von Microarrayuntersuchungen zur Identifizierung von neuen Kandidatengen für suizidales Verhalten. Die Autoren fanden in allen untersuchten Regionen in der Suizidgruppe signifikant geringere mRNA- und Proteinmengen der Spermidine/Spermine N1-acetyltransferase 1 (SSAT). Die Genotypisierung des SSAT-Gens demonstrierte die Assoziation eines Polymorphismus mit einer höheren Genexpression, und die Analyse der Allelverteilung zeigte den protektiven Effekt eines Allels für suizidales Verhalten.

4.3.2. Vergleich mit Genexpressionsstudien

Die Expression der meisten Transkripte des menschlichen Genoms ist gewebespezifisch. Eine Ausnahme davon bilden definitionsgemäß nur die sogenannten 'Housekeeping-Gene', die im idealen Fall über alle Gewebearten und Individuen hinweg gleichmäßig exprimiert sein sollten und deshalb zur Normalisierung der quantitativen RT-PCR verwendet werden. Die vorliegende Arbeit wurde aufgrund der Bedeutung des orbitofrontalen Cortex für Faktoren wie Persönlichkeit, Impulsivität und Ärgerentstehung mit Gewebe aus der Brodmann Area 11 dieser Region durchgeführt. Die Mehrzahl der bisher veröffentlichten Studien verwendete aber Gewebe aus der Brodmann Area 9 und sind deswegen nur bedingt mit der vorliegenden Arbeit vergleichbar.

Eine Ausnahme bildet eine Untersuchung der Expression der CRH1- und CRH2-Rezeptoren sowie verschiedener GABA_A-Rezeptoruntereinheiten im frontopolen, dorsomedial-präfrontalen und orbitofrontalen Cortex von 12 Suizidenten und 12 Kontrollen (Merali et al, 2004). Interessanterweise wurden dabei im frontopolen Cortex erhöhte Mengen an mRNA für den CRH-Rezeptor 1 sowie erhöhte Mengen an CRH-Protein gefunden. Dieses Ergebnis konnte durch die vorliegende Arbeit auf Ebene der mRNA zumindest teilweise bestätigt werden, da bei den Suizidenten

durch die Arrays signifikant höhere Mengen an CRH-mRNA im orbitofrontalen Cortex nachgewiesen wurde. Die Validierung dieses Resultats mit der qRT-PCR zeigte die gleiche Richtung der Expressionsänderung bei allerdings fehlender Signifikanz.

Außerdem fand die gleiche Studie bei den GABA_A-Rezeptoruntereinheiten *GABRA1*, *GABRA3*, *GABRA4* und *GABRD* signifikant erniedrigte Transkriptmengen im frontopolen Cortex, während im dorsomedial-präfrontalen und auch im orbitofrontalen Cortex keine signifikanten Unterschiede detektiert werden konnten. Im Gegensatz dazu war die Expression von *GABRA1* in der vorliegenden Arbeit im orbitofrontalen Cortex erhöht.

Die Bestimmung der Transkriptmengen verschiedener G-Protein-alpha-Untereinheiten (*GNAS*, *GNAI1*, *GNAI2* sowie *GNAL*) im präfrontalen Cortex von 43 Suizidenten und 38 Kontrollen zeigte eine Dysregulation der Genexpression. *GNAS* war bei den Suizidenten signifikant stärker exprimiert, während *GNAI2* und *GNAL* schwächer transkribiert waren (Dwivedi et al, 2002). *GNAI2* zeigte auch in den Microarrays eine signifikant schwächere Expression. Der Fold-Change lag hierbei allerdings nur bei -1,19 bei einem p-Wert von 0,020. Die Untereinheit *GNAI3* zeigte ebenfalls eine signifikant schwächere Expression mit einem Fold-Change von -1,53 bei einem p-Wert von 0,013.

4.3.3. Verknüpfung der Resultate mit Kopplungsstudien

Die meisten chromosomalen Kandidatenregionen für suizidales Verhalten wurden durch die Studie von Zubenko und Kollegen im Zusammenhang mit affektiven Störungen ermittelt (Zubenko et al, 2004). Diese Studie fand genomweit signifikante Δ LOD-Werte die Regionen 2p12, 5q31-q33, 6q12, 8p22-p21, 11q25 und Xq25-26.1, die möglicherweise genetische Varianten enthalten, die das Risiko für suizidales Verhalten Krankheiten erhöhen. Durch zwei weitere Untersuchungen an alkoholabhängigen Personen und Patienten mit bipolaren Erkrankungen wurden die Regionen 2p11 und 6q25.2 als Risikoloci identifiziert (Hesselbrock et al, 2004; Cheng et al, 2006).

Die Gene *PCDHB5* und *PDGFRB* liegen 3,6 beziehungsweise 5,4 Millionen Basen entfernt in der Nähe des Markers D5S1480 auf Chromosom 5q31-q32, während der Genlocus von *HS6ST2* etwa 2,9 Millionen Basen Abstand zu dem Marker DXS1047 auf dem X-Chromosom besitzt (Zubenko et al, 2004). Die auf dem X-Chromosom beobachtete Kopplung erstreckt sich dabei proximal von Marker

DXS6789 bis hin zu Marker DXS1047 und betrifft einen Bereich von 33,6 Millionen Basen.

Das Gen VIP liegt etwas mehr als 1 Million Basen vom Marker D6S2436 entfernt, welcher in der Gruppe der untersuchten bipolaren Familien eine signifikante Linkage zum Phänotyp 'letaler Suizid' zeigte (Cheng et al, 2006).

Alle anderen signifikant differentiell exprimierten Gene der Gruppe mit einem p-Wert von höchstens 0,01 liegen jeweils mehr als 10 Millionen Basen von den oben genannten Kopplungsregionen entfernt. Deswegen ist ein Zusammenhang dieser Gene mit den Ergebnissen der Kopplungsstudien zu suizidalem Verhalten sehr unwahrscheinlich.

4.4. Ausblick

Die vorliegende Microarraystudie zu suizidalem Verhalten mit *post mortem* Hirngewebe zeigt signifikante Unterschiede der Expression einiger Gene, die bisher noch nicht mit Suizid in Zusammenhang gebracht worden sind. Diese interessanten Kandidatengene liefern neue Ansätze für die Aufklärung der Ätiologie des Suizids durch weitere Untersuchungen.

Als nächster Schritt sollte die Bestimmung der korrespondierenden Proteinmengen durchgeführt werden, da diese in weniger als 50 % aller Fälle gut mit den gefundenen mRNA-Mengen korrelieren (Chuaqui et al, 2003). Die Bestimmung der Proteinexpression könnte durch Immunoblots oder immunohistochemische Methoden erfolgen.

Die gefundenen Unterschiede der Genexpression sind nicht zwangsläufig mit suizidalem Verhalten verknüpft, aber sie können ein guter Hinweis auf eine Assoziation sein. Es ist ebenso denkbar, dass die veränderten mRNA-Level spezifisch für charakterliche Merkmale wie impulsives Verhalten oder Aggressivität sind. Ebenso ist es denkbar, dass die Änderungen der Transkriptmengen mit einer Neigung zu affektiven Störungen oder anderen psychiatrischen Krankheiten assoziiert sind, die wiederum selbst eine Rolle bei der Entstehung suizidalen Verhaltens spielen (Mann et al, 2003).

Die durchgeführte Studie ist unter diesem Gesichtspunkt vor allem ein ergänzender Ansatz zu Assoziations- und Kopplungsstudien und dient dem Screening auf neue Kandidatengene. Die Implikation dieser Gene für die Entstehung suizidalen Verhaltens könnte durch Assoziationsstudien oder Haplotypanalysen

verschiedener Polymorphismen weiter untermauert werden. Assoziationsuntersuchungen stellen bei einer genauen Auswahl des Probandenkollektivs ohne Stratifikation eine geeignete Methode zur Identifikation von beteiligten Genen mit nur kleinen Effekten dar. Da bei suizidalem Verhalten ein polygener Erbgang mit vielen implizierten Genen angenommen wird, sind Assoziationsstudien sehr gut zur weiteren Bestätigung der Bedeutung eines Kandidatengens geeignet. Ein endgültiger Beweis ist aber nur durch die Aufklärung des funktionellen Zusammenhangs zu erbringen. Die untersuchten Polymorphismen können dabei zu einem Aminosäure-Austausch in dem betreffenden Protein führen, der direkte Konsequenzen auf die Funktion des Proteins hat. Ebenso kann es durch Frameshift-Mutationen zu einem kompletten Funktionsverlust des Genprodukts führen. DNA-Polymorphismen können durch die Lokalisation im Promotorbereich eines Gens auch direkte Auswirkungen auf die Transkription haben und die Genexpression so erhöhen oder erniedrigen. Dies lässt sich zum Beispiel durch die Verknüpfung der Ergebnisse von Expressionsstudien und Assoziationsstudien überprüfen.

Die simultane Messung der Expression tausender Gene bei Microarrayexperimenten ermöglicht eine grundlegende Ausrichtung der Experimente auf biologische Funktionskreise und Pathways anstatt auf einzelne Gene. Dies ist ein vielversprechender Ansatz bei komplexen Krankheiten und Verhaltensweisen. Die außerordentliche Heterogenität suizidalen Verhaltens erschwert die Erkennung genetischer Risikofaktoren sehr. Deswegen wäre es für weitere Studien hilfreich, den untersuchten Phänotyp durch die Bildung von Subgruppen noch genauer zu definieren.

Ein weiterer Ansatz ist die Identifikation und Verwendung von Endophänotypen, da der sehr komplexe Phänotyp 'Suizidales Verhalten' sehr wahrscheinlich durch multiple genetische Faktoren beeinflusst wird. Endophänotypen besitzen idealerweise monogenetische Ursachen und erlauben so die Aufspaltung ätiologisch sehr heterogener Krankheitsbilder und Verhaltensweisen in homogenere Subtypen.

Vielleicht ermöglicht die neurobiologische Forschung auf diesem Gebiet in der weiteren Zukunft die Identifikation von Hochrisikopatienten für suizidales Verhalten, die dann spezifisch und präventiv betreut werden können.

5. Zusammenfassung

Suizidales Verhalten ist sehr komplex und wird sowohl durch Umwelteinflüsse als auch durch genetische Faktoren beeinflusst. Es wird dabei ein polygener Erbgang mit multiplen Genen angenommen, die jeweils nur einen kleinen Einfluss haben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung neuer Kandidatengene für suizidales Verhalten durch die Ermittlung der Expression von mehr als 23.000 Genen in *post mortem* Hirngewebe aus dem orbitofrontalen Cortex. Aus einer Datenbank mit 150 Subjekten wurde dazu Gewebe von 11 Suizidenten und 10 nichtpsychiatrischen Kontrollen für die Versuche ausgewählt. Beide Gruppen wurden nach wichtigen Kofaktoren wie Gewebe-pH-Wert, *post mortem* Intervall, Alter der Probanden sowie Geschlecht gematcht und zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der genannten Variablen.

Bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,01$ zeigten 59 Gene eine mindestens um den Faktor 1,3 erniedrigte Transkriptmenge in der Suizidgruppe, während 65 Gene in dieser Gruppe signifikant stärker exprimiert waren. Die funktionelle Einteilung dieser 124 Gene anhand der Gene Ontology Kriterien zeigte, dass die vier GO-Kategorien 'Entwicklung des zentralen Nervensystems', 'homophile Zelladhäsion', 'Regulation der Zellproliferation' und 'Transmission von Nervenimpulsen' jeweils überzufällig häufig viele differentiell exprimierte Transkripte enthielten. Dies lässt eine Bedeutung der genannten Funktionskreise für die Etiologie suizidalen Verhaltens vermuten.

Die Validierung der Expression von 16 Genen durch die unabhängige Methode der quantitativen RT-PCR konnte die Richtung der Genexpression für alle Gene mit einer Ausnahme bestätigen. Neun Transkripte, namentlich *CDCA7L*, *CDH12*, *EFEMP1*, *MLC1*, *PCDHB5*, *PTPRR*, *S100A13*, *SCN2B* und *ZFP36*, waren auch nach den Resultaten der qRT-PCR signifikant differentiell exprimiert. Die hohe Übereinstimmung der Resultate beider Methoden spricht dabei für die Qualität und Genauigkeit der durchgeführten Microarrayversuche.

Insgesamt sind die gefundenen Expressionsunterschiede erste Hinweise auf eine mögliche Implikation der entsprechenden Gene und biologischen Funktionen für die Entstehung suizidalen Verhaltens. Die Bedeutung der neuen Kandidatengene kann durch weitere Untersuchungen auf Proteinebene und durch genetische Assoziationsstudien weiter belegt und aufgeklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

Agren,H (1980): Symptom patterns in unipolar and bipolar depression correlating with monoamine metabolites in the cerebrospinal fluid: II. Suicide. *Psychiatry Res.* 3: 225-236.

Anderson,SW, Bechara,A, Damasio,H, Tranel,D, Damasio,AR (1999): Impairment of social and moral behavior related to early damage in human prefrontal cortex. *Nat.Neurosci.* 2: 1032-1037.

Anguelova,M, Benkelfat,C, Turecki,G (2003): A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II. Suicidal behavior. *Mol.Psychiatry* 8: 646-653.

Antretter,E, Dunkel,D, Seibl,R, Haring,C (2002): [Classification and predictive quality of the "suicide intent" marker in parasuicides. A cluster analytic study]. *Nervenarzt* 73: 219-230.

Arango,V, Underwood,MD, Gubbi,AV, Mann,JJ (1995): Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Res.* 688: 121-133.

Arsenault-Lapierre,G, Kim,C, Turecki,G (2004): Psychiatric diagnoses in 3275 suicides: a meta-analysis. *BMC.Psychiatry* 4: 37.

Asberg,M, Traskman,L, Thoren,P (1976): 5-HIAA in the cerebrospinal fluid. A biochemical suicide predictor? *Arch.Gen.Psychiatry* 33: 1193-1197.

Ashburner,M, Ball,CA, Blake,JA, Botstein,D, Butler,H, Cherry,JM et al (2000): Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat.Genet.* 25: 25-29.

Austin,MC, Whitehead,RE, Edgar,CL, Janosky,JE, Lewis,DA (2002): Localized decrease in serotonin transporter-immunoreactive axons in the prefrontal cortex of depressed subjects committing suicide. *Neuroscience* 114: 807-815.

- Bach-Mizrachi,H, Underwood,MD, Kassir,SA, Bakalian,MJ, Sibille,E, Tamir,H et al (2006): Neuronal tryptophan hydroxylase mRNA expression in the human dorsal and median raphe nuclei: major depression and suicide. *Neuropsychopharmacology* 31: 814-824.
- Bachus,SE, Hyde,TM, Herman,MM, Egan,MF, Kleinman,JE (1997): Abnormal cholecystokinin mRNA levels in entorhinal cortex of schizophrenics. *J Psychiatr.Res.* 31: 233-256.
- Bahn,S, Augood,SJ, Ryan,M, Standaert,DG, Starkey,M, Emson,PC (2001): Gene expression profiling in the post-mortem human brain--no cause for dismay. *J Chem.Neuroanat.* 22: 79-94.
- Balazic,J, Marusic,A (2005): The completed suicide as interplay of genes and environment. *Forensic Sci.Int.* 147 Suppl: S1-S3.
- Baldessarini,RJ, Hennen,J (2004): Genetics of suicide: an overview. *Harv.Rev.Psychiatry* 12: 1-13.
- Banki,CM, Arato,M, Papp,Z, Kurcz,M (1984): Biochemical markers in suicidal patients. Investigations with cerebrospinal fluid amine metabolites and neuroendocrine tests. *J Affect.Disord.* 6: 341-350.
- Barnes,M, Freudenberg,J, Thompson,S, Aronow,B, Pavlidis,P (2005): Experimental comparison and cross-validation of the Affymetrix and Illumina gene expression analysis platforms. *Nucleic Acids Res.* 33: 5914-5923.
- Barton,AJ, Pearson,RC, Najlerahim,A, Harrison,PJ (1993): Pre- and postmortem influences on brain RNA. *J Neurochem.* 61: 1-11.
- Beautrais,AL (2001): Effectiveness of barriers at suicide jumping sites: a case study. *Aust.N.Z.J Psychiatry* 35: 557-562.
- Bechara,A, Damasio,AR, Damasio,H, Anderson,SW (1994): Insensitivity to future consequences following damage to human prefrontal cortex. *Cognition* 50: 7-15.

- Bellivier,F, Chaste,P, Malafosse,A (2004): Association between the TPH gene A218C polymorphism and suicidal behavior: a meta-analysis. *Am.J Med.Genet.B Neuropsychiatr.Genet.* 124: 87-91.
- Benedum,UM, Lamouroux,A, Konecki,DS, Rosa,P, Hille,A, Baeuerle,PA et al (1987): The primary structure of human secretogranin I (chromogranin B): comparison with chromogranin A reveals homologous terminal domains and a large intervening variable region. *EMBO J* 6: 1203-1211.
- Benjamini,Y, Hochberg,Y (2000): Controlling the false discovery rate / a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy.Stat.Soc.B* 57: 289-300.
- Berlin,HA, Rolls,ET, Kischka,U (2004): Impulsivity, time perception, emotion and reinforcement sensitivity in patients with orbitofrontal cortex lesions. *Brain* 127: 1108-1126.
- Bertolote,JM, Fleischmann,A, De Leo,D, Wasserman,D (2004): Psychiatric diagnoses and suicide: revisiting the evidence. *Crisis* 25: 147-155.
- Bilder,RM, Volavka,J, Lachman,HM, Grace,AA (2004): The catechol-O-methyltransferase polymorphism: relations to the tonic-phasic dopamine hypothesis and neuropsychiatric phenotypes. *Neuropsychopharmacology* 29: 1943-1961.
- Blair-West,GW, Mellsop,GW, Eyeson-Annan,ML (1997): Down-rating lifetime suicide risk in major depression. *Acta Psychiatr.Scand.* 95: 259-263.
- Blakely,TA, Collings,SC, Atkinson,J (2003): Unemployment and suicide. Evidence for a causal association? *J Epidemiol.Community Health* 57: 594-600.
- Boor,PK, de Groot,K, Waisfisz,Q, Kamphorst,W, Oudejans,CB, Powers,JM et al (2005): MLC1: a novel protein in distal astroglial processes. *J Neuropathol.Exp.Neurol.* 64: 412-419.
- Brent,DA, Oquendo,M, Birmaher,B, Greenhill,L, Kolko,D, Stanley,B et al (2003): Peripubertal suicide attempts in offspring of suicide attempters with siblings concordant for suicidal behavior. *Am.J Psychiatry* 160: 1486-1493.
- Brent,DA, Mann,JJ (2005): Family genetic studies, suicide, and suicidal behavior. *Am.J Med.Genet.C.Semin.Med.Genet.* 133: 13-24.

- Brezo,J, Paris,J, Turecki,G (2006): Personality traits as correlates of suicidal ideation, suicide attempts, and suicide completions: a systematic review. *Acta Psychiatr.Scand.* 113: 180-206.
- Bridges,FS, Kunselman,JC (2004): Gun availability and use of guns for suicide, homicide, and murder in Canada. *Percept.Mot.Skills* 98: 594-598.
- Brodsky,BS, Oquendo,M, Ellis,SP, Haas,GL, Malone,KM, Mann,JJ (2001): The relationship of childhood abuse to impulsivity and suicidal behavior in adults with major depression. *Am.J Psychiatry* 158: 1871-1877.
- Brower,MC, Price,BH (2001): Neuropsychiatry of frontal lobe dysfunction in violent and criminal behaviour: a critical review. *J Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 71: 720-726.
- Brunner,HG, Nelen,M, Breakefield,XO, Ropers,HH, van Oost,BA (1993): Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 262: 578-580.
- Brunner,J, Bronisch,T (2002): Genetik und Neurobiologie suizidalen Verhaltens. *Psychotherapie* 7: 260-272.
- Brzustowicz,LM, Hodgkinson,KA, Chow,EW, Honer,WG, Bassett,AS (2000): Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22. *Science* 288: 678-682.
- Burvill,PW (1998): Migrant suicide rates in Australia and in country of birth. *Psychol.Med.* 28: 201-208.
- Caberlotto,L, Hurd,YL (2001): Neuropeptide Y Y(1) and Y(2) receptor mRNA expression in the prefrontal cortex of psychiatric subjects. Relationship of Y(2) subtype to suicidal behavior. *Neuropsychopharmacology* 25: 91-97.
- Carlsten,A, Allebeck,P, Brandt,L (1996): Are suicide rates in Sweden associated with changes in the prescribing of medicines? *Acta Psychiatr.Scand.* 94: 94-100.
- Cavalli-Sforza,LL, Menozzi,P, Piazza,A (1994): *The History and Geography of Human Genes* : Princeton University Press.

- Chaiet,L, Wolf,FJ (1964): The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by *Streptomyces*. *Arch.Biochem.Biophys.* 106: 1-5.
- Chan,WY, Xia,CL, Dong,DC, Heizmann,CW, Yew,DT (2003): Differential expression of S100 proteins in the developing human hippocampus and temporal cortex. *Microsc.Res.Tech.* 60: 600-613.
- Chen,C, Bharucha,V, Chen,Y, Westenbroek,RE, Brown,A, Malhotra,JD et al (2002): Reduced sodium channel density, altered voltage dependence of inactivation, and increased susceptibility to seizures in mice lacking sodium channel beta 2-subunits. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99: 17072-17077.
- Chen,K, Ou,XM, Chen,G, Choi,SH, Shih,JC (2005): R1, a novel repressor of the human monoamine oxidase A. *J Biol.Chem.* 280: 11552-11559.
- Cheng,R, Juo,SH, Loth,JE, Nee,J, Iossifov,I, Blumenthal,R et al (2006): Genome-wide linkage scan in a large bipolar disorder sample from the National Institute of Mental Health genetics initiative suggests putative loci for bipolar disorder, psychosis, suicide, and panic disorder. *Mol.Psychiatry* 11: 252-260.
- Choudary,PV, Molnar,M, Evans,SJ, Tomita,H, Li,JZ, Vawter,MP et al (2005): Altered cortical glutamatergic and GABAergic signal transmission with glial involvement in depression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102: 15653-15658.
- Chowdari,KV, Mirnics,K, Semwal,P, Wood,J, Lawrence,E, Bhatia,T et al (2002): Association and linkage analyses of RGS4 polymorphisms in schizophrenia. *Hum.Mol.Genet.* 11: 1373-1380.
- Chuaqui,RF, Bonner,RF, Best,CJ, Gillespie,JW, Flaig,MJ, Hewitt,SM et al (2002): Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nat.Genet.* 32 Suppl: 509-514.
- Coccaro,EF, Silverman,JM, Klar,HM, Horvath,TB, Siever,LJ (1994): Familial correlates of reduced central serotonergic system function in patients with personality disorders. *Arch.Gen.Psychiatry* 51: 318-324.
- Cooper,PN, Milroy,CM (1995): The coroner's system and under-reporting of suicide. *Med.Sci.Law* 35: 319-326.

Correa,H, Duval,F, Mokrani,M, Bailey,P, Tremeau,F, Staner,L et al (2000): Prolactin response to D-fenfluramine and suicidal behavior in depressed patients. *Psychiatry Res.* 93: 189-199.

Coryell,W, Schlessner,M (2001): The dexamethasone suppression test and suicide prediction. *Am.J Psychiatry* 158: 748-753.

Cummings,TJ, Strum,JC, Yoon,LW, Szymanski,MH, Hulette,CM (2001): Recovery and expression of messenger RNA from postmortem human brain tissue. *Mod.Pathol.* 14: 1157-1161.

Damasio,H, Grabowski,T, Frank,R, Galaburda,AM, Damasio,AR (1994): The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science* 264: 1102-1105.

De Luca,V, Likhodi,O, Van Tol,HH, Kennedy,JL, Wong,AH (2006): Gene expression of tryptophan hydroxylase 2 in post-mortem brain of suicide subjects. *Int.J Neuropsychopharmacol.* 9: 21-25.

De Leo,D, Bertolote,J, Lester,D, Hunter,E, Leenaars,A, Wasserman,D (2002): WHO World report on violence and health:Self-directed violence, pp 183-212.

Di Paolo,G, Sankaranarayanan,S, Wenk,MR, Daniell,L, Perucco,E, Caldarone,BJ et al (2002): Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron* 33: 789-804.

Dickinson,T, Craumer,W (2003): RNA profiling with bead-based array platforms: Sentrix Arrays for focused gene expression studies across large sample sets. *Gen.Eng.News* 23.

Diekstra,RF, Garnefski,N (1995): On the nature, magnitude, and causality of suicidal behaviors: an international perspective. *Suicide Life Threat.Behav.* 25: 36-57.

Doll,R, Gray,R, Hafner,B, Peto,R (1980): Mortality in relation to smoking: 22 years' observations on female British doctors. *Br.Med.J* 280: 967-971.

Doll,R, Peto,R, Wheatley,K, Gray,R, Sutherland,I (1994): Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *BMJ* 309: 901-911.

Du,L, Faludi,G, Palkovits,M, Sotonyi,P, Bakish,D, Hrdina,PD (2002): High activity-related allele of MAO-A gene associated with depressed suicide in males. *Neuroreport* 13: 1195-1198.

Dwivedi,Y, Rizavi,HS, Roberts,RC, Conley,RC, Tamminga,CA, Pandey,GN (2001): Reduced activation and expression of ERK1/2 MAP kinase in the post-mortem brain of depressed suicide subjects. *J Neurochem.* 77: 916-928.

Dwivedi,Y, Rizavi,HS, Conley,RR, Roberts,RC, Tamminga,CA, Pandey,GN (2002): mRNA and protein expression of selective alpha subunits of G proteins are abnormal in prefrontal cortex of suicide victims. *Neuropsychopharmacology* 27: 499-517.

Dwivedi,Y, Rao,JS, Rizavi,HS, Kotowski,J, Conley,RR, Roberts,RC et al (2003): Abnormal expression and functional characteristics of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in postmortem brain of suicide subjects. *Arch.Gen.Psychiatry* 60: 273-282.

Dwivedi,Y, Rizavi,HS, Conley,RR, Roberts,RC, Tamminga,CA, Pandey,GN (2003): Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch.Gen.Psychiatry* 60: 804-815.

Dwivedi,Y, Rizavi,HS, Shukla,PK, Lyons,J, Faludi,G, Palkovits,M et al (2004): Protein kinase A in postmortem brain of depressed suicide victims: altered expression of specific regulatory and catalytic subunits. *Biol.Psychiatry* 55: 234-243.

Dwivedi,Y, Mondal,AC, Rizavi,HS, Conley,RR (2005): Suicide brain is associated with decreased expression of neurotrophins. *Biol.Psychiatry* 58: 315-324.

Dwivedi,Y, Mondal,AC, Rizavi,HS, Faludi,G, Palkovits,M, Sarosi,A et al (2006): Differential and brain region-specific regulation of Rap-1 and Epac in depressed suicide victims. *Arch.Gen.Psychiatry* 63: 639-648.

Escriba,PV, Ozaita,A, Garcia-Sevilla,JA (2004): Increased mRNA expression of alpha2A-adrenoceptors, serotonin receptors and mu-opioid receptors in the brains of suicide victims. *Neuropsychopharmacology* 29: 1512-1521.

Eswaran,J, von Kries,JP, Marsden,B, Longman,E, Debreczeni,JE, Ugochukwu,E et al (2006): Crystal structures and inhibitor identification for PTPN5, PTPRR and PTPN7: a family of human MAPK-specific protein tyrosine phosphatases. *Biochem.J* 395: 483-491.

Eubanks,J, Srinivasan,J, Dinulos,MB, Disteché,CM, Catterall,WA (1997): Structure and chromosomal localization of the beta2 subunit of the human brain sodium channel. *Neuroreport* 8: 2775-2779.

Fazel,S, Benning,R, Danesh,J (2005): Suicides in male prisoners in England and Wales, 1978-2003. *Lancet* 366: 1301-1302.

Fergusson,DM, Horwood,LJ, Beautrais,AL (1999): Is sexual orientation related to mental health problems and suicidality in young people? *Arch.Gen.Psychiatry* 56: 876-880.

Fergusson,DM, Beautrais,AL, Horwood,LJ (2003): Vulnerability and resiliency to suicidal behaviours in young people. *Psychol.Med.* 33: 61-73.

Frank,M, Kemler,R (2002): Protocadherins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 14: 557-562.

Fu,Q, Heath,AC, Bucholz,KK, Nelson,EC, Glowinski,AL, Goldberg,J et al (2002): A twin study of genetic and environmental influences on suicidality in men. *Psychol.Med.* 32: 11-24.

Gardner,DL, Lucas,PB, Cowdry,RW (1990): CSF metabolites in borderline personality disorder compared with normal controls. *Biol.Psychiatry* 28: 247-254.

Geisbrecht,ER, Montell,DJ (2002): Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration. *Nat.Cell Biol.* 4: 616-620.

Gentleman,RC, Carey,VJ, Bates,DM, Bolstad,B, Dettling,M, Dudoit,S et al (2004): Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5: R80.

Glasel,JA (1995): Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques* 18: 62-63.

- Gottesman,II, Gould,TD (2003): The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am.J Psychiatry* 160: 636-645.
- Grafman,J, Schwab,K, Warden,D, Pridgen,A, Brown,HR, Salazar,AM (1996): Frontal lobe injuries, violence, and aggression: a report of the Vietnam Head Injury Study. *Neurology* 46: 1231-1238.
- Gress,TM, Hoheisel,JD, Lennon,GG, Zehetner,G, Lehrach,H (1992): Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mamm.Genome* 3: 609-619.
- Gross,J, Grimm,O, Meyer,J, Lesch,KP (2003): [The cadherin hypothesis of schizophrenia]. *Fortschr.Neurol.Psychiatr.* 71: 84-88.
- Gumbiner,BM (2005): Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 6: 622-634.
- Gwadry,FG, Sequeira,A, Hoke,G, Ffrench-Mullen,JM, Turecki,G (2005): Molecular characterization of suicide by microarray analysis. *Am.J Med.Genet.C.Semin.Med.Genet.* 133: 48-56.
- Harlow,JM (1848): Passage of an iron rod through the head. *Boston Med.Surg.J* 39: 389-393.
- Harris,EC, Barraclough,B (1997): Suicide as an outcome for mental disorders. A meta-analysis. *Br.J Psychiatry* 170: 205-228.
- Harris,MA, Clark,J, Ireland,A, Lomax,J, Ashburner,M, Foulger,R et al (2004): The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res.* 32: D258-D261.
- Heikkinen,M, Aro,H, Lonnqvist,J (1994): Recent life events, social support and suicide. *Acta Psychiatr.Scand.Suppl* 377: 65-72.
- Heikkinen,ME, Isometsa,ET, Marttunen,MJ, Aro,HM, Lonnqvist,JK (1995): Social factors in suicide. *Br.J Psychiatry* 167: 747-753.

- Henriksson,MM, Aro,HM, Marttunen,MJ, Heikkinen,ME, Isometsa,ET, Kuoppasalmi,KI et al (1993): Mental disorders and comorbidity in suicide. *Am.J Psychiatry* 150: 935-940.
- Hesselbrock,V, Dick,D, Hesselbrock,M, Foroud,T, Schuckit,M, Edenberg,H et al (2004): The search for genetic risk factors associated with suicidal behavior. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 28: 70S-76S.
- Hishimoto,A, Shirakawa,O, Nishiguchi,N, Hashimoto,T, Yanagi,M, Nushida,H et al (2006): Association between a functional polymorphism in the renin-angiotensin system and completed suicide. *J Neural Transm.*
- Ho,LW, Furlong,RA, Rubinsztein,JS, Walsh,C, Paykel,ES, Rubinsztein,DC (2000): Genetic associations with clinical characteristics in bipolar affective disorder and recurrent unipolar depressive disorder. *Am.J Med.Genet.* 96: 36-42.
- Hynd,MR, Lewohl,JM, Scott,HL, Dodd,PR (2003): Biochemical and molecular studies using human autopsy brain tissue. *J Neurochem.* 85: 543-562.
- Iijima,Y, Inada,T, Ohtsuki,T, Senoo,H, Nakatani,M, Arinami,T (2004): Association between chromogranin b gene polymorphisms and schizophrenia in the Japanese population. *Biol.Psychiatry* 56: 10-17.
- Inskip,HM, Harris,EC, Barraclough,B (1998): Lifetime risk of suicide for affective disorder, alcoholism and schizophrenia. *Br.J Psychiatry* 172: 35-37.
- Ji,J, Kleinman,A, Becker,AE (2001): Suicide in contemporary China: a review of China's distinctive suicide demographics in their sociocultural context. *Harv.Rev.Psychiatry* 9: 1-12.
- Johnston,NL, Cervenak,J, Shore,AD, Torrey,EF, Yolken,RH (1997): Multivariate analysis of RNA levels from postmortem human brains as measured by three different methods of RT-PCR. Stanley Neuropathology Consortium. *J Neurosci.Methods* 77: 83-92.
- Jollant,F, Bellivier,F, Leboyer,M, Astruc,B, Torres,S, Verdier,R et al (2005): Impaired decision making in suicide attempters. *Am.J Psychiatry* 162: 304-310.

- Kamiya,A, Kubo,K, Tomoda,T, Takaki,M, Youn,R, Ozeki,Y et al (2005): A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat.Cell Biol.* 7: 1167-1178.
- Kanehisa,M, Goto,S, Kawashima,S, Okuno,Y, Hattori,M (2004): The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res.* 32: D277-D280.
- Kausch,O (2003): Suicide attempts among veterans seeking treatment for pathological gambling. *J Clin.Psychiatry* 64: 1031-1038.
- Kety,SS, Rosenthal,D, Wender,PH, Schulsinger,F (1968): The types and prevalence of mental illness in the biological and adoptive families of adopted schizophrenics. *J Psychiatr.Res.* 345-362.
- Kidd,SA (2003): The need for improved operational definition of suicide attempts: illustrations from the case of street youth. *Death.Stud.* 27: 449-455.
- Kim,CH, Jayathilake,K, Meltzer,HY (2003): Hopelessness, neurocognitive function, and insight in schizophrenia: relationship to suicidal behavior. *Schizophr.Res.* 60: 71-80.
- Kingree,JB, Thompson,MP, Kaslow,NJ (1999): Risk factors for suicide attempts among low-income women with a history of alcohol problems. *Addict.Behav.* 24: 583-587.
- Kitao,Y, Inada,T, Arinami,T, Hirotsu,C, Aoki,S, Iijima,Y et al (2000): A contribution to genome-wide association studies: search for susceptibility loci for schizophrenia using DNA microsatellite markers on chromosomes 19, 20, 21 and 22. *Psychiatr.Genet.* 10: 139-143.
- Kjoller,M, Helweg-Larsen,M (2000): Suicidal ideation and suicide attempts among adult Danes. *Scand.J Public Health* 28: 54-61.
- Koen,L, Kinnear,CJ, Corfield,VA, Emsley,RA, Jordaan,E, Keyter,N et al (2004): Violence in male patients with schizophrenia: risk markers in a South African population. *Aust.N.Z.J Psychiatry* 38: 254-259.
- Kolves,K, Varnik,A, Schneider,B, Fritze,J, Allik,J (2006): Recent life events and suicide: a case-control study in Tallinn and Frankfurt. *Soc.Sci.Med.* 62: 2887-2896.

Kolves,K, Varnik,A, Tooding,LM, Wasserman,D (2006): The role of alcohol in suicide: a case-control psychological autopsy study. *Psychol.Med.* 36: 923-930.

Kondrichin,SV (1995): Suicide among Finno-Ugrians. *Lancet* 346: 1632-1633.

Konradi,C (2005): Gene expression microarray studies in polygenic psychiatric disorders: applications and data analysis. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 50: 142-155.

Kotler,M, Barak,P, Cohen,H, Averbuch,IE, Grinshpoon,A, Gritsenko,I et al (1999): Homicidal behavior in schizophrenia associated with a genetic polymorphism determining low catechol O-methyltransferase (COMT) activity. *Am.J Med.Genet.* 88: 628-633.

Kposowa,AJ (2001): Unemployment and suicide: a cohort analysis of social factors predicting suicide in the US National Longitudinal Mortality Study. *Psychol.Med.* 31: 127-138.

Kreitman,N (1988): Suicide, age and marital status. *Psychol.Med.* 18: 121-128.

Kringelbach,ML, Rolls,ET (2004): The functional neuroanatomy of the human orbitofrontal cortex: evidence from neuroimaging and neuropsychology. *Prog.Neurobiol.* 72: 341-372.

Kuhn,K, Baker,SC, Chudin,E, Lieu,MH, Oeser,S, Bennett,H et al (2004): A novel, high-performance random array platform for quantitative gene expression profiling. *Genome Res.* 14: 2347-2356.

Kunugi,H, Hashimoto,R, Yoshida,M, Tatsumi,M, Kamijima,K (2004): A missense polymorphism (S205L) of the low-affinity neurotrophin receptor p75NTR gene is associated with depressive disorder and attempted suicide. *Am.J Med.Genet.B Neuropsychiatr.Genet.* 129: 44-46.

Lachman,HM, Papolos,DF, Saito,T, Yu,YM, Szumlanski,CL, Weinshilboum,RM (1996): Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 6: 243-250.

Lalovic,A, Turecki,G (2002): Meta-analysis of the association between tryptophan hydroxylase and suicidal behavior. *Am.J Med.Genet.* 114: 533-540.

Landen,M, Grenfeldt,B, Davidsson,P, Stridsberg,M, Regland,B, Gottfries,CG et al (1999): Reduction of chromogranin A and B but not C in the cerebrospinal fluid in subjects with schizophrenia. *Eur.Neuropsychopharmacol.* 9: 311-315.

Langlois,S, Morrison,P (2002): Suicide deaths and suicide attempts. *Health Rep.* 13: 9-22.

Leegwater,PA, Boor,PK, Yuan,BQ, van der,SJ, Visser,A, Konst,AA et al (2002): Identification of novel mutations in MLC1 responsible for megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts. *Hum.Genet.* 110: 279-283.

Leonard,S, Logel,J, Luthman,D, Casanova,M, Kirch,D, Freedman,R (1993): Biological stability of mRNA isolated from human postmortem brain collections. *Biol.Psychiatry* 33: 456-466.

Lester,D (1987): National distribution of blood groups, personal violence (suicide and homicide), and national character. *Personality & Individual Differences* 8: 575-576.

Lester,D (1990): The effect of the detoxification of domestic gas in Switzerland on the suicide rate. *Acta Psychiatr.Scand.* 82: 383-384.

Lester,D (1992): The dexamethasone suppression test as an indicator of suicide: a meta-analysis. *Pharmacopsychiatry* 25: 265-270.

Li,JZ, Vawter,MP, Walsh,DM, Tomita,H, Evans,SJ, Choudary,PV et al (2004): Systematic changes in gene expression in postmortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions. *Hum.Mol.Genet.* 13: 609-616.

Lin,PY, Tsai,G (2004): Association between serotonin transporter gene promoter polymorphism and suicide: results of a meta-analysis. *Biol.Psychiatry* 55: 1023-1030.

Linnoila,M, Virkkunen,M, Scheinin,M, Nuutila,A, Rimon,R, Goodwin,FK (1983): Low cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid concentration differentiates impulsive from nonimpulsive violent behavior. *Life Sci.* 33: 2609-2614.

Malone,KM, Oquendo,MA, Haas,GL, Ellis,SP, Li,S, Mann,JJ (2000): Protective factors against suicidal acts in major depression: reasons for living. *Am.J Psychiatry* 157: 1084-1088.

- Manabe,T, Togashi,H, Uchida,N, Suzuki,SC, Hayakawa,Y, Yamamoto,M et al (2000): Loss of cadherin-11 adhesion receptor enhances plastic changes in hippocampal synapses and modifies behavioral responses. *Mol.Cell Neurosci.* 15: 534-546.
- Manji,HK, Gottesman,II, Gould,TD (2003): Signal transduction and genes-to-behaviors pathways in psychiatric diseases. *Sci.STKE.* 2003: e49.
- Mann,JJ, McBride,PA, Malone,KM, DeMeo,M, Keilp,J (1995): Blunted serotonergic responsivity in depressed inpatients. *Neuropsychopharmacology* 13: 53-64.
- Mann,JJ, Malone,KM (1997): Cerebrospinal fluid amines and higher-lethality suicide attempts in depressed inpatients. *Biol.Psychiatry* 41: 162-171.
- Mann,JJ (1998): The neurobiology of suicide. *Nat.Med.* 4: 25-30.
- Mann,JJ, Waternaux,C, Haas,GL, Malone,KM (1999): Toward a clinical model of suicidal behavior in psychiatric patients. *Am.J Psychiatry* 156: 181-189.
- Mann,JJ, Huang,YY, Underwood,MD, Kassir,SA, Oppenheim,S, Kelly,TM et al (2000): A serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) and prefrontal cortical binding in major depression and suicide. *Arch.Gen.Psychiatry* 57: 729-738.
- Mann,JJ (2003): Neurobiology of suicidal behaviour. *Nat.Rev.Neurosci.* 4: 819-828.
- Maris,RW (1997): Social and familial risk factors in suicidal behavior. *Psychiatr.Clin.North Am.* 20: 519-550.
- Marusic,A, Farmer,A (2001): Genetic risk factors as possible causes of the variation in European suicide rates. *Br.J Psychiatry* 179: 194-196.
- Marusic,A (2004): Toward a new definition of suicidality? Are we prone to Fregoli's illusion? *Crisis* 25: 145-146.
- Marusic,A (2005): History and geography of suicide: could genetic risk factors account for the variation in suicide rates? *Am.J Med.Genet.C.Semin.Med.Genet.* 133: 43-47.

- Maser,JD, Akiskal,HS, Schettler,P, Scheftner,W, Mueller,T, Endicott,J et al (2002): Can temperament identify affectively ill patients who engage in lethal or near-lethal suicidal behavior? A 14-year prospective study. *Suicide Life Threat.Behav.* 32: 10-32.
- McGuffin,P, Marusic,A, Farmer,A (2001): What can psychiatric genetics offer suicidology? *Crisis* 22: 61-65.
- Merali,Z, Du,L, Hrdina,P, Palkovits,M, Faludi,G, Poulter,MO et al (2004): Dysregulation in the suicide brain: mRNA expression of corticotropin-releasing hormone receptors and GABA(A) receptor subunits in frontal cortical brain region. *J Neurosci.* 24: 1478-1485.
- Meyer,J, Huberth,A, Ortega,G, Syagailo,YV, Jatzke,S, Mossner,R et al (2001): A missense mutation in a novel gene encoding a putative cation channel is associated with catatonic schizophrenia in a large pedigree. *Mol.Psychiatry* 6: 302-306.
- Miller,CL, Yolken,RH (2003): Methods to optimize the generation of cDNA from postmortem human brain tissue. *Brain Res.Brain Res.Protoc.* 10: 156-167.
- Mimmack,ML, Brooking,J, Bahn,S (2004): Quantitative polymerase chain reaction: validation of microarray results from postmortem brain studies. *Biol.Psychiatry* 55: 337-345.
- Minois,G (1999): *History of suicide: voluntary death in Western culture* .
- Mirnic,K, Middleton,FA, Stanwood,GD, Lewis,DA, Levitt,P (2001): Disease-specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia. *Mol.Psychiatry* 6: 293-301.
- Mirnic,K, Pevsner,J (2004): Progress in the use of microarray technology to study the neurobiology of disease. *Nat.Neurosci.* 7: 434-439.
- Morris,DW, Rodgers,A, McGhee,KA, Schwaiger,S, Scully,P, Quinn,J et al (2004): Confirming RGS4 as a susceptibility gene for schizophrenia. *Am.J Med.Genet.B Neuropsychiatr.Genet.* 125: 50-53.
- Murase,S, Mosser,E, Schuman,EM (2002): Depolarization drives beta-Catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron* 35: 91-105.

Müller,J, Sartor,H, Schuierer,G, Marienhagen,J, Putzhammer,A (2001): Psychopathie und Hirntrauma. *Nervenheilkunde* 20: 330-337.

Nagase,T, Ishikawa,K, Suyama,M, Kikuno,R, Hirose,M, Miyajima,N et al (1998): Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins *in vitro*. *DNA Res.* 5: 355-364.

Neylan,TC (1999): Frontal lobe function: Mr. Phineas Gage's famous injury. *J Neuropsychiatry Clin.Neurosci.* 11: 280-281.

Nolan,KA, Volavka,J, Czobor,P, Cseh,A, Lachman,H, Saito,T et al (2000): Suicidal behavior in patients with schizophrenia is related to COMT polymorphism. *Psychiatr.Genet.* 10: 117-124.

Ohberg,A, Lonnqvist,J, Sarna,S, Vuori,E, Penttila,A (1995): Trends and availability of suicide methods in Finland. Proposals for restrictive measures. *Br.J Psychiatry* 166: 35-43.

Ono,H, Shirakawa,O, Nushida,H, Ueno,Y, Maeda,K (2004): Association between catechol-O-methyltransferase functional polymorphism and male suicide completers. *Neuropsychopharmacology* 29: 1374-1377.

Oquendo,MA, Friedman,JH, Grunebaum,MF, Burke,A, Silver,JM, Mann,JJ (2004): Suicidal behavior and mild traumatic brain injury in major depression. *J Nerv.Ment.Dis.* 192: 430-434.

Pandey,GN, Dwivedi,Y, Rizavi,HS, Ren,X, Pandey,SC, Pesold,C et al (2002): Higher expression of serotonin 5-HT(2A) receptors in the postmortem brains of teenage suicide victims. *Am.J Psychiatry* 159: 419-429.

Pandey,GN, Dwivedi,Y, Rizavi,HS, Ren,X, Conley,RR (2004): Decreased catalytic activity and expression of protein kinase C isozymes in teenage suicide victims: a postmortem brain study. *Arch.Gen.Psychiatry* 61: 685-693.

Pandey,GN, Dwivedi,Y, Ren,X, Rizavi,HS, Mondal,AC, Shukla,PK et al (2005): Brain region specific alterations in the protein and mRNA levels of protein kinase A subunits in the post-mortem brain of teenage suicide victims. *Neuropsychopharmacology* 30: 1548-1556.

Patel,KG, Liu,C, Cameron,PL, Cameron,RS (2001): Myr 8, a novel unconventional myosin expressed during brain development associates with the protein phosphatase catalytic subunits 1alpha and 1gamma1. *J Neurosci.* 21: 7954-7968.

Peled,A (2005): Plasticity imbalance in mental disorders the neuroscience of psychiatry: implications for diagnosis and research. *Med.Hypotheses* 65: 947-952.

Perrett,CW, Marchbanks,RM, Whatley,SA (1988): Characterisation of messenger RNA extracted post-mortem from the brains of schizophrenic, depressed and control subjects. *J Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 51: 325-331.

Pfennig,A, Kunzel,HE, Kern,N, Ising,M, Majer,M, Fuchs,B et al (2005): Hypothalamus-pituitary-adrenal system regulation and suicidal behavior in depression. *Biol.Psychiatry* 57: 336-342.

Pietrini,P, Guazzelli,M, Basso,G, Jaffe,K, Grafman,J (2000): Neural correlates of imaginal aggressive behavior assessed by positron emission tomography in healthy subjects. *Am.J Psychiatry* 157: 1772-1781.

Platt,S, Bille-Brahe,U, Kerkhof,A, Schmidtke,A, Bjerke,T, Crepet,P et al (1992): Parasuicide in Europe: the WHO/EURO multicentre study on parasuicide. I. Introduction and preliminary analysis for 1989. *Acta Psychiatr.Scand.* 85: 97-104.

Ponizovsky,AM, Ritsner,MS, Modai,I (1999): Suicidal ideation and suicide attempts among immigrant adolescents from the former Soviet Union to Israel. *J Am.Acad.Child Adolesc.Psychiatry* 38: 1433-1441.

Quattrone,A, Tedeschi,G, Aguglia,U, Scopacasa,F, Drenzo,GF, Annunziato,L (1983): Prolactin secretion in man: a useful tool to evaluate the activity of drugs on central 5-hydroxytryptaminergic neurones. Studies with fenfluramine. *Br.J Clin.Pharmacol.* 16: 471-475.

- Rapoport, JL, Addington, AM, Frangou, S, Psych, MR (2005): The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Mol.Psychiatry* 10: 434-449.
- Reynolds, MS (1985): Hemingway's Home: Depression and Suicide. *American Literature* 57: 600-610.
- Roy, A (2003): Distal risk factors for suicidal behavior in alcoholics: replications and new findings. *J Affect.Disord.* 77: 267-271.
- Rujescu, D, Thalmeier, A, Moeller, H, Bronisch, T, Giegling, I (2006): Molecular genetic findings in suicidal behavior; What is beyond the serotonergic system? *Archives of Suicide Research*: in press.
- Rujescu, D, Giegling, I, Sato, T, Hartmann, AM, Moller, HJ (2003): Genetic variations in tryptophan hydroxylase in suicidal behavior: analysis and meta-analysis. *Biol.Psychiatry* 54: 465-473.
- Rujescu, D, Giegling, I, Gietl, A, Hartmann, AM, Moller, HJ (2003): A functional single nucleotide polymorphism (V158M) in the COMT gene is associated with aggressive personality traits. *Biol.Psychiatry* 54: 34-39.
- Sainsbury, P, Barraclough, B (1968): Differences between suicide rates. *Nature* 220: 1252.
- Schena, M, Shalon, D, Davis, RW, Brown, PO (1995): Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470.
- Schena, M, Shalon, D, Heller, R, Chai, A, Brown, PO, Davis, RW (1996): Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 10614-10619.
- Schmidt-Kastner, R, van Os, J, Steinbusch, WM, Schmitz, C (2006): Gene regulation by hypoxia and the neurodevelopmental origin of schizophrenia. *Schizophr.Res.* 84: 253-271.
- Schmidtke, A, Bille-Brahe, U, De Leo, D, Kerkhof, A, Bjerke, T, Crepet, P et al (1996): Attempted suicide in Europe: rates, trends and sociodemographic characteristics of suicide attempters during the period 1989-1992. Results of the WHO/EURO Multicentre Study on Parasuicide. *Acta Psychiatr.Scand.* 93: 327-338.

- Schmidtke,A, Weinacker,B, Fricke,S (1998): Epidemiologie von Suiziden und Suizidversuchen in Deutschland. *Suizidprophylaxe* Sonderheft: 37-49.
- Schoor,O, Weinschenk,T, Hennenlotter,J, Corvin,S, Stenzl,A, Rammensee,HG et al (2003): Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA. *Biotechniques* 35: 1192-1201.
- Schramm,M, Falkai,P, Tepest,R, Schneider-Axmann,T, Przkora,R, Waha,A et al (1999): Stability of RNA transcripts in post-mortem psychiatric brains. *J Neural Transm.* 106: 329-335.
- Schulsinger,F, Kety,SS, Rosenthal,D, Wender,PH (1979): A family study of suicide. In Schou,M, Stromgren,E, editors. *Origins, prevention, and treatment of affective disorders.*: New York: Academic, pp 277-287.
- Selig,S, Lidov,HG, Bruno,SA, Segal,MM, Kunkel,LM (1997): Molecular characterization of Br-cadherin, a developmentally regulated, brain-specific cadherin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 2398-2403.
- Sequeira,A, Kim,C, Seguin,M, Lesage,A, Chawky,N, Desautels,A et al (2003): Wolfram syndrome and suicide: Evidence for a role of WFS1 in suicidal and impulsive behavior. *Am.J Med.Genet.B Neuropsychiatr.Genet.* 119: 108-113.
- Sequeira,A, Gwadry,FG, Ffrench-Mullen,JM, Canetti,L, Gingras,Y, Casero,RA, Jr. et al (2006): Implication of SSAT by gene expression and genetic variation in suicide and major depression. *Arch.Gen.Psychiatry* 63: 35-48.
- Seroczynski,AD, Bergeman,CS, Coccaro,EF (1999): Etiology of the impulsivity/aggression relationship: genes or environment? *Psychiatry Res.* 86: 41-57.
- Sharma,E, Lombroso,PJ (1995): A neuronal protein tyrosine phosphatase induced by nerve growth factor. *J Biol.Chem.* 270: 49-53.
- Shenassa,ED, Catlin,SN, Buka,SL (2003): Lethality of firearms relative to other suicide methods: a population based study. *J Epidemiol.Community Health* 57: 120-124.
- Sher,L (2004): Depression and alcoholism. *QJM.* 97: 237-240.

- Sherrin,T, Heng,KY, Zhu,YZ, Tang,YM, Lau,G, Tan,CH (2004): Cholecystokinin-B receptor gene expression in cerebellum, pre-frontal cortex and cingulate gyrus and its association with suicide. *Neurosci.Lett.* 357: 107-110.
- Shih,JC, Chen,K, Ridd,MJ (1999): Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu.Rev.Neurosci.* 22: 197-217.
- Shindo,S, Yoshioka,N (2005): Polymorphisms of the cholecystokinin gene promoter region in suicide victims in Japan. *Forensic Sci.Int.* 150: 85-90.
- Sibille,E, Arango,V, Galfalvy,HC, Pavlidis,P, Erraji-Benchekroun,L, Ellis,SP et al (2004): Gene expression profiling of depression and suicide in human prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 29: 351-361.
- Smith,GD, Phillips,AN, Neaton,JD (1992): Smoking as "independent" risk factor for suicide: illustration of an artifact from observational epidemiology? *Lancet* 340: 709-712.
- Soderstrom,H, Tullberg,M, Wikkelso,C, Ekholm,S, Forsman,A (2000): Reduced regional cerebral blood flow in non-psychotic violent offenders. *Psychiatry Res.* 98: 29-41.
- Stanley,B, Molcho,A, Stanley,M, Winchel,R, Gameroff,MJ, Parsons,B et al (2000): Association of aggressive behavior with altered serotonergic function in patients who are not suicidal. *Am.J Psychiatry* 157: 609-614.
- Statham,DJ, Heath,AC, Madden,PA, Bucholz,KK, Bierut,L, Dinwiddie,SH et al (1998): Suicidal behaviour: an epidemiological and genetic study. *Psychol.Med.* 28: 839-855.
- Stemmers,FJ, Gunderson,KL (2005): Illumina, Inc. *Pharmacogenomics* 6: 777-782.
- Storey,JD, Tibshirani,R (2003): Statistical significance for genomewide studies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100: 9440-9445.
- Strous,RD, Nolan,KA, Lapidus,R, Diaz,L, Saito,T, Lachman,HM (2003): Aggressive behavior in schizophrenia is associated with the low enzyme activity COMT polymorphism: a replication study. *Am.J Med.Genet.B Neuropsychiatr.Genet.* 120: 29-34.

- Sugimoto,K, Honda,S, Yamamoto,T, Ueki,T, Monden,M, Kaji,A et al (1996): Molecular cloning and characterization of a newly identified member of the cadherin family, PB-cadherin. *J Biol.Chem.* 271: 11548-11556.
- Suzuki,T, Higgins,PJ, Crawford,DR (2000): Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques* 29: 332-337.
- Taniguchi,M, Miura,K, Iwao,H, Yamanaka,S (2001): Quantitative assessment of DNA microarrays--comparison with Northern blot analyses. *Genomics* 71: 34-39.
- Taniguchi,H, Kawauchi,D, Nishida,K, Murakami,F (2006): Classic cadherins regulate tangential migration of precerebellar neurons in the caudal hindbrain. *Development* 133: 1923-1931.
- Taupenot,L, Harper,KL, O'Connor,DT (2003): The chromogranin-secretogranin family. *N.Engl.J Med.* 348: 1134-1149.
- Thome,J, Eisch,AJ (2005): [Neurogenesis. Relevance for pathophysiology and pharmacotherapy of psychiatric diseases]. *Nervenarzt* 76: 11-19.
- Togashi,H, Abe,K, Mizoguchi,A, Takaoka,K, Chisaka,O, Takeichi,M (2002): Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron* 35: 77-89.
- Tomita,H, Vawter,MP, Walsh,DM, Evans,SJ, Choudary,PV, Li,J et al (2004): Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol.Psychiatry* 55: 346-352.
- Tork,I (1990): Anatomy of the serotonergic system. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 600: 9-34.
- Traskman,L, Asberg,M, Bertilsson,L, Sjostrand,L (1981): Monoamine metabolites in CSF and suicidal behavior. *Arch.Gen.Psychiatry* 38: 631-636.
- Tsai,TH, Milhorn,DM, Huang,SK (2006): Microarray and gene-clustering analysis. *Methods Mol.Biol.* 315: 165-174.
- Tverdal,A, Thelle,D, Stensvold,I, Leren,P, Bjartveit,K (1993): Mortality in relation to smoking history: 13 years' follow-up of 68,000 Norwegian men and women 35-49 years. *J Clin.Epidemiol.* 46: 475-487.

- Uchida,N, Honjo,Y, Johnson,KR, Wheelock,MJ, Takeichi,M (1996): The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol.* 135: 767-779.
- Van Heeringen,C, Audenaert,K, Van Laere,K, Dumont,F, Slegers,G, Mertens,J et al (2003): Prefrontal 5-HT2a receptor binding index, hopelessness and personality characteristics in attempted suicide. *J Affect.Disord.* 74: 149-158.
- Vandesompele,J, De Preter,K, Pattyn,F, Poppe,B, Van Roy,N, De Paepe,A et al (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3: RESEARCH0034.
- Vaquerizas,JM, Conde,L, Yankilevich,P, Cabezon,A, Minguez,P, Diaz-Uriarte,R et al (2005): GEPAS, an experiment-oriented pipeline for the analysis of microarray gene expression data. *Nucleic Acids Res.* 33: W616-W620.
- Verma,R, Mukerji,M, Grover,D, Rao,C, Das,SK, Kubendran,S et al (2005): MLC1 gene is associated with schizophrenia and bipolar disorder in Southern India. *Biol.Psychiatry* 58: 16-22.
- Walther,DJ, Peter,JU, Bashammakh,S, Hortnagl,H, Voits,M, Fink,H et al (2003): Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science* 299: 76.
- Wang,E (2005): RNA amplification for successful gene profiling analysis. *J Transl.Med.* 3: 28.
- Wender,PH, Kety,SS, Rosenthal,D, Schulsinger,F, Ortmann,J, Lunde,I (1986): Psychiatric disorders in the biological and adoptive families of adopted individuals with affective disorders. *Arch.Gen.Psychiatry* 43: 923-929.
- Wepner,U (2006): Der Hausarzt als Krisenmanager. *MMW.Fortschr.Med.* 148: 6.
- Wicki,R, Schafer,BW, Erne,P, Heizmann,CW (1996): Characterization of the human and mouse cDNAs coding for S100A13, a new member of the S100 protein family. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 227: 594-599.
- Wiesner,G (2004): Suizidmethoden - ein Vergleich zwischen Ost- und Westdeutschland. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 47: 1095-1106.

- Wilfinger,WW, Mackey,K, Chomczynski,P (1997): Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 22: 474-481.
- Williams,NM, Preece,A, Spurlock,G, Norton,N, Williams,HJ, McCreadie,RG et al (2004): Support for RGS4 as a susceptibility gene for schizophrenia. *Biol.Psychiatry* 55: 192-195.
- Wilson,MA, Molliver,ME (1991): The organization of serotonergic projections to cerebral cortex in primates. *Neuroscience* 44: 537-570.
- Wulsin,LR, Vaillant,GE, Wells,VE (1999): A systematic review of the mortality of depression. *Psychosom.Med.* 61: 6-17.
- Yagi,T, Takeichi,M (2000): Cadherin superfamily genes: functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes Dev.* 14: 1169-1180.
- Yalom,ID, Yalom,M (1971): Ernest Hemingway. A psychiatric view. *Arch.Gen.Psychiatry* 24: 485-494.
- Yamamoto,R, Li,X, Winter,S, Francke,U, Kilimann,MW (1995): Primary structure of human amphiphysin, the dominant autoantigen of paraneoplastic stiff-man syndrome, and mapping of its gene (AMPH) to chromosome 7p13-p14. *Hum.Mol.Genet.* 4: 265-268.
- Yanagi,M, Shirakawa,O, Kitamura,N, Okamura,K, Sakurai,K, Nishiguchi,N et al (2005): Association of 14-3-3 epsilon gene haplotype with completed suicide in Japanese. *J Hum.Genet.* 50: 210-216.
- Yasojima,K, McGeer,EG, McGeer,PL (2001): High stability of mRNAs postmortem and protocols for their assessment by RT-PCR. *Brain Res.Brain Res.Protoc.* 8: 212-218.
- Zhang,B, Tan,Z, Zhang,C, Shi,Y, Lin,Z, Gu,N et al (2002): Polymorphisms of chromogranin B gene associated with schizophrenia in Chinese Han population. *Neurosci.Lett.* 323: 229-233.
- Zhang,B, Kirov,S, Snoddy,J (2005): WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* 33: W741-W748.

Zill,P, Buttner,A, Eisenmenger,W, Moller,HJ, Bondy,B, Ackenheil,M (2004): Single nucleotide polymorphism and haplotype analysis of a novel tryptophan hydroxylase isoform (TPH2) gene in suicide victims. *Biol.Psychiatry* 56: 581-586.

Zubenko,GS, Maher,BS, Hughes,HB, III, Zubenko,WN, Scott,SJ, Marazita,ML (2004): Genome-wide linkage survey for genetic loci that affect the risk of suicide attempts in families with recurrent, early-onset, major depression. *Am.J.Med.Genet.B Neuropsychiatr.Genet.* 129: 47-54.

7. Anhang

7.1. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2004 bis September 2006 in der Sektion für molekulare und klinische Neurobiologie der Klinik für Psychiatrie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Allen voran möchte ich dem Leiter der Arbeitsgruppe, Herrn PD Dr. Dan Rujescu, für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit zur Anfertigung der Arbeit in einem anregenden und konstruktiven Umfeld danken. Er war zu jeder Zeit ein kompetenter Ansprechpartner und konstruktiver Betreuer.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Möller dafür, dass ich diese Arbeit in der von ihm geleiteten Klinik für Psychiatrie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen durfte.

Ausdrücklich möchte ich mich bei Frau Diplom-Psychologin Ina Giegling bedanken, die alle meine statistischen und organisatorischen Fragen äußerst geduldig beantwortet hat und dadurch unerlässlich für die Anfertigung der Arbeit war. Das detaillierte Wissen von Frau Dr. Annette Hartmann über Genetik und molekulare Neurobiologie und von Herrn Dr. Just Genius über alle Bereiche der Medizin haben ebenfalls entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, Danke für alle Ratschläge und anregenden Diskussionen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin Nicole für die Aufmunterung in schwierigen Phasen und Ihre Unterstützung während der gesamten Arbeit bedanken.

7.2. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
5-HIES	5-Hydroxy-Indol-Essigsäure
A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Brodmann Area
bp	Basenpaare
Biotin-16-UTP	Biotin-16-Uridintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
Corp.	Corporation
cDNA	Komplementäre DNA
COMT	Catecholamin-O-Methyltransferase
cRNA	Komplementäre RNA
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
FC	Fold-Change
FDR	False Discovery Rate
G	Guanin
GEPAS	Gene Expression Analysis Suite
GO	Gene Ontology
GTP	Guanosintriphosphat
HR	Hybridisierungsreplikat
Inc.	Incorporation
LOD	Logarithm of the Odds
LR	Labelingreplikat
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	Quantitative Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
OFC	Orbitofrontaler Cortex
PMI	<i>Post mortem</i> Intervall
RNA	Ribonukleinsäure
SNP	Single Nucleotide Polymorphismus
T	Thymin
Temp.	Temperatur
TPH	Tryptophan-Hydroxylase
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
WHO	Weltgesundheitsorganisation

7.3. Publikationen

Publikationen in Fachzeitschriften

1. Rujescu,D, Thalmeier,A, Moeller,H, Bronisch,T, Giegling,I (2006): Molecular genetic findings in suicidal behavior; What is beyond the serotonergic system? *Archives of Suicide Research*, im Druck.
2. Thalmeier,A, Dickmann,M, Giegling,I, Schneider,B, Hartmann,A, Maurer,K et al (2006): Gene expression profiling of *post mortem* orbitofrontal cortex in suicide victims. *Biological Psychiatry*, eingereicht.

Poster und Vorträge

1. Vortrag „Differentiell exprimierte Gene in *post mortem* Hirngewebe von Suizidenten – eine Microarraystudie“; Winterseminar für Biologische Psychiatrie in Oberlech vom 10. bis 16. Januar 2005.
2. Poster auf dem 12. Kongress der Association of European Psychiatrists (AEP) vom 02. bis 06. April 2005 in München.
3. Poster auf dem 8. Weltkongress der World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP) vom 28. Juni bis 03. Juli 2005 in Wien.
4. Poster auf dem 24. Symposium der Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie vom 05. bis 08. Oktober 2005 in München.
5. Vortrag: „Verminderte Expression von Neurotrophenen im ZNS von Suizidenten“; Journal Club der Klinik für Psychiatrie der LMU München am 14. Dezember 2005.
6. Vortrag „Genexpressionsanalysen zur Identifikation neuer Kandidatengene für suizidales Verhalten“; Winterseminar für Biologische Psychiatrie in Oberlech vom 20. bis 24. März 2006.
7. Poster auf dem Research-Festival der Klinik für Psychiatrie der LMU München am 28. Juli 2006.
8. Poster auf dem 9. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Biologische Psychiatrie in München am 13. Oktober 2006.

7.4. Lebenslauf

Andreas Thalmeier

Geburtsdatum/-ort 15. September 1974 in Kempten
Adresse Grasmückenstrasse 4, 82140 Olching
Telefon 08142/6526383
E-Mail Andreas.Thalmeier@gmx.de
Familienstand Ledig

Schulbildung

1980 bis 1984 Grundschule Sulzberg
1984 bis 1993 Allgäu-Gymnasium Kempten

Wehrdienst

10/1993 bis 09/1994 Sanitätssoldat in Horb am Neckar und Füssen

Studium

10/1994 bis 04/1999 Studium der Pharmazie an der Universität Regensburg
05/1999 bis 10/1999 Praktikum bei der Boehringer Ingelheim Pharma KG (Biberach)
11/1999 bis 04/2000 Praktikum in der Hof- und Residenzapotheke in Kempten
07/2000 Pharmazeutische Prüfung

Berufspraxis

09/2000 bis 12/2003 Tätigkeit bei der Allga Pharma GmbH in Fischen in der
Qualitätskontrolle und Qualitätssicherung

Promotion

Seit 01/2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für Psychiatrie der
LMU München in der Sektion molekulare und klinische
Neurobiologie bei PD Dr. Dan Rujescu