

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

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

**Die Bedeutung des Serotonin-2A-Rezeptorgens in der
Schizophrenie**

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

vorgelegt von
Marion Anna – Maria Friedl
aus
München
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dan Rujescu-Balcu

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Friedrich Strian
Prof. Dr. Ines Golly

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. Annette Hartmann

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2011

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	7
2	Einleitung	9
2.1	Definition der Schizophrenie	9
2.2	Historische Aspekte der Schizophrenie	9
2.3	Klassifikation schizophrener Psychosen	10
2.4	Epidemiologie	11
2.5	Krankheitsverlauf	12
2.6	Ätiopathogenese	13
2.6.1	Risikofaktoren	13
2.6.2	Morphologische Veränderungen des ZNS bei Schizophrenie	15
2.6.3	Genetische Faktoren	19
2.6.4	Lokalisation von Kandidatengenen	21
2.6.5	Biochemische Befunde	30
2.7	Das serotonerge System	35
2.7.1	Serotonin	35
2.7.2	Serotonerge Bahnen im Gehirn	36
2.7.3	Serotonerge Neuroplastizität	39
2.7.4	Serotoninmetabolismus	40
2.7.5	Serotoninrezeptoren	43
2.8	Die Rolle des serotonergen Systems in der Schizophrenie	47
2.8.1	Der 5-HT _{2A} -Rezeptor und Schizophrenie	47
2.8.2	Befunde zur Rezeptorbindung und Expression	47
2.8.3	Polymorphismen im 5-HT _{2A} Rezeptor und Schizophrenie	53
3	Fragestellung	71
4	Material und Methoden	72
4.1	Studienteilnehmer	72
4.1.1	Kontrollgruppe	72
4.1.2	Schizophrene Patienten	72
4.2	DNA-Extraktion	73
4.3	Konzentrationseinstellung der DNA	75
4.4	Geschlechtsbestimmung der Proben- DNA	79

4.5	Prinzip der Hochdurchsatzgenotypisierung mittels MALDI- TOF	
	Massenspektrometrie	83
4.5.1	Der MALDI- Prozess	83
4.5.2	Die Flugzeitspektrometrie (TOF)	84
4.6	Assay Design	86
4.6.1	Auswahl geeigneter SNPs	86
4.6.2	Multiplex Assay Design	87
4.7	Multiplex- Polymerase Kettenreaktion	90
4.8	Dephosphorylierung mit <i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>	93
4.9	Primerextensionseaktion	95
4.10	Entsalzung der Extensionsprodukte	98
4.11	Messung der Extensionsprodukte im MALDI-TOF Massenspektrometer	99
4.11.1	Probenvorbereitung	100
4.11.2	Messung der Extensionsprodukte	101
4.12	Qualitätskontrolle	102
4.12.1	Manuelle Nacheditierung	102
4.12.2	Überprüfung der Callrate	105
4.12.3	Überprüfung der Duplikat- und CEPH- Genotypen	105
4.12.4	Überprüfung des Hardy- Weinberg- Gleichgewichts	106
4.13	Statistische Auswertung	106
4.14	Quantitative Genexpression mit MALDI- TOF	107
4.14.1	Reverse Transkription	108
4.14.2	Multiplex <i>Real Competitive</i> PCR	110
4.14.3	Primerextensionsreaktion	114
4.14.4	Messung der Extensionsprodukte im MALDI- TOF MS	116
4.14.5	Quantitative Genexpression mit Kompetitorfeinverdünnung	116
4.14.6	Qualitätskontrolle	117
5	Ergebnisse	119
5.1	Das HTR2A Gen in der Schizophrenie	119
5.1.1	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	120
5.1.2	Analyse der Einzelmarker auf eine Assoziation mit Schizophrenie	121
5.1.3	Haplotypblockstruktur des humanen Genoms	125
5.1.4	Analyse der Haplotypen auf eine Assoziation mit Schizophrenie	126
5.2	Quantitative Genexpression	128
6	Diskussion	136

6.1	Diskussion funktioneller Konsequenzen	152
6.2	Quantitative Genexpression	158
6.2.1	Abschließende Beurteilung	161
6.3	Ausblick	163
7	Verzeichnis der Fachbegriffe und Abkürzungen	165
8	Literatur	168
9	Danksagung	207
10	Lebenslauf	208

1 Zusammenfassung

Der starke Einfluss genetischer Faktoren auf die Ätiologie der Schizophrenie gilt heute als unbestritten. In der vorliegenden Arbeit wurden an einer Fall- Kontroll-Stichprobe im Zuge eines Hochdurchsatzgenotypisierungsprojektes 11 Polymorphismen im Serotonin- 2A- Rezeptorgen (HTR2A) auf einen Zusammenhang mit der Erkrankung untersucht. Dieser Rezeptor, der in verschiedenen, auch für die Schizophrenie relevanten Regionen des humanen Gehirns in hoher Dichte exprimiert wird, dient als Zielrezeptor für atypische Antipsychotika. Des Weiteren üben Serotonin und seine Rezeptoren einen bedeutenden Einfluss auf kognitive Prozesse aus, die bei schizophrenen Patienten defizitär ausgeprägt sind. Somit scheint HTR2A ein vielversprechendes Kandidatengen für die Erkrankung darzustellen.

Bisher wurden zahlreiche Studien mit variablen Stichprobengrößen und verschiedener Ethnizität zu Polymorphismen in dem hier beschriebenen Gen publiziert. Die dabei erzielten Ergebnisse sind nicht konsistent, eine Replikation positiver Befunde ist bisher nur sehr selten gelungen, so dass eine Assoziation des HTR2A- Gens mit der Erkrankung als nicht gesichert gilt.

Auch die vorliegende Arbeit zeigte keinen positiven Zusammenhang des HTR2A- Gens mit der Schizophrenie. Weder bei der Untersuchung von Allel- und Genotypfrequenzen noch bei der Analyse der Häufigkeiten von Haplotypen konnte in der hier untersuchten deutschen Population aus 1325 gesunden Kontrollpersonen und 513 schizophrenen Patienten eine signifikante Assoziation ($p < 0,05$) mit der Schizophrenie ermittelt werden.

Ursachen für diese Inkonsistenz der bisherigen Befunde könnten in den unterschiedlichen Stichprobengrößen, der ethnischen Herkunft, den Rekrutierungskriterien für die Patienten- und Kontrollgruppen, aber auch in einer genetischen und phänotypischen Heterogenität der Erkrankung zu finden sein. Nicht zuletzt könnte das Serotonin- 2A- Rezeptorgen nicht mit der Erkrankung an sich assoziiert sein, sondern nur mit einem Teilaspekt, wie bestimmten kognitiven Funktionen oder dem Ansprechen auf verschiedene Neuroleptika.

Ob HTR2A einen Beitrag zur Suszeptibilität der Erkrankung leistet, kann hier nicht abschließend geklärt werden und sollte in weiteren Studien mit großen

Individuenzahlen und strengen Rekrutierungskriterien anhand einer ausreichenden Anzahl an sorgfältig ausgewählten Markern im Gen untersucht werden.

Nach bestätigter Assoziation eines Gens mit einer Erkrankung stellt sich die Frage nach der Funktionalität. Es muss geklärt werden, wie ein Genprodukt die Suszeptibilität für eine Erkrankung beeinflusst. Dazu wurde in dieser Arbeit eine neue Methode zur Untersuchung quantitativer Genexpression (QGE) mittels kompetitiver PCR und anschließender Messung im MALDI- TOF Massenspektrometer an einem bereits bestehenden humanen Genset getestet.

Anhand der Erfahrungen aus der vorliegenden Arbeit scheint die QGE-Technik nach sorgfältiger Auswahl der zu untersuchenden Gene und des Startmaterials eine vielversprechende Alternative zur häufig verwendeten *real time* PCR zu sein.

2 Einleitung

2.1 Definition der Schizophrenie

Die Schizophrenie ist eine schwerwiegende psychische Erkrankung, die den endogenen Psychosen zugeordnet wird. Charakteristisch sind psychopathologische Auffälligkeiten des Denkens, der Wahrnehmung und der Affektivität. Im akuten Schub bestehen meist eine erheblich verzerrte Realitätswahrnehmung und -bewertung mit Wahnsymptomatik und psychomotorischen Defiziten (Arolt et al., 2007).

2.2 Historische Aspekte der Schizophrenie

Das komplexe und phänotypisch sehr heterogene Erscheinungsbild der Schizophrenie ist schon seit mehreren Jahrhunderten bekannt und wurde von Emil Kraepelin zunächst 1896 in Hinblick auf den ungünstigen Verlauf der Erkrankung unter der Bezeichnung *Dementia praecox* (frühzeitige Verblödung) zusammengefasst. Kraepelin sah die Erkrankung vorrangig als eine Gesamtveränderung der Persönlichkeit, in der die Willensfunktionen des Erkrankten fortschreitend immer umfassender beeinträchtigt werden (Kraepelin, 1896).

Eugen Bleuler führte 1911 erstmals den Begriff Schizophrenie (Bewusstseinspaltung) ein (Bleuler, 1911), wobei er bei dem Krankheitsbild zwischen Grundsymptomen und akzessorischen Symptomen unterschied. Grundsymptome sind nach Bleulers Verständnis grundsätzlich anzutreffen, wenn die Erkrankung eine bestimmte Ausprägung erreicht hat, während akzessorische Symptome nicht bei jedem Erkrankten und auch bei anderen psychischen Störungen auftreten können. Außerdem teilte er die bei der Schizophrenie auftretenden Charakteristika in primäre und sekundäre Symptome ein. Dabei sah er in primären Symptomen solche, die eine direkte Folge des Krankheitsprozesses darstellen, wie zum Beispiel die Lockerung der Assoziation und die Disposition zu Halluzinationen. Sekundäre Symptome wie Affektstörungen und Störungen des Gedächtnisses, wertete er dagegen als eine Folge der primären Symptome (Bleuler, 1911).

In der Mitte des 20. Jahrhunderts konzipierte Kurt Schneider die Lehre von den Symptomen ersten und zweiten Ranges. Diese Einteilung war ein erster Versuch, die bei der Schizophrenie auftretenden Störungen nach ihrer Gewichtung für eine Diagnose zu operationalisieren. Gedankeneingebung oder -entzug, Wahnwahrnehmungen und andere Beeinflussungserlebnisse zählte Schneider zu den primären Affektveränderungen, Wahneinfälle und Halluzinationen zu den sekundären Symptomen (Schneider, 1957).

2.3 Klassifikation schizophrener Psychosen

Konzepte der Schizophrenie nach modernen Klassifikationssystemen wie ICD 10 (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10*) und DSM- IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV*) basieren vorwiegend auf dem Ansatz von Kraepelin. Heute wird in erster Näherung zwischen positiven und negativen Symptomen unterschieden (Andreasen und Olsen, 1982). Positive Symptome, wie zum Beispiel Wahn und Halluzinationen, sind hierbei als Eigenschaften zu verstehen, die bei Schizophrenen auftreten, bei Gesunden hingegen nicht. Im Gegensatz hierzu werden Verhaltensweisen, die bei Schizophrenen im Vergleich zu Gesunden defizitär ausgeprägt sind, der Negativsymptomatik zugeordnet, wie zum Beispiel Affektverflachung und Aufmerksamkeitsstörungen (Rothenhäusler und Täschner, 2007).

Sowohl DSM- IV als auch ICD 10 verlangen für die Diagnosestellung die Erfüllung einer Mindestanzahl an definierten diagnostischen Kriterien. Das Vorhandensein eines Einzelsymptoms genügt nicht für eine Diagnose. Die von der WHO entwickelte ICD 10 teilt die Schizophrenie in sieben Subtypen ein, während das von der *American Psychiatric Association* konzipierte DSM- IV fünf Haupttypen der Erkrankung unterscheidet (Tabelle 2-1, S. 8).

Tabelle 2-1: Klassifikation schizophrener Erkrankungen (nach Möller et al., 2005)

ICD 10	DSM IV
Paranoide Schizophrenie (F20.0)	Paranoider Typ (295.30)
Hebephrene Schizophrenie (F20.1)	Desorganisierter Typ (295.10)
Katatone Schizophrenie (F20.2)	Katatoner Typ (295.20)
Undifferenzierte Schizophrenie (F20.3)	Undifferenzierter Typ (295.90)
Postschizophrene Depression (F20.4)	
Schizophrenes Residuum (F20.5)	Residualer Typ (295.60)
Schizophrenia simplex (F20.6)	

Diese beiden Systeme unterscheiden sich in der Dauer der geforderten schizophrenen Symptome. So wird zum Beispiel nach ICD 10 die Dauer eines psychotischen Zustandes von einem Monat für die Diagnosestellung postuliert, während bei DSM- IV ein Vorhandensein von sechs Monaten erforderlich ist.

2.4 Epidemiologie

Die Distribution einer Erkrankung in der Bevölkerung wird generell durch zwei Kennzahlen angegeben. Mit der Inzidenzrate werden die Neuerkrankungen in einer Population innerhalb einer bestimmten Zeitspanne ausgedrückt, während die Prävalenz den Anteil an Menschen in einer Gemeinschaft erfasst, die zu einem bestimmten Zeitpunkt oder Zeitraum von einer Erkrankung betroffen sind, ganz gleich, ob es sich um Neuerkrankungen oder bereits bestehende Fälle handelt. Die Schätzungen zur Lebenszeitprävalenz der Schizophrenie umfassen einen Bereich von 0,3% bis 2% mit einem Mittelwert von etwa 0,7% (Saha et al., 2005). Eine Metaanalyse über eine große Anzahl an Studien zur Inzidenzrate aus einer Zeitspanne von 46 Jahren ergab eine mittlere jährliche Inzidenzrate von 0,02% (McGrath et al., 2004).

Lange wurde eine gleiche Verteilung der Erkrankung bei beiden Geschlechtern angenommen (Jablensky und Cole, 1997), jedoch konnten zwei aktuellere Metaanalysen zeigen, dass Männer ein 1,4fach höheres Risiko tragen, an Schizophrenie zu erkranken als Frauen (Aleman et al., 2003; McGrath et al., 2004). Zwischen verschiedenen geographischen, ethnischen und soziokulturellen Kollektiven gibt es aber kaum Unterschiede (Saha et al., 2006; Tsuang and Tohen, 2002). In den genannten Metaanalysen konnte auch die Hypothese bestätigt werden,

dass eine urbane Herkunft signifikant mit einem größeren Erkrankungsrisiko verbunden ist. Die Kausalität dieses Befundes konnte jedoch noch nicht abschließend geklärt werden. So wäre es zum Einen möglich, dass sich eine städtische Abstammung mit ihren Einflüssen direkt auf die Suszeptibilität für Schizophrenie auswirkt (*breeder hypothesis*), zum anderen könnten aber auch Schizophrene ein urbanes Umfeld vorziehen (*selection hypothesis*) (Tandon et al., 2008).

Die Erstmanifestation erfolgt bei einem Großteil der Patienten vor dem 30. Lebensjahr, wobei das durchschnittliche Prädilektionsalter bei Frauen mit 26 um fünf Jahre höher als bei Männern liegt (Jablensky und Cole, 1997). Ursachen hierfür könnten neben subtypologischen und psychosozialen Faktoren auch neurohumorale intersexuelle Differenzen, wie zum Beispiel eine protektive Wirkung des Östrogens sein (Häfner, 1995). Auch Spät- oder Altschizophrenien, bei denen die Erstmanifestation nach dem 40. oder 60. Lebensjahr auftritt, sind zu beobachten.

Von schizophrenen Psychosen sind Personen mit niedrigen Bildungsabschlüssen und niedriger sozioökonomischer Schichtzugehörigkeit besonders häufig betroffen (Crow, 2007; McClellan et al., 2007; Sullivan et al., 2003). Diesem Phänomen liegt kein gehäuftes Auftreten der Erkrankung in niedrigen sozioökonomischen Schichten zu Grunde, sondern vielmehr eine bereits im frühen Erkrankungsstadium auftretende Beeinträchtigung der sozialen Kompetenzen und ein damit verbundenes Abgleiten in tiefere soziale Schichten (*Drift-Hypothese*). Dieses Abgleiten hat nicht nur individuell, sondern auch ökonomisch weitreichende Konsequenzen. Nur 15% der Erkrankten sind in der Lage, auf dem primären Arbeitsmarkt einer längerfristigen Beschäftigung nachzugehen, nur 30% leben in einer festen partnerschaftlichen Beziehung (Falkai und Maier, 2006).

2.5 Krankheitsverlauf

Bereits Jahre vor Beginn der ersten schizophrenen Episode finden sich bei etwa einem Drittel der späteren Patienten charakteristische prodromale Symptome. Hierzu gehören depressive Verstimmtheit, Unruhe, Gespanntheit und eine Minderung der Leistungsfähigkeit (Marneros et al., 1991). Nur bei etwa einem Drittel verläuft die Erkrankung nach Ausbruch der ersten psychotischen Episode eher chronisch, häufiger ist ein schubhaftes Auftreten (Arolt et al., 2006). Im Laufe ihres Lebens

durchlaufen 90% aller Patienten mehr als eine Krankheitsepisode. An die akute Erkrankungsphase, die in der Regel etwa 3 Monate dauert, kann sich eine postpsychotische Depression anschließen. Außerdem weisen jeweils etwa ein Drittel der Patienten in dieser Phase leichte, mittelschwere oder schwere Residualzustände auf (Häfner, 1995).

Für die Prognose sind mehrere Parameter entscheidend. So wirken sich weibliches Geschlecht, das Auftreten eines paranoiden Subtyps und stabile soziale Herkunft eher positiv auf die Prognose aus, während eine prämorbid Persönlichkeit, akustische Halluzinationen und Zwangssymptomatik eher einen ungünstigen Verlauf prognostizieren (Arolt et al., 2006). Marneros und Mitarbeiter beobachteten in einer Langzeitstudie über 25 Jahre lang 148 schizophrene Patienten, dabei stellte sich nur bei 7% eine psychopathologische Symptombefreiheit ein, während 48,6% eine andauernde Negativsymptomatik zeigten. 34,4% litten weiterhin unter positiven und negativen Symptomen und bei 7% dominierte eine positive Symptomatik (Marneros et al., 1991). Auch neuere Studien konnten bestätigen, dass zwar häufig eine deutliche längerfristige Verbesserung der sozialen und kognitiven Fähigkeiten erreicht werden kann, eine vollständige Genesung jedoch unwahrscheinlich ist (Tandon et al., 2008).

2.6 Ätiopathogenese

2.6.1 Risikofaktoren

Obwohl die Ätiologie der Schizophrenie seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung ist, sind die Umstände, die zur Ausbildung einer Schizophrenie führen, nach wie vor unklar.

Dennoch gibt es einige, heute als fundiert geltende Risikofaktoren, die eine Manifestation begünstigen. So erhöhen ernste Ernährungsdefizite der Mutter (Tandon et al., 2008), pränatale und perinatale Schwangerschafts- und Geburtskomplikationen, maternale Infektionen während der Schwangerschaft und Infektionen in der Kindheit, Cannabisabusus (Moore et al., 2007) und das Aufwachsen in urbaner Umgebung das Risiko, eine schizophrene Psychose zu entwickeln (Maier et al., 1999). Auch ein hohes väterliches Alter scheint die Entstehung einer schizophrenen Psychose zu begünstigen (Falkai und Maier, 2006).

Es wird angenommen, dass mit steigendem Alter die Häufigkeit fehlerhafter Spermatogenesen zunimmt und so entstandene *de novo* Mutationen oder eine veränderte epigenetische Regulation ein erhöhtes Erkrankungsrisiko beim Kind bedingen könnten (Tandon et al., 2008).

Mit der Geburt in den Wintermonaten steigt auch das individuelle Risiko für die Ausbildung einer Schizophrenie um das 1,2- bis 1,5- fache im Vergleich zu einer Geburt in den Sommermonaten (Lewis, 1989; Torrey und Bowler, 1990). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass wintergeborene Personen antenatal im ersten und frühen zweiten Trimenon der Schwangerschaft vermehrt intrauterin Infektionen, wie Influenzaerkrankungen, ausgesetzt sind (Meyer et al., 2008; Penner und Brown, 2007), welche die neuronale Entwicklung des Fetus beeinträchtigen könnten. Vor dem Hintergrund der weltweit gleichen Prävalenzzahlen können allerdings nur Agenzien mit ubiquitärer Durchseuchungsrate in Betracht kommen.

Auch einige Infektionen, die die Patienten selbst betreffen, werden im Zusammenhang mit der Schizophrenie diskutiert. Dazu gehören neben den Influenzaviren Herpes Simplex Infektionen, Varicella Zoster Infektionen und Zytomegalovirusinfektionen (Buka et al., 2001; Dickerson et al., 2003; Leweke et al., 2004; Watson et al., 1984). Dickerson und Mitarbeiter konnten außerdem zeigen, dass sich bei Schizophrenen mit einer diagnostizierten Zytomegalovirus- Infektion eine Therapie mit Valacyclovir positiv auf die schizophrene Symptomatik auswirkt (Dickerson et al., 2003). Obwohl der genaue neurobiologische Mechanismus, durch den ein erhöhtes Erkrankungsrisiko vermittelt wird, noch nicht bekannt ist, wird im Allgemeinen eine Rolle der Zytokine und eine anormale Immunantwort auf diese Infektionen angenommen, die mit der normalen Hirnentwicklung interferiert (Ashdown et al., 2006).

Oft sind in der Anamnese von schizophrenen Patienten Geburtskomplikationen zu finden. Dazu gehören Ereignisse wie eine Frühgeburt, Inkubatorbehandlung, Asphyxie, Geburtsstillstand, Präeklampsie, Rhesusfaktor- Inkompatibilität, längere Geburtsdauer, niedriges Geburtsgewicht oder Nabelschnurkomplikationen (Dalman et al., 1999; Kunugi et al., 2001; McNeil et al., 1994; O'Callaghan et al., 1991) . Der hieraus resultierende Sauerstoffmangel im kindlichen Gehirn führt bevorzugt zu Zellverlusten in der sensiblen Amygdala- und Hippocampusregion und könnte damit ursächlich für die schizophrenietypische leichte Hippocampusschädigung sein (McGrath und Murray, 1995)

2.6.2 Morphologische Veränderungen des ZNS bei Schizophrenie

Ein Teil der schizophrenen Patienten zeigt morphologische Abnormitäten im ZNS. Schon in den 1960er Jahren wurden morphologische Veränderungen angenommen (Huber, 1963), aufgrund der unzureichenden apparativen Ausstattung waren aber keine eindeutigen Befunde zu erbringen. Erst mit der Einführung der Computertomographie (CT) wurden gesicherte *in vivo* Befunde möglich. Die ersten CT-Untersuchungen der 70er Jahre bestätigten die Vermutung pneumoencephalographischer Befunde, die eine Erweiterung der Liquorräume bei Schizophrenen vermuten ließ (Johnstone et al., 1976). Im letzten Viertel des 20. Jahrhunderts folgte eine Vielzahl von Studien zu volumetrischen Veränderungen bei schizophrenen Psychosen. Bis heute ist es aber noch nicht gelungen, spezifische volumetrische oder neuroanatomische Pathologien zu identifizieren, die bei der Diagnosestellung hilfreich sein könnten (Arolt et al., 2006). Ein grundsätzliches Problem bei neuroanatomischen und volumetrischen Befunden liegt in der großen Streubreite der ermittelten Abweichungen. So überlappen die Messwerte von Schizophrenen mit denen von gesunden Kontrollpersonen, und nur etwa 20% der Patienten zeigen überhaupt morphologische Veränderungen im ZNS (Iritani, 2007). Außerdem überschneiden sich die Befunde zur Schizophrenie mit denen anderer psychischer Erkrankungen, wie zum Beispiel den bipolaren Psychosen. Inzwischen wurde nahezu in allen bedeutenden Hirnregionen über Volumenabnormitäten bei schizophrenen Patienten berichtet (Harrison, 1999).

Quantitative Hirnsubstanzdefizite konnten in temporalen Regionen, schwerpunktmäßig im Hippokampus und entorhinalen Kortex, in frontalen Gehirnregionen, besonders dorsal und orbitofrontal, und im Thalamus gezeigt werden (Iritani, 2007; Vogele und Falkai, 1998).

Gesamthirnvolumina

Das Gesamthirnvolumen stellt eine wichtige Basisgröße dar, auf die sich alle volumetrischen Befunde beziehen müssen, um reliabel zu sein.

Shenton und Mitarbeiter werteten 51 Studien zum Gesamthirnvolumen schizophrener Patienten aus und konnten bei 61% der Untersuchungen eine Volumenreduktion der Gesamthirnmasse der Erkrankten im Vergleich zu Normalprobanden darstellen (Shenton et al., 2001). Diese Volumenreduktionen sind

auch bei nahen Verwandten der Betroffenen zu finden, ebenso wie bei Neuroleptika-naiven Patienten (Keshavan et al., 2008).

In einem anderen Untersuchungsansatz wird das Gesamthirnvolumen in graue und weiße Substanz segmentiert. Dabei zeigte sich eine Verminderung der grauen Substanz im Temporallappen, aber nicht in frontalen Hirnarealen (Mitelman et al., 2000; Steen et al., 2005). Für die weiße Substanz konnten bisher keine Volumenreduktionen ermittelt werden.

Temporallappen

Der mediale Temporallappen schließt den Hippokampus, die Amygdala und den Gyrus parahippocampalis mit ein.

Eine frühe Metaanalyse über 18 MRI- Studien ergab eine Volumendifferenz von ca. 4% zwischen Patienten und Kontrollen (Nelson et al., 1998). Untersuchungen der Seitendifferenzen des Temporallappens zeigten bei Patienten einen Volumenunterschied von links nach rechts (Shenton et al., 1992). Neuere Befunde weisen auf eine Reduktion der grauen Substanz im Hippokampus hin, die schon sehr früh und während der gesamten Erkrankung besteht, was gegen eine progrediente Volumenveränderung spricht (Keshavan et al., 2008). Neben dem Hippokampus wurden auch Volumenminderungen in der Amygdala, dem temporalen Gyrus und dem Gyrus zingulum berichtet (Baiano et al., 2007).

Außerdem gibt es Hinweise, dass auch die Neuronenzahl und -größe in diesen Regionen reduziert sein könnte (Bogerts et al., 1990). Des weiteren konnten Störungen in der Zytoarchitektur, sowie eine ektopische Anordnung der Neuronen nachgewiesen werden (Akbarian et al., 1993). Diese Veränderungen auf zellulärer Ebene könnten bereits pränatal zu einer gestörten Neuronenwanderung (*migration*) führen (Iritani, 2007).

Eine Volumenminderung im anterioren Gyrus temporalis superior konnte mit akustischen Halluzinationen in Verbindung gebracht werden (Rajarethinam et al., 2000). Das Ausmaß der Volumenminderungen ist mit 5-10% aber relativ gering (Falkai und Maier, 2006).

Frontallappen

Es wurden Volumenreduktionen in den Frontallappen berichtet, die vor allem den präfrontalen und orbitofrontalen Kortex betreffen. Außerdem konnte eine verminderte Durchblutung des Frontalhirns (Hypofrontalität) festgestellt werden, die als Korrelat kognitiver Störungen schizophrener Patienten angesehen wird (Paulman et al., 1990).

Zerebellum

Die Verbindung zwischen Zerebellum, den Assoziationskortexen und den limbischen Strukturen lassen eine Bedeutung des Zerebellums in der Pathologie der Schizophrenie wahrscheinlich werden. Arolt und Mitarbeiter (2008) werteten 13 MR-Untersuchungen aus, von denen vier positive Befunde ergaben. In einer Verlaufsuntersuchung kindlicher Schizophrenien über 3,5 Jahre zeigte sich eine signifikante Volumenreduktion des Zerebellums (Keller et al., 2003) .

Subkortikale Hirnareale

Die Basalganglien bilden einen Komplex aus fünf eng miteinander verknüpften subkortikalen Kerngebieten. Shenton und Mitarbeiter werteten 25 MR- Studien aus, von denen 17 einen signifikanten Volumenunterschied der Basalganglien von Erkrankten zu Normalprobanden ergaben. Dabei stellten 14 dieser Untersuchungen eine Volumenreduktion fest, 3 Studien ermittelten aber eine Volumenzunahme (Shenton et al., 2001). Diese Volumenzunahme war nur bei chronisch kranken zu finden und mit der Langzeiteinnahme von typischen Neuroleptika assoziiert, so dass hier eine echte morphologische Veränderung als nicht sehr wahrscheinlich angesehen wird (Keshavan et al., 2008).

Ventrikelsysteme

Von 55 in einer Metaanalyse erfassten MRI- Studien zeigten über 80% erweiterte Ventrikel und einige Studien fanden zumindest eine linkslateralisierte Temporalhornenerweiterung (Arolt et al., 2006). Für die lateralen Ventrikel konnte eine Vergrößerung mit einer Effektstärke (Cohens d) von 0,70 und damit ein Nichtüberlappungsbereich von 43% zwischen Patienten und Kontrollpersonen gezeigt werden (Raz und Raz, 1990). Eine ähnliche Effektstärke von $d = 0,66$ wurde

für den III. Ventrikel angegeben. Der III. Ventrikel ist insbesondere aufgrund seiner Nähe zum Thalamus von größerem Interesse.

Diese Befunde lassen sich mit den morphometrischen Befunden über reduzierte Volumina im Hippokampus- Amygdala Bereich in Einklang bringen.

Einzelne volumetrische Normabweichungen sind bereits vor Erkrankungsbeginn und bei Personen mit erhöhtem genetischen Erkrankungsrisiko (Angehörige 1. Grades) nachweisbar, auch wenn diese lebenslang gesund sind (Falkai und Maier, 2006), was auf eine genetisch bedingte Ursache der Volumenminderungen hindeutet. Diese Beobachtung trifft vor allem für den Hippokampus (Tepest et al., 2003) und die Erweiterung der Liquorräume zu (Falkai et al., 2003; Keshavan et al., 2008).

Die diesen morphologischen Veränderungen zugrunde liegenden Ursachen konnten bisher noch nicht ermittelt werden. Es werden sowohl eine ontogenetische Entwicklungsstörung als auch progredienter Krankheitsverlauf nach der Erstmanifestation diskutiert (Arolt et al., 2006). Befunde zu Gyrfikationsstörungen bei Schizophrenen stützen die Hypothese der pränatalen Entwicklungsstörung, da die in der 20. bis 24. Schwangerschaftswoche erfolgende Gyrfikation postnatal durch externe Faktoren praktisch nicht mehr beeinflusst wird (Vogeley und Falkai, 1998). Für einen progredienten Verlauf sprechen hingegen einige Untersuchungen, die Hinweise auf eine fortschreitende Reduktion der grauen Kortikalen Substanz ergaben (Cahn et al., 2002; Thompson et al., 2001).

Ein Erklärungsansatz der derzeitigen kontroversen Befundlage stellt die Betrachtung der Ergebnisse unter dem Aspekt der Heterogenität schizophrener Psychosen dar, womit sich auch die Schwierigkeit der Replikation volumetrischer oder neuroanatomischer Befunde begründen ließe.

2.6.3 Genetische Faktoren

Neben morphologischen Veränderungen wird auch eine starke genetische Komponente in der Ätiologie der Schizophrenie angenommen, wobei der genaue Vererbungsmodus noch nicht bekannt ist. Ein monogener Erbgang gilt jedoch als ausgeschlossen, vielmehr wird ein multigener Vererbungsmodus in Wechselwirkung mit bestehenden Umweltbedingungen angenommen. So steht heute eine multifaktorielle Ätiopathogenese mit starker Betonung auf der genetischen Vulnerabilität im Mittelpunkt der Diskussion. Dabei können die einzelnen genetischen und Umweltfaktoren individuell mit unterschiedlich starker Gewichtung zur Ätiopathogenese beitragen und sich wechselseitig beeinflussen. Unter anderem können hirnstrukturelle, neurophysiologische und/oder biochemische Besonderheiten entstehen, die eine erhöhte Vulnerabilität bewirken und so zu einer erhöhten Prädisposition führen. Werden nun vulnerable Personen mit ungünstigen Umständen, wie zum Beispiel psychosozialem Stress oder psychotogenen Substanzen konfrontiert, kann eine Erstmanifestation bzw. eine erneute Exazerbation der Erkrankung begünstigt werden (Möller et al., 2005). Zu einer Manifestation kann es nach dem Schwellenmodell aber erst kommen, wenn eine bestimmte multifaktorielle Schwelle überschritten wird (Sawa und Snyder, 2002).

Genetische Faktoren erklären etwa 60- 80% der Varianz in der Entstehung schizophrener Erkrankungen (Cannon et al., 1998; McGue und Gottesman, 1991). Obwohl etwa zwei Drittel der Erkrankungsfälle spontan auftreten, tragen nahe Verwandte eines Betroffenen ein erhöhtes Risiko, ebenfalls eine Schizophrenie zu entwickeln (Tandon et al., 2008). Wong und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen in Bezug auf die Schizophrenie bei 50% lag (Wong et al., 2005), während sie bei dizygoten Zwillingen, die sich wie normale Geschwister 50% der genetischen Information teilen, nur bei 4-17% lag (Cannon et al., 1998; Farmer et al., 1987; Franzek und Beckmann, 1996; Farmer et al., 1987; Onstad et al., 1991). Bei monozygoten Zwillingen sollte aber berücksichtigt werden, dass sie sich eine ähnlichere Umwelt teilen als dizygote Zwillinge. Sie sind immer gleichen Geschlechts, sehen sich sehr ähnlich und teilen sich mit einer gemeinsamen Plazenta die gleichen intrauterinen Umstände. Somit ist nicht geklärt, ob die hohe Konkordanzrate auch durch Umweltfaktoren mitbedingt wird, und so der Heritabilität eine zu starke Gewichtung zugesprochen wird.

Auch Kinder eines schizophrenen Elternteils zeigen mit 13% ein erhöhtes Erkrankungsrisiko gegenüber der Allgemeinbevölkerung. Enkelkinder eines schizophrenen Patienten sind immer noch dreimal häufiger selbst von der Erkrankung betroffen als familiär nicht vorbelastete Personen (Häfner, 1995; Tsuang et al., 2001).

Mit Hilfe von Adoptionsstudien konnte demonstriert werden, dass die deutliche familiäre Häufung der Schizophrenie nicht allein auf eine geteilte familiäre Umwelt zurück zu führen ist. Kendler und Mitarbeiter zeigten auf, dass familiär unbelastete Kinder, die von einer Familie mit schizophrenem Elternteil adoptiert wurden, kein erhöhtes Erkrankungsrisiko gegenüber der Allgemeinbevölkerung aufweisen. Dagegen behielten Kinder von schizophrenen leiblichen Eltern, die von einer unbelasteten Familie adoptiert wurden, ihr erhöhtes Risiko, eine schizophrene Psychose zu entwickeln (Kendler et al., 1994; Kety et al., 1994).

Die Suche nach Krankheitsgenen für psychische Störungen war lange erfolglos. Dies lässt sich zum einen damit erklären, dass Gene nicht für Diagnosen, sondern für Funktionen kodieren, zum anderen liegt mit großer Wahrscheinlichkeit kein Mendel-Erbgang vor, und die Kenntnis der Pathophysiologie ist nach wie vor unzureichend.

2.6.3.1 Kopplungs- und Assoziationsstudien

Bei der Suche nach Kandidatengenen wurde zumeist entweder nach Kopplungssignalen oder positiven Assoziationen mit bestimmten genetischen Markern gesucht.

Mit Hilfe von Kopplungsstudien kann überprüft werden, ob ein polymorpher genetischer Marker, dessen chromosomale Position bekannt ist, signifikant in Zusammenhang mit dem Auftreten einer Erkrankung innerhalb einer betroffenen Familie vererbt wird. Für jeden Marker wird dabei die Kosegregation mit dem zu untersuchenden Phänotypen analysiert. Wird eine Kosegregation festgestellt, so kann angenommen werden, dass der Marker in der Nähe eines Prädispositionsgens lokalisiert ist. Grundsätzlich sind für Kopplungsanalysen Familien mit zwei oder mehr betroffenen Mitgliedern nötig, eine größere Anzahl an Individuen ist jedoch hilfreich. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für einen solchen Kopplungsbefund wird mit dem *logarithm of odds – Score* (LOD- score) angegeben, wobei ein LOD- score von 3,0 eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 1:10000 bedeutet und als hinweisgebend für eine Kopplung angesehen wird.

Assoziationsstudien hingegen sind in der Regel Fall- Kontroll- Studien, in denen geprüft wird, ob ein Polymorphismus mit einem seiner Allele überzufällig häufig bei Betroffenen im Vergleich zu Kontrollen vorkommt. Es bietet sich an, hierbei Kandidatengene zu untersuchen, die entweder in Regionen mit positiven Kopplungsbefunden liegen, oder deren Genprodukte in Zusammenhang mit der Pathophysiologie der Erkrankung stehen könnten.

Diese Studien zeichnen sich durch eine vergleichsweise hohe Sensitivität und eine eher geringe Spezifität aus, wodurch sich einerseits die Wahrscheinlichkeit erhöht, auch Gene mit nur geringem Einfluss zu identifizieren, andererseits steigt aber auch das Risiko für falsch- positive Ergebnisse gegenüber dem der Kopplungsanalysen (Arolt et al., 2006). Eine Replikation möglicher Befunde ist daher bei dieser Methode von besonders großer Bedeutung.

Die Etablierung der *array* Technologie ermöglicht es, heute eine sehr große Anzahl an genetischen Markern zeitgleich bei einem Individuum zu untersuchen. In solchen genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) wird das gesamte Genom hypothesenfrei mit bis zu einer Million äquidistanter Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) an einer Vielzahl von Individuen auf Assoziation untersucht. Auf diese Weise wurden bis zum heutigen Zeitpunkt einige vielversprechende SNPs identifiziert, die Hinweise auf Suszeptibilitätsgene geben könnten.

Die Strategie der genomweiten Assoziationsstudien hat den Nachteil, dass eine wesentlich höhere Korrekturrate für multiples Testen erforderlich wird. Aus diesem Grund ist eine umfangreiche Stichprobe mit mehreren tausend Individuen nötig. Oft werden GWAS im mehrstufigen Siebverfahren durchgeführt. Mit Hilfe eines initialen Kollektivs werden Regionen identifiziert, die dann im nächsten Schritt feinmaschiger mit einer höheren Anzahl von SNPs abgedeckt werden.

2.6.4 Lokalisation von Kandidatengen

Zahlreiche Kopplungs- und Assoziationsstudien, mehr als 30 GWAS und einige Metaanalysen zur Genetik der Schizophrenie wurden bisher durchgeführt (Tandon et al., 2008), meist mit sehr inkonsistenten Ergebnissen. Mittlerweile existieren aber einige, in unabhängigen Stichproben replizierte Hinweise auf mehrere chromosomale Abschnitte, in denen Prädispositionsgene für schizophrene Erkrankungen lokalisiert sein könnten (z.B. Gurling et al., 2001; Owen et al., 2005; Prasad et al., 2005;

Gurling et al., 2001; Straub und Weinberger, 2006). Keines dieser Gene scheint aber für sich eine substantielle Rolle zu spielen.

Neben Einzelnukleotidpolymorphismen werden in zunehmendem Maße auch Genkopieanzahlvarianten (*copy number variations*, CNV) in Zusammenhang mit der Schizophrenie gebracht. Diese genomischen Veränderungen führen dazu, dass größere Teile eines chromosomalen Abschnitts verdoppelt, vervielfacht oder deletiert werden. Obwohl diese Art von Variationen nur selten vorkommt, ist ihre Penetranz sehr hoch, so dass schon ihr alleiniges Vorliegen reicht, um den Phänotypen einer bestimmten Erkrankung auszubilden (Mössner et., 2009). Eine neuere Untersuchung kam zu dem Ergebnis, dass monogene CNVs für etwa 1% der Fälle von Schizophrenie verantwortlich sein könnten (Stefansson et al., 2008).

Chromosom 1

In drei unabhängigen Stichproben ergaben sich Kopplungsbefunde für die Region 1q21-23 in Familien mit gehäuften Auftreten der Erkrankung (Brzustowicz et al., 2000; Gurling et al., 2001).

Ein Kandidatengen auf Chromosom 1q21-22 ist das G- Protein- Regulator- Gen 4 (RGS4). RGS4 kodiert für ein Protein, das die Funktion verschiedener G-Protein-gekoppelter Neurotransmitterrezeptoren reguliert und wird im gesamten ZNS exprimiert. In Anbetracht der angenommenen dopaminergen Überaktivität im Gehirn schizophrener Patienten sind Veränderungen dieses regulierenden Proteins von großem Interesse.

Eine *microarray*- Studie konnte eine vermehrte Expression des RGS4-Gens im Gehirn Erkrankter zeigen (Mirnics et al., 2001), und es konnte eine Assoziation verschiedener Haplotypen des Gens mit der Schizophrenie nachgewiesen werden (Brzustowicz et al., 2000). Chowdary und Mitarbeiter (2001) fanden zumindest Hinweise auf eine Assoziation mit der Schizophrenie.

Das *Disrupted in Schizophrenia*- Gen (DISC1) stellt ein weiteres Kandidatengen auf Chromosom 1 dar. In einer schottischen, von Schizophrenie mehrfach betroffenen Familie wurde eine Translokation auf Chromosom 1q42 gefunden, die zu einer unvollständigen Proteinvariante führt und in dieser Familie mit der Schizophrenie kosegregiert. Das reguläre Genprodukt bindet an Proteine, die für die Funktionen des Zytoskeletts von Bedeutung sind. Das mutierte Protein scheint hierzu nicht oder nur

wenig in der Lage zu sein und somit das Neuritenwachstum negativ zu beeinflussen (Arolt et al., 2006).

Die Region 1q21 könnte neben Einzelnukleotidpolymorphismen auch andere erkrankungsrelevante Variationen beinhalten. In einer Studie zu CNVs und Schizophrenie konnte eine große, seltene Deletion in der Region 1q21.1 identifiziert werden, die eine *odds ratio* von 14,83 erreichte (Stefansson et al., 2009).

Chromosom 2

Moises und Mitarbeiter fanden Hinweise auf die chromosomale Region 2q12-13 (Moises et al., 1995), konnten diesen Befund jedoch nicht replizieren (Lewis et al., 2003). Dennoch erscheint eine Kopplung dieser Region mit der Schizophrenie nicht unwahrscheinlich (DeLisi et al., 2002). Auch eine von Lewis und Mitarbeitern durchgeführte Metaanalyse über 20 genomweite Kopplungsstudien lieferte zumindest einen Hinweis auf die Region 2q (Lewis et al., 2003), eine weitere Metaanalyse über 32 genomweite Kopplungsstudien bekräftigte diesen Befund (Ng et al., 2009).

O'Donovan und Mitarbeiter führten eine genomweite Assoziationsstudie durch und genotypisierten über 500 000 SNPs an einer Stichprobe aus etwa 500 schizophrenen europäischen Patienten und 2000 Kontrollpersonen. Die signifikantesten SNPs in dieser Kohorte wurden an drei weiteren unabhängigen Stichproben repliziert und so die Genotypen von über 7000 Patienten und 12000 Probanden analysiert. Dabei ergab sich ein starker Hinweis auf eine signifikante Assoziation des SNPs rs1344706 ($p = 9,25 \times 10^{-5}$) im ZNF804A- Gen (O'Donovan et al., 2008). Aufgrund dieser positiven Assoziationsbefunde wurden insgesamt 12 Polymorphismen im ZNF804A an einer kleineren irischen Stichprobe untersucht. Dabei konnte eine Assoziation von rs1344706 mit der Schizophrenie bestätigt werden ($p = 0,0113$), außerdem wurde eine Assoziation des ZNF804A SNPs rs7597593 ($p = 0,0013$) sowie eines ZNF804A Haplotypen ($p < 0,003$) aufgezeigt. Des weiteren untersuchten die Autoren die allelspezifische Expression des Gens im präfrontalen Kortex gesunder Kontrollpersonen. Hier wurde bei Vorliegen des A- Allels von rs1344706 signifikant mehr mRNA gebildet, als bei Vorliegen des C- Allels ($p = 0,033$), was auf eine funktionelle Relevanz dieses Polymorphismus hinweisen könnte (Riley et al., 2010) ZNF804A ist in der Region 2q31.1 lokalisiert. Das zugehörige Protein wurde bisher funktionell noch nicht untersucht, aber es besitzt vermutlich Bindungsdomänen für

Zinkionen und DNA, so dass eine regulierende Funktion des Proteins bei der Genexpression nahe liegt (O'Donovan et al., 2008).

Ein weiterer Hinweis auf die Region 2q fand sich in der GWAS, die an der MGS-Stichprobe (MGS = *molecular genetics of schizophrenia*) durchgeführt wurde. Dabei wurden die Genotypen von über 1200 schizophrenen Patienten und 973 gesunden Kontrollpersonen europäischer Herkunft analysiert. Der Polymorphismus rs13025591 in der Region 2q37.3 erreichte annähernd genomweite Signifikanz ($p=4,59 \times 10^{-7}$). Dieser SNP liegt in der Nähe des Gens CENTG2, dessen Produkt ein GTPase Aktivator ist (Shi et al., 2009).

Chromosom 3

Das auf Chromosom 3q13.3 lokalisierte Dopamin-D3-Rezeptorgen (DRD3) kodiert für den Dopamin- D3- Rezeptor und ist in Hinblick auf die Dopaminhypothese interessant. Für dieses Gen liegen eine Reihe positiver Assoziationstudien vor, die auf einen funktionellen Polymorphismus in Exon 1, der zu einem Aminosäureaustausch von Serin nach Glycin führt, hinweisen (z.B.: Dubertret et al., 1998).

Chromosom 5

Für die Region 5q22-31 ergab sich in einer Kopplungsstudie an über 256 irischen Familien ein LOD- Score von 3,5 (Straub et al., 1995), ähnliche Resultate wurden für eine finnische Stichprobe erreicht (Paunio et al., 2001), und auch in einer Metaanalyse wurde ein positiver Kopplungsbefund berichtet (Ng et al., 2009). In einer Multicenter-Studie konnte dieser Befund aber nicht repliziert werden (Levinson et al., 2000). Auch für den Chromosomenabschnitt 5p14-13 liegen positive Kopplungsbefunde vor (Gurling et al., 2001; Silverman et al., 1996).

Chromosom 6

Das Chromosom 6 wurde im Zusammenhang mit der Schizophrenie häufig untersucht, bereits früh gab es Hinweise auf eine Kopplung mit der Region 6p22-24 (Moises et al., 1995; Straub et al., 1995). Diese Ergebnisse konnten später repliziert werden (Schwab et al., 2000). Das Dysbindin- Gen (DTNBP1) stellt ein mögliches Kandidatengen in dieser Region dar. Das Protein Dysbindin bildet zusammen mit dem Dystrophin-Protein einen Komplex, welcher als Bestandteil des Zytoskeletts in

die Synapsenbildung involviert und wahrscheinlich auch an der Signaltransduktion von NMDA- und GABA- Rezeptoren beteiligt ist (Benson et al., 2001).

Straub und Mitarbeiter konnten in einem systematischen *Genmapping* der chromosomalen Region 6p22 in einer irischen Familie Assoziationen zwischen Haplotypen und SNPs in der Umgebung des Gens für dystrophinbindendes Protein mit der Schizophrenie feststellen (Straub et al., 2002). Die Region des DTNBP1-Gens wurde bereits in mehreren Studien als mit der Schizophrenie assoziiert angegeben (Bailer et al., 2002; Hwu et al., 2000), jedoch nicht von allen Arbeitsgruppen (Morris et al., 2003).

Sehr robuste Ergebnisse konnten drei Konsortien zur chromosomalen Region 6p21.3-22.1 erbringen. Das *International Schizophrenia Consortium* führte eine genomweite Assoziationsstudie mit etwa einer Million SNPs durch. Dabei identifizierten sie eine etwa 450 SNPs umfassende Region um den Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC), die einen starken Hinweis auf eine Assoziation mit der Schizophrenie lieferte. Um die Aussagekraft dieser Ergebnisse zu vergrößern, wurden sie mit den Resultaten zweier anderer GWAS kombiniert, die ebenfalls zumindest einen Trend zur Assoziation der MHC- Region mit der Erkrankung festgestellt hatten (Shi et al., 2009; Stefansson et al., 2009). Stefansson und Mitarbeiter führten dabei eine GWAS am SGENE- Kollektiv durch, während die Gruppe um Shi die MGS- Stichprobe untersuchte. Bei der Analyse der Genotypen von insgesamt 8008 schizophrenen, kaukasischen Patienten und 19077 Kontrollpersonen erreichten elf SNPs in der MCH- Region genomweite Signifikanz (Tabelle 2-2).

Tabelle 2-2: p-Werte der genomweit signifikant assoziierten Polymorphismen der erweiterten MCH-Region in der kombinierten Stichprobe und den drei Einzelkollektiven.

SNP_ID	Chromosomale Position	p-Wert (kombinierte Stichprobe)	p-Wert (ISC)	p-Wert (MGS)	p-Wert (SGENE)
rs6904071	27155235	1.8E-08	3.0E-04	1.2E-02	3.7E-04
rs926300	27167422	1.1E-08	3.0E-04	1.2E-02	2.1E-04
rs6913660	27199404	2.4E-08	3.0E-04	1.7E-02	3.4E-04
rs13219181	27244204	1.3E-08	3.0E-04	1.5E-02	2.1E-04
rs13194053	27251862	9.5E-09	3.0E-04	1.5E-02	1.5E-04
rs3800307	27293771	4.4E-08	3.4E-03	1.3E-02	6.1E-05
rs6932590	27356910	7.1E-08	2.2E-03	3.4E-03	8.5E-04
rs3800316	27364081	3.8E-08	3.5E-03	7.2E-04	1.1E-03
rs7746199	27369303	5.0E-08	8.8E-04	6.8E-04	5.7E-03
rs3800318	27371620	6.4E-08	8.8E-04	2.8E-03	2.3E-03
rs9272219	32710247	6.9E-08	2.2E-05	1.3E-02	1.0E-02
rs9272535	32714734	8.9E-08	2.5E-05	1.6E-02	9.9E-03

(ISC = *International Schizophrenia Consortium*, MGS = *Molecular Genetics of Schizophrenia*, SGENE = *Schizophrenia Gene*)

Chromosom 7

In einer kürzlich veröffentlichten genomweiten Assoziationsstudie wurden Hinweise auf eine geschlechtsspezifische Assoziation mit Chromosom 7 gefunden. Shifman und Mitarbeiter genotypisierten vier DNA *pools* aus jeweils weiblichen und männlichen Patienten und weiblichen und männlichen Kontrollen. Dabei zeigte sich eine Assoziation des SNPs rs7241475 des Reelin- Gens (RELN), jedoch nur bei Frauen ($p = 9,8 \times 10^{-5}$, odds ratio = 2,1). Diese frauenspezifische Assoziation konnte in vier weiteren unabhängigen Stichproben repliziert werden (Shifman et al., 2008). Reelin ist eine Serin- Protease, die in vielfältiger Weise an rezeptorvermittelten Vorgängen beteiligt ist.

Chromosom 8

Mehrfach wurde für den Abschnitt 8p21-22 ein positiver Kopplungsbefund berichtet (Blouin et al., 1998; Kendler et al., 1995; Pulver et al., 2000), eine Metaanalyse bestätigte diesen Befund (Ng et al., 2009). In einer großangelegten genomweiten Kopplungsanalyse mit 807 Familien gemischter Ethnizität konnten ebenfalls positive Kopplungssignale für das Chromosom 8 ermittelt werden. Den stärksten Hinweis lieferte dabei die Region 8p21 (LOD- score = 2,65). Ein Trend zur signifikanten Kopplung zeigte sich für die Region 8q24.1 (Holmans et al., 2009). Zwei weitere Genomscans weisen auf eine Kopplung mit der Region 8p23.3-p12 hin (Holliday et al., 2008; Suarez et al., 2006).

Das bestuntersuchtete Kandidatengen auf Chromosom 8p ist das Neuregulin- Gen (NRG1). Ein Zusammenhang des NRG1- Gens mit Schizophrenie konnte in vielen Studien bestätigt werden (z.B. Stefansson et al., 2002). Verschiedene Haplotypen in der Nähe des NRG1- Gens auf Chromosom 8p12-21 haben sich als mit der Schizophrenie assoziiert gezeigt. Die Träger eines Risikohaplotyps des NRG1 haben signifikant kleinere Hippokampusvolumina als Personen ohne diesen Haplotypen. Von dieser Volumenminderung sind auch gesunde Verwandte 1. Grades betroffen (Gruber et al., 2008).

Chromosom 10

Die Region 10p11-15 lieferte in drei Kopplungsanalysen ein positives Signal (DeLisi et al., 2002; Faraone et al., 1998; Schwab et al., 2000). Eine genomweite Kopplungsstudie erbrachte ein starkes Signal für Chromosom 10q25.3-q26.3 (*odds ratio*= 3,87) (Williams et al., 2003). Diese Region wurde in weiteren Kopplungsstudien bestätigt (Lerer et al., 2003; Suarez et al., 2006). Da für diesen Abschnitt von Chromosom 10 kein Kandidatengen bekannt war, wurden über 3000 SNPs in dieser Region in bis zu neun unabhängigen europäischen Kohorten genotypisiert. Dabei zeigte der Polymorphismus rs1710921, der etwa 85kb stromabwärts von dem Gen FGFR2 lokalisiert ist, den stärksten Hinweis auf eine Assoziation mit Schizophrenie ($p= 0,002$) (O'Donovan et al., 2009).

Chromosom 11

In einer genomweiten Assoziationsstudie an 2663 schizophrenen Patienten und 13498 Kontrollpersonen kaukasischer Ethnizität (SGENE- Kollektiv) konnte für den SNP rs12807809 in der Region 11q24.2 eine genomweit signifikante Assoziation festgestellt werden ($p= 2,4 \times 10^{-9}$). Dieser Polymorphismus liegt etwa 3,5kb stromaufwärts des Neurogranin- Gens (NRGN), ein Gen, das in die Neuroentwicklung involviert ist und bereits in einer kleinen portugiesischen Stichprobe mit Schizophrenie assoziiert war (Stefansson et al., 2009).

Chromosom 12

Kirov und Mitarbeiter führten eine genomweite Assoziationsstudie an drei DNA *pools* durch und genotypisierten die auffälligsten SNPs individuell an einer weiteren Stichprobe. Dabei ergab sich der stärkste, annähernd genomweit signifikante, Hinweis auf Assoziation für einen intronischen Polymorphismus des Gens *CCDC60* auf Chromosom 12 (rs11064768, $p= 1,2 \times 10^{-6}$) (Kirov et al., 2009). Die Funktion von *CCDC60* ist bisher noch nicht bekannt.

Chromosom 13

Auf Chromosom 13q32-34 liegen zwei benachbarte genetische Marker, die in zwei unabhängigen Stichproben mit der Erkrankung gekoppelt waren (Blouin et al., 1998; Brzustowicz et al., 1999).

Chumakov und Mitarbeiter konnten einen Zusammenhang zwischen zwei überlappenden Genen auf Chromosom 13q22-34, *G32* und *G72*, und der Schizophrenie zeigen.

Das auf Chromosom 13q14 lokalisierte Serotonin- 2A- Rezeptorgen (*HTR2A*) zeigte mehrfach eine signifikante Assoziation mit der Schizophrenie (z.B.: Inayama et al., 1996), die in vielen Studien bestätigt wurde.

Chromosom 17

Bei einer genomweiten Kopplungsstudie an 353 Geschwisterpaaren mit jeweils einem betroffenen Individuum ergab sich ein starkes Kopplungssignal mit einer seltenen Mutation in der Region 17p11.2-q25.1 (Williams et al., 2003). Als plausibelstes Kandidatengen in diesem chromosomalen Abschnitt bot sich das Proteinkinase C, alpha- Gen (*PRKCA*) an. Deshalb wurden die Daten einer genomweiten Assoziationsstudie an einer englischen Stichprobe speziell für diesen Bereich von Chromosom 17 ausgewertet, und es zeigte sich eine genomweit signifikante Assoziation von *PRKCA* und Schizophrenie. Eine Replikation des besonders signifikant assoziierten SNPs (rs873417) in drei weiteren europäischen Stichproben bestätigte den Zusammenhang mit der Erkrankung ($p= 0,0004$, odds ratio= 1,4 in der kombinierten Stichprobe) (Carroll et al., 2009).

Chromosom 18

In ihrer genomweiten Assoziationsstudie konnten Stefansson und Mitarbeiter unter anderem eine signifikante Assoziation mit dem Polymorphismus rs9960767 auf Chr. 18q21.2 feststellen ($p=4,1 \times 10^{-9}$) (Stefansson et al., 2009). Dieser SNP ist in der Nähe des TCF4- Gens lokalisiert, dessen Produkt essentiell für die Hirnentwicklung ist. Diese Region war bereits in einer Metaanalyse aufgefallen (Lewis et al., 2003).

Chromosom 22

Mehrere Kopplungsanalysen weisen auf die Region 22q11-12 hin (Blouin et al., 1998; DeLisi et al., 2002). Diese Region ist insofern von besonderem Interesse, da sie das Catecholamin-O-Methyltransferase- Gen (COMT) beherbergt, das als Kandidatengen diskutiert wird.

Für dieses Gen gibt es bemerkenswerte, wenn auch widersprüchliche Hinweise auf die Assoziation eines funktionellen Polymorphismus, der einen Basenaustausch von Valin nach Methionin zur Folge hat, mit der Schizophrenie. Dieser Polymorphismus führt vermutlich zu einem präfrontal veränderten Dopaminmetabolismus (Egan et al., 2001; Goldberg et al., 2003) und wurde im Zusammenhang mit kognitiven Funktionen wie Arbeitsgedächtnis und Handlungsplanung genannt.

Bray und Mitarbeiter konnten auch eine Assoziation der 3'-Region des COMT- Gens mit der Erkrankung zeigen (Bray et al., 2003).

Einen weiteren Hinweis auf eine Assoziation mit der Region 22q11.2-q12.1 konnte das *International Schizophrenia Consortium* in einer genomweiten Assoziationsstudie erbringen. Dabei wurden etwa eine Million SNPs an einem kaukasischen Kollektiv genotypisiert. Die stärkste, annähernd genomweit signifikante Assoziation zeigte sich dabei mit dem Polymorphismus rs5761163 ($p= 3,44 \times 10^{-7}$) im ersten Intron des Gens MYO18B (Purcell et al., 2009).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in den unterschiedlichsten chromosomalen Regionen viele Gene einen jeweils kleinen Beitrag zur Entstehung einer Schizophrenie leisten. Diese kleinen Beiträge könnten aufgrund des Studiendesigns oftmals übersehen werden. Die derzeit üblichen Stichprobengrößen sind eventuell zu klein, um Gene mit relativ geringem Effekt zu detektieren und es wäre möglich, dass erst eine viel größere Individuenzahl eine ausreichende statistische *power* liefert, um eindeutige Aussagen treffen zu können (Tandon et al., 2008). Auch für die

vielversprechendsten Kandidatengene wie NRG1, DNTBP1, DISC1 oder COMT erweist sich eine Replikation der Befunde als schwierig, meist misslingt es, die exakten Marker und Haplotypen in weiteren unabhängigen Stichproben zu replizieren (Sanders et al., 2008).

2.6.5 Biochemische Befunde

Schon früh wurde vermutet, dass Neurotransmittergleichgewichte im Gehirn Schizophrener aus dem Lot geraten sein könnten, und so wurden verschiedene biochemische Hypothesen zur Ätiologie der Schizophrenie aufgestellt. Diese Hypothesen beziehen sich dabei in der Regel auf neuropharmakologische Befunde. Es ist beispielsweise gut belegt, dass Rezeptoren vor allem im glutamatergen, dopaminergen, serotonergen und GABAergen System bei Schizophrenie eine arealspezifisch veränderte Dichte und Funktion aufweisen (Blum und Mann, 2002; Konradi und Heckers, 2003). Zunächst wurde dem dopaminergen System eine Schlüsselrolle zugewiesen, vor allem aufgrund der eingesetzten typischen Neuroleptika, deren Hauptbindungsstelle die Dopaminrezeptoren darstellen (Davis et al., 1991). Heute wird aber vermutet, dass ein gestörtes Zusammenspiel verschiedener Neurotransmittersysteme für das Erscheinungsbild der Schizophrenie verantwortlich sein könnte.

2.6.5.1 Dopaminhypothese

Dopamin ist ein wichtiger Neurotransmitter im Gehirn und wurde aufgrund verschiedener pharmakologischer Befunde schon früh als schizophrenierelevant angesehen. Zum einen war bekannt, dass alle effektiv antipsychotisch wirkenden Substanzen einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Antagonismus am Dopamin- D2- Rezeptor ausbilden. Zum anderen zeigte sich, dass durch Dopaminagonisten, wie zum Beispiel Amphetamin, bei gesunden Probanden psychotomimetische Zustände ausgelöst werden können und bei Patienten mit einer akuten Schizophrenie eine erhöhte Dopaminfreisetzung stimuliert werden kann (Abi-Dargham et al., 1998). Deshalb wurde in den sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts eine Überaktivität dopaminergener Neurone im Gehirn schizophrener Patienten postuliert (Carlsson und Lindquist, 1963; Carlsson, 1967).

Die darauf folgenden Untersuchungen zeigten aber, dass eine generelle dopaminerge Überaktivität nicht allein für das Krankheitsbild der Schizophrenie verantwortlich sein konnte, da eine klassische Behandlung mit Antipsychotika zwar die Positivsymptomatik linderte, aber kaum einen Einfluss auf die Negativsymptomatik nahm (Meltzer, 1997).

Dopaminerge Bahnen verlaufen von der Substantia nigra und dem ventralen Tegmentum zu mesolimbischen, mesokortikalen und striatalen Regionen. Außerdem erstreckt sich eine tuberoinfundibuläre Bahn vom Hypothalamus zur Hypophyse. Kortikale und striatale Regionen unterscheiden sich bezüglich der Dopaminkonzentration, -rezeptorregulation und -rezeptordichte (Lidow et al., 1998).

In *post mortem* Studien wurden zwar eine erhöhte DRD2- Rezeptordichte im Striatum schizophrener Patienten nachgewiesen, da aber die untersuchten Patienten zuvor lange Jahre eine neuroleptische Behandlung erfahren hatten, und eine klassische antipsychotische Therapie eine Erhöhung der DRD2- Rezeptordichte verursacht, wurden diese Ergebnisse zunächst in Frage gestellt (Jones und Pilowsky, 2002). Auch in *Imaging*- und PET- Untersuchungen konnten die *post mortem* Ergebnisse nur zum Teil bestätigt werden (Frankle und Laruelle, 2002).

Nach Amphetamingabe zeigte aber eine Gruppe von Schizophrenen einen erheblich größeren Dopaminanstieg als die Vergleichsgruppe (Laruelle et al., 1996). Dieser Anstieg galt sowohl für medikamentös behandelte, als auch für noch nie medikamentös behandelte Erkrankte (Laruelle et al., 1999). In einer Langzeitstudie konnten Knable und Mitarbeiter zeigen, dass eine Verschlechterung der Negativsymptome bei nicht medikamentös behandelten Patienten mit einer verminderten endogenen Dopaminaktivität verbunden war (Knable et al, 1998).

Moore und Mitarbeiter formulierten aufgrund der bisherigen Ergebnisse eine weiterentwickelte Dopaminhypothese:

1. Eine gesteigerte phasisch- dopaminerge Wirkung im limbischen System führt zu einer Fehlinterpretation harmloser äußerer Einflüsse, was Wahnwahrnehmungen und Halluzinationen zur Folge hat.
2. In frontalen und präfrontalen Regionen ist die Dopaminaktivität bei Schizophrenen vermindert, wodurch kognitive Störung und Affektverflachung entstehen können (Moore et al., 1999). Diese Hypofrontalität ist schon zu Erkrankungsbeginn vorhanden und bleibt über den Verlauf hinweg bestehen,

kann aber durch Neuroleptikaeinnahme gemildert werden (Keshavan et al., 2008).

Diese Hypothese wird durch Befunde gestützt, dass DRD2- Rezeptoren in verschiedenen Hirnregionen auch durch atypische Antipsychotika differentiell besetzt werden (Lidow et al., 1998; Meltzer et al., 1999).

2.6.5.2 Glutamathypothese

Schon 1980 wurde von einer verminderten Glutamatkonzentration im Liquor schizophrener Patienten berichtet (Kim et al., 1980) und diese primäre Hypoaktivität des glutamatergen Systems konnte in vielen weiteren Studien bestätigt werden (z.B. (Meador-Woodruff et al., 2003; Olney and Farber, 1995);

Des weiteren kann die Einnahme von NMDA- Rezeptorantagonisten, wie zum Beispiel Phencyclidin (PCP, *angel dust*) bei gesunden Menschen schizophrenieforme Psychosen mit positiven und negativen Symptomen auslösen (Javitt et al., 1987). Dies legt eine Involvierung des Glutamatsystems in die Pathogenese der Schizophrenie nahe.

Glutamat kommt als Neurotransmitter im gesamten Kortex und insbesondere im Hippokampus vor, glutamaterge Bahnen projizieren in das limbische System, die Basalganglien und den Kortex. Kortikofugale Neurone können dabei Einfluss auf monoaminerge Neurone nehmen, direkt verschaltet aktivieren sie dopaminerge, noradrenerge und serotonerge Neurone (Blum und Mann, 2002). Wird aber ein GABAerges Neuron zwischengeschaltet, wirkt Glutamat hemmend auf monoaminerge Neurone. Diese zwei Wirkungsweisen ermöglichen eine differenzierte Steuerung der Monoamine über Glutamat (Konradi und Heckers, 2003).

Eine Blockade der NMDA- Rezeptoren durch zum Beispiel PCP führt zu gesteigerter Dopaminfreisetzung, wobei bei einer Blockade im Striatum positive Symptome ausgelöst werden, während sich bei einer Blockierung kortikaler NMDA- Rezeptoren negative Symptome verstärken (Adler et al., 1999). Bei remittierten Schizophrenen lösen NMDA- Antagonisten das Wiederauftreten der selben psychotischen Symptomen aus, die die Betroffenen während der vorangegangenen Episode erlebt hatten (Adler et al., 1999).

Die Gabe des Glutamatagonisten D-Serin als *add-on* Medikament bei Schizophrenie führt hingegen zu einer Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit und zu einer Reduktion positiver und negativer Symptome (Tsai et al., 1999).

Während die Dopaminhypothese also von einem mesolimbisch- mesokortikalen Ungleichgewicht des dopaminergen Systems bei Schizophrenie, mit Hypoaktivität im frontalen Bereich und Hyperaktivität in mesolimbischen Regionen (Möller et al., 2006), ausgeht, postuliert die Glutamathypothese eine generelle Verminderung der Glutamatrezeptoren. Diese glutamaterge Hypoaktivität nimmt wiederum Einfluss auf das dopaminerge System. Damit sind beide Hypothesen eng miteinander verknüpft und ergänzen einander.

2.6.5.3 Serotoninhypothese

Serotonin wurde mit vielen Funktionen in Verbindung gebracht, die in der Schizophrenie verändert sind. Dazu gehören Halluzinationen, Kognition, sensorisches *gating*, Aggression und Gefühlslage (Roth and Meltzer, 1995).

Der erste Versuch, die Rolle des Serotonins in der Ätiologie der Schizophrenie zu erläutern, basierte auf den psychotomimetischen Effekten von Lysergsäurediethylamid (LSD), von dem zunächst ein Antagonismus an 5-HT-Rezeptoren angenommen wurde. So gilt es gemeinhin als akzeptiert, dass der 5-HT_{2A}- Rezeptor als Zielrezeptor für LSD und ähnliche Halluzinogene wie Phenylisopropylamine und Tryptamine wie N,N-Dimethyltryptamin (DMT) fungiert. Es scheint auch einen Zusammenhang zwischen den Bindungsaffinitäten LSD-ähnlicher Derivate für den 5-HT_{2A}- Rezeptor und ihrem halluzinogenen Potential zu geben (Egan et al., 1998). Die LSD- induzierte Psychose wurde anfänglich als Modellpsychose für die Schizophrenie interpretiert. Der Konsum von LSD führt zu einer dramatischen Realitätsverzerrung mit paranoidem Wahn und Stimmungsänderungen, ähnlich einer schizophrenen Psychose. Auch negative Symptome wie sozialer Rückzug und Passivität können auftreten. Allerdings ist die prominente Eigenschaft der LSD- Psychose, die visuelle Halluzination, kein Hauptmerkmal einer schizophrenen Psychose, auch formale Denkstörungen sind eher selten bei LSD- Konsum zu finden (Breier, 1995).

Die Hypothese der verminderten serotonergen Aktivität wurde durch die Entdeckung widerlegt, dass LSD nicht wie angenommen antagonistisch, sondern überwiegend agonistisch an 5-HT_{2A}- Rezeptoren wirkt. Außerdem agieren Serotoninantagonisten wie Ritanserin oder Cyproheptadin nicht psychotomimetisch und zeigten sogar positive Auswirkungen auf psychotische Symptome (Glennon, 1990).

Die Serotonindefizithypothese wurde nun von dem Vorschlag abgelöst, dass die Produktion von endogenen methylierten Indolaminen mit psychotomimetischen

Eigenschaften wie N,N-Dimethyltryptamin wichtig für die Ätiopathologie der Schizophrenie sein könnten (Bleich et al., 1988). Da aber keine veränderten Konzentrationen der N-Methyltransferase, einem Enzym, das die Substanzklasse der methylierten Indolamine im Gehirn synthetisiert, der methylierten Indolamine selbst oder ihrer Metaboliten im Urin und Plasma nachgewiesen werden konnten, wurde auch diese Hypothese verworfen (Bleich et al., 1988).

Ein Durchbruch, der das Interesse wieder verstärkt auf Serotonin lenkte, war die Identifizierung zahlreicher weiterer Serotoninrezeptoren und ihr starker Einfluss auf das Verhalten und andere Neurotransmittersysteme. Es wurde nun auch angenommen, dass die Fähigkeit von Clozapin, psychotische Symptome effektiv zu lindern bei gleichzeitiger Reduktion der Nebenwirkungen, zumindest zum Teil auf seine Blockade der 5-HT_{2A}- Rezeptoren zurückzuführen sein könnte (Roth und Meltzer, 1995).

Obwohl atypische Neuroleptika in klinisch relevanten Dosen 70-80% der kortikalen 5-HT_{2A}- Rezeptoren besetzen (du Bois et al., 2005), reicht eine reine Blockade des 5-HT_{2A}- Rezeptors aber nicht aus, um psychotische Symptome effektiv zu lindern. Deshalb wurde postuliert, dass das Verhältnis von 5-HT_{2A}- und DRD₂-Rezeptorblockade entscheidend für die Wirkung der atypischen Neuroleptika sein müsste (de Paulis, 2001; Kapur et al., 1999).

Eine Weiterentwicklung und Kombination der Serotonin- und Dopaminhypothese ging nun von einer verstärkten dopaminergen und serotonergen Neurotransmission in subkortikalen Regionen aus, die für die positiven Symptome verantwortlich sein sollte. Eine gleichzeitig verminderte dopaminerge und serotonerge Aktivität im präfrontalen Kortex würde dagegen die negativen Symptome verursachen (Abi-Dargham et al., 1997; Breier, 1995; Meltzer und Deutch, 1999; Weinberger, 1987).

Somit schlagen Hypothesen, die eine Beteiligung des serotonergen Systems an der Schizophrenie postulieren, eine gestörte serotonerge Wirkung bei der neurologischen Entwicklung, eine verminderte 5-HT_{2A}- Rezeptoraktivität im präfrontalen Kortex und eine gestörte Interaktion zwischen Serotonin und Dopamin vor (Kapur und Remington, 1996).

2.7 Das serotonerge System

2.7.1 Serotonin

Bereits seit dem frühen 19. Jahrhundert ist bekannt, dass das nach der Blutgerinnung verbleibende Serum eine Substanz enthält, die die glatte Muskulatur kontrahiert und den vaskulären Tonus erhöht. Rapport und Mitarbeitern gelang es 1948 diesen Stoff als das Indolamin 5-Hydroxytryptamin (5-HT) in Eingeweiden und im Blutserum als vasokonstriktiven Stoff nachzuweisen. Aufgrund seiner physiologischen Eigenschaften erhielt diese Substanz den Namen »Serotonin« (Rapport et al., 1948). Serotonin spielt eine wichtige Rolle in zahlreichen physiologischen Prozessen im Säugerorganismus. Ein großer Teil des körpereigenen Serotonins ist in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes und im enterischen Nervensystem zu finden und für die Kontrolle der Verdauung bedeutsam (Rodenbeck et al., 2005). Es beeinflusst auch die glatten Gefäßmuskelzellen, das Herz und die Thrombozyten (Roth und Meltzer, 1995).

5-HT gehört neben dem Katecholamin Dopamin und den Aminosäuretransmittern Glutamat und γ -Aminobuttersäure zu den wichtigsten Transmittern des zentralen Nervensystems und ist an der Steuerung kognitiver, emotionaler und neuroendokriner Prozesse beteiligt. Dazu gehören grundlegende Funktionen wie die Entstehung von Angst und Aggression, die Regulation des zirkadianen Rhythmus, die Kontrolle des Ess- und Sexualverhaltens und die Verarbeitung von Schmerzreizen (Coccaro et al., 1989). Serotonin kontrolliert auch die Amplitude von Schreckreizen (*prepulse inhibition*, PPI) (Lachenmayer und Baumgarten, 2005).

Bei der Modulierung des Schlafverhaltens kommt den serotonergen Neuronen eine besonders bedeutende Rolle zu. Das serotonerge System feuert im Wachzustand mit einer Frequenz von 5-7Hz. Diese Frequenz der Feuerung sinkt im Tiefschlaf auf 3-5Hz ab und kommt in der REM- Phase gänzlich zum Erliegen (Rodenbeck et al., 2005).

Da Serotonin auch in kognitive Funktionen wie Lernen und Gedächtnis involviert ist, ist dieser Neurotransmitter auch Gegenstand intensiver Forschung im Zusammenhang mit kognitiven Störungen (Huether und Rüter, 2000). Außerdem wird eine Mitbeteiligung an psychiatrischen Erkrankungen wie Essstörungen, Morbus Alzheimer, Migräne und Suchterkrankungen angenommen. Die bedeutende Rolle

des Serotonins in der Pathophysiologie der Depressionen ist unbestritten, und auch in der Schizophrenie scheint dieser Neurotransmitter eine nicht unerhebliche Rolle zu spielen (Nitsch et al., 1996; Poblete und Azmitia, 1995).

2.7.2 Serotonerge Bahnen im Gehirn

Das serotonerge System ist durch eine weitverzweigte anatomische Verbreitung im ZNS gekennzeichnet. Serotonerge Nervenzellen sind meist große, archetypische retikuläre Neurone, die bis zu 500 000 Kontakte zu anderen Netzwerkelementen ausbilden. Mit einer Anzahl von unter 500 000 Neuronen ist die Gesamtanzahl serotonerger Nervenzellen aber relativ gering (Lachenmayer und Baumgarten, 2005).

Serotonerge Neurone konzentrieren sich in *clustern* oder Zellgruppen entlang der Mittellinie des Hirnstamms (Molliver, 1987), diese Gruppen werden als Raphenuklei bezeichnet. Die Perykarien serotonerger Neuronen besitzen lange und stark verzweigte Axone, die in den gesamten Kortex und das Striatum projizieren (Rodenbeck et al., 2005). Eine besonders ausgeprägte Verbindung besteht zwischen Thalamus und Hippokampus.

Die serotonergen Neurone der Raphe- Kerne werden früh in der Ontogenese angelegt und innervieren im ausgewachsenen Zustand die sich noch ausdifferenzierenden Zielgebiete (Rodenbeck et al., 2005). Sie entwickeln sich aus zwei im Hirnstamm gelegenen Geweben, dem rostralen mesopontinen und dem kaudalen pontomedullären Primordium (Lachenmayer und Baumgarten, 2005). Unmittelbar nach ihrer Ausbildung entwickeln die Perykarien Axone, die vom rostralen Primordium in Richtung des Vorderhirns ascendieren, während die Axone des kaudalen Primordiums zu den Strukturen des Hirnstamms und des Rückenmarks descendieren. Dieser hohe Grad an Polarität ist für das serotonerge System einzigartig und wird über die gesamte Ontogenese aufrecht erhalten (Tork, 1990).

Die serotonergen Zellen sind allesamt multipolar, unterscheiden sich aber je nach Lokalisation in ihrer Größe und Orientierung. Während die Neurone in der Region um die Mittellinie der Raphenuklei klein bis mittelgroß sind, zeichnen sich die weiter von der Mittellinie entfernten Perykarien durch größere Gestalt aus und täuschen zum Teil bipolare Morphologie vor (Tork, 1990). Die größten serotonergen Zellen befinden sich in den peripheren Bereichen der serotonergen Nuklei.

Die Raphekerne B1-B9 liegen im Mesenzephalon, der Pons und der Medulla, wobei die kaudale Gruppe (B1-B5) in der Medulla lokalisiert ist, während sich die rostrale Gruppe auf die Pons und das Mesenzephalon verteilt (Tabelle 2-3). Der überwiegende Teil der serotonergen B-Regionen stimmt mit den Zellmassen der Raphe- Nuklei überein, es gibt jedoch auch Ausnahmen, z.B. gehören manche zytoarchitektonische Entitäten zu mehr als einem B- *cluster*, oder ein B- *cluster* deckt mehr als einen Raphekern ab, bzw. ist unscharf abgegrenzt (Tork, 1990).

Tabelle 2-3: Lokalisation serotonerger Raphekerne im Gehirn (nach Frazer und Hensler, 1999)

serotonerge Zellgruppe	Anatomische Lokalisation
B1	Raphe pallidus nukleus, kaudale ventrale Medulla
B2	Raphe obskurus nukleus
B3	Raphe magnus nukleus, rostrale ventrolaterale Medulla
B4	Raphe obskurus nukleus, dorsolateraler Teil
B5	Dorsaler Raphe nukleus, kaudaler Teil
B6	Medianer Raphe Nukleus, kaudaler Teil
B7	Dorsaler Raphe Nukleus, rostraler Teil
B8	Medianer Raphe Nukleus, rostraler Teil; Nukleus pontis realis
B9	Nukleus pontis oralis, suprallemniskale Region

Den prominentesten Raphekern im Stammhirn stellt der dorsale Raphenukklus dar. Er ist im ventralen Teil des zentralen Höhlengraus lokalisiert und dehnt sich bis in die periventrikuläre graue Substanz der rostralen Pons aus. Er ist durch eine bilaterale Symmetrie gekennzeichnet und enthält kleine, mittelgroße und große serotonerge Neurone (Tork, 1990).

Im medialen Raphekern können zwei parallele Regionen unterschieden werden. An der Mittellinie befinden sich viele kleine Zellen mit relativ kurzen Dendriten. Außerhalb der Mittellinie sind die serotonergen Zellen jedoch lose und ohne bestimmte Orientierung arrangiert. Die laterale Grenze dieses Raphekerns ist nicht scharf definiert und viele der hier lokalisierten Zellen reichen bis in die umliegenden pontinen Formationen (Tork, 1990).

Für die sehr dichte Innervation des Vorderhirns (Kortex, Amygdala, Hippokampus und Striatum) mit serotonergen Axonterminalen sind die Raphekerne B7-B9 im medialen Teil des Mesenzephalon verantwortlich. Der dorsale Anteil der Raphekerne, B7, projiziert vor allem in den Kortex, das Neostriatum, das Zerebellum, das zentrale Höhlengrau und den Thalamus. Der mediane Raphekern B8 (Nukleus

zentralis superior) hingegen versorgt eher limbische Hirngebiete wie die Amygdala, den Nukleus interstitialis der Stria terminalis (*Bed nucleus of Stria terminalis*, BNST) und den Hippokampus (Koch, 2006). Die Kerngruppen B1- B3 in Medulla und Pons projizieren absteigend ins Ventralhorn des Rückenmarks, während die B5- und B6-Kerne der Pons den Thalamus mit 5-HT versorgen (Abbildung 2-1).

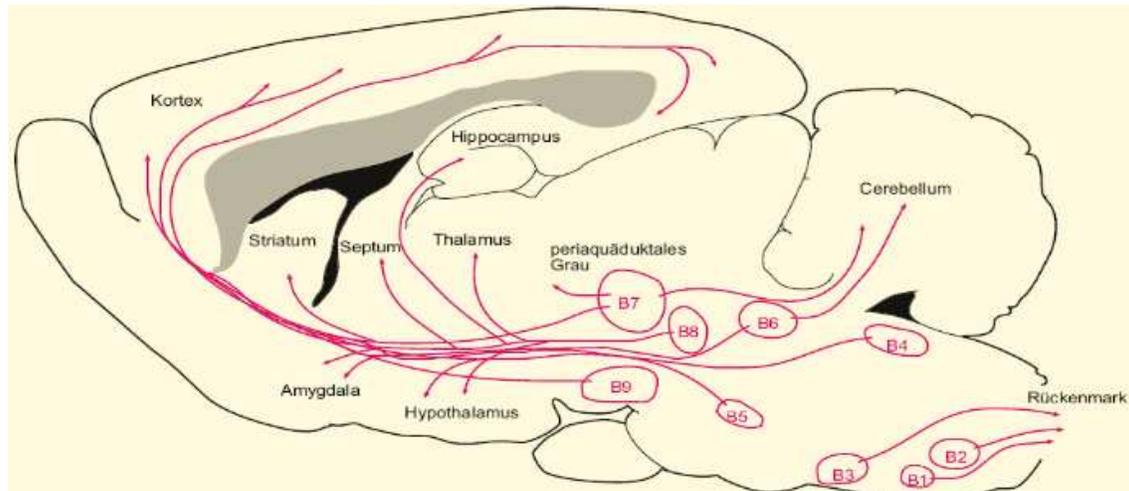


Abbildung 2-1: Serotonerge Bahnen im Gehirn an einem Sagittalschnitt eines schematischen Säugerhirns. B1-B9=serotonerge Zellgruppen, periaquäduktales Grau=zentrales Hölengrau (Koch, 2006)

Die serotonergen Neurone finden sich aber nicht ausschließlich in den Raphekernen, und nicht alle Zellen in den Nuklei sind serotonerg (Frazer und Hensler, 1999). Der dorsale Raphenuklear zum Beispiel enthält mit 40-50% den größten Anteil an serotonergen Neuronen, außerhalb der Raphenuklear finden sich serotonerge Neurone unter anderem in den Regionen der Formatio reticularis (Tork, 1990).

Nur ein kleiner Teil der serotonergen Nervenendigungen bildet klassische Synapsen. Der weitaus größere Teil endet frei im Parenchym und entlässt Serotonin in den intrazellulären Raum (Lachenmayer und Baumgarten, 2005). Hierdurch werden vor allem von den Astrozyten exprimierte Rezeptoren aktiviert (Rodenbeck et al., 2005).

Auch das Rückenmark wird intensiv serotonerg innerviert. Es wurden drei prinzipielle absteigende Bahnen beschrieben:

1. Von der Raphe magnus nucleus (B3) zu Lamina I und II des dorsalen Horns.
2. Von der Raphe obscurus nucleus (B2) zu Lamina IX des ventralen Horns
3. Von der rostralen ventrolateralen Medulla und dem lateralen paragigantozellulären retikulären Nukleus (B3) zur intramediolateralen Zellsäule (Frazer und Hensler, 1999)

Serotonin interagiert sehr eng mit anderen Neurotransmittersystemen (Jokisch et al., 2005). Verglichen mit anderen Systemen verfügt das serotonerge System über die ausgeprägteste Fähigkeit, neuronale Aktivität in weit verteilten neuronalen Netzwerken zu beeinflussen. So spielt es eine wichtige Rolle bei der Regulation cholinergischer Bahnen vom medialen Septum zum Hippokampus und vom Nucleus mesencephalicus profundus zum Kortex und zur Amygdala (Buhot et al., 2000; Cassel und Jeltsch, 1995). Außerdem bestehen Verschaltungen serotonergischer Bahnen mit dopaminergen und GABAergen Bahnen (Alex und Pehek, 2007).

2.7.3 Serotonerge Neuroplastizität

Serotonerge Neuronen gehören zu den ersten ontogenetisch gebildeten Neuronentypen im Rückenmark und Gehirn und sind bereits in der sechsten Schwangerschaftswoche nachweisbar. Schon in diesem frühen Entwicklungsstadium interagieren sie mit einer Vielzahl von Zelltypen in sehr komplexer Weise. Serotonin scheint dabei auch in die Neuroplastizität involviert zu sein (Azmitia, 2001).

Die Neuroplastizität ist ein wichtiges Konzept der Neurobiologie. Es geht von dem Vermögen neuronaler Systeme aus, sich in Bezug auf Aktivität und Funktion kurz- oder langfristig anzupassen. Einer der Prozesse, die neuronale Plastizität mitbedingt, ist die Fähigkeit, die Neurotransmittersyntheserate und -ausschüttung zu erhöhen und so die neuronale Aktivität zu steigern (Frazer und Hensler, 1999). So kann die Synthese von Serotonin als Antwort auf erhöhte elektrische Stimulation des serotonergen Somas deutlich verstärkt werden (Boadle-Biber, 1993). Der 5-HT_{2A}-Rezeptor steuert des Weiteren die Glykogenese in den Astrozyten und erhöht das intrazelluläre Kalzium in Neuronen, was zu einer Destabilisierung des Zytoskeletts führt und so die Zellproliferation oder Apoptose anstößt. Auch bei der adulten Synaptogenese spielt Serotonin eine entscheidende Rolle. So können adulte Säugerzellen in der subgranulären Schicht proliferieren und in die granuläre Schicht des dentaten Gyrus migrieren. Diese migrierenden Zellen reifen aus, bilden Dendriten und entwickeln synaptische Kontakte innerhalb des Hippokampus (Filippini et al., 2006).

Im Zusammenhang mit neuroplastischen Vorgängen lassen sich dem serotonergen System folgende Funktionen zuordnen:

1. Die Stimulierung der Synthese und Sekretion von astrozytären, neurotrophen Faktoren
2. Die Stabilisierung bereits vorhandener angelegter synaptischer Verschaltung bzw. der strukturellen Plastizität
3. Die kooperative Integration der Aktivität räumlich getrennter lokaler neuronaler Netzwerke (Rodenbeck et al., 2005)

2.7.4 Serotoninmetabolismus

Das Indolamin Serotonin gehört zusammen mit den Katecholaminen Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin und dem Imidazolderivat Histamin zu der Klasse der Monoaminotransmitter (von Bohlen und Halbach, 2003). Ausgangssubstanz für die Synthese von Serotonin ist die essentielle Aminosäure L-Tryptophan (Rodenbeck et al., 2005). Durch eine Hydroxygruppe und ein primäres Amin, dessen Stickstoffatom als Protonenakzeptor dient, hat Serotonin hydrophile und damit polare Eigenschaften (Frazer und Hensler, 1999). Es kann somit die Blut- Hirn- Schranke nicht passieren und muss in den entsprechenden Neuronen vor Ort aus L-Tryptophan synthetisiert werden. Im Plasma ist das lipophile L-Tryptophan an Albumin gebunden und muss erst von diesem gelöst werden (Rodenbeck et al., 2005). Nach der Freisetzung gelangt L-Tryptophan dann über einen Aminosäuretransporter über die Blut-Hirn-Schranke (Koch, 2006). Dabei konkurriert L-Tryptophan mit anderen Aminosäuren (Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin und Tyrosin), die über den selben Transportmechanismus in das Gehirn und so in die serotonergen Neuronen gelangen.

Das Enzym Tryptophanhydroxylase oxidiert die Aminosäure im Zytoplasma der Perykarien der serotonergen Neuronen zu 5-Hydroxytryptophan. Dieses Enzym existiert in zwei Isoformen (TPH1 und TPH2), wird von serotonergen Zellen der Raphekerne gebildet und wurde bisher nur in serotonin synthetisierenden Zellen gefunden. Neben dem Substrat L-Tryptophan benötigt das Enzym noch molekularen Sauerstoff als Oxidationsmittel und einen reduzierten Pteridin- Kofaktor als Elektronendonator für seine Aktivität (Frazer und Hensler, 1999). Notwendige Kofaktoren für diese Reaktionen sind Vitamin B₆, B₃ und Magnesium (Boadle-Biber, 1993). Die Michaeliskonstante K_m der Tryptophanhydroxylase liegt bei etwa 30-60 μ M, was etwa der Konzentration von Tryptophan im Gehirn entspricht. Die

Oxidation von L-Tryptophan stellt den limitierenden Faktor der Synthese von Serotonin dar (Jonnakuty und Gagnoli, 2008).

5-Hydroxytryptophan wird in einer zweiten Reaktion hocheffizient von der Aminosäuredecarboxylase (AADC) zu Serotonin dekarboxyliert (Abb. 2-2).

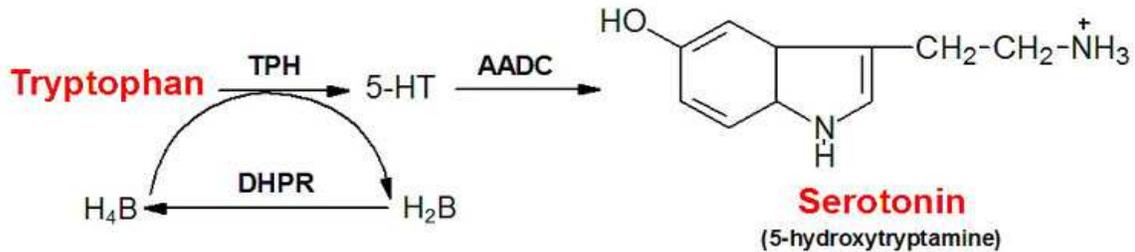


Abbildung 2-2: Synthese des Neurotransmitters Serotonin aus der Aminosäure L-Tryptophan. THP = Tryptophanhydroxylase, DHPR = Dihydropteridinereduktase, H₂B = Dihydrobiopterin, H₄B = Tetrahydrobiopterin, 5-HT = 5-Hydroxytryptophan, AADC = aromatische L-Aminosäuredecarboxylase.

Das Serotonin wird dann in die Axonterminale transportiert und dort über aktiven Transport in Speichervesikel aufgenommen. Hierzu benötigen die vesikulären Serotonintransporter VMAT1 und VMAT2 für den aktiven Transport aus dem Zytoplasma einen elektrochemischen Gradienten, der von einer vesikulären Protonen-ATPase aufrecht erhalten wird (Frazer und Hensler, 1999).

Bei Eintreffen eines Aktionspotenzials wird über einen vom Ca²⁺-Einstrom-abhängigen Prozess die Exozytose der Speichervesikel ausgelöst. Dabei verschmelzen diese Vesikel mit der synaptischen Membran und entleeren das enthaltene Serotonin in den synaptischen Spalt. Die so freigesetzten Transmittermoleküle können sowohl prä- als auch postsynaptisch agieren. Dabei dient die Erregung postsynaptischer Rezeptoren der Auslösung von Signalkaskaden in nachgeschalteten Neuronen und somit letztlich der Reizweiterleitung. Aktivierung des präsynaptisch endständigen 5-HT_{1B}- oder des präsynaptisch somatodendritischen 5-HT_{1A}-Rezeptors bewirkt eine Reduktion der 5-HT-Freisetzung im Sinne einer negativen Rückkopplung (Hevers et al., 2006).

Die Entfernung von Serotonin aus dem synaptischen Spalt erfolgt durch die Wiederaufnahme der Transmittermoleküle in die synaptischen Terminale mittels hochaffiner Serotonintransporter (SERT) über die präsynaptische Membran durch einen elektrochemischen Na⁺/K⁺- und Cl⁻-Gradienten (Koch, 2006). Das zytoplasmatische 5-HT wird dann entweder in synaptische Vesikel wiederaufgenommen oder enzymatisch abgebaut (Hevers et al., 2006).

Die Katabolisierung des Transmitters geschieht hierbei über eine Desaminierung und Oxidation durch Monoaminoxidase (MAO) und Aldehyddehydrogenase zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES). MAO führt das 5-HT in 5-Hydroxyindolacetaldehyd über, welches von der NAD^+ -abhängigen Aldehyddehydrogenase zu 5-HIES abgebaut wird. Anstelle einer Oxidation kann das intermediäre Aldehyd auch durch eine NADH -abhängige Aldehydreduktase zu 5-Hydroxytryptophol reduziert werden. Ob eine Reduktion oder Oxidation eingeleitet wird, hängt von dem Verhältnis von NAD^+ zu NADH im umgebenden Medium ab (Frazer und Hensler, 1999). Das 5-HIES wird aktiv in die Peripherie transportiert und mit dem Urin ausgeschieden (Jonnakuty und Gragnoli, 2008) (Abbildung 2-3).

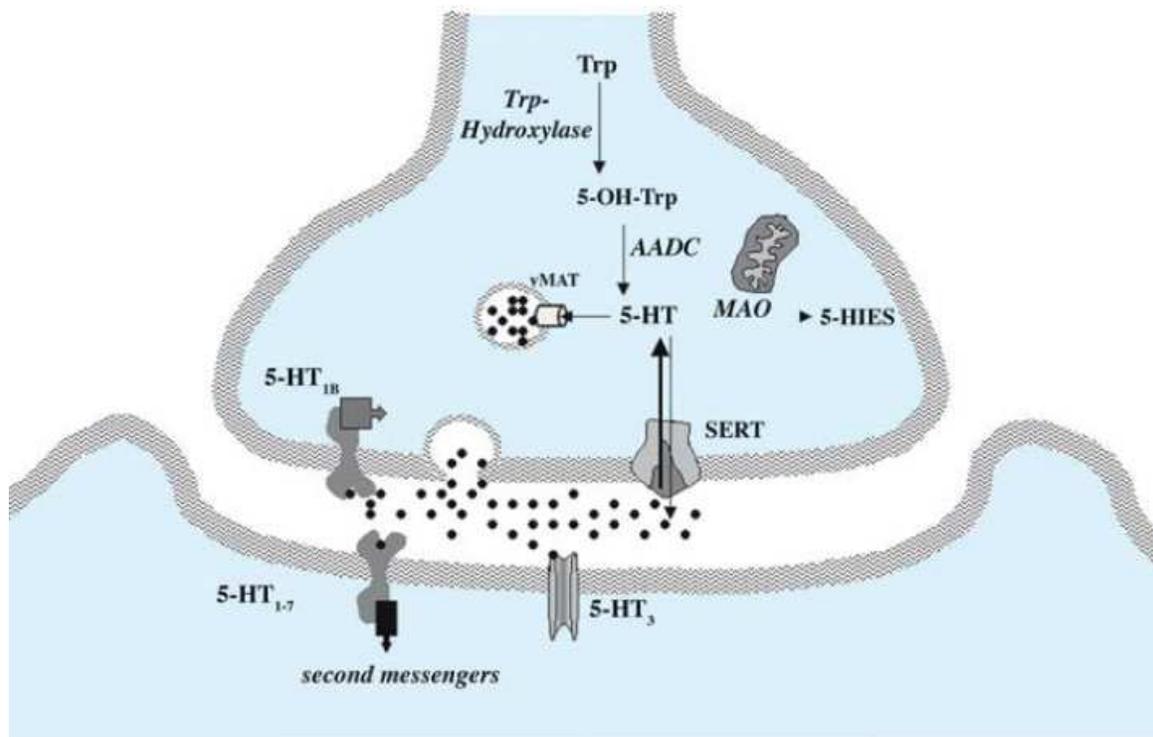


Abbildung 2-3: Wirkung und Abbau von Serotonin an einer serotonergen Synapse. Trp= Tryptophan; 5-OH-Trp= 5-Hydroxytryptophan; AADC= Aminosäuredecarboxylase; 5-HT= Serotonin; vMAT= vesikulärer Monoamintransporter; SERT= Serotonintransporter, MAO= Monoaminoxidase; 5-HIES= 5-Hydroxyindolessigsäure (Hevers et al, 2006).

2.7.5 Serotoninrezeptoren

Serotoninrezeptoren können prä- oder postsynaptisch lokalisiert sein und bei Aktivierung exzitatorisch oder inhibitorisch agieren, wodurch sich das breite Wirkungsspektrum dieses Neurotransmitters erklären lässt. Bis heute wurden 20 Serotoninrezeptorsubtypen identifiziert, wobei nicht alle Subtypen in allen Spezies vertreten sind. Aufgrund starker Sequenzhomologien lassen sich die Rezeptoren den sieben Klassen 5-HT1 bis 5-HT7 zuordnen. All diesen Rezeptorklassen ist der Aufbau aus sieben Transmembrandomänen (TMDs) gemeinsam, dazu ein intrazellulärer Karboxy- und ein extrazellulärer Aminoterminus. Die für die TMDs kodierenden Aminosäuresequenzen gehören zu den am stärksten konservierten Regionen dieser Rezeptoren (Frazer und Hensler, 1999).

Mit Ausnahme des 5-HT3- Rezeptors sind alle Serotoninrezeptoren G-Protein gekoppelt und somit metabotrop (Meneses, 1999). Die 5-HT3- Rezeptoren gehören zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen und bewirken eine schnelle Depolarisation von Neuronen durch die Öffnung von Kationenkanälen (Frazer und Hensler, 1999). Dabei zeigen sie eine Permeabilität für Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} - Ionen. Diese Rezeptoren sind pentamer aufgebaut, wobei jede Untereinheit mehrere Transmembrandomänen aufweist. Mittlerweile sind fünf Untereinheiten bekannt (5-HT3A, 3B, 3C, 3D, 3E), wovon nur 5-HT3A in der Lage ist, einen funktionsfähigen homomeren Rezeptor zu bilden. Alle anderen Untereinheiten benötigen eine 5-HT3A- Untereinheit, um so einen funktionstüchtigen heteromeren Rezeptor zu bilden (Niesler et al., 2007). Im menschlichen Gehirn werden jedoch nur die Untereinheiten 5-HT3A, 3B und 3C exprimiert (Niesler et al., 2003).

2.7.5.1 5-HT1- Rezeptoren

In der 5-HT1 Rezeptorfamilie lassen sich sechs Serotoninrezeptoren unterscheiden, 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1C, 5-HT1D, 5-HT1E und 5-HT1F. Diese Subtypen zeigen mit bis zu 63% eine hohe Sequenzhomologie und damit auch ein recht ähnliches pharmakologisches Profil. 5-HT1A- Rezeptoren sind über G_i - Proteine inhibitorisch an zwei Effektorsysteme gekoppelt. Eine Kopplung an die Adenylatzyklase zum einen führt zu einer Senkung cAMP- Konzentration (cyclisches Adenosinmonophosphat) in den Neuronen. Die Öffnung von K^+ - Kanälen zum anderen resultiert in einer Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran. In terminalen Feldern serotonerger Inaktivierung, wie dem Hippokampus, ist der 5-

HT1A- Rezeptor an beide Effektorsysteme gekoppelt, im dorsalen Raphe Kern bewirkt er nur die Öffnung von K^+ - Kanälen (Frazer und Hensler, 1999). 5-HT1A Rezeptoren sind präsynaptisch ausschließlich auf serotonergen Neuronen und postsynaptisch auch auf nicht-serotonergen Neuronen in verschiedenen kortikolimbischen Regionen lokalisiert (Jonnakuty und Gragnoli, 2008).

Auch die 5-HT1B- und 5-HT1C- Rezeptoren sind an eine Inhibierung von Adenylatzyklase gebunden. Die Dichte dieser Rezeptoren ist besonders in der Substantia nigra sehr hoch (Frazer und Hensler, 1999).

2.7.5.2 5-HT2- Rezeptoren

Die drei Mitglieder 5-HT2A, 5-HT2B und 5-HT2C der 5-HT2- Rezeptorfamilie bewirken durch ihre Aktivierung die Hydrolyse von Phosphoinositid, was wiederum zur Stimulierung der phosphoinositid- spezifischen Phospholipase C führt (Ozaki et al., 1997). 5-HT2- Rezeptoren sind sowohl in der Gehirnentwicklung als auch für die Plastizität des visuellen Kortex relevant (Li et al., 2004).

Eine Besonderheit der 5-HT2- Rezeptoren stellt die atypische Regulierung ihrer Aktivität dar. Sowohl chronische Behandlung mit agonistischen Substanzen als auch eine Applikation antagonistischer Substanzen, wie zum Beispiel atypische Neuroleptika, führen zu einer funktionellen Herabregulierung der Rezeptordichte (Van Oekelen et al., 2003).

5-HT2A- Rezeptoren lösen bei Aktivierung durch einen Liganden eine komplexe Signaltransduktionskaskade aus. Nach Bindung eines Agonisten kommt es vorwiegend zur Aktivierung von Phospholipase C (PLC) über G_q - Proteine. Die PLC katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 fungiert als *second messenger* und bedingt unter anderem eine Ca^{2+} - Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum. DAG aktiviert die Proteinkinase C (Norton und Owen, 2005).

5-HT2B- Rezeptoren bewirken durch ihre Aktivierung unter anderem eine Kontraktion der Magenbodenmuskulatur (Frazer und Hensler, 1999). Dieser Rezeptor wurde zunächst der 5-HT1- Rezeptorfamilie zugeordnet, aber durch seine pharmakologische Ähnlichkeit mit dem 5-HT2A- Rezeptor erfolgte eine Umbenennung in den 5-HT2B- Rezeptor (Bradley et al., 1986).

5-HT2C- Rezeptoren weisen ein den 5-HT2A- Rezeptoren sehr ähnliches pharmakologisches Profil auf und sind in hoher Dichte im choroiden Plexus

lokalisiert. In wesentlich geringerer Dichte sind sie in vielen weiteren Regionen des Gehirns zu finden, wie im Hypothalamus, Hippokampus, Septum, Neokortex und in Regionen, die mit motorischem Verhalten assoziiert sind, wie dem Globus pallidus und der Substantia nigra (Frazer und Hensler, 1999).

2.7.5.3 Weitere Serotonin- Rezeptorsubtypen

Während die 5-HT1-, 5-HT2- und 5-HT3- Rezeptorsubtypen bereits gut charakterisiert wurden, ist über die verbleibenden Subtypen relativ wenig bekannt. Der 5-HT4- Rezeptor befindet sich in hoher Dichte im Striatum, in der Substantia nigra und den olfaktorischen Tuberkeln (Frazer und Hensler, 1999).

Die beiden Rezeptorsubtypen 5-HT5A und 5-HT5B zeigen mit 70% eine hohe Sequenzhomologie, bisher wurde aber nur 5-HT5A als funktionsfähiger Rezeptor gefunden. 5-HT5B bildet dagegen im menschlichen Gehirn kein funktionelles Protein. 5-HT5A scheint beim Menschen ausschließlich im ZNS lokalisiert zu sein, seine mRNA wird vor allem im Kortex, Hippokampus und Zerebellum exprimiert (Jonnakuty und Gagnoli, 2008). Die genaue physiologische Rolle von 5-HT5-Rezeptoren ist noch unklar.

5-HT6- Rezeptoren sind mit hoher Dichte im Striatum vertreten und haben eine hohe Affinität zu Clozapin und Olanzapin (Roth und Meltzer, 1995). Es gibt Hinweise darauf, dass 5-HT6 eine entscheidende Rolle bei kognitiven Prozessen und Lernvorgängen spielen könnte (Jonnakuty und Gagnoli, 2008).

Obwohl selektive Agonisten für den 5-HT7- Rezeptor fehlen, konnte seine mRNA im Septum, Thalamus, Hypothalamus, Amygdala und im superioren Colliculus gefunden werden.

Tabelle 2-4 fasst die bisher bekannten Eigenschaften der Serotoninrezeptoren zusammen.

Tabelle 2-4: Anatomische Lokalisierung der Serotoninrezeptoren im humanen ZNS (nach Frazer und Hensler, 1999)

Rezeptor	Lokalisation im Genom	Anatomische Verteilung im ZNS	Effektormechanismus
5-HT1A	5q11.2-13	Hippokampus, Amygdala, Septum, enthorinaler Kortex, Raphekerne	Inhibierung von Adenylatzyklase, Öffnung von K ⁺ -Kanälen
HTR1B	6q13	Substantia nigra, Basalganglien, Colliculi superiores	Inhibierung von Adenylatzyklase
5-HT1D	1p36.3-p34.3	Substantia nigra, Basalganglien, Colliculi superiores	Inhibierung von Adenylatzyklase
5-HT1E	6q14-q15	Kortex, Gyrus dentatus, Rückenmark	Inhibierung von Adenylatzyklase
5-HT1F	3p12	Zerebraler Kortex, Striatum, Hippokampus, Bulbus olfactorius	Inhibierung von Adenylatzyklase
5-HT2A	13q14-21	Klastrum, zerebraler Kortex, olfaktorische Tuberkel, Striatum, nukleus akkumbens	Stimulierung der phosphoinositid-spezifischen Phospholipase C, Schließung von K ⁺ -Kanälen
5-HT2B	2q36.3-q37.1	Zerebellum, laterales Septum, Hypothalamus, dorsale Raphekerne	Stimulierung der phosphoinositid-spezifischen Phospholipase C
5-HT2C	Xq24	Plexus choroideus, Globus pallidus, zerebraler Kortex, Hypothalamus, Septum, Substantia nigra, Rückenmark	Stimulierung der phosphoinositid-spezifischen Phospholipase C
5-HT3A	11q23.1	Hippokampus, enthorinaler Kortex, Amygdala, Nucleus akkumbens, Area postrema, zerebraler Kortex, limbisches System	Ligandengesteuerter Ionenkanal
5-HT3B	11q23.1	Area postrema, zerebraler Kortex, limbisches System	Ligandengesteuerter Ionenkanal
5-HT3C	3q27.1	Area postrema, zerebraler Kortex, limbisches System	Ligandengesteuerter Ionenkanal
5-HT4	5q31-q33	Hippokampus, Striatum, olfaktorische Tuberkel, Substantia nigra	Stimulierung von Adenylatzyklase

Rezeptor	Lokalisation im Genom	Anatomische Verteilung im ZNS	Effektormechanismus
5-HT _{5A}	7q36.1	Nicht bekannt	Inhibierung von Adenylatzyklase
5-HT ₆	1p36-p35	Nicht bekannt	Stimulierung von Adenylatzyklase
5-HT ₇	10q21-q24	zerebraler Kortex, Septum, Thalamus, Hypothalamus, Amygdala, Colliculus superioris	Stimulierung von Adenylatzyklase

2.8 Die Rolle des serotonergen Systems in der Schizophrenie

2.8.1 Der 5-HT_{2A}-Rezeptor und Schizophrenie

Der humane 5-HT_{2A}- Rezeptor wird durch das HTR2A- Gen auf Chromosom 13q14-q21 kodiert (Hsieh et al., 1990). Dieses Gen ist aus 3 kodierenden Exons aufgebaut, die von 2 Introns unterbrochen werden (Norton und Owen, 2005). Am Ende der Translation steht der aus 471 Aminosäuren aufgebaute Serotonin- 2A- Rezeptor. HTR2A scheint zwei alternative Promotoren zu besitzen, außerdem ein *silencer*-Element direkt stromabwärts des zweiten Promoterelements (Parsons et al., 2004).

2.8.2 Befunde zur Rezeptorbindung und Expression

Post mortem Studien zur 5-HT_{2A}- Rezeptordichte im Gehirn Schizophrener führten zu sehr uneinheitlichen Ergebnissen.

So zeigte sich bereits früh eine verminderte Dichte an 5-HT_{2A}- Rezeptoren im dorsolateralen präfrontalen Kortex schizophrener Patienten (Bennett, Jr. et al., 1979). Diese verminderte Rezeptordichte und –bindung konnte in den Folgejahren mit [³H]-Ketanserin bestätigt werden (Arora und Meltzer, 1991; Kouzmenko et al., 1997; Laruelle et al., 1993; Matsumoto et al., 2005; Mita et al., 1986). Ebenso wurde eine verringerte Rezeptorbindung im lateralen frontalen Kortex (Kouzmenko et al., 1999), im anterioren Zingulum (Gurevich und Joyce, 1997) und im Planum temporale (Pralong et al., 2000) nachgewiesen.

Auch verstärkte Rezeptorbindungsprofile bei schizophrenen Patienten im Hippokampus und im temporalen Gyrus wurden berichtet (Joyce et al., 1993; Govitrapong et al., 2000).

Diesen positiven Ergebnissen steht eine ähnliche Anzahl an Befunden gegenüber, die keine Veränderungen der Rezeptorbindung im Gehirn schizophrener Patienten im frontalen Kortex (Mackay et al., 1978; Whitaker et al., 1981), im präfrontalen Kortex (Reynolds et al., 1983), im Putamen oder Hippokampus (Matsumoto et al., 2005) finden konnten.

Mit der Entwicklung moderner bildgebender Geräte wurden neben *post mortem* Studien auch *in vivo* Befunde möglich. Positronen- Emissions- Tomographie (PET) - Studien zur Rezeptordichte ergaben ähnlich widersprüchliche Befunde wie die früheren *post mortem* Studien.

Bei der Untersuchung einer kleinen Stichprobe aus Neuroleptika- naiven Patienten stellte sich eine verminderte Rezeptordichte im frontalen Kortex heraus (Ngan et al., 2000), ebenso wie im präfrontalen und okzipitalen Kortex (Hurlemann et al., 2005), im Brodmann Areal 9 (Matsumoto et al., 2005) und im anterioren Zingulum (Zavitsanou und Huang, 2002) verminderte Rezeptordichten gefunden wurden.

Auch Hochrisikopatienten, wie Verwandte ersten Grades von Schizophrenen, waren von diesen Reduktionen betroffen (Hurlemann et al., 2005).

Mehrere Arbeitsgruppen, die ebenfalls mit bildgebenden Verfahren arbeiteten, konnten diese Befunde jedoch nicht bestätigen (Trichard et al., 1998; Lewis et al., 1999; Okubo et al., 2000) (Tabelle 2-5, S.47).

Eine mögliche Erklärung für diese inkonsistenten Befunde konnte im Tierversuch demonstriert werden. Hierbei führte die Applikation von atypischen Neuroleptika, wie zum Beispiel Clozapin, zu einer Verminderung der 5-HT_{2A}- Rezeptordichte. Dabei wurden Ratten über zwölf Monate hinweg mit einer hohen Dosis Clozapin behandelt und dann mit [³H]- Ketanserin die 5-HT_{2A}- Rezeptorbindung untersucht. Es zeigt sich eine deutlich verminderte 5-HT_{2A}- Rezeptordichte im präfrontalen Kortex (Reynolds et al., 1983). Deshalb muss bei einer verminderten Rezeptordichte eine langjährige Neuroleptikagabe zumindest als konfundierender Faktor angesehen werden (Dean, 2003).

Eine weiterer wichtiger Aspekt sind mögliche Differenzen in den Studienbedingungen wie das *post mortem* Intervall (PMI), das Alter des Patienten und die Todesursache (du Bois et al., 2005). In *post mortem* Studien wurden häufig ältere Patienten untersucht, so dass hier zum einen keinerlei Aussage zu Zuständen im sich

entwickelnden Gehirn getroffen werden können. Außerdem könnte dies auch zu falsch positiven oder falsch negativen Resultaten führen, da eine altersabhängige Serotoninrezeptorreduktion angenommen wird (Marcusson et al., 1984). Ngan und Mitarbeiter konnten an einer kleinen Stichprobe (n=13) eine durchschnittliche Reduktion der Serotoninrezeptordichte um 4% mit jedem adulten Lebensjahr zeigen (Ngan et al., 2000). In dieser Studie konnte eine altersbereinigte verminderte Rezeptorbindung bei schizophrenen Patienten auch ohne vorherige Medikation im Vergleich zu Kontrollpersonen demonstriert werden. Eine ähnliche altersabhängige Verminderung der Serotonin- 2A- Rezeptordichte konnte auch die Arbeitsgruppe um Okubo feststellen (Okubo et al., 2000).

Eine weitere mögliche Quelle zur Inkonsistenz der Befunde könnte in der Tatsache zu finden sein, dass schizophrene Suizidopfer eine höhere 5-HT_{2A}- Rezeptordichte zeigen, als Patienten, die eines natürlichen Todes versterben (Laruelle et al., 1993). In einigen Studien wurde dieser Aspekt nicht berücksichtigt und Schizophrene, die eines natürlichen Todes starben, in der Auswertung genau so behandelt wie schizophrene Suizidopfer (Burnet et al., 1996a).

Auch die verwendeten Rezeptorliganden selbst könnten die Identifikation einer Assoziation erschweren. So kann der häufig eingesetzte Radioligand [³H]-Ketanserin zwar innerhalb der Serotoninrezeptoren als spezifisch angesehen werden, er ist aber durchaus auch in der Lage, an α -adrenergen Rezeptoren zu binden und so zu falschen Ergebnissen beizutragen (Burnet et al., 1996b).

Tabelle 2-5: *Post-mortem* und *imaging* Studien zur 5-HT_{2A}- Rezeptorbindung

Studie	5-HT _{2A} - Rezeptorbindung
(Mackay et al., 1978)	Kein signifikanter Unterschied im frontalen Kortex zwischen Patienten und Kontrollen
(Bennett, Jr. et al., 1979)	Verminderte Rezeptorbindung im präfrontalen Kortex schizophrener Patienten
(Whitaker et al., 1981)	Keine signifikante Unterschiede im frontalen Kortex Verstärkte Bindung bei nicht medikamentös behandelten Patienten
(Reynolds et al., 1983)	Keine signifikanten Unterschiede im präfrontalen Kortex schizophrener Patienten
(Mita et al., 1986)	Verminderte Rezeptorbindung im präfrontalen Kortex schizophrener Patienten
(Arora and Meltzer, 1991)	Verminderte Rezeptorbindung im präfrontalen Kortex schizophrener Patienten
(Laruelle et al., 1993)	Verminderte Rezeptorbindung im präfrontalen Kortex schizophrener Patienten
(Joyce et al., 1993)	Gesteigerte Rezeptorbindung im Hippokampus und im temporalen Gyrus schizophrener Patienten
(Dean and Hayes, 1996)	Verminderte Rezeptorbindung im präfrontalen Kortex schizophrener Patienten
(Gurevich and Joyce, 1997)	Verminderte Rezeptorbindung im anterioren Zingulum schizophrener Patienten
(Kouzmenko et al., 1997)	Verminderte Rezeptordichte im dorsolateralen präfrontalen Kortex schizophrener Patienten
(Trichard et al., 1998)	Kein signifikanter Unterschied zwischen Neuroleptika- naiven Patienten und Kontrollen
(Lewis et al., 1999)	Kein signifikanter Unterschied zwischen Neuroleptika- naiven Patienten und Kontrollen
(Kouzmenko et al., 1999)	Verminderte Rezeptordichte im lateralen frontalen Kortex schizophrener Patienten
(Pralong et al., 2000)	Verminderte Rezeptorbindung im Planum temporale schizophrener Patienten
(Govitrapong et al., 2000)	Erhöhte Rezeptorbindung bei nicht medikamentös behandelten Patienten im Vergleich zu medikamentös behandelten Patienten

Studie	5-HT _{2A} - Rezeptorbindung
(Ngan et al., 2000)	Verminderte Rezeptordichte im frontalen Kortex schizophrener, Neuroleptika-naiver Patienten Signifikante Abnahme der Rezeptordichte in Abhängigkeit des Alters
(Okubo et al., 2000)	Keine Veränderungen der Rezeptorbindung in präfrontalem, temporalen und occipitalem Kortex und anteriorem Zingulum schizophrener Patienten Signifikante Abnahme der Rezeptordichte in Abhängigkeit des Alters
(Matsumoto et al., 2005)	Geringere Rezeptordichte in Brodmann Areal 9 bei schizophrenen Patienten keine Veränderungen in Putamen oder Hippokampus.
(Zavitsanou and Huang, 2002)	Verminderte Rezeptorbindung im anterioren Zingulum schizophrener Patienten.
(Hurlemann et al., 2005)	Verminderte Rezeptorbindung bei Hochrisikoindividuen im orbitofrontalen und präfrontalen Kortex. Keine Veränderung der Rezeptorbindung im anterioren Zingulum, im Striatum und okzipitalem Kortex von Hochrisikoindividuen.

Neben der indirekten Untersuchung der Rezeptordichte über die Bindung bestimmter Radioliganden wurde die Expression des Serotonin-2A- Rezeptorgens auch direkt über die Menge der vorhandenen mRNA gemessen. Eine frühe Studie zeigte verminderte mRNA- Konzentrationen in vier Gehirnregionen und konnte eine signifikante Reduktion der mRNA- Konzentration in den Brodmann Arealen 22, 24 und 46 messen, jedoch nicht im parahippokampalen Gyrus (Burnet et al., 1996b). Im Gegensatz dazu konnten Lopez- Figuera und Mitarbeiter in ihrer Stichprobe eine signifikante Verminderung der mRNA- Konzentration im Hippokampus schizophrener Patienten nachweisen, nicht aber im dorsolateralen präfrontalen Kortex (Lopez-Figueroa et al., 2004).

In der einzigen Untersuchung zur mRNA- Expression im Zerebellum konnte zwar in der Gesamtstichprobe keine nennenswerte Veränderung bei Patienten im Vergleich zu Kontrollen festgestellt werden, bei der alleinigen Betrachtung der männlichen Individuen wurde allerdings eine signifikant geringere mRNA- Konzentration bei

männlichen Patienten im Vergleich zu männlichen Kontrollpersonen nachgewiesen (Eastwood et al., 2001).

Die Gruppe um Hernandez untersuchte *post mortem* Gewebe aus dem superioren temporalen Gyrus und den frontalen Kortex von Neuroleptika- freien und – behandelten schizophrenen Patienten und gesunden Kontrollpersonen. Dabei konnte zwischen Patienten unter Neuroleptika- Einfluss und Kontrollen kein Unterschied festgestellt werden, während die mRNA- Konzentration bei Erkrankten ohne Medikation signifikant niedriger war, als bei Kontrollen und Patienten mit Neuroleptika- Einfluss (Hernandez und Sokolov, 2000; Polesskaya und Sokolov, 2002) (Tabelle 2-6).

Tabelle 2-6: Befunde zur mRNA- Konzentration im schizophrenen Gehirn

Studie	5-HT2A- mRNA- Konzentration
(Burnet et al., 1996b)	Verminderte mRNA- Konzentration in den Brodmann Arealen 22, 24 und 46. Keine signifikanten Veränderungen im parahippokampalen Gyrus.
(Hernandez and Sokolov, 2000)	Signifikant geringere mRNA- Konzentration im superioren temporalen Gyrus von Neuroleptika- freien schizophrenen Patienten. Kein Unterschied zwischen Patienten mit aktueller Neuroleptika- Medikation und Kontrollen.
(Eastwood et al., 2001)	Verminderte mRNA- Konzentration im Zerebellum männlicher schizophrener Patienten.
(Polesskaya and Sokolov, 2002)	Signifikant geringere mRNA- Konzentration im frontalen Kortex von Neuroleptika- freien schizophrenen Patienten.
(Lopez-Figueroa et al., 2004)	Verminderte mRNA- Konzentration im Hippokampus schizophrener Patienten. Keine Veränderung im dorsolateralen präfrontalen Kortex.

In *post mortem* Studien wird die Expression der Gene sehr häufig mittels *real time* PCR untersucht. Eine Alternative zu dieser Methode ist die Messung der quantitativen Genexpression mit kompetitiver PCR (QGE) und anschliessender massenspektrometrischer Bestimmung des Expressionslevels (del Mistro und Oeth, 2005).

2.8.3 Polymorphismen im 5-HT_{2A} Rezeptor und Schizophrenie

In Zusammenhang mit der Schizophrenie wurde zunächst der bereits bekannte exonische T102C- Polymorphismus im Serotonin-2A- Rezeptorgen genotypisiert (Inayama et al., 1996). Erdmann und Mitarbeiter durchsuchten zur gleichen Zeit das HTR2A- Gen mittels DNA- Einzelstrang- Konformationsanalyse auf weitere exonische Polymorphismen. Sie identifizierten dabei vier funktionelle Varianten: C74T, ein SNP am 5'- Ende des Rezeptorgens, der einen Aminosäureaustausch von Threonin nach Asparagin am Codon 25 (Thr25Asn) bedingt, C1352T, der zu einem Aminosäureaustausch von Histidin nach Tyrosin führt (His452Tyr) und die stille Mutation C516T, die zu keinem Aminosäureaustausch führt (Erdmann et al., 1996). Außerdem wurde der bereits von Warren und Mitarbeitern (1993) entdeckte T102C validiert. Derzeit werden dem Gen etwa 420 SNPs zugeordnet, aber nur wenige wurden bisher im Zusammenhang mit psychiatrischen Erkrankungen untersucht (Harvey et al., 2003).

2.8.3.1 Der T102C- (rs6313) und der A-1438G- Polymorphismus (rs6311) des HTR2A-Gens

Der in Exon 1 an Position 102 des HTR2A- Gens gelegene T102C (Ser34Ser)- Polymorphismus wurde 1993 erstmals identifiziert (Warren, Jr. et al., 1993) und seither intensiv untersucht. Dieser SNP befindet sich an der dritten Position des Codon 34, und führt aufgrund des degenerierten genetischen Codes zu keinem Aminosäureaustausch.

Ein weiterer interessanter Polymorphismus liegt in der 5'- Region des Gens. Der A(-1438)G- SNP ist stromaufwärts der beiden alternativen Promotoren des HTR2A- Gens lokalisiert (Norton und Owen, 2005) und scheint mit der T102C- Variante in vollständigem Kopplungsungleichgewicht (*linkage Disequilibrium*, LD) zu liegen (z.B.: Arranz et al., 1998a; Spurlock et al., 1998). Deshalb wurde dieser SNP ebenfalls als Kandidatenpolymorphismus untersucht, da vermutet wurde, dass er der eigentliche Grund für die Assoziation des T102C mit Schizophrenie sein könnte (Parsons et al., 2004). Aber ebenso wie beim T102C- Polymorphismus gab es auch bei diesem SNP negative Befunde (Kouzmenko et al., 1997; Ohara et al., 1999), und auch eine Studie zur Dichte kortikaler 5-HT_{2A}- Rezeptoren und dem -1438A/G- Polymorphismus konnte keine Assoziation zeigen (Kouzmenko et al., 1997). Ob dieser SNP Einfluss

auf die Promotoraktivität haben könnte, wurde noch nicht abschließend beantwortet. Während eine verminderte Promoteraktivität in einer Studie aus den neunziger Jahren nicht bestätigt werden konnte (Spurlock et al., 1998), war die Promoteraktivität bei Vorhandensein des -1438A- Allels in einer neueren Untersuchung deutlich gesteigert (Parsons et al., 2004).

Zwei frühe Studien berichteten ein erhöhtes Auftreten des 102C- Allels bei Schizophrenen (Erdmann et al., 1996; Inayama et al., 1996), ein Befund, der an weiteren kaukasischen Populationen bestätigt wurde (z.B.: Abdolmaleky et al., 2004; Baritaki et al., 2004; Golimbet et al., 2007; Joober et al., 1999; Spurlock et al., 1998; Tay et al., 1997; Williams et al., 1996).

In einer spanischen Stichprobe aus 188 schizophrenen Patienten und 440 gesunden Kontrollpersonen wurde das 102C- Allel ebenfalls signifikant häufiger bei Erkrankten als bei Kontrollen gefunden (odds ratio= 1,28) (Vaquero et al., 2006).

Golimbet und Mitarbeiter untersuchten ein russisches Kollektiv aus schizophrenen und schizoauffektiv erkrankten Patienten und stellten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem 102C- Allel (odds ratio= 1,2, $p= 0,02$) und dem 102C/C- Genotypen mit Erkrankungen des schizophrenen Spektrums her (Golimbet et al., 2007).

Bei einer kürzlich untersuchten, relativ kleinen rumänischen Stichprobe, die allerdings weder weibliche Patienten noch weibliche Kontrollen umfasste, bedeutete der Besitz des 102C- und -1438G- Allels ein erhöhtes Risiko, an Schizophrenie zu erkranken, ebenso wie das Vorhandensein der Genotypen 102C/T bzw. -1438A/G und 102C/C bzw. -1438G/G (Procopciuc et al., 2009). Außerdem zeigten Patienten mit dem 102C/C- bzw. -1438G/G Genotyp ein signifikant schlechteres Ansprechen auf atypische Neuroleptika.

Bisher wurden zwei Metaanalysen des T102C- Polymorphismus veröffentlicht, die beide eine signifikante Assoziation des 102C- Allels in europäischen Populationen mit der Erkrankung bestätigen konnten. Abdolmaleky und Mitarbeiter bezogen dabei insgesamt 36 Studien mit ein und analysierten die Genotypen von insgesamt 4632 Patienten und 4410 Kontrollen aus 17 verschiedenen Ländern (Abdolmaleky et al., 2004). Dabei ergab sich in der Gesamtstichprobe eine schwach signifikante Assoziation des C- Allels (odds ratio=1.1). Da sich aber eine starke Heterogenität zwischen europäischen und asiatischen Stichproben abzeichnete, wurden diese

beiden ethnischen Gruppen nochmals getrennt untersucht und eine stärkere Assoziation in europäischen Stichproben entdeckt, während für asiatische Stichproben nun keine Signifikanz mehr erkennbar war.

Eine aktuellere Metaanalyse untersuchte alle in englischer und chinesischer Sprache verfassten Studien zum T102C Polymorphismus (Li et al., 2006). Die Allelfrequenz des T- Allels war mit 0,496 bei Europäern geringer als bei Asiaten (0,576). Bei der untersuchten Gesamtpopulation konnte keine Assoziation mit der Schizophrenie festgestellt werden, ebenso in dem asiatischen Teil der Stichproben. Für Europäer allein konnte jedoch eine schwach signifikante Assoziation detektiert werden.

In anderen, vorwiegend asiatischen Kollektiven konnte, analog zu den Befunden der Metaanalysen, keine Assoziation des T102C- SNPs mit der Schizophrenie nachgewiesen werden (z.B. (Arranz et al., 1996b; Chen et al., 2001; Hawi et al., 1997; He et al., 1999; Ishigaki, 1996; Kouzmenko et al., 1997; Lin et al., 1999; Ohara et al., 1999; Sasaki et al., 1996; Shinkai et al., 1998).

Aber auch in kaukasischen Stichproben konnte in einigen Fällen keine signifikante Assoziation des T102C- Polymorphismus mit der Schizophrenie gefunden werden (Fanous et al., 2004; Jonsson et al., 1996).

Einige Studien brachten gegenteilige positive Ergebnisse hervor und fanden einen Zusammenhang des 102T- Allels mit Schizophrenie (Tan et al., 2001; Tay et al., 1997). In einer kleineren spanischen Stichprobe zeigte sich eine höhere Allelfrequenz des 102T- Allels von 0,54 bei Schizophrenen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (0,46) (Penas-Lledo et al., 2007). Ähnliche Allelfrequenzen wurden in einer kleinen griechischen Stichprobe ermittelt. Auch hier zeigte sich eine Assoziation des 102T- Allels mit der Schizophrenie (odds ratio= 2,11; p=0,0001) (Baritaki et al., 2004).

Insgesamt scheint das 102T- Allel eher in chinesischen und südeuropäischen schizophrenen Patienten häufiger vertreten zu sein (Baritaki et al., 2004; Chen et al., 1997; Chen et al., 2001; Lin et al., 1999). Während die Allelfrequenz des 102T- Allels bei Ostasiaten 59,5% (Patienten) bzw. 57,5% (Kontrollen) beträgt, liegt sie bei Nordeuropäern mit 40% (Patienten) bzw. 43,5% (Kontrollen) deutlich darunter (Abdolmaleky et al., 2004) (Tabelle 2-7).

Tabelle 2-7: Studien zur Assoziation des T102C- und A-1438G- Polymorphismus mit Schizophrenie

Untersuchungsgegenstand	Stichprobengröße	Befund	Quelle
Diagnose Schizophrenie	62 Patienten 96 Kontrollen (Japaner)	102C- Allel bei Schizophrenen signifikant häufiger.	(Inayama et al., 1996)
Diagnose Schizophrenie	571 Patienten 639 Kontrollen (Kaukasier)	102C- Allel bei Schizophrenen signifikant häufiger.	(Williams et al., 1996)
Diagnose Schizophrenie	45 Patienten 46 Kontrollen (Europäer)	102C- Allel bei Schizophrenen signifikant häufiger.	(Erdmann et al., 1996)
Diagnose Schizophrenie	50 Patienten 158 Eltern (Europäer)	T102C nicht mit Schizophrenie assoziiert.	(Malhotra et al., 1996b)
Diagnose Schizophrenie	99 Patienten 118 Kontrollen (Kaukasier)	T102C nicht mit Schizophrenie assoziiert.	(Jonsson et al., 1996)
Diagnose Schizophrenie	74 Patienten 183 Kontrollen (Kaukasier)	T102C nicht mit Schizophrenie assoziiert.	(Arranz et al., 1996b)
Diagnose Schizophrenie	121 Patienten 162 Kontrollen (Asiaten)	T102C nicht mit Schizophrenie assoziiert.	(Sasaki et al., 1996)
Diagnose Schizophrenie	150 Schizophrene 158 Kontrollen (Asiaten)	T102C nicht mit Schizophrenie assoziiert.	(Ishigaki, 1996)
Diagnose Schizophrenie	247 Patienten 249 Kontrollen (Iren)	T102C nicht mit Schizophrenie assoziiert.	(Hawi et al., 1997)
Diagnose Schizophrenie	177 Patienten 98 Kontrollen (Asiaten)	T102C nicht mit Schizophrenie assoziiert.	(Chen et al., 1997)
Diagnose Schizophrenie	101 Patienten 103 Kontrollen (Kaukasier)	102C- Allel bei Schizophrenen signifikant häufiger.	(Tay et al., 1997)
Diagnose Schizophrenie	63 Trios (Patienten und Eltern) 103 Kontrollen (Kaukasier)	102C- Allel bei Schizophrenen signifikant häufiger.	(Spurlock et al., 1998)

Untersuchungsgegenstand	Stichprobengröße	Befund	Quelle
Diagnose Schizophrenie	106 Patienten 109 Kontrollen (Asiaten)	T102C nicht mit Schizophrenie assoziiert.	(Shinkai et al., 1998)
Diagnose Schizophrenie	39 Responder 69 Nonresponder 90 Kontrollen (Kaukasier)	T102C nicht mit Schizophrenie assoziiert.	(Joober et al., 1999)
Diagnose Schizophrenie	119 Patienten 106 Eltern (Asiaten)	A-1438G nicht mit Schizophrenie assoziiert.	(Ohara et al., 1999)
Diagnose Schizophrenie	471 Patienten 523 Kontrollen (Chinesen)	T102C nicht mit Schizophrenie assoziiert.	(Chen et al., 2001)
Diagnose Schizophrenie	141 Patienten 79 Kontrollen (Türken)	T102C nicht mit Schizophrenie assoziiert.	(Herken et al., 2003)
Diagnose Schizophrenie	270 Familien mit 1425 Individuen und davon 595 Patienten (Iren)	T102C nicht mit Schizophrenie gekoppelt.	(Fanous et al., 2004)
Diagnose Schizophrenie	Metaanalyse über 36 Studien, 4632 Patienten 4410 Kontrollen	102C- Allel bei Schizophrenen häufiger, Assoziation bei Kaukasiern stärker.	(Abdolmaleky et al., 2004)
Diagnose Schizophrenie	114 Patienten 192 Kontrollen (Griechen)	102C- Allel häufiger bei Kontrollen.	(Baritaki et al., 2004)
Diagnose Schizophrenie	919 Patienten 330 Angehörige 500 Kontrollen (Russen)	102C-Allel und 102T/C- und C/C- Genotyp häufiger bei Patienten. Keine familien-basierte Assoziation.	(Golimbet et al., 2007)
Diagnose Schizophrenie	114 Patienten 142 Kontrollen (Kaukasier)	102T-Allel und -1438A- Allel bei Patienten häufiger als bei Kontrollen.	(Penas-Lledo et al., 2007)

Untersuchungsgegenstand	Stichprobengröße	Befund	Quelle
Diagnose Schizophrenie	82 Patienten 72 Kontrollen (Rumänen)	102C- Allel und -1438G- Allel signifikant häufiger bei Patienten als Kontrollen.	(Procopciuc et al., 2009)

Auch wenn von einer signifikanten Assoziation des T102C- Polymorphismus mit der Schizophrenie ausgegangen wird, so ist nach wie vor unklar, wie dieser Polymorphismus zur Suszeptibilität beitragen könnte. Da dieser SNP keinen Aminosäureaustausch im 5-HT_{2A}- Rezeptor bewirkt, scheint ein direkter Einfluss auf die Funktion des Rezeptors weniger wahrscheinlich. Durch seine physikalische Nähe zur Promoterregion und sein vollständiges LD mit dem Polymorphismus -1438A/G ist eine Beeinflussung der Genexpression aber zumindest nicht gänzlich auszuschließen (Williams et al., 1996).

Es wurde auch postuliert, dass die beiden Allele des T102C- SNPs die Genexpression quantitativ beeinflussen könnten. So wurden Hinweise darauf gefunden, dass die mRNA des HTR_{2A}- Transkripts eine abweichende Sekundärstruktur ausbildet, wenn das 102C- Allel vorhanden ist (Arranz et al., 1995). Mittels quantitativer *real time* PCR konnte sowohl bei schizophrenen Patienten als auch bei gesunden Kontrollpersonen eine signifikant um 21% geringere Konzentration an mRNA mit dem 102C- Allel gegenüber der mRNA des 102T- Allels festgestellt werden. Diese Reduktion beschränkte sich nicht nur auf das Verhältnis in Heterozygoten, auch interindividuell zeigte sich eine invers proportionale Korrelation zwischen dem Gesamt-mRNA- Niveau und der Präsenz von 102C- Allelen (T/T>T/C>C/C) (Polesskaya und Sokolov, 2002; Polesskaya et al., 2006). Im Einklang hierzu war der 102T/T- Genotyp mit einer höheren Anzahl an 5-HT_{2A}- Rezeptorbindungsstellen bei gesunden Individuen assoziiert (Khait et al., 2005). Diese signifikanten Unterschiede konnten aber in einer weiteren Studie nicht repliziert werden (Bray et al., 2004).

Es wurde auch vermutet, dass der T102C Polymorphismus die Rezeptorbindungseigenschaften im humanen Kortex verändern könnte. Dies wurde aber durch Kouzmenko und Mitarbeiter nicht bestätigt (Kouzmenko et al., 1997)

Neben einer Assoziation des T102C und -1438A/G mit der Diagnose Schizophrenie wurde auch ein eventueller Einfluss der Polymorphismen auf die Neuroleptikaantwort in Betracht gezogen (z.B. Arranz et al., 1995; Chen et al., 2009; Malhotra et al., 1996a). So fanden Joober und Mitarbeiter bei einem Vergleich von männlichen Neuroleptika- Nonrespondern mit gesunden Kontrollpersonen signifikante Unterschiede, nicht jedoch beim Vergleich von Neuroleptika- Respondern mit Kontrollpersonen (Joober et al., 1999). Anttila und Mitarbeiter konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigen. Sie stellten in einer finnischen Population aus schizophrenen Patienten im Gegensatz zu der Arbeitsgruppe um Joober den 102C/C- Genotyp signifikant erhöht bei weiblichen Neuroleptika- Nonrespondern fest (Anttila et al., 2007). Beide Studien bekräftigen aber die früheren Befunde, nach denen der homozygote 102C/C- Genotyp (Arranz et al., 1995) ebenso wie der -1438G/G- Genotyp (Arranz et al., 1998b) häufiger bei Clozapin- Nonrespondern zu finden sei. Dieser Befund konnte aber in einer weiteren Studie nicht repliziert werden (Masellis et al., 1998). Im Gegensatz zu den Befunden von Arranz und Mitarbeitern war in einer asiatischen Stichprobe das Vorhandensein des 102C/C- Genotyps mit besserem Ansprechen auf Risperidon assoziiert (Lane et al., 2002).

Eine Untersuchung an 128 mit Aripiprazol behandelten Patienten zeigte, dass die Wirkung der eingesetzten Medikation auf die Negativsymptomatik signifikant schwächer war, wenn die Patienten Träger des -1438G/G- Genotyps waren (Chen et al., 2009)

Benmessaoud und Mitarbeiter untersuchten den -1438A/G- Polymorphismus auch in Zusammenhang mit dem Ansprechen auf typische Neuroleptika, vorwiegend Haloperidol. Sie konnten feststellen, dass das -1438G- Allel in einer algerischen Stichprobe signifikant häufiger bei Haloperidol- Respondern vertreten war (Benmessaoud et al., 2008) (Tabelle 2-8).

Tabelle 2-8: Untersuchungen zum Einfluss von T102C und A-1438G auf das Ansprechen auf Neuroleptika.

Untersuchungsgegenstand	Stichprobengröße	Befund	Quelle
Clozapin Response	92 Responder 57 Nonresponder (Kaukasier)	102C/C- Genotyp häufiger bei Nonrespondern.	(Arranz et al., 1995)
Clozapin Response	105 Responder 41 Nonresponder (Europäer)	Kein signifikanter Unterschied.	(Nothen et al., 1995)
Clozapin Response	97 Responder 88 Nonresponder (Kaukasier, Afro- Amerikaner, Asiaten)	Kein signifikanter Unterschied.	(Masellis et al., 1998)
Clozapin Response	(Metaanalyse)	102C- und -1438G- Allel häufiger bei Nonrespondern.	(Arranz et al., 1998b)
Clozapin Response	42 Responder 98 Nonresponder 140 Kontrollen	Kein signifikanter Unterschied.	(Malhotra et al., 1996a)
Clozapin Response	181 Responder 178 Nonresponder (Asiaten)	-1438G häufiger bei Nonrespondern.	(Tan et al., 2001)
Risperidon <i>response</i>	100 Patienten (Asiaten)	102C/C mit besserer Risperidon <i>response</i> assoziiert.	(Lane et al., 2002)
Risperidon <i>response</i>	73 Patienten (Japaner)	T102C und -1438A/G nicht mit Risperidon <i>response</i> assoziiert.	(Yamanouchi et al., 2003)
Neuroleptika Response	111 Patienten 172 Kontrollen (Koreaner)	Kein signifikanter Unterschied.	(Pae et al., 2005)
Haloperidol Response	100 Trios (Algerier)	-1438G häufiger bei Respondern.	(Benmessaoud et al., 2008)
Negativsymptomatik unter Aripiprazol	128 Patienten (Taiwanesen)	Stärkere Verbesserung der Negativsymptomatik bei 102T/T und 102C/T bzw. -1438A/A- und - 1438A/G-Genotyp.	(Chen et al., 2009)

Besonders typische Neuroleptika bergen das Risiko, dass die Behandelten ein extrapyramidalmotorisches Syndrom (EPS) entwickeln. Dabei zeigen betroffene

Patienten Störungen im Bewegungsablauf, die mit einer verminderten oder vermehrten Motorik, verbunden mit einem erhöhten und verminderten Muskeltonus einhergehen. Es können sich akute Dystonie, Parkinsonismus, Akathisie oder Tardive Dyskinesie ausbilden (Möller et al., 2005). Verantwortlich für das EPS scheint eine Blockade der DRD2- Rezeptoren zu sein, die die Haupt- Zielrezeptoren der typischen Neuroleptika darstellen (Meltzer und Deutch, 1999). Da das serotonerge System regulierend auf die Dopaminfreisetzung in den nigrostriatalen und mesolimbischen dopaminergen Bahnen wirkt (Gunes et al., 2007), scheint auch eine Untersuchung des 5-HT_{2A}- Gens im Zusammenhang mit EPS vielversprechend. So zeigte sich in einer estländischen Stichprobe perphenazinbehandelter Patienten eine Häufung des 102C- Allels bei den Patienten, die ein EPS ausbildeten (Gunes et al., 2007).

Auch ein Zusammenhang mit Tardiver Dyskinesie (TD) wurde in Betracht gezogen. Nach der initialen Studie von Segman und Mitarbeitern (Segman et al., 2001) konnte auch in anderen Stichproben eine Assoziation des T102C- Polymorphismus mit TD festgestellt werden, jedoch wurden auch negative Ergebnisse publiziert (Basile et al., 2001; Herken et al., 2003). Auffällig bei den Studien mit positiven Resultaten ist, dass das allelbedingt gesteigerte Risiko für TD mit zunehmendem Alter größer wird. Hierfür könnte die in der Regel längere Exposition gegenüber neuroleptischen Substanzen verantwortlich sein, aber auch eine stärkere Funktionalität des Polymorphismus in späteren Lebensphasen, in denen ein Großteil der 5-HT_{2A}-Rezeptoren bereits abgebaut ist (Segman et al., 2001) (Tabelle 2-9).

Tabelle 2-9: Befunde zur Auswirkung von T102C und A-1438G auf Neuroleptika- bedingte Nebenwirkungen

Untersuchungsgegenstand	Stichprobengröße	Befund	Quelle
Tardive Dyskinesie (TD)	59 TD vorhanden 62 keine TD 96 Kontrollen (Juden, Askenazi und Nicht-Ashkenazi)	TD häufiger bei älteren Patienten mit 102C- Allel bzw. -1438G und 102C/C bzw. -1438G/G- Genotyp.	(Segman et al., 2001)
Tardive Dyskinesie (TD)	87 TD vorhanden 134 keine TD 97 Kontrollen	TD häufiger bei Patienten mit 102T- Allel.	(Tan et al., 2001)
Tardive Dyskinesie (TD)	82 TD vorhanden 63 keine TD (Afroamerikaner, Kaukasier)	T102C und -1438A/G nicht mit TD assoziiert.	(Basile et al., 2001)
Tardive Dyskinesie (TD)	34 TD vorhanden 111 keine TD (Türken)	Kein signifikanter Unterschied bei T102C und -1438A/G.	(Herken et al., 2003)
Tardive Dyskinesie (TD)	Metaanalyse über 5 Stichproben	102C- Allel signifikant mit höherem Risiko für TD assoziiert.	(Lerer et al., 2005)
Extrapyramidal-motorisches Syndrom	25 EPS vorhanden 27 keine EPS (Estländer)	102C- Allel signifikant häufiger bei Patienten mit EPS.	(Gunes et al., 2007)
Rezeptorbindung, allelische Expression	39 Patienten 35 Kontrollen (Kaukasier)	Signifikant reduzierte Expression bei C-Trägern um 21%.	(Poleskaya und Sokolov, 2002)
Rezeptorbindung, allelische Expression	50 Kontrollen (Kaukasier)	T102C und -1438A/G nicht mit Rezeptorbindung und allelischer Expression assoziiert.	(Bray et al., 2004)
N100 Amplitude	99 Patienten (Chinesen)	N100 Amplitude größer bei 102C- Allel- Trägern	(Yu et al., 2001)
PPI	21 Patienten (Kaukasier)	102T/T bzw. -1438A/A Homozygote signifikant bessere PPI.	(Quednow et al., 2008)

Ein weiterer Befund zum T102C- SNP ist der Zusammenhang der beiden Allele mit elektrophysiologischen Eigenschaften und sensimotorischem *gating*. Schizophrene

Patienten zeigen konsistent eine schlechtere Informationsprozessierung, die sich durch eine verminderte Präpulsinhibierung (PPI) zeigt (Quednow et al., 2008). Die PPI vermittelt eine deutliche Reduktion der Reizantwort auf einen Schreckreiz, wenn etwa 30- 500ms vor dem eigentlichen Reiz ein Warnton geboten wird. Dieser Mechanismus scheint eine wichtige Rolle bei der Filterung irrelevanter Informationen zu spielen (Quednow et al., 2008). Halluzinogene, serotoninagonistische Substanzen hemmen die PPI bei Nagern, während atypische Neuroleptika sich positiv auf die Steuerung der PPI bei schizophrenen Patienten auszuwirken scheinen. Eine Untersuchung an 21 Erkrankten zeigte, dass die PPI bei homozygoten 102T/T- und -1438A/A- Trägern signifikant besser war als bei 102C/C- und -1438G/G-Trägern (Quednow et al., 2008).

Die N100 Amplitude, ein weiterer elektrophysiologischer Marker, ist ein ereigniskorreliertes Potential, das auf einen akustischen Stimulus folgt und bei Erkrankten als verändert gefunden wurde (Dean, 2003). Bei Patienten mit 102C/C- Genotyp wurden nach Clozapingabe höhere N100 Amplituden als bei anderen Patienten gefunden (Yu et al., 2001) (Tabelle 2-9, S.59).

Zusammenfassend betrachtet sind die Ergebnisse zu den beiden Polymorphismen sehr heterogen. Ein übereinstimmender Befund ist jedoch die Tatsache, dass der T102C- und der A-1438G- SNP im vollständigen LD liegen. Folgerichtig wurde immer dann, wenn beide Polymorphismen in der gleichen Stichprobe untersucht wurden, entweder für beide Polymorphismen ein positiver Befund, oder für beide Polymorphismen ein negativer Befund erbracht.

Die Frage, ob der T102C- Polymorphismus und die Promotorvariante A-1438G in Zusammenhang mit der Schizophrenie, dem Ansprechen auf bestimmte Neuroleptika oder mit Medikation verbundenen unerwünschten Nebenwirkungen besteht, konnte allerdings nicht abschließend geklärt werden.

2.8.3.2 Der His452Tyr - Polymorphismus des HTR2A-Gens (rs6314)

Der His452Tyr Polymorphismus liegt am C-terminalen Ende des Rezeptors, welches die G- Proteinaktivierung beeinflusst (Hazelwood und Sanders-Bush, 2004). An der ersten Position des Codons 452 kann entweder ein Thymin oder ein Cytosin liegen, wobei Thymin für die Aminosäure Histidin und Cytosin für Tyrosin kodiert. Die seltenere Tyrosin-Variante tritt mit einer Häufigkeit von etwa 9% bei Europäern auf (Erdmann et al., 1996), während er in asiatischen Populationen nicht zu finden ist (ncbi, 2010). Da mit diesem Polymorphismus eine basische Aminosäure gegen eine neutrale ausgetauscht wird, könnte möglicherweise die Tertiärstruktur des Rezeptors verändert werden (Erdmann et al., 1996).

Dieser Polymorphismus schien zunächst nicht mit Schizophrenie assoziiert, spätere Studien führten zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen. So wurden signifikante positive Ergebnisse gefunden (Arranz et al., 1995; Arranz et al., 1996b; Procopciuc et al., 2009), aber auch negative Befunde wurden berichtet (Malhotra et al., 1996b; Nothen et al., 1995). Auch eine aktuelle Metaanalyse über alle publizierten Studien zu diesem Polymorphismus in englischer und chinesischer Sprache konnte keine signifikante Assoziation mit der Erkrankung feststellen (Li et al., 2006).

Eine irische Arbeitsgruppe untersuchte ebenfalls den Zusammenhang zwischen dem His452Tyr- Polymorphismus und der Schizophrenie. Dazu genotypisierten sie 270 irische Familien mit insgesamt 595 schizophrenen und affektiven Patienten. Es konnte zwar keine Assoziation mit der Schizophrenie festgestellt werden, jedoch zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang des Polymorphismus mit affektiven Symptomen (Fanous et al., 2004).

Während die Befundlage zur Assoziation mit der Erkrankung selbst eher inkonsistent erscheint, ist ein Einfluss des His452Tyr auf die Wirkung des atypischen Neuroleptikums Clozapin durchgängig bestätigt worden. Dabei scheint sich der Besitz eines Tyr- Allels negativ auf das Ansprechen auf diesen Wirkstoff auszuwirken (Arranz et al., 1995; Arranz et al., 1998a; Dean, 2003; Masellis et al., 1998). Diesen Zusammenhang konnte auch eine Metaanalyse bestätigen (Arranz et al., 1998b).

Auch eine mögliche Auswirkung auf das Risiko einer Tardiven Dyskinesie wurde untersucht, jedoch mit negativem Befund (Basile et al., 2001; Herken et al., 2003; Segman et al., 2001). Allerdings konnten Lerer und Mitarbeiter einen kleinen, aber signifikanten Anstieg des Risikos für TD feststellen, wenn 102C- Träger zugleich auch das 452Tyr- Allel trugen. Dazu wurde eine Metaanalyse über fünf Stichproben

durchgeführt und eine signifikante Assoziation des 102C- Allels mit TD detektiert. Kombiniert mit dem 452Tyr- Allel zeigte sich ein größeres Risiko als für 102C alleine (Lerer et al., 2005). Eine mögliche Erklärung für die fehlende Signifikanz des His452Tyr alleine könnte in seiner geringen minoren Allelfrequenz zu finden sein, wodurch eine erheblich größere Individuenanzahl als die bisher verwendete für eine Risikodetektion nötig sein könnte.

Neuere Studien konnten einen replizierbaren Zusammenhang zwischen für die Schizophrenie relevanten kognitiven Funktionen und dem His452Tyr-Polymorphismus herstellen. Besonders an jüngeren gesunden Probanden konnte eine Assoziation des Tyr- Allels mit schlechterer Gedächtnisleistung gezeigt werden. Dabei schnitten Tyr- Träger bei verbalen Gedächtnistests 21% schlechter ab als die His- Träger (de Quervain et al., 2003). Dieser Befund konnte von Papassotiropoulos und Mitarbeitern repliziert werden. Interessant hierbei ist, dass dieser Alleleffekt mit steigendem Alter an Bedeutung verliert und ab dem 45. Lebensjahr nicht mehr detektierbar ist. Eine Begründung hierfür könnte das altersbedingte Absinken der 5-HT_{2A}- Rezeptordichte im humanen Gehirn sein. Es tritt ab dem 20. Lebensjahr ein fortschreitender Verlust der Rezeptoren um bis zu 70% auf, der in der fünften Lebensdekade ein Plateau von etwa 30% der juvenilen Rezeptordichte erreicht (Papassotiropoulos et al., 2005) (Tabelle 2-10).

Tabelle 2-10: Untersuchungen zum His452Tyr- Polymorphismus

Untersuchungsgegenstand	Stichprobengröße	Befund	Quelle
Diagnose Schizophrenie	45 Patienten 46 Kontrollen (Kaukasier)	Kein signifikanter Unterschied.	(Erdmann et al., 1996)
Diagnose Schizophrenie	270 Familien mit 1425 Individuen und davon 595 Patienten (Iren)	Keine Kopplung mit Schizophrenie.	(Fanous et al., 2004)
Diagnose Schizophrenie	82 Patienten 72 Kontrollen (Rumänen)	452Tyr- Allel signifikant häufiger bei Patienten als Kontrollen.	(Procopciuc et al., 2009)
Clozapin Response	105 Responder 41 Nonresponder	Kein signifikanter Unterschied.	(Nothen et al., 1995)
Clozapin Response	92 Responder 57 Nonresponder	452Tyr- Allel häufiger bei Nonrespondern.	(Arranz et al., 1995)
Clozapin Response	99 Responder 54 Nonresponder 178 Kontrollen	452Tyr- Allel häufiger bei Nonrespondern.	(Arranz et al., 1996a)
Clozapin Response	181 Responder 93 Nonresponder 178 Kontrollen	452Tyr- Allel häufiger bei Nonrespondern.	(Arranz et al., 1998a)
Clozapin Response	42 Responder 98 Nonresponder 140 Kontrollen	Kein signifikanter Unterschied.	(Malhotra et al., 1996a)
Tardive Dyskinesie (TD)	82 TD vorhanden 63 keine TD (Afroamerikaner, Kaukasier)	Kein signifikanter Unterschied.	(Basile et al., 2001)
Tardive Dyskinesie (TD)	59 TD vorhanden 62 keine TD 96 Kontrollen (Juden, Ashkenazi und Nicht-Ashkenazi)	Kein signifikanter Unterschied.	(Segman et al., 2001)
Hirnvolumina	72 gesunde Probanden	Signifikante Reduktion grauer und weißer Substanz in temporalen Regionen bei 452Tyr – Trägern.	(Filippini et al., 2006)

Untersuchungsgegenstand	Stichprobengröße	Befund	Quelle
G-Protein-Aktivierung	(keine Angabe)	452Tyr- Allel aktiviert weniger effizient G-Proteine.	(Hazelwood and Sanders-Bush, 2004)

Beide Varianten werden quantitativ gleich exprimiert, aber die 452Tyr Variante scheint weniger effizient G- Proteine zu aktivieren (Hazelwood und Sanders-Bush, 2004), was auf eine verminderte intrazelluläre Signalkapazität hinweisen könnte.

Außerdem scheint ein Zusammenhang des His452Tyr- Polymorphismus mit einer Reduktion bestimmter Hirnvolumina zu bestehen. In einer MR- Studie an 76 gesunden Probanden konnte bei Tyr- Trägern eine signifikante Reduktion der weißen Substanz in linken temporalen Regionen und der grauen Substanz im linken Hippokampus, im linken inferioren temporalen Gyrus und beidseitig im mittleren und superioren Gyrus gemessen werden (Filippini et al., 2006). Diese Befunde könnten auf eine schlechtere serotonerge Neuroplastizität hinweisen und stehen wiederum im Einklang mit den schlechteren kognitiven Leistungen bei Tyr- Trägern, da der Substanzverlust Regionen betrifft, die für Gedächtnisfunktionen relevant sind.

Ozaki und Mitarbeiter untersuchten die Eigenschaften der beiden Allele anhand der Zellmembranen von Blutplättchen. Die humanen Blutplättchen stammen onthogenetisch vom Neuroectoderm ab (Bleich et al., 1988) und die Strukturen der 5-HT_{2A}- Rezeptoren in Thrombozyten sind identisch mit denen in Hirnneuronen, so dass sie direkt verglichen werden können (Cook, Jr. et al., 1994). Wie auch im Gehirn führt die Aktivierung von 5-HT_{2A}- Rezeptoren in Thrombozyten zur vermehrten Phosphoinositid- Hydrolyse, wodurch Inositidphosphat entsteht, dass das intrazelluläre Kalzium mobilisiert. So wurde die intrazelluläre Kalziummobilisierung bei beiden Allelen in Thrombozyten untersucht. Während sich bei der basalen Kalziumkonzentration noch keine Unterschiede zeigten, war die Kalziummobilisierung nach Serotoninapplikation bei 452Tyr- Trägern signifikant erniedrigt und verzögert (Ozaki et al., 1997).

2.8.3.3 Weitere Polymorphismen des HTR2A-Gens

Ein weiterer Polymorphismus des HTR2A-Gens ist in der vierten Transmembrandomäne lokalisiert. Die Aminosäure an Position 197 kann hierbei mit Isoleucin oder Valin besetzt sein (Ile197Val, rs6308). Valin bewirkt eine signifikante Reduktion der Sensitivität des 5-HT_{2A}-Rezeptors für das Neuroleptikum Clozapin (Harvey et al., 2003). Es ist aber nicht geklärt, ob die Mutation die Sensitivität des Rezeptors für Clozapin direkt beeinflusst, oder ob die anschließende Signalkaskade verändert wird.

Die meisten Assoziationsstudien zum 5-HT_{2A}-Rezeptorgen basieren auf Einzelmarkern. Dies macht die Ergebnisse schwer interpretierbar, es sei denn, der analysierte SNP ist eine echte funktionelle Variante, die eine erhöhte Suszeptibilität verursachen könnte (Sullivan, 2005). Die kausale Variation ist aber meist unbekannt und eine entdeckte Assoziation besteht nur mit einem Marker, der mit der kausalen Mutation im LD liegt. Wenn nur ein unvollständiges LD zwischen dem Marker und der kausalen Variante besteht, dann können die Ergebnisse aus Assoziationsstudien falsch interpretiert oder Assoziationen übersehen werden (Dominguez et al., 2007).

Ein alternativer Ansatz benutzt diese indirekten Assoziationen zum Auffinden von Suszeptibilitätsvarianten. Das humane Genom ist in Haplotypblöcke strukturiert, die sich durch hohes LD und geringe Diversität auszeichnen (Dominguez et al., 2007). Dies erlaubt die Auswahl von SNP-Sets (*haplotype tag* SNPs, htSNPs), die die größte genetische Variabilität in jedem Block abdecken. Diese htSNPs können verwendet werden, um Assoziationen zu identifizieren, ohne die wirkliche Suszeptibilitätsvariante zu genotypisieren (Gabriel et al., 2002; Johnson et al., 2001). Dominguez und Mitarbeiter verfolgten diesen Ansatz in einer spanischen Stichprobe um eine Assoziation zwischen dem Serotonin-2A-Rezeptorgen und Schizophrenie zu untersuchen. Dafür wählten sie 23 htSNPs nach der *tagger*-Methode (de Bakker et al., 2005), die zusammen mit sieben exonischen SNPs genotypisiert wurden. Sie konnten dabei eine Assoziation der drei htSNPs rs7333412, rs2296972 und rs659734 mit der Schizophrenie feststellen. Diese Signifikanz hielt multiplem Testen aber nicht stand (Dominguez et al., 2007).

Eine weitere Haplotypanalyse wurde von Fanous und Mitarbeitern durchgeführt. Dazu wurden zehn HapMap tagSNPs (hapmap 2009) und zwei der häufig publizierten HTR2A-SNPs in einer großen irischen familienbasierten Stichprobe

untersucht. Obwohl keine Assoziation mit der Diagnose Schizophrenie festgestellt werden konnte, wurden zwei Haplotypen identifiziert, die signifikant häufiger bei Patienten mit psychotischen Erkrankungen zu finden waren. Haplotyp 1 umfasste dabei die vier SNPs rs3125, rs6314 (His542Tyr), rs659734 und rs1745837, während Haplotyp 2 sich aus den Polymorphismen rs6314 (His542Tyr), rs659734, rs1745837 und rs1928042 zusammen setzte. Des weiteren waren auch die beiden Einzelmarker rs659734 und rs207037 mit dem Symptom Psychose assoziiert (Fanous et al., 2009).

2.8.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zu Polymorphismen des HTR2A- Gens

Von den 420 bekannten Einzelnukleotid- Polymorphismen wurden bisher drei sehr intensiv untersucht. Die stille T102C- Variation in Exon 1 (rs6313), ein Promoter-SNP (rs6311, -1438A/G und der zu einem Aminosäureaustausch führende His452Tyr (rs6314) (Abbildung 2-4).

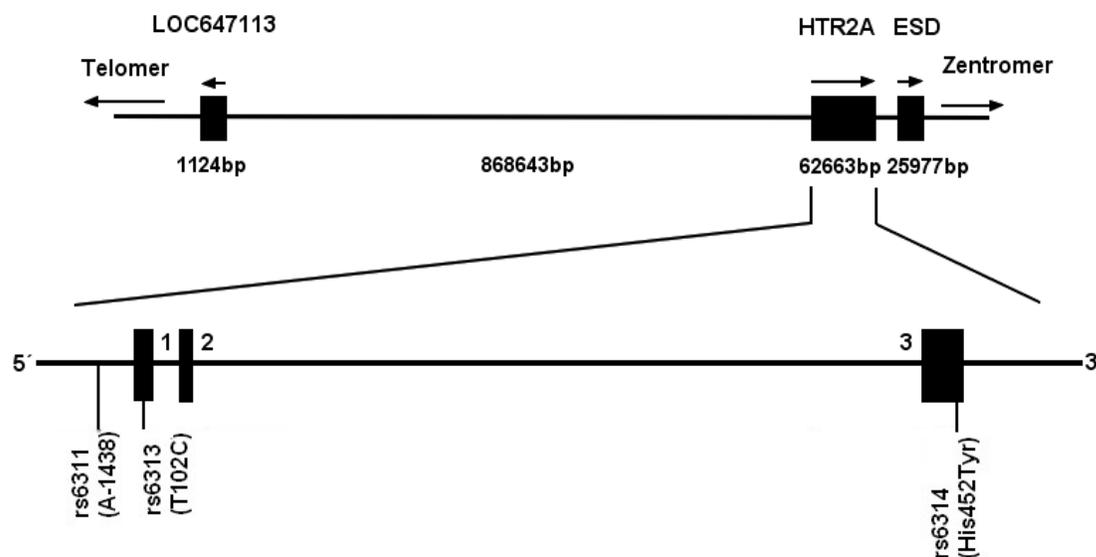


Abbildung 2-4: Lage der häufig untersuchten Polymorphismen im HTR2A- Gen

Während die Befundlage in Bezug auf T102C und -1438A/G eher auf eine Assoziation mit der Erkrankung zumindest in einigen ethnischen Kollektiven hindeutet, scheint His452Tyr nicht zur Suszeptibilität für die Schizophrenie beizutragen. Wahrscheinlicher ist eine Beeinflussung der Arzneimittelantwort oder

neurophysiologischer Korrelate wie der PPI und kognitiver Fähigkeiten bzw. dem Risiko, an Nebenwirkungen zu leiden.

Die insgesamt widersprüchlichen Ergebnisse zur Assoziation des HTR2A- Gens mit Schizophrenie könnten epigenetischer Natur sein. Bunzel und Mitarbeiter konnten zeigen, dass HTR2A zu den genomisch geprägten Genen zählt und somit nur eine der beiden elterlichen Kopien aktiv ist (Bunzel et al., 1998). Genomisch geprägte Gene sind zwar diploid in einer Zelle vorhanden, aber in Abhängigkeit ihrer Herkunft wird nur das maternale oder paternale Gen auch wirklich exprimiert, während die zweite Kopie durch einen hohen Methylierungsgrad seiner DNA- Sequenz inaktiviert wird. Dies könnte bedeuten, dass die Auswirkungen eines Polymorphismus im HTR2A- Gen nicht allein vom vorliegenden Genotyp abhängen. Es könnte daher von Bedeutung sein, ob ein Allel von der Mutter oder vom Vater vererbt wurde, denn das Allel des inaktiven Gens könnte weniger Einfluss auf den Phänotypen nehmen, als das Allel des aktiv exprimierten Gens.

Eine weitere Ursache könnte in zu kleinen und zu heterogenen Studienkollektiven zu finden sein. So ist es möglich, dass die bisher verwendeten Stichproben nicht genug *power* aufwiesen, um geringe Effekte, wie sie bei Einzelnukleotidpolymorphismen erwartet werden, zu detektieren. Assoziationsstudien sind dazu geeignet, auch Marker mit geringem phänotypischen Effekt zu identifizieren. Dies gelingt aber nur, wenn die verwendete Stichprobe eine ausreichende Größe besitzt.

3 Fragestellung

Während eine starke genetische Komponente in der Ätiologie der Schizophrenie als unbestritten gilt, sind die Auswirkungen der potentiellen Suszeptibilitätsgene auf die molekulargenetischen Mechanismen, die zur Entstehung der Erkrankung führen, noch weitgehend unbekannt. Fall- Kontroll- Studien mit einer ausreichend großen Individuenzahl sind geeignet, mit hoher Sensitivität Gene oder Marker mit geringem Effekt auf die Ätiologie komplexer Erkrankungen zu identifizieren.

Aufgrund seiner Funktionalität wurde dem Serotonin- 2A- Rezeptorgen in der Vergangenheit große Aufmerksamkeit gewidmet. Sowohl seine Eigenschaft als Zielrezeptor für antipsychotische Substanzen als auch seine Lokalisation in schizophrenierelevanten Hirnregionen zeichnen den Rezeptor als vielversprechenden Kandidaten für die Schizophrenie aus.

Ziel der vorliegenden Studie war es, mögliche Zusammenhänge zwischen den untersuchten Polymorphismen und Haplotypen des HTR2A- Gens mit der Schizophrenie an einer deutschen Fall-Kontroll-Stichprobe zu erfassen. Dazu wurden Allel-, Genotyp- und Haplotypfrequenzen im Vergleich schizophrener Patienten zu einer gesunden Kontrollpopulation bestimmt.

Des weiteren sollte die funktionelle Relevanz positiv assoziierter Variationen in Hinblick auf eine veränderte mRNA- Expression mittels quantitativer Genexpression (QGE) untersucht werden. Die dazu verwendete Technik sollte unter Verwendung von kompetitiver PCR und MALDI- TOF Massenspektrometrie anhand eines Sets aus zehn humanen *housekeeping* Genen etabliert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Studienteilnehmer

4.1.1 Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe umfasste 1325 Personen aus dem Großraum München. Die potentiellen Studienteilnehmer wurden nach dem Zufallsprinzip durch das Einwohnermeldeamt München ausgewählt und dann schriftlich über das Ziel der Studie informiert und um eine Teilnahme gebeten. Nach schriftlicher Zusage wurde zunächst bei allen Personen ein *Telefonscreening* durchgeführt, um eine grundsätzliche Eignung für die Studie zu sichern. In diesem etwa zehnminütigen Gespräch wurde eine Anamnese über die psychiatrische Vorgeschichte erhoben, wobei hirnorganische und psychische Erkrankungen, wie zum Beispiel Depressionen, Suizidversuche, Psychosen oder Alkohol- und Drogenabusus bei den potentiellen Probanden und ihren Verwandten ersten Grades als Ausschlusskriterium galten. Des Weiteren mussten die Teilnehmer deutsche Vorfahren aufweisen. Waren alle Voraussetzungen erfüllt, so wurden die Personen zu einem ausführlichen klinischen Interview eingeladen, das das Strukturierte Klinische Interview (SKID) für DSM-IV (SKID I und SKID II) einschloss (First et al. 1997; Wittchen et al. 1997). Psychiatrische Diagnosen unter Verwandten ersten Grades wurden mit Hilfe des *Family History Assessment Modules* (Rice et al. 1995) beurteilt. Testpersonen mit relevanten somatischen Krankheiten oder Achse I/II-Störungen (*lifetime*) wurden ausgeschlossen.

4.1.2 Schizophrene Patienten

In dieser Studie wurden 513 schizophrene Patienten untersucht. Für alle Patienten wurde eine standardisierte Anamnese die Lebens- und Krankheitsgeschichte betreffend erstellt, unter anderem wurden Daten zur familiären Situation, zum schulischen und beruflichen Werdegang, zu stationären Aufenthalten und zur Medikation erhoben. Patienten mit substanzinduzierten oder organischen Störungen, die psychotische Symptome verursachen könnten, wurden von der Teilnahme ausgeschlossen. Mit den Patienten wurden ebenfalls das Strukturierte Klinische

Interview für DSM-IV (SKID I und SKID II) durchgeführt und die Diagnose Schizophrenie gesichert (Wittchen et al., 1997).

4.2 DNA-Extraktion

Tabelle 4-1 Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die DNA-Extraktion

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
10x PBS-Puffer: 80g NaCl 2g KCl 14,4g Na ₂ HPO ₄ 2,4g KH ₂ PO ₄ Ad 1l mit Aqua dest. Mit NaOH auf pH 7,4	Herstellung des 1x PBS-Puffers	Reagenzien zur Eigenherstellung, Carl Roth, Hamburg
1x PBS-Puffer: 100ml 10x PBS-Puffer 900ml Aqua dest.	Resuspendierung des Blutkuchens	Eigene Herstellung
50ml Zentrifugenröhre	Auffangen der Eluate	Sarstedt, Nürnberg
Sammelgefäße	Auffangen der DNA	Qiagen, Hilden
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Herstellung des 10x PBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA Monovette	Blutentnahme	Sarstedt, Nürnberg
Eppendorf <i>Research</i> Pipette (100-1000µl)	Pipettierung der DNA	Eppendorf, Hamburg
Ethanol Rotipuran >99,8% p.a.	Entfernung der Hydrathülle der DNA	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid, KCl	Herstellung des 10x PBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	Herstellung des 10x PBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
Micro Schraubröhre, 2,0ml	Lagerung der DNA	Sarstedt, Nürnberg
Natriumhydrogenphosphat, Na ₂ HPO ₄	Herstellung des 10x PBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, NaOH	Herstellung des 10x PBS-Puffers	Carl Roth, Karlsruhe
Puffer AE	Elution der DNA	Qiagen, Hilden
Puffer AL	Zellyse	Qiagen, Hilden
Puffer AW1	Entfernung von Zellrückständen	Qiagen, Hilden
Puffer AW2	Entfernung von Zellrückständen	Qiagen, Hilden
QIAamp <i>Maxi Spin Columns</i>	Bindung der DNA	Qiagen, Hilden
Qiagen Protease	Abbau von Zellproteinen	Qiagen, Hilden
Rotixa RP Standzentrifuge	Alle Zentrifugationsschritte	Hettich, Tuttlingen
Vortex Genie	Durchmischung der Blut-Puffer-Suspensionen	Scientific Industries, New York, USA
WB Wasserbad	Inkubation bei 70°C der Blut-Puffer-Suspension	Memmert, Schwabhausen

Für die Hochdurchsatzgenotypisierung wurde genomische DNA benötigt. Hierbei war von besonderer Bedeutung, eine DNA- Extraktionsmethode zu wählen, die frei von MALDI- inkompatiblen Substanzen war. So durften keine Detergenzien wie

Dimethylsulfoxid oder Harnstoff verwendet werden, da diese später die Genotypisierung mit MALDI- TOF Massenspektrometrie gestört hätten (Jurinke et al., 2004).

Von allen Studienteilnehmern wurde etwa 7ml venöses Blut in EDTA- Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht) entnommen. Das Vollblut wurde bei 3000rpm für 10min zentrifugiert (Rotixa RP Standzentrifuge, Firma Hettich, Tuttlingen), das so abgetrennte Plasma wurde abgenommen und für weitere Untersuchungszwecke bei -80°C getrennt gelagert. Der Blutkuchen wurde zunächst bei -20°C gelagert und zur DNA- Extraktion bei Raumtemperatur aufgetaut, mit 1xPBS- Puffer auf ein Volumen von etwa 10ml gebracht und gemischt.

Die DNA-Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Qiagen DNA *Blood Maxi Kits* (Qiagen, 2002). Diese Extraktionsmethode beruht auf einer Bindung der DNA an eine Silikagelmembran in Gegenwart von hohen Konzentrationen chaotroper Salze (Grieß et al., 2002). Chaotrope Salze, wie Guanidiniumhydrochlorid (GHCl), denaturieren und inaktivieren Proteine und entfernen auch die Hydrathülle von Nukleinsäuren, eine wichtige Voraussetzung für die Bindung von Nukleinsäuren an die Silikageloberfläche. Nach einigen Waschschritten erfolgt dann unter Niedrigsalzbedingungen die Elution der aufgereinigten DNA in wässriges Medium (Grieß et al., 2002).

Der resuspendierte Blutkuchen wurde zur Zellyse mit 500µl QIAGEN Protease (Firma Qiagen, Hilden) versetzt und gemischt. Anschließend wurden 12ml des GHCl-haltigen Lysepuffers AL (Firma Qiagen, Hilden) zugegeben und für 60s auf einem Vortexer (Firma Scientific Industries, New York) gründlich homogenisiert. Für optimale Lysebedingungen und einen maximalen Ertrag an DNA wurde dieses Gemisch für 30min bei 70°C im Wasserbad inkubiert.

Um die DNA für die Bindung an die Silikagelmembran zu präparieren, wurden 10ml Ethanol (Firma Carl Roth, Karlsruhe) zugegeben und erneut gemischt. Diese Lösung wurde sukzessive auf eine QIAamp Maxi Säule überführt und jeweils bei 3000rpm 3min zentrifugiert und so die DNA an die Silikagelmembran gebunden.

In einem folgenden Waschschriff mit 5ml Puffer AW1 (Firma Qiagen, Hilden) und anschließender Zentrifugation bei 4000rpm für 2min wurden restliche Protein- und RNA- Kontaminationen entfernt. Um nun GHCl- Salze quantitativ auszuwaschen und die DNA für die Elution vorzubereiten, erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 5ml ethanolhaltigem, salzarmem Puffer AW2 (Firma Qiagen, Hilden). Für eine restlose

Rückstandseliminierung wurden die Säulen 15min bei 4000rpm zentrifugiert. Die Elution erfolgte dann durch zweimalige Inkubation der Silikagelmembran mit insgesamt 1,5ml Tris- haltigem AE- Puffer (Firma Qiagen, Hilden) für jeweils 5 Minuten bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation für 2min bei 5000rpm. Die DNA- Lösung wurde in 2,0ml Mikroschraubröhren (Firma Sarstedt, Nürnberg) bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

4.3 Konzentrationseinstellung der DNA

Tabelle 4-2: Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die Konzentrationseinstellung

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
20µl <i>Conductive Roborack Tips</i>	Pipettierung der DNA und Reagenzien	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
200 µL <i>Conductive Roborack Tips</i>	Pipettierung der DNA und Reagenzien	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
1000 µL <i>Conductive Roborack Tips</i>	Pipettierung der DNA und Reagenzien	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
96 <i>Well Flat Bottom Plate Black</i>	Vorlagenplatte für Standard- und Proben DNA	Greiner Bio-one, Frickenhausen
<i>Human genomic DNA 100ng/µl</i>	Standardverdünnungsreihe	Firma Clontech, Mountain View, USA
<i>Janus Automated Workstation</i>	Durchführung aller Pipettierschritte	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
Micro Schraubröhre, 2,0ml	Lagerung der DNA	Sarstedt, Nürnberg
<i>Quant iT PicoGreen dsDNA reagent</i>	Fluoreszenzmessung der DNA	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Thermo Fast 96 well Plate</i>	Vorverdünnung der Proben-DNA, Standardverdünnungsreihe	ABgene, Hamburg
<i>Victor 3 Multilabel Counter 1420</i>	Fluoreszenzmessung der DNA	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
<i>Wallac 1420 Workstation</i>	Software zur Steuerung Victor3 Multilabel Counters	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA
WinPREP	Software zur Steuerung Janus Pipettierroboter	Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA

Die aus der Extraktion erhaltenen DNA- Lösungen wiesen eine durchschnittliche Konzentration von 120-150ng/µl auf. Für die weitere Prozessierung wurden die Konzentrationen aller extrahierten DNA- Lösungen bestimmt und auf einen Wert von 50ng/µl eingestellt. Die hierzu notwendige Konzentrationsmessung wurde mit einem auf dem Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen (Firma Invitrogen, Karlsruhe) basierenden assay durchgeführt. PicoGreen ist ein selektiv an doppelsträngige DNA bindendes Fluorophor (Rengarajan et al., 2002). Zusammen mit doppelsträngiger DNA entsteht ein DNA- Farbstoff- Komplex, der Licht der Wellenlänge 480nm absorbiert. Wird dieser Komplex durch Lichtbestrahlung angeregt, wird wiederum Licht der Wellenlänge von 520nm, im grünen Bereich des sichtbaren Lichts, emittiert. Dabei ist

die Anzahl der emittierten Lichtquanten direkt proportional zur vorhandenen doppelsträngigen DNA. Mithilfe einer interpolierten Standardkurve aus bekannten DNA- Konzentrationen wurde so eine Quantifizierung der extrahierten DNA-Lösungen durchgeführt.

Die Standardkurve wurde durch eine 1:2 Verdünnungsreihe eines 100ng/µl DNA-Standards (Firma Clontech, Mountain View, USA) bestimmt. Hierzu wurden 200µl dieses Standards aus genomischer DNA in der Vertiefung A1 einer *Thermo fast 96 well plate* (Firma ABgene, Hamburg) vorgelegt und die Vertiefungen B1 bis H1 mit 100µl autoklaviertem, destilliertem Wasser befüllt. Aus der Vertiefung A1 wurden mit einer Pipette (Firma Eppendorf, Hamburg) 100µl entnommen, in die Vertiefung B1 einpipettiert und die Lösung durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt. Aus dem Well B1 wurden wiederum 100µl entnommen und in Vertiefung C1 transferiert und gemischt. Die Verdünnungsreihe wurde bis zur Vertiefung G1 fortgeführt, während das Well H1 unberührt blieb und somit keine genomische DNA enthielt (Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3: Positionen, Volumina und Konzentrationen der DNA- Verdünnungsreihe

Position	Volumen	Konzentration an genomischer DNA
A1	100µl	100ng/ml
B1	100µl	50ng/µl
C1	100µl	25ng/µl
D1	100µl	12,5ng/µl
E1	100µl	6,25ng/µl
F1	100µl	3125ng/µl
G1	200µl	1,5262ng/µl
H1	100µl	0

Um Messfehler auszuschließen wurden sowohl Standard- als auch Proben- DNAs in Replikaten gemessen. Alle weiteren Pipettierschritte wurden dabei von einem Roboter ausgeführt (*Janus Automated Workstation*, Firma Perkin Elmer, Massachusetts). Hierzu wurden leitende Pipettenspitzen (*conductive tips*, Firma Perkin Elmer, Massachusetts) verwendet, durch die das Gerät Spannungsänderungen, die durch das Auftreffen auf eine Flüssigkeitsoberfläche ausgelöst werden, registrieren und so auf variable Flüssigkeitspegel reagieren konnte.

Die zu messenden DNA- Lösungen wurden in einer 96 *well plate* (Firma ABgene, Hamburg) mit autoklaviertem, destilliertem Wasser 1:10 vorverdünnt (5µl DNA und 45µl H₂O), während die Standardkurve nicht mehr weiter verdünnt wurde. Außerdem wurde in eine 96 *well flat bottom plate* (Firma Greiner, Frickenhausen) 50µl autoklaviertes, destilliertes Wasser pro Vertiefung vorgelegt. Zu diesen wurden jeweils 5µl der Standardverdünnungsreihe bzw. der vorverdünnten DNA gegeben. Sowohl die Standard- DNA als auch die Proben- DNA wurde jeweils aus dem selben Röhrchen bzw. Vertiefung in Replikaten in die *flat bottom plate* einpipettiert (Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4: Plattendesign für die DNA- Konzentrationsmessung

	1 (Std.)	1 (Std.)	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 ng/µl	100 ng/µl	DNA1	DNA1	DNA9	DNA9	DNA17	DNA17	DNA25	DNA25	DNA33	DNA33
B	50 ng/µl	50 ng/µl	DNA2	DNA2	DNA10	DNA10	DNA18	DNA18	DNA26	DNA26	DNA34	DNA34
C	25 ng/µl	25 ng/µl	DNA3	DNA3	DNA11	DNA11	DNA19	DNA19	DNA27	DNA27	DNA35	DNA35
D	12,5 ng/µl	12,5 ng/µl	DNA4	DNA4	DNA12	DNA12	DNA20	DNA20	DNA28	DNA28	DNA36	DNA36
E	6,25 ng/µl	6,25 ng/µl	DNA5	DNA5	DNA13	DNA13	DNA21	DNA21	DNA29	DNA29	DNA37	DNA37
F	3,125 ng/µl	3,125 ng/µl	DNA6	DNA6	DNA14	DNA14	DNA22	DNA22	DNA30	DNA30	DNA38	DNA38
G	1,5625 ng/µl	1,5625 ng/µl	DNA7	DNA7	DNA15	DNA15	DNA23	DNA23	DNA31	DNA31	DNA39	DNA39
H	BLIND	BLIND	DNA8	DNA8	DNA16	DNA16	DNA24	DNA24	DNA32	DNA32	DNA40	DNA40

Unmittelbar vor der Messung wurde das photosensible PicoGreen (Firma Invitrogen, Karlsruhe) unter möglichst geringem Lichteinfall mit autoklaviertem, destilliertem, Wasser 1:156 verdünnt und aus dieser Verdünnung pro Vertiefung 145µl zu der vorverdünnten Proben- bzw. der Standard-DNA gegeben. So ergab sich eine Endverdünnung des PicoGreens von 1:200. Die befüllte Platte wurde durch einen Greifarm von der Janus Workstation in den Victor 3 *Multilabel Counter* 1420 (Firma Perkin Elmer, Massachusetts) überführt.

Vor der Messung wurde die 96 *well* Platte im Messgerät 30s in horizontaler Ebene in Doppellellipsen geschüttelt, um eine homogene Durchmischung der Lösungen zu erreichen. Die Anregung des PicoGreens erfolgte bei 485nm und die Emissionsmessung bei 520nm. Die Fluoreszenzmessung konnte mit Hilfe der Wallac 1420 Workstation Software (Perkin Elmer, Massachusetts) *online* verfolgt werden.

Die ermittelten Fluoreszenzwerte wurden vom Messgerät an einen Rechner (Optiplex GX620 Pentium 4 HAT, Dell, Frankfurt) übermittelt und die Konzentrationen der

DNA- Lösungen anhand der Fluoreszenzwerte der Standardkurve mit einem auf *Virtual Basic* basierenden Makro berechnet, ebenso wie die nötigen Volumina an DNA-Lösung und autoklaviertem, destilliertem Wasser, die für die Konzentrationseinstellung der DNA- Lösungen auf 50ng/µl nötig waren. Die berechneten Werte wurden automatisch in einer *Excel*- Tabelle (Firma Microsoft, Seattle, USA) ausgegeben und vor der eigentlichen Verdünnung gesichtet. Hierbei wurde überprüft, ob DNA- Lösungen mit einer Ausgangskonzentration geringer als 50ng/µl vorhanden waren, und ob für einzelne Verdünnungen nicht mehr ausreichend Ausgangsvolumen vorhanden war. In beiden Fällen wurde eine erneute DNA- Extraktion der Probe eingeleitet, um eine vergleichbare Konzentration in allen Proben zu gewährleisten.

Die Konzentrationseinstellung auf 50ng/µl wurde, basierend auf den Ergebnissen der Konzentrationsmessung, vollautomatisch mit dem Janus Pipettierroboter durchgeführt, das Endvolumen betrug dabei 500µl. Die so entstandene Arbeitslösung wurde bei -80°C gelagert und bei Bedarf bei 4°C auf getaut.

Für die Hochdurchsatzgenotypisierung wurden die Arbeitslösungen in 96- well Platten (Firma ABgene, Hamburg) vorgelegt und bis zur weiteren Prozessierung sorgfältig verschlossen und bei -20°C gelagert.

4.4 Geschlechtsbestimmung der Proben- DNA

Tabelle 4-5: Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die Geschlechtsbestimmung

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
5xTBE- Puffer: 54g TRIS Base 27,5g Borsäure 20ml 0,5M EDTA-Lsg. Ad 1000ml Aqua dest.	Gelelektrophorese	Reagenzien zur Eigenherstellung, Carl Roth, Hamburg
0,5x TBE- Puffer 100ml 5x TBE-Puffer 900ml Aqua dest.	Gelelektrophorese	eigene Herstellung
Bromphenolblau	Herstellung des <i>loading dyes</i>	Carl Roth, Karlsruhe
Cap Strips	Verschluss der 96 well Platten	Eppendorf, Hamburg
dNTP Set , <i>molecular biology grade</i>	Polymerasekettenreaktion	Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Eagle Eye II</i>	Visuelle Auswertung der Gelelektrophorese	Stratagene, La Jolla, USA
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Herstellung des <i>loading dye</i>	Carl Roth, Karlsruhe
Eppendorf <i>Research</i> Pipette (1-10µl)	Pipettierung der DNA	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf <i>Research</i> Pipette (10-100µl)	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf, Hamburg
Ethidiumbromidlösung 10mg/ml	Sichtbarmachung der DNA durch Interkalation	Bio-Rad, Hercules, USA
Glycerin	Herstellung des <i>loading dyes</i>	Carl Roth, Karlsruhe
<i>Loading dye</i> 4g Glycerin 100µl 0,5M EDTA 10mg Bromphenolblau 10mg Xylencyanol Ad 15ml Aqua dest.	Gelelektrophorese	Reagenzien zur Eigenherstellung, Carl Roth, Hamburg
Magnesiumchloridlösung 1M	Herstellung des PCR-Puffers	Sigma Aldrich Chemie, Steinheim
<i>Mastercycler Gradient</i>	Thermocycler	Eppendorf GmbH, Hamburg
Mikrotiterplatte 96 well, <i>semi-skirted</i>	Polymerasekettenreaktion	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
PCR-Puffer 500µl 10x Puffer pH=8,5 350µl 59mM MgCl ₂ 150µl Aqua dest.	Polymerasekettenreaktion	Reagenzien zur Eigenherstellung, Carl Roth, Hamburg
<i>Power Pac 300</i>	Stromgeber für die Elektrophorese	Bio-Rad, Hercules, USA
Precisa 1620C	Analysenwaage	Pesa Waagen GmbH, Steinhofen
Primer	Polymerasekettenreaktion	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Privileg 9024E Mikrowelle	Erhitzung der Agarose-Puffer- Lösung	Quelle GmbH, Fürth
Taq DNA Polymerase (<i>recombinant</i>) 1U/l	Polymerasekettenreaktion	Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Wide mini sub cell</i>	Elektrophoresekammer	Bio-Rad, Hercules, USA
Xylencyanol	Herstellung des <i>loading dyes</i>	Carl Roth, Karlsruhe

Die auf 50ng/µl äquilibrierten DNA- Lösungen wurden für die Genotypisierung in 96 well plates (Firma ABgene, Hamburg) pipettiert. Dabei wurden immer 93 individuelle

Proben- DNAs, eine Blindprobe und eine Kontroll- DNA auf einer Platte kombiniert. Um das Fehlerrisiko zu minimieren, wurde nach Fertigstellung aus jeder Platte direkt eine Geschlechtsbestimmung aller Proben durchgeführt. Dabei war für jede Platte ein individuelles Muster an weiblichen und männlichen DNAs zu erwarten, welches exakt mit dem Ergebnis der Geschlechtsbestimmung übereinstimmen musste.

Für die Geschlechtsdeterminierung wurde eine Besonderheit des humanen Amelogeningens genutzt. Dieses Gen ist auf den Geschlechtschromosomen lokalisiert, und existiert als AMELX auf dem X-Chromosom und als AMELY, dem homologen Gen auf dem Y-Chromosom. Frauen besitzen demnach zwei identische Kopien des AMELX- Gens, während Männer jeweils eine Kopie der Gene AMELX und AMELY aufweisen.

Beide Gene unterscheiden sich unter anderem in der Sequenz des Intron 1, so dass hier eine Unterscheidung der Geschlechter mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) möglich wird. Hierzu wurde ein Primerset entworfen, das spezifische Produkte für AMELX und AMELY hervorbringt (Tabelle 4-6).

Tabelle 4-6: Primersequenzen für die Geschlechtsbestimmung

Primer	Sequenz
amelx-f	CAC AAA CAA TGG CTC CAT CC
amely/x-r	TCC CCA TTT CTT GAT GGT TC
amely-f	TCC TCA ACT TGT TCA GTT TCC A

Diese Primer (Firma Invitrogen, Karlsruhe) wurden lyophilisiert geliefert und zunächst mit destilliertem, autoklaviertem Wasser eine Stammlösung mit einer Konzentration von 100pM erstellt. Diese Stammlösungen wurden dann zu einem Primermix kombiniert, der direkt in der PCR eingesetzt wurde (Tabelle 4-7).

Tabelle 4-7: Zusammensetzung des Primermix

Primer	Volumen
amelx-f (100pM)	10 µl
amely/x-r (100pM)	10 µl
amely-f (100pM)	20 µl
Wasser	60 µl

Für die PCR wurde jeweils 1µl Proben- DNA auf Eis in einer 96 well Mikrotiterplatte (Firma Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf) vorgelegt und mit jeweils 25µl Mastermix gemischt (Tabelle 4-8).

Tabelle 4-8: Zusammensetzung des Mastermix für die PCR zur Geschlechtsbestimmung

Komponente	Volumen eine Reaktion
Primer Mix	1,00µl
dNTP Mix (10mM each)	1,00µl
H ₂ O	17,00µl
PCR- Puffer	5,00µl
Taq DNA Polymerase	1,00µl

Das Reaktionsgemisch wurde in einem *Mastercycler Gradient* Thermocycler (Firma Eppendorf, Hamburg) unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

1. 95°C für 5min
 2. 95°C für 30sec
 3. 56°C für 30sec
 4. 72°C für 1min
 5. 72°C für 10 min
 6. 4°C *forever*
- } 45 Zyklen

Während der reverse Primer *amely/x-r* sowohl an der Gensequenz von AMELX als auch AMELY hybridisieren kann, binden die beiden *forward* Primer *amelx-f* und *amely-f* jeweils nur an eines der beiden homologen Amelogeningene. Somit entstehen zwei unterschiedlich lange PCR- Produkte (Tabelle 4-9).

Tabelle 4-9: PCR-Produkte der Geschlechtsbestimmung mit dem Amelogeningen

Primerset	Produktlänge	Produktsequenz
<i>amelx-f</i> und <i>amely/x-r</i> (X- Chromosom)	145bp	CACAAACAATGGCTCCATCC TTCTTACTAGCAATAGACTAATG TAGATTATGTGTGTTTTATGGAGCATTACATCCATGTTTC AGAAGAGATAAGAAAAGTGGATGTTGACTTACATTTCA GAACC ATCAAGAAATGGGGA
<i>amely-f</i> und <i>amely/x-r</i> (Y- Chromosom)	250bp	TCCTCAACTTGTTTCAGTTTCCA ACCTAAATGAAAAATGATTTTA TGCTAACTACTGTGACTCCAAAACAATAAAATGGACTGAGAAC TTGAAATCAAATAAGAAAAATTAACCTTGCAAAGAATATCCTA CTTGCTACCCACAGACAAATGCAGATTATGTTTTTTAAGGCAC TTTATGGTGACATGTTTGAGAAGAGATGAGAAAAGCACTTG CTGATTTTCATTTCA GAACCATCAAGAAATGGGGA

(Primersequenzen gelb unterlegt, für den reversen Primer ist jeweils die komplementäre Sequenz markiert)

Zur Auswertung der PCR wurde eine Gelelektrophorese eingesetzt. Da DNA sowohl unter physiologischen als auch unter PCR- Bedingungen als Polyanion vorliegt, wandern DNA- Moleküle unter Einfluss von Gleichstrom in Richtung Anode. Bei der

Gelelektrophorese kann die DNA mit interkalierenden Farbstoffen, wie Ethidiumbromid, versetzt und so unter UV- Licht sichtbar gemacht werden. Als Matrix für die DNA- Moleküle wurde ein Agarosegel mit definierter Agarosekonzentration verwendet.

Für die Auswertung der Amelogenin- PCR wurden 4g Agarose (Firma Carl Roth, Karlsruhe) zusammen mit 200ml 0,5x TBE- Puffer (eigene Herstellung) bei 600 Watt für 4min in einer Mikrowelle erhitzt und so eine 2%ige Lösung hergestellt. Nach einer Abkühlzeit von etwa 10min wurden 2µl Ethidiumbromidlösung (Bio-Rad, Hercules, USA) zugesetzt und die noch heiße Lösung nach gründlichem Mischen in eine Elektrophoresekammer (Bio-Rad, Hercules, USA), die zuvor mit Seitenabdichtungen und Gelkämmen präpariert wurde, gegossen. Nach abgeschlossener Polymerisation wurden die Abdichtungen und Kämmen entfernt, so dass ein Gel mit definierter Größe und Geltaschen vorlag. Das Gel wurde in der Kammer mit 0,5x TBE-Puffer überschichtet und in jede Geltasche wurden jeweils 20µl des mit 5µl Ladepuffer versehenen PCR- Produktes einpipettiert. Der Ladepuffer ist glycerinhaltig, wodurch die Dichte der PCR- Ladepuffer- Mischung erhöht wird und somit auf dem Boden der Geltasche sinkt.

Die Elektrophoresekammer wurde an einen Stromgeber (Bio-Rad, Hercules, USA) angeschlossen und die Elektrophorese bei 100mV Gleichspannung und 400mA Stromstärke für 22min bei Raumtemperatur durchgeführt.

So konnte eine Auftrennung der PCR- Produkte in zwei Banden erreicht werden, welche im Anschluss unter einer UV- Licht Quelle (Firma Stratagene, La Jolla, USA) sichtbar gemacht und ausgewertet werden konnten. Hierbei ergaben sich bei Vorliegen des männlichen Geschlechts zwei Banden, wohingegen bei weiblichem Geschlecht nur eine Bande sichtbar war.

4.5 Prinzip der Hochdurchsatzgenotypisierung mittels MALDI- TOF Massenspektrometrie

Die Genotypisierung erfolgte mit einer auf MALDI- TOF- Massenspektrometrie-basierenden Methode. Massenspektrometrische Verfahren zur Analyse niedermolekularer Substanzen sind schon seit dem letzten Drittel des vorangegangenen Jahrhunderts gebräuchlich. Aber erst durch die Einführung der matrixgestützten Massenspektrometrie (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*, MALDI) durch Karas und Hillenkamp (Karas und Hillenkamp, 1988) wurden größere und empfindlichere Biopolymere zugänglich.

Haff und Mitarbeiter entwickelten den PinPoint Assay, eine Methode der Einzelbasenverlängerung, mit der sie SNPs mit MALDI- TOF genotypisieren konnten (Haff und Smirnov, 1997). Für die Genotypisierung wurden Extensionsprimer eingesetzt, die unmittelbar 5'- vor dem polymorphen Locus hybridisierten. Das aufgereinigte PCR- Produkt wurde dazu zusammen mit den Extensionsprimern, einer thermophilen DNA- Polymerase und den vier Didesoxynucleotiden einer zyklischen Reaktion zugeführt und so die Extensionsprimer genau um die komplementäre Base des polymorphen Locus verlängert und mit MALDI- TOF MS die komplementären Allele des SNPs identifiziert. Die in dieser Arbeit verwendete iPLEX- Methode verfolgt dasselbe Prinzip der Einzelbasenverlängerung.

4.5.1 Der MALDI- Prozess

Eine Grundvoraussetzung für die matrixgestützte Laserdesorption ist der Einbau des Analyten in die Kristallstruktur der Matrix. Dabei wird der Analyt separiert und als „feste Lösung“ (*solid solution*) in den Matrixkristall inkorporiert (Beavis und Bridson, 1993). Heute sind viele Matrices für verschiedene MALDI-Anwendungen in Gebrauch, wobei diese einige grundlegende Eigenschaften aufweisen sollten:

- geringe Sublimationsneigung im Vakuum
- Absorption der eingestrahlten Laserwellenlänge
- Kristallisation im Matrix- Analytgemisch
- Toleranz gegen Verunreinigung

Mittlerweile wurden empirisch einige Verbindungsklassen ermittelt, die als Matrices besonders geeignet scheinen. Aufgrund der Notwendigkeit einer geringen

Flüchtigkeit handelt es sich oft um polare Verbindungen mit hohem Siedepunkt (Beavis und Chait, 1989). Außerdem wurde als wichtige Voraussetzung die Fähigkeit, protonierte Matrixmoleküle zu stabilisieren, angenommen, ein Umstand, der vor allem auf funktionelle Gruppen in ortho-Position zutrifft (Ehring et al., 1992). Zudem besitzen die meisten Matrizes einen aziden Wasserstoff in Form einer Hydroxy- oder Aminogruppe sowie eine Carbonylgruppe. Die in dieser Arbeit eingesetzte Matrix 3-Hydroxypicolinsäure (3- HPA) erfüllt diese Kriterien.

MALDI- Matrizes werden meist in 10000- bis 100000fachem Überschuss gegenüber dem Analyten eingesetzt. Oft werden die Matrixverbindungen noch mit Zusätzen vermischt, um die Spektrenqualität positiv zu beeinflussen. So haben sich für Oligonukleotidanalysen besonders Zusätze aus Ammonium- und Pyridiniumsalzen bewährt (Cheng und Chan, 1996).

Das Matrix- Analytgemisch wird auf einen inerten Probeneträger aufgetragen und dann der Bestrahlung durch die Ionenquelle ausgesetzt. Als Ionenquelle dient eine gepulste Laserbestrahlung von mehreren Nanosekunden (Jurinke et al., 2004), aufgrund der benutzten Wellenlängen sind hier Infrarotlaser und Ultraviolett laser zu nennen.

Unmittelbar nach dem Laserschuss kommt es zur Desorption, dem Herauslösen von Neutralteilchen aus der kondensierten Phase. Die Desorption wird dabei durch einen kurzen Laserimpuls mit hohem Energiegehalt eingeleitet, wobei der genaue Ablauf der Desorption nach wie vor unbekannt ist. Während der Desorption erfolgt die Desintegration des Matrix- Analytgemisches aus der kondensierten in die gasförmige Phase. Ob die Ionisation bereits beim Übergang in die gasförmige Phase abgeschlossen ist, oder erst in gasförmiger Phase erfolgt, ist noch nicht eindeutig belegt (Karas et al., 2007).

4.5.2 Die Flugzeitspektrometrie (TOF)

Die im MALDI generierten Ionen werden im Anschluss in einen Massenspektrometer überführt. Da während des MALDI- Prozesses hauptsächlich einfach geladene, unfragmentierte Ionen generiert werden, können ihre Massen recht unkompliziert und ohne komplexe Berechnungen aus den resultierenden Spektren ermittelt werden (Jurinke et al., 2004). Sehr oft werden zur Massenspektrometrie Flugzeitspektrometer (*Time of Flight*, TOF) benutzt. In TOF- Spektrometern werden die erzeugten Ionen

nach ihrem Verhältnis von Masse m (in Kilogramm [kg]) zu Ladung z (in Coulomb [C]) aufgetrennt (Guilhaus, 1995). Hierzu werden die Ionen zunächst beschleunigt, treten dann in eine feldfreie Driftstrecke ein und werden nach einer Flugzeit t_{ges} (in Sekunden [s]) detektiert, wobei die Flugzeit ab dem Laserbeschuss gemessen wird. Dabei weisen Ionen mit gleichen Verhältnissen aus Masse zu Ladung im Idealfall auch gleiche Flugzeiten auf. Die Beschleunigung der Ionen erfolgt in einem elektrischen Feld U . Die kinetische Energie E_{kin} der Ionen nach Durchlaufen der Beschleunigungsstrecke hängt hier von ihrer Ladung und der angelegten Beschleunigungsspannung ab:

$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 = z \cdot U$$

Die Geschwindigkeit der Ionen lässt sich wiedergeben durch die Gleichung:

$$v = \sqrt{\frac{2zU}{m}}$$

Mit der Flugstrecke L (in Metern [m]) ergibt sich so folgende Gesamtflugzeit:

$$t_{ges} = \frac{L}{v} = L \cdot \sqrt{\frac{m}{2zU}} = \frac{L}{\sqrt{2U}} \cdot \sqrt{m \cdot z} = k\sqrt{m/z} \quad \text{mit} \quad k = \frac{L}{\sqrt{2U}}$$

4.6 Assay Design

4.6.1 Auswahl geeigneter SNPs

Die in dieser Arbeit behandelten SNPs wurden zusammen mit etwa 1000 anderen SNPs im Rahmen einer großen Fall- Kontroll- Studie genotypisiert. Hierbei wurde das Ziel verfolgt, möglichst informative SNPs zu genotypisieren. Neben einer ausführlichen Recherche nach bereits publizierten SNPs in der *PubMed* Datenbank (NCBI, 2009) wurden folgende Kriterien mit abnehmender Priorität bei der SNP-Auswahl beachtet:

1. Exonische, kodierende SNPs, die zu einem Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz führen
2. funktionelle SNPs in der Promotorregion des betreffenden Gens
3. exonische SNPs, die zu einer „stillen Mutation“ führen, also keinen Aminosäureaustausch bewirken

Außerdem wurde versucht, die Gene mit Hilfe von *haplotype tag* SNPs (htSNPs) möglichst komplett abzudecken. htSNPs sind Polymorphismen in einer Genomregion, die in hohem *linkage disequilibrium* (Kopplungsungleichgewicht, LD) mit anderen SNPs in dieser Region liegen (International HapMap Consortium., 2005). Sind die Allele der htSNPs bekannt, kann auf alle Allele der mit diesen SNPs im LD liegenden Polymorphismen rückgeschlossen werden. So kann mit einer minimalen Anzahl an genotypisierten SNPs ein maximaler Informationsgehalt erzielt werden. Im Idealfall wurden htSNPs mit einem LD von 1,0 mit möglichst vielen weiteren Polymorphismen und einer minoren Allelfrequenz (MAF) von mindestens 0,25 selektiert.

Die htSNPs wurden mithilfe der Tagger Methode (de Bakker et al., 2005) bestimmt. Hierzu wurde die entsprechende Genomregion ausgewählt und auf der Internetpräsenz des internationalen HapMap Projektes (International HapMap Consortium., 2005) die htSNPs für die CEU- Population nach der *tagger pairwise* Methode, definiert durch einen R^2 - Grenzwert von 1,0 und eine minore Allelfrequenz (MAF) von 0,25 exportiert (Tabelle 4-10).

Tabelle 4-10: Exportkriterien für die tagSNP-Auswahl

Kriterium	Konfiguration
Population	CEU
<i>Pairwise Method</i>	Tagger Pairwise
<i>RSquare cutt off</i>	1,0
MAF cut off	0,25

Für die vollständige Abdeckung des Gens wurden die SNPs auch in Hinblick auf ihre physikalische Position ausgewählt. Dazu wurde überprüft, ob die funktionellen, exonischen und htSNPs in Bezug auf ihre chromosomalen Position gleichmäßig verteilt waren. Im Falle von größeren Lücken im Gen wurden noch weitere, intronische SNPs mit einer MAF von mindestens 0,25 mit in das Design übernommen, um diese Lücken zu schließen.

4.6.2 Multiplex Assay Design

Für das *assay design* waren verschiedene Angaben zu den ausgewählten SNPs nötig, unter anderem die SNP- Allele und die flankierenden Sequenzen in 5´- und 3´-Richtung. Alle hierfür nötigen Informationen wurden über die Datenbank des *National Centre of Biotechnology Information* (NCBI, 2009) und die *CHIP Bioinformatic* Datenbank (SNPper, 2009) eingeholt.

Die in die Genotypisierung mit eingeschlossenen SNPs wurden mit der Software *AssayDesign* 3.1 (Firma Sequenom, San Diego) zu Multiplexen zusammengestellt. Dieses Programm entwirft für jeden SNP ein Primersset aus zwei PCR- Primern und einem Extendprimer und ermittelt die optimale Plexzusammenstellung.

Abbildung 4-1 Eingabemaske der *Assay Design* Software

Für den Import in die Design Software wurde eine Tabulator- getrennte Textdatei erstellt, die in drei Spalten folgende Informationen enthielt:

- Spalte 1: rsNummer
- Spalte 2: (optional) SNP- Group (sollte aus einem Set von SNPs nur ein SNP ins Design übernommen werden, dann wurde diesen die gleiche Gruppennummer zugeteilt)
- Spalte 3: SNP- Allele in eckigen Klammern und die flankierenden Sequenzen (+/- 200 Basen um den SNP) in Großbuchstaben.

In dieser Form wurden alle SNP-Informationen zusammengestellt und in die Software importiert. Für den eigentlichen Design- Vorgang wurden die in Tabelle 4.11 zusammengefassten Einstellungen verwendet (Tabelle 4-11).

Tabelle 4-11: Plexkriterien für das iPLEX *assay design*

Assay Design	Wert1	Wert2	Wert3
SBE Stop Mix	iPLEX		
PCR Primer Length (bp)	Min: 18	Opt: 20	Max: 24
PCR-Primer Tm	Min: 30°C	Opt: 60°C	Max: 80°C
Multiplex Level	Min: 1		Max: 36
Amplicon Length (bp)	Min: 80	Opt: 100	Max: 120
Sequence Annotation	Scan and Restrict		
Tags	hME-10		
Extend Primer Tm	Min: 45°C	Max: 100°C	
Extend Primer Length (bp)	Min: 15	Max: 30	
Allow non-templated 5'bases	5		
Mass Range (Da)	Lower Limit: 4300	Upper Limit: 9000	
Min Peak Separation Analytes (Da)	30		
Min Peak Separation ME Primer (Da)	0		

4.7 Multiplex- Polymerase Kettenreaktion

Tabelle 4-12 Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die Multiplex- PCR

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
<i>Centrifuge</i> 5810 R	Zentrifugation der 96- und 384- <i>well</i> Platten	Eppendorf, Hamburg
Dan Klorix	Verhinderung von DNA-Kontaminationen	Colgate-Palmolive, Hamburg
dNTP Set, 100mM	Multiplex- PCR	ABene, Hamburg
<i>Easy Peel Heat Sealing Foil</i>	Verschluss der 96- und 384- <i>well</i> Platten	ABgene, Hamburg
Eppendorf <i>Research</i> Pipetten	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf, Hamburg
e.T.I.P.S. Pipettenspitzen (0,5-20µl; 2-200µl; 50-1000µl)	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf, Hamburg
<i>Gene Amp PCR System</i> 9700	Multiplex-PCR	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Heat Sealer</i> ALPS-300	Verschluss der 96- und 384- <i>well</i> Platten	ABgene, Hamburg
<i>HotStar</i> Taq DNA Polymerase (5U/µl)	Multiplex-PCR	Qiagen, Hilden
MgCl ₂ , 25mM	Multiplex-PCR	Qiagen, Hilden
MICROLAB MPH 96	Pipettierroboter	Hamilton, Reno, USA
Mikrotestplatte 96 K	Pipettierung des Multiplex-PCR- Mastermix	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettierwanne für Mehrkanalpipetten	Pipettierung des Multiplex-PCR- Mastermix	Firma Ratiolab, Dreieich
PCR-Puffer 10x	Qiagen, Hilden	Qiagen, Hilden
<i>Purelab Ultra</i>	Reinstwasseranlage	ELGA, Celle
Spritzen, 50ml	Wasserfiltration	BD Bioscience GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter, 0,22µM	Wasserfiltration	Qualilab, Olivet, Frankreich
<i>Thermo Fast 384 Well Plate</i>	Multiplex- PCR	ABgene, Hamburg

Um einen SNP mit einem MassEXTEND Primer zu analysieren, musste zunächst die den SNP flankierende genomische Sequenz amplifiziert werden. Nur so konnte die Zielsequenz in ausreichender Konzentration für die Extendprimer zur Verfügung gestellt werden. Dazu wurden jeweils die SNPs eines Plexes zeitgleich in einer modifizierten PCR prozessiert. Diese Reaktion wird auch als *SNP Capture* bezeichnet (Sequenom, 2005). Im Vergleich zu Standard- PCRs wird für die *SNP Capture* Methode mehr DNA (12,5ng genomische DNA pro Plex) und mehr Polymerase eingesetzt (Oeth et al., 2005). Da doppelsträngige DNA vermehrt wird, kann der Extendprimer entweder für den Sinnstrang oder für den Gegensinnstrang entworfen werden. Diese Flexibilität ist eine wichtige Voraussetzung für das Multiplexen.

Für die *SNP Capture* Reaktion wurden PCR- Primer mit zur Zielsequenz inkomplementären Basen am 5'- Ende der Primer entworfen. Diese *tag*- Sequenzen

haben zwar bei der initialen Amplifizierung noch keinen Einfluss, sind jedoch in den weiteren Zyklen hilfreich für die Anlagerung der nächsten PCR- Primer. Außerdem stellten diese *tag*- Sequenzen sicher, dass die Massen der Primer eine Größe erreichen, die außerhalb des Massenfensters des Spektrometers liegt (Sequenom, 2005). Beim Design der Primersets wurde darauf geachtet, dass alle Amplikons eines Plexes etwa gleich lang sind, da sonst ein Ungleichgewicht zwischen der Amplifizierung ungleich langer PCR- Produkte hätte entstehen können. Die optimale Amplikonlänge wurde bei 100bp festgelegt, inklusive der zehn Basen langen *tag*-Sequenzen (Tabelle 4-13).

Tabelle 4-13: Verwendete PCR- Primer für die untersuchten HTR2A- SNPs

SNP	Chromosomale Position	Forward PCR-Primer	Reverse PCR-Primer
rs7333412	46301361	XTATTTGAAATCCATCTAGAG	XAGGTGCCAAGGATAATCTGG
rs6314	46307035	XTTCACTCCGTCGCTATTGTC	XGCAAGATGCCAAGACAACAG
rs6308	46307049	XGCAAGATGCCAAGACAACAG	XTTCACTCCGTCGCTATTGTC
rs1923884	46319837	XATCTTGGCCTTGCTCTTGTC	XAAAGTTGTTTGGGCCTCGTG
rs2296972	46326472	XCTGGAGTTGACAGGAGGATC	XCTGAGGAACACCTAAGCTTG
rs2770296	46338561	XCACCATTTACATTCCTCAGC	XTCTGCAGAGCTATCCTGTAC
rs582385	46343995	XTTGTTTCAGAGGCTTGCTGAC	XTTGATAAATCTTTCCAGCTC
rs594242	46356053	XCATTATCAGTGTGGTCACTTC	XAGCTCCACACAGAAAACAC
rs4941573	46362858	XCCCTGATACACTGTCCATAG	XAAGATGGTTGACCTTCCCAG
rs1805055	46367969	XTCAGAAGTGTTAGCTTCTCC	XTGAGCTCAACTACGAACTCC
rs4142900	46371551	XCCAGGGAGAACTTAGAACC	XTTACATTTCCCTCTGCTATC

X= ACGTTGGATG (*mass tags*)

Das im Folgenden verwendete destillierte Wasser wurde aus einer Reinstwasseranlage (Firma ELGA, Celle) entnommen, mittels einer 50ml Spritze (Firma BD Bioscience, Heidelberg) aufgezogen und dann über einen Spritzenvorsatzfilter mit Porengröße 0,22µm (Firma Qualilab, Olivet) sterilfiltriert.

Für die SNP *Capture* Reaktion wurden die als 50ng/µl vorliegenden Arbeitslösungen um das Zehnfache auf eine Endkonzentration von 5ng/µl mit verdünnt. Dazu wurden mit Hilfe eines Pipettierroboters (Microlab MPH 96, Firma Hamilton) in 96 *well* Platten (Firma ABgene, Hamburg) 90µl destilliertes, sterilfiltriertes Wasser pro Vertiefung vorgelegt und dann mit einer 12- Kanalpipette (Firma Eppendorf, Hamburg) jeweils 10µl der Arbeitslösung einpipettiert und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt. Die Platten wurden bei nicht sofortigem Gebrauch mit einer Folie (*Easy*

Peel Heat Sealing Foil, Firma ABgene, Hamburg) verschweißt (*Heat Sealer*, Firma ABgene, Hamburg) und bei -20°C gelagert.

Die für die *SNP Capture* Reaktion verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) HPLC- gereinigt auf Matrixplatten im 96er Format in gefrorenem Zustand geliefert. Die Primer wurden vor Gebrauch bei Raumtemperatur aufgetaut, beschriftet und vorsichtig auf einem Vortex Genie2- Gerät gemischt (Firma Scientific Industries, New York).

Die weiteren für den Mastermix benötigten Reagenzien, 10x PCR- Puffer (Firma Qiagen, Hilden), 25mM MgCl₂ (Firma Qiagen, Hilden), 25mM dNTP Mix (Firma ABgene, Hamburg), wurden ebenfalls bei Raumtemperatur aufgetaut und die benötigten Mengen zusammen mit den Primern in einem 15ml Röhrchen (Firma Sarstedt, Nürnberg) vorgelegt und gemischt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die bei -20°C gelagerte Taq- Polymerase (Firma Qiagen, Nürnberg) vorsichtig durch Umkippen gemischt und abzentrifugiert. Die erforderliche Menge an Polymerase wurde zu dem Mastermix gegeben, und dieser vorsichtig durch Umkippen gemischt und abzentrifugiert (Tabelle 4-14).

Der Mastermix wurde in eine Pipettierwanne (Firma Ratiolab, Dreieich) gegeben und mit einer Mehrkanalpipette (Firma Eppendorf, Hamburg) auf eine Mikrottestplatte 96K (Firma Sarstedt, Nürnberg) aliquotiert. Mithilfe eines Pipettierroboters (Firma Microlab, Hamilton) wurden aus dieser 96 Platte jeweils 3µl Mastermix in die Vertiefungen einer 384 *well* Platte (Firma ABgene, Hamburg) überführt (Tabelle 4-12).

Tabelle 4-14: : Eingesetzte Volumina und Konzentrationen der einzelnen Reagenzien in der Multiplex *SNP Capture* Reaktion

Reagenz	Konzentration in einer 5µl Reaktion	Volumen in einer Reaktion (incl. 25% Überhang)	Volumen für 384 Reaktionen (Incl. 25% Überhang)
Wasser	NA	1,850µl	888µl
10xPCR- Puffer	1,25x	0,625µl	300µl
MgCl ₂ 25mM	1,625mM	0,325µl	156µl
dNTP Mix, 25mM	500µM	0,100µl	480µl
Primer Mix, 500nM each	100nM	1,000µl	480µl
Hotstar Taq Polymerase, 5U/µl	0,5U/Reaktion	0,100µl	48µl
Total	NA	4,000µl	2400µl

Aus den im 96 *well* Format vorliegenden DNA- Lösungen wurden ebenfalls mit dem Pipettierroboter jeweils 2,5µl (12,5ng) DNA in die Vertiefungen der 384 *well*

Mastermixplatte überführt. Hierzu wurden die DNAs aus vier 96 *well* Platten in vier Pipettierschritten auf eine 384 *well* Platte vereinigt. Um DNA- Kontaminationen zu verhindern, wurden nach jedem Pipettierschritt alle der DNA exponierten Teile des Roboters mit 2%iger Hypochlorid- Lösung (Dan Klorix, Firma Colgate-Palmolive, Hamburg) behandelt.

Die so entstandenen Reaktionsplatten wurden abzentrifugiert, mit *Heat Sealing Foil* (Firma ABgene, Hamburg) verschweisst und in *Thermocyclern* (Firma Applied Biosystems, Foster City) weiter prozessiert:

SNP Capture -Programm:

- | | |
|--------------------|-------------|
| 1. 95°C für 5 min | } 45 Zyklen |
| 2. 95°C für 20 sec | |
| 3. 56°C für 30 sec | |
| 4. 72°C für 1 min | |
| 5. 72°C für 3 min | |
| 6. 12°C forever | |

4.8 Dephosphorylierung mit *Shrimp Alkaline Phosphatase*

Tabelle 4-15: Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die SAP- Reaktion

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
Centrifuge 5810 R	Zentrifugation der 96- und 384- <i>well</i> Platten	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf <i>Research</i> Pipetten	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf, Hamburg
e.T.I.P.S. Pipettenspitzen (0,5-20µl; 2-200µl, 50-1000µl)	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf, Hamburg
<i>Gene Amp PCR System 9700</i>	Multiplex- PCR	Applied Biosystems, Foster City, USA
Mikrotestplatte 96 K	Pipettierung des Multiplex Extend-Mastermix	Sarstedt, Nümbrecht
Multimek Pipettierroboter	Zugabe des Extend-Mastermix zum PCR- Produkt	Beckmann, Fullerton, USA
Pipettierwanne für Mehrkanalpipetten	Pipettierung des Multiplex Extend-Mastermix	Ratiolab, Dreieich
<i>Purelab Ultra</i>	Reinstwasseranlage	ELGA, Celle
SAP-Buffer	Dephosphorylierung uninkorporierter dNTPs	Sequenom, San Diego, USA
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) Enzyme</i>	Dephosphorylierung uninkorporierter dNTPs	Sequenom, San Diego, USA
Spritzen, 50ml	Wasserfiltration	BD Bioscience GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter, 0,22µM	Wasserfiltration	Qualilab, Olivet, Frankreich

Um nicht inkorporierte dNTPs zu dephosphorylieren, wurde das Reaktionsprodukt aus der SNP *Capture* Reaktion mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP, Firma Sequenom, San Diego) behandelt. Diese Phosphatase arbeitet effektiv bei niedrigen Temperaturen und wird durch eine Erhitzung auf 85°C denaturiert und dauerhaft inaktiviert. Alle für die SAP- Behandlung nötigen Reagenzien wurden in einem 15ml Röhrchen (Sarstedt, Nürnberg) vorgelegt und gemischt, in einer Pipettierwanne (Firma Ratiolab, Dreieich) vorgelegt und mit einer Zwölfkanalpipette (Firma Eppendorf, Hamburg) auf eine Mikrottestplatte 96K (Firma Sarstedt, Nürnberg) aliquotiert (Tabelle 4-16).

Tabelle 4-16: Zusammensetzung des SAP Mastermix

Reagenz	Volumen für 1 Reaktion (incl. 25% Überhang)	Volumen für 384 Reaktionen
Wasser	1,530µl	734,4µl
10x SAP Buffer	0,170µl	81,6µl
SAP-Enzym	0,300µl	144,0µl
Total	2,000µl	960,0µl

Zu jedem der 5µl Reaktionsprodukte aus der SNP- *Capture* Reaktion wurden mit einem Multimek Pipettierroboter (Firma Beckmann, Fullerton) 2µl SAP- Mastermix gegeben, gemischt und abzentrifugiert und in einem Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City) zunächst bei 37°C für 40min inkubiert, und dann die SAP bei 85°C für 10min irreversibel inaktiviert.

SAP-Programm:

1. 37°C für 40 min
2. 85°C für 10 min
3. 4°C *forever*

4.9 Primerextensionsreaktion

Tabelle 4-17: Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die Multiplex Extend- Reaktion

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
<i>Centrifuge 5810 R</i>	Zentrifugation der 96- und 384- <i>well</i> Platten	Eppendorf GmbH, Hamburg
<i>Easy Peel Heat Sealing Foil</i>	Verschluss der 96- und 384- <i>well</i> Platten	ABgene, Hamburg
Eppendorf Research Pipetten	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf, Hamburg
e.T.I.P.S. Pipettenspitzen (0,5-20µl; 2-200µl, 50-1000µl)	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf, Hamburg
Gene Amp PCR System 9700	Multiplex Extend- Reaktion	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Heat Sealer ALPS-300</i>	Verschluss der 384- <i>well</i> Platten	ABgene, Hamburg
<i>iPLEX Buffer Plus</i>	Multiplex Extend- Reaktion	Sequenom, San Diego, USA
<i>iPLEX Enzyme</i>	Multiplex Extend- Reaktion	Sequenom, San Diego, USA
<i>iPLEX Termination Mix</i>	Multiplex Extend- Reaktion	Sequenom, San Diego, USA
Mikrotestplatte 96 K	Pipettierung des Multiplex Extend-Mastermix	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Multimek Pipettierroboter	Zugabe des Extend-Mastermix zum PCR-Produkt	Beckmann, Fullerton, USA
Pipettierwanne für Mehrkanalpipetten	Pipettierung des Multiplex Extend-Mastermix	Ratiolab, Dreieich
<i>Purelab Ultra</i>	Reinstwasseranlage	ELGA, Celle
Spritzen, 50ml	Wasserfiltration	BD Bioscience GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter, 0,22µM	Wasserfiltration	Qualilab, Olivet, Frankreich
<i>Thermo Fast 384 Well Plate</i>	Multiplex Extend- Reaktion	ABgene, Hamburg

In der anschließenden iPLEX- Reaktion wurden die MassExtend Primer um eine Base verlängert (Tabelle 4-17).

Tabelle 4-17: Verwendete Extendprimer für die untersuchten HTR2A- SNPs

SNP	Extendprimer	Mögliche Verlängerungen
rs7333412	ATCCATCTAGAGAATTTAAGAAAAC	A/G
rs6314	TCTTTAGAAGCCTCTTCAGAAT	A/G
rs6308	AAGAATGACTGCTCAATGGTTG	A/G
rs1923884	TGGTCACTGTTCTCGT	C/T
rs2296972	GGTGACAGGAGGATCAGCGATGT	A/C
rs2770296	AGCTGCTCTCTCCCCT	C/T
rs582385	TTGGTGTGAAACCCAACAGTAG	A/G
rs594242	TCAGTGTGGTCACTTCACTGCTTGC	C/G
rs4941573	CCTCCATAGTTTTACCCCAATA	A/G
rs1805055	AGTTAAAGTCATTACTGTAGAGCCTG	G/T
rs4142900	GAGAACTTAGAACCTCTCATTTT	G/T

Zur Generierung dieser Einzelbasenextensionsprodukte (*Single Base Extension*, SBE) wurden Didesoxynukleotide (ddNTPs) benutzt. Da die Massenunterschiede zwischen SBE- Produkten aus herkömmlichen ddNTPs mit 9-14Da zu gering sind, um sie im Spektrum sauber aufzulösen, erweisen sich diese für hohes Multiplexen als ungeeignet (Oeth et al., 2005) Deshalb werden für den iPLEX- assay massenmodifizierte ddNTPs eingesetzt (Oeth et al., 2005), die als Terminatoren in der MassExtend Reaktion dienen. Die Unterschiede zwischen den Terminatoren betragen so mindestens 16Da (Oeth et al., 2005) (Tabelle 4-18).

Tabelle 4-18: Massendifferenzen zwischen den vier eingesetzten massenmodifizierten ddNTPs

Terminator/ Massendifferenz	ddATP	ddCTP	ddGTP	ddTTP
ddATP	0	-24	16	55,9
ddCTP	24	0	40	79,9
ddGTP	-16	-40	0	39,9
ddTTP	-55,9	-79,9	-39,9	0

Da die Signalintensität im Spektrum umgekehrt proportional zur Masse des Ions ist, gilt: je länger das Extensionsprodukt, desto geringer ist sein Signal im Spektrum (Oeth et al., 2005). Um diesen Effekt zu kompensieren, wurden längere Extensionsprimer in höheren Konzentrationen eingesetzt (Oeth et al., 2005). Hierzu wurden die Extensionsprimer eines Multiplexes ihrer Länge und damit auch ihrer Masse nach in vier Gruppen eingeteilt und proportional zu ihrer Masse in höheren molaren Endkonzentrationen eingesetzt (7µM, 9,33µM, 11,66µM und 14µM).

Alle für den Reaktionscocktail benötigten Reagenzien, mit Ausnahme des iPLEX- Enzyms (Firma Sequenom, San Diego) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, gemischt und abzentrifugiert. Die benötigten Mengen an Wasser, iPLEX *Buffer Plus* (Firma Sequenom, San Diego), iPLEX *Termination Mix* (Firma Sequenom, San Diego) und Extensionsprimer (Firma Metabion, Martinsried) wurden in einem 15ml Röhrchen (Firma Sarstedt, Nürnberg) vorgelegt, auf einem Vortex2- Genie (Firma Scientific Industries, Bohemia) gemischt und abzentrifugiert. Unmittelbar vor Gebrauch wurde das bei -20°C gelagerte iPLEX- Enzym (Firma Sequenom, San Diego) vorsichtig durch Umkippen gemischt, abzentrifugiert und die erforderliche Menge zum Reaktionscocktail geben. Der iPLEX Reaktionscocktail wurde aus einer Pipettierwanne (Firma Ratiolab, Dreieich) mit einer Mehrkanalpipette (Firma

Eppendorf, Hamburg) in eine 96 well Platte aliquotiert und mit dem Multimek Pipettierroboter (Firma Beckmann, Fullerton) je 2µl Cocktail zu den mit SAP behandelten SNP *Capture* Reaktionsprodukten gegeben.

Tabelle 4-19: Eingesetzte Konzentrationen und Volumina für die iPLEX Reaktion

Reagenz	Konz./ 9µl	Volumen für eine Reaktion (incl. Überhang)	Volumen für 384 Reaktionen (incl. Überhang)
Wasser	NA	0,755µl	362,40µl
iPLEX Buffer Plus	0,222x	0,200µl	96,00µl
iPLEX Termination Mix	1x	0,200µl	96,00µl
Primer Mix (7µM bis 14µM)	0,625µM bis 1,25µM	0,804µl	385,92µl
iPLEX Enzym	1x	0,041µl	19,68µl
Total		2,000µl	960,00µl

Nach Zugabe des Reaktionscocktails wurden die Platten abzentrifugiert und im Thermocycler (Firma Applied Biosystems, Foster City) nach folgendem Schema prozessiert:

iPLEX- Programm:

1. 94°C für 30 sec
 2. 94°C für 5 sec
 3. 52°C für 5 sec
 4. 80°C für 5 sec
 5. 72°C für 3 min
 6. 4°C forever
-

4.10 Entsalzung der Extensionsprodukte

Tabelle 4-20: Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die Entsalzung der Extensionsprodukte

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
<i>Centrifuge 5810 R</i>	Zentrifugation der 96- und 384-well Platten	Eppendorf GmbH, Hamburg
<i>Clean Resin</i>	Entsalzung des Extensionsprodukts	Sequenom, San Diego, USA
<i>Dimple Plates</i>	Entsalzung des Extensionsprodukts	Sequenom, San Diego, USA
Multimek Pipettierroboter	Zugabe von Wasser zum Entsalzten Extensionsprodukt	Beckmann, Fullerton, USA
<i>Purelab Ultra</i>	Reinstwasseranlage	ELGA, Celle
Spritzen, 50ml	Wasserfiltration	BD Bioscience GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter, 0,22µM	Wasserfiltration	Qualilab, Olivet, Frankreich

Aufgrund ihres negativ geladenen Phosphatrückgrats liegen Nukleinsäuren unter Analysebedingungen als Polyanionen vor. Aus diesem Grund zeigen sie eine hohe Tendenz zur Adduktbildung mit vorhandenen Kationen (Jurinke et al., 2004). Besonders Kalium- und Natriumionen spielen hier eine Rolle, denn jedes Natriumion, das an ein Analytmolekül addiert, generiert ein zusätzliches, um 22Da schwereres Signal, ein K^+ -Ion erzeugt ein um 38Da schwereres Signal als das salzfreie Extensionsprodukt (Oeth et al., 2005). Somit kann die Bestimmung von A/C- (Massendifferenz: 24Da) und C/G- Heterozygoten (Massendifferenz: 40Da) erschwert oder ein Homozygoter fälschlicherweise als Heterozygoter interpretiert werden (Oeth et al., 2005). Deshalb ist eine möglichst quantitative Entsalzung der Analytlösung vor der Mischung mit der Matrix von hoher Bedeutung (Nordhoff et al., 1992; Nordhoff et al., 1993). Anwendungen, die eine Adduktbildung verhindern sollen, sind Kationenaustauscher in fester Phase (Tang et al., 1995) oder eine Behandlung der Analyten mit Kationenaustauscherharzen (Nordhoff et al., 1992). Pieles et al. machte die Beobachtung, dass die Zugabe von Ammoniumionen während der Matrixpräparation die Probleme mit Na^+ und K^+ reduzierte (Pieles et al., 1993). So liegen Ammoniumionen im Überschuss vor, und die Wahrscheinlichkeit, dass eine Adduktbildung mit Kalium oder Natrium erfolgt, ist vermindert. Ammoniumionen sind flüchtige Kationen, die als Ammoniak in der Gasphase freigesetzt werden und keine Addukte mit den Nukleinsäuren während der Desorption bilden (Jurinke et al., 2004).

Um eine quantitative Entsalzung zu erreichen, wurde den Extensionsprodukten *Clean Resin* (Firma Sequenom, San Diego) im Überschuss zugegeben. Das *Clean*

Resin ist ein effektiver Ionenaustauscher, der unter anderem Alkalimetallionen durch Ammoniumionen ersetzt.

Jede der 9µl Reaktionen wurde mit Hilfe einer *dimple plate* (Firma Sequenom, San Diego) mit 6mg *Clean Resin* versetzt und mit dem Multimek Pipettierroboter (Beckmann, Fullerton) 25µl sterilfiltriertes, destilliertes Wasser zugegeben. Die Platten wurden verschlossen und 10min in einen Rotor gespannt, wodurch sich das *Clean Resin* verteilen konnte und eine homogene Suspension als Voraussetzung für eine quantitative Entsalzung entstand. Im Anschluss wurden die Extensionprodukte bei 4000rpm für 5min zentrifugiert, so dass sich das Clean Resin am Boden der Wells absetzen und später die Messung nicht beeinflussen konnte.

4.11 Messung der Extensionsprodukte im MALDI-TOF Massenspektrometer

Tabelle 4-20: Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software für die Messung der Extensionsprodukte im MALDI-TOF-MS

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
<i>3 Point Calibrand</i>	Kalibrierung der Massenspektren	Sequenom, San Diego, USA
<i>AssayEditor 3.4.0.7</i>	Assayimport	Sequenom, San Diego, USA
FLEXControl	MALDI-Steuerung	Bruker Daltonics, Bremen
MassARRAY POINT <i>Nanodispenser</i>	Applikation der Extensionsprodukte auf SpectroCHIPs	Sequenom, San Diego, USA
MNL 200 Stickstofflaser	Massenspektrometrische Analyse der Extensionsprodukte	LTB Laser Technik, Berlin
Autoflex Massenspektrometer	Massenspektrometrische Analyse der Extensionsprodukte	Bruker Daltonics, Bremen
<i>Nitrogen Generator</i>	Stickstoffversorgung des Lasers	Parker Balston, Haverhill, USA
<i>PlateEditor 3.4.0.48</i>	Plattenzusammenstellung	Sequenom, San Diego, USA
<i>RT Workstation 3.4</i> , Chiplinker	Datenbankverlinkung	Sequenom, San Diego, USA
<i>SpectroAcquire 3.3.1.3</i>	MALDI- Steuerung	Sequenom, San Diego, USA
SpectroCHIPs	Probenträger mit <i>Matrixdroplets</i>	Sequenom, San Diego, USA
SpectroTARGET	Träger für SpectroCHIPs	Sequenom, San Diego, USA
<i>TyperAnalyzer 3.4.0.18</i>	Spektrenauswertung	Sequenom, San Diego, USA

4.11.1 Probenvorbereitung

Für die Messung der Extensionsprodukte in einem MALDI-TOF Massenspektrometer muss der Analyt auf einem geeigneten Probenträger mit Matrix vereinigt werden. In dieser Arbeit wurde hierzu die *dried droplet* Methode eingesetzt. Als Probenträger wurden Siliziumchips mit bereits aufpräparierten Matrixpunkte verwendet. Auf diesen SpectroCHIPS (Firma Sequenom, San Diego) sind 384 Matrixspots für die Analyten und 8 Calibrandenspots für einen Dreipunkt Kalibranden aufgebracht. Die Probenübertragung aus einer 384 *well* Platte auf einen SpectroCHIP erfolgte mit einem MassARRAY POINT Nanodispenser (Firma Sequenom, San Diego), ein Gerät mit Edelstahl*pins*, geschlitzten Nadeln aus Edelstahl, an denen durch Adhäsion und Kapillarkräfte ein bestimmtes Volumen an Analytlösung haften bleibt. Der 24-*pin*- Dispensierkopf taucht hierzu in 24 Vertiefungen einer 384 *well* Platte ein und nimmt Analytlösungen auf. Diese werden dann auf die Matrixpunkte eines SpectroCHIPS übertragen. Die Menge an Analytlösung, die hierbei auf einen Matrixspot übertragen wurde, konnte durch die Geschwindigkeit, mit der die *pins* auf einen SpectroCHIP auftrafen, kontrolliert werden. Üblicherweise werden mit diesem Verfahren etwa 0,5µl Analyt pro Matrixpunkt übertragen (Jurinke et al., 2004). Nach jedem Übertragungsschritt erfolgte eine intensive Reinigung der *pins* zunächst in einem Ethanol-, dann in einem Ultraschallbad. Vor dem erneuten Eintauchen in die folgenden 24 Analyten wurden die *pins* mit Druckluft getrocknet. Neben der Analytlösung wurde auch ein Kalibrand auf jeden SpectroCHIP aufgetragen. Dazu wurden acht Matrixpunkte mit einem Dreipunkt Kalibranden (*3 Point Calibrand*, Sequenom) durch eine Einzelpin benetzt. Dieser Kalibrand enthält drei definierte Substanzen mit bekannten Massen. Anhand des erhaltenen Kalibrandenspektrums wurden dann die Analytenspektren kalibriert. Unmittelbar nach dem *spotten* wurden die Chips auf ein SpectroTARGET (Sequenom, San Diego), einer Halterung aus schwarz beschichtetem, nicht spiegelndem Edelstahl aufgelegt und in das Massenspektrometer (Autoflex, Firma Bruker Daltonics, Bremen) eingeschleust.

4.11.2 Messung der Extensionsprodukte

Die eigentliche Genotypisierung wurde mit einem Autoflex MALDI- TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) durchgeführt. Hierzu wurden für jeden Chip alle nötigen Informationen zur Probandenbezeichnung, Massen der verlängerten und unverlängerten Extensionsprimer und zugehörigen Allelen in eine Datenbank eingespeist. Mithilfe des *AssayEditors* (Firma Sequenom, San Diego) wurden die Informationen zu den erwarteten Massen der Extensionsprodukte festgelegt, alle Angaben zu Position der einzelnen DNAs und der gemessenen SNPs konnten mithilfe des *PlateEditors* (Firma Sequenom, San Diego) zusammengeführt und so die zu messenden Chips in der Datenbank kreiert werden. Um eine Verbindung zwischen Datenbank und MALDI- TOF Massenspektrometer herzustellen und so die korrekte Zuordnung der Messergebnisse zu gewährleisten, wurde der *ChipLinker* (Firma Sequenom, San Diego) verwendet.

Die MALDI- TOF Messung wurde mit der *FlexControl* Software (Bruker Daltonics, Bremen) gesteuert. Hierbei konnten Parameter wie Laserenergie, Detektor- und Reflektorspannung überwacht und bei Bedarf modifiziert werden. Die Genotypisierung konnte in Echtzeit mit der *SpectroAQUIRE* (Firma Sequenom, San Diego) Software verfolgt werden.

4.12 Qualitätskontrolle

Bevor die Genotypen eines Polymorphismus als valide angesehen wurden, mussten sie eine Reihe von Qualitätskriterien erfüllen.

4.12.1 Manuelle Nacheditierung

Alle generierten Ergebnisse wurden anhand der Spektren mit der *TyperAnalyzer* (Firma Sequenom, San Diego) Software auf ihre Qualität gesichtet. Mit der *TyperAnalyzer* Software konnte für jeden untersuchten SNP ein *clusterplot* generiert werden, in dem alle Proben nach ihren Genotypen sortiert in Gruppen dargestellt wurden. Hierbei wurde ein *clusterplot* dann als qualitativ hochwertig und valide eingestuft, wenn die *cluster* der einzelnen Genotypen sauber voneinander getrennt und möglichst in sich geschlossen dargestellt wurden (Abbildung 4-3).

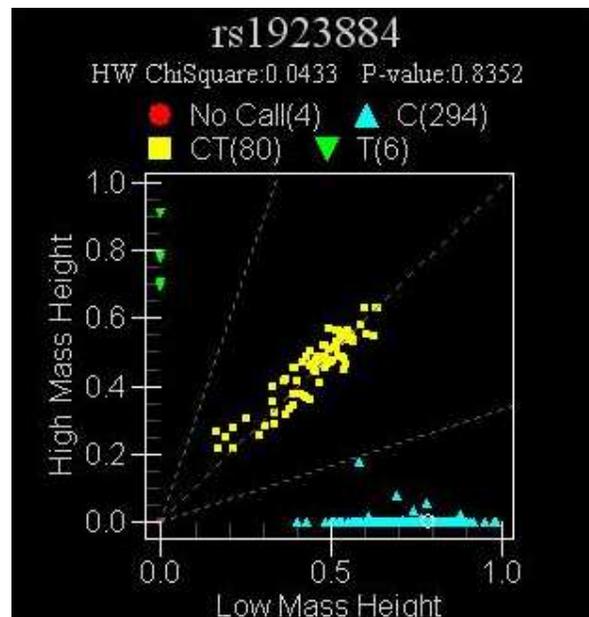


Abbildung 4-3: *Clusterplot* eines SNPs, der die Qualitätskriterien erfüllt. Die Genotypcluster sind in sich geschlossen und sauber getrennt. Blaue und grüne Punkte: Homozygote Genotypen, gelbe Punkte: heterozygote Genotypen.

Jede prozessierte DNA- Platte war mit mindestens einer Blindprobe versehen. Diese Blindproben wurden so auf den 96- well- Platten verteilt, dass ihre Position in einem Experiment einzigartig war. So konnte jede verwendete DNA- Platte anhand der Lage ihrer Blindprobe eindeutig identifiziert werden. Alle Blindproben wurden auf ihre Sauberkeit geprüft. Zeigten sich für einen SNP unklare Signale, so wurde dieser

verworfen. In der Regel zeigte sich in den Blindproben für jeden Assay nur das Signal des nicht verlängerten Extensionsprimers (Abbildung 4-4).

Außerdem konnten in diesen eventuelle Artefakte, die zum Beispiel zu einer Clusterverschiebung führen konnten, begutachtet und beurteilt werden.

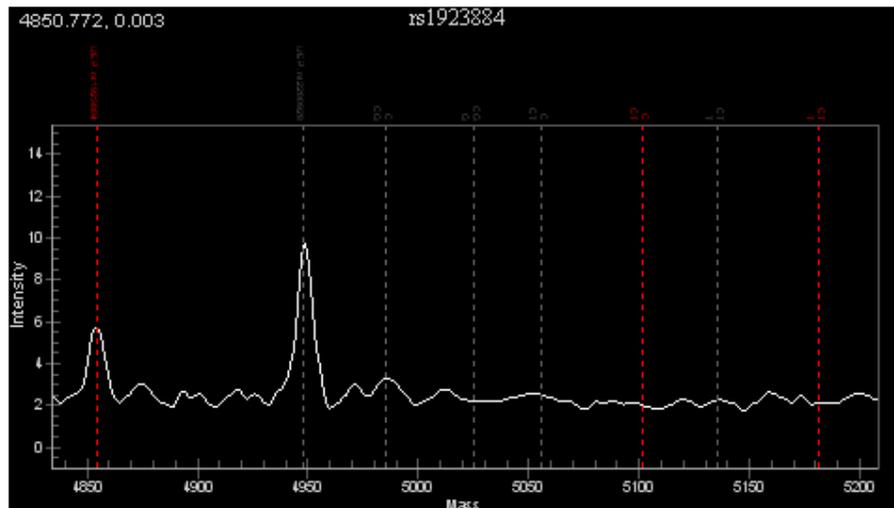


Abbildung 4-4: Typisches Spektrum einer Blindprobe für den SNP rs1923884. Die für diesen SNP möglichen Massensignale sind rot markiert. Während das Signal für den nicht verlängerten Extensionsprimer (4850Da) rechts deutlich erkennbar ist, finden sich an den Signalpositionen der beiden möglichen Allele (5100Da, 5180Da) links keine *peaks*. Das zweite starke Signal zeigt den nicht verlängerten Extendprimer eines anderen SNPs an.

Neben den Blindproben wurden für jeden SNP stichprobenartig echte *calls* aller drei Genotypen kontrolliert. Dabei sollte der Extendprimer möglichst quantitativ umgesetzt sein, beide heterozygote *peaks* sollten gleich hoch sein (Abbildung 4-5), und auch die Homozygoten mussten eindeutig erkennbar sein (Abbildung 4-6).

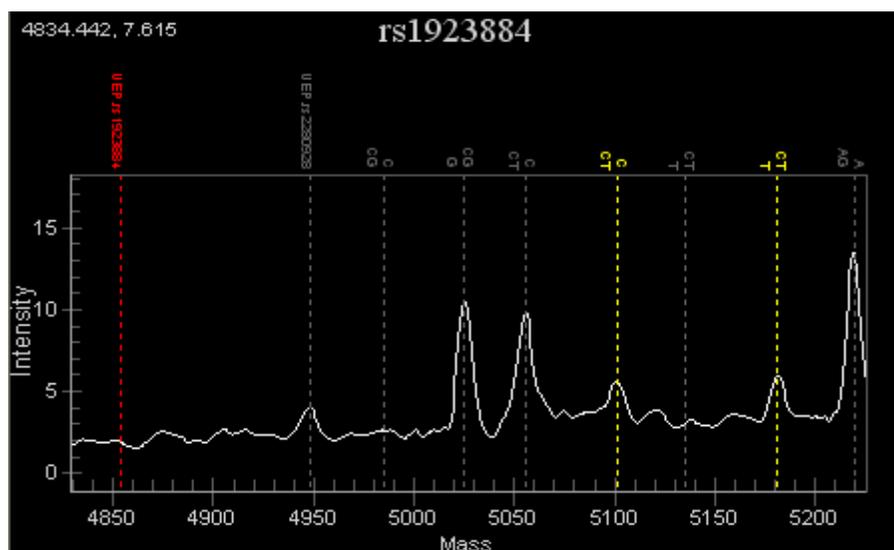


Abbildung 4-5: Typisches Spektrum eines Heterozygoten für den SNP rs1923884. Die für diesen SNP möglichen Massensignale sind farbig markiert. Während der Extendprimer (rot, 4850Da) vollständig umgesetzt wurde, sind die Signale für beide Allele (gelb, 5100Da, 5180Da) deutlich sichtbar.

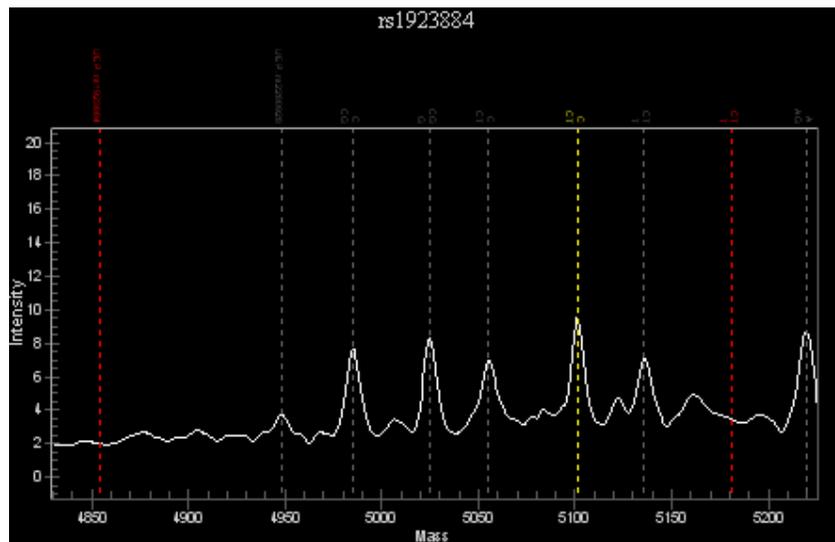


Abbildung 4-6: Typisches Spektrum eines Homozygoten für den SNP rs1923884. Die für diesen SNP möglichen Massensignale sind farbig markiert. Während der Extendprimer (links, 4850Da) vollständig umgesetzt wurde, ist das Signal für ein Allel (gelb, 5100Da) deutlich sichtbar.

Neben falschpositiven Blindproben führten auch diffuse *cluster* oder Artefakte und Nebensignale zur Verwerfung von Ergebnissen (Abbildung 4-7).

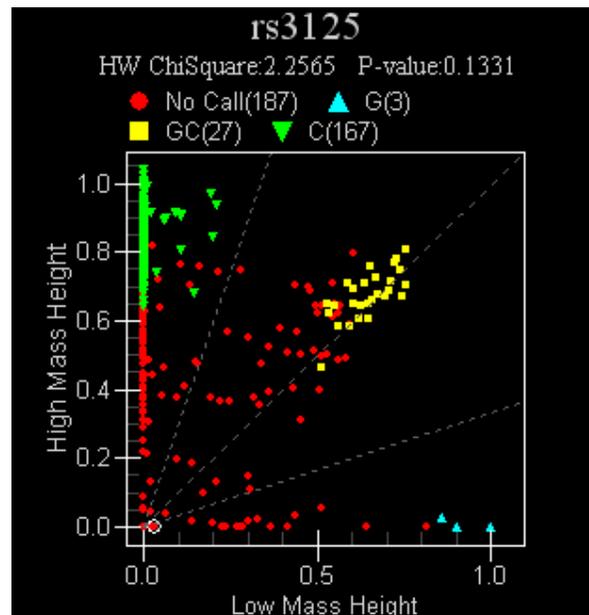


Abbildung 4-7: Diffuser *clusterplot*, der zum Ausschluss des SNPs rs3125 führte.

Alle auswertbaren Genotypen wurden in Form einer Excel- Tabelle exportiert und der weiteren Auswertung zugeführt.

4.12.2 Überprüfung der Callrate

Die in der ersten Sichtung als valide eingestuft Ergebnisse wurden in einer teilautomatisierten Prozedur auf weitere Qualitätsmerkmale untersucht. Dazu wurde die als Excel-Tabelle vorliegenden Einzeldateien eines Experiments zu einer größeren SPSS- Datei (*Statistical Package for Social Sciences*; SPSS 15.0; SPSS Inc., Chicago, USA) zusammengefasst, die alle Ergebnisse eines Plexes enthielt.

Für die weitere Auswertung wurden nur die Ergebnisse von Probanden miteinbezogen, die eine *plexcallrate* von 0,80 und höher aufwiesen. Nach Ausschluss der Probanden mit einer geringeren Rate an erfolgreich bestimmten Genotypen wurde der für jeden Polymorphismus der Anteil an erfolgreich bestimmten Genotypen im Verhältnis zur maximal möglichen Anzahl an Genotypen (SNP *callrate*) bestimmt. Für die weitere Auswertung wurden nur Polymorphismen mit einer SNP *callrate* über 0,95 verwendet.

4.12.3 Überprüfung der Duplikat- und CEPH- Genotypen

Auf jeder prozessierten DNA- Platte wurde eine Vertiefung mit einer Kontrollprobe belegt. Die Genotypen dieser Kontrollprobe mussten auf jeder Platte identisch sein. Bei inkonsistenten Ergebnissen wurden die entsprechenden SNPs verworfen.

Neben der Kontrollprobe wurden in jedem Plex die Referenzproben des *Centre d'Etude du Polymorphisme Humain* (CEPH) genotypisiert. Diese DNA- Sammlung besteht aus 30 Trios (Eltern und ein Kind) europäischen Ursprungs. Die Genotypen der Probanden sind für den Großteil aller bekannten SNPs in der Hapmap- Datenbank gesammelt und sind frei einsehbar (International Hapmap Consortium, 2009).

Die mit der iPLEX- Methode für die CEPH- Proben ermittelten Genotypen wurden mit denen der Hapmap- Datenbank abgeglichen. Dabei mussten von den 90 genotypisierten CEPH- Proben mindestens 89 Proben die erwarteten Genotypen aufweisen (98,9% Übereinstimmung). War die Übereinstimmung kleiner als 98,9%, so wurden die Ergebnisse für den betroffenen Polymorphismus verworfen.

4.12.4 Überprüfung des Hardy- Weinberg- Gleichgewichts

Für jeden SNP, der die angelegten Qualitätskriterien erfüllte, wurde das Hardy-Weinberg- Gleichgewicht überprüft. Dazu wurden die Genotypen einem Fisher- Test unterzogen und als Grenzwert wurde ein p- Wert von 0,05 festgelegt. Polymorphismen, die das Hardy- Weinberg- Gleichgewicht nicht erfüllten und einen p- Wert kleiner als 0,05 aufwiesen, wurden gesondert betrachtet.

4.13 Statistische Auswertung

Nach der ausführlichen qualitativen Kontrolle wurden die für valide befundenen Genotypen der eigentlichen statistischen Auswertung zu Allel- und Genotypverteilungen der HTR2A SNPs zugeführt. Diese erfolgte mit Hilfe der Software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS 15.0; SPSS Inc., Chicago, USA).

Es interessierten insbesondere die Unterschiede in der Allel- und Genotypverteilung zwischen Patienten und Kontrollen. Die Prüfung der Signifikanz der Unterschiede erfolgte mit dem Chi- Quadrat- Test.

Das Ausmaß des Kopplungsungleichgewichtes zwischen zwei Markern wurde mit Lewontins D' geschätzt (Lewontin 1964). Zusätzlich wurde der Chi- Quadrat- Test eingesetzt, um die Unabhängigkeit der Marker untereinander zu überprüfen.

Für alle statistischen Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ festgelegt, während $p < 0.1$ als Trend gewertet wurde.

4.14 Quantitative Genexpression mit MALDI- TOF

Die in dieser Arbeit verwendete Methode zur Quantifizierung der Genexpression kombiniert eine Multiplex- kompetitive PCR mit der iPLEX Einzelbasenverlängerung. Dabei wird zunächst Gesamt- RNA aus dem interessierenden Gewebe extrahiert und revers transkribiert. Anhand der bekannten cDNA- Sequenzen der zu untersuchenden Gene werden Kompetitoren entworfen, synthetische DNA- Moleküle, die bis auf eine einzige Base der Sequenz der jeweiligen Wildtyp- cDNA Sequenz entsprechen. Auf diese Weise wird ein synthetischer SNP und der Zustand zweier Allele simuliert. Die cDNA kann nun zusammen mit den Kompetitoren koamplifiziert werden. Dabei dient der Kompetitor, der in bekannter Konzentration vorliegt, als interne Kontrolle, denn anfängliche Unterschiede an Kompetitor- und cDNA- Konzentrationen bleiben auch während der Amplifizierung erhalten (del Mistro und Oeth, 2005). Die Kompetitoren können dabei in einer Verdünnungsreihe eingesetzt werden und so die Menge der vorhandenen cDNA mit der *best fitting* Methode bestimmt werden.

Durch die Prozessierung verschiedener bekannter Kompetitorkonzentrationen kann für jede der eingesetzten Konzentrationen die cDNA- Frequenz bestimmt werden. Die cDNA- Frequenz ist definiert als Verhältnis der Amplifizierung der Wildtyp- cDNA zur Gesamtamplifikation. Bei Vorhandensein gleicher Mengen an cDNA und Kompetitor ist somit eine cDNA- Frequenz von 0,5 zu erwarten (del Mistro und Oeth, 2005).

Die in dieser *real competitive* PCR generierten Amplikons dienen dann in der SBE Reaktion als Zielsequenz. Auch hier ist die Bindung und Verlängerung der Extensionsprimer direkt proportional zur Amplikonmenge. Das heißt, dass das Verhältnis von cDNA zu Kompetitor auch hier beibehalten wird.

Dieses Verhältnis zeigt sich ebenfalls in der Signalintensität im Massenspektrometer. Dabei ist die Fläche unter einem *Allelpeak* abhängig von der Menge an verlängerten Extensionsprimern. Somit kann die cDNA- Frequenz direkt aus dem Verhältnis der *Peakfläche* der Wildtyp- cDNA zu den *Gesamtpeakflächen* bestimmt werden. Anhand der real vorhandenen Datenpunkte und cDNA- Frequenzen kann durch Interpolierung der EC50- Wert und somit die ursprünglich vorhandene Menge an cDNA ermittelt werden. Der EC50- Wert gibt die effektive Konzentration an Kompetitor an, die nötig ist, um die Amplifizierung der Wildtyp- cDNA zu 50% zu inhibieren. Um die quantitative Genexpression mit MALDI- TOF MS zu etablieren,

wurde das *human normalization panel* (Sequenom, 2009) verwendet, ein Set aus 10 *housekeeping* Genen. *Housekeeping* Gene sind maßgeblich an der Aufrechterhaltung grundlegender Zellprozesse beteiligt, weshalb sie annähernd ubiquitär exprimiert werden.

4.14.1 Reverse Transkription

Tabelle 4-21: Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die Reverse Transkription

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
0,1M DTT	Reverse Transkription	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>5x First Strand Buffer</i>	Reverse Transkription	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Agilent 2100 Bioanalyzer</i>	Qualitätsbestimmung der RNA	Agilent Technologies, Böblingen
dNTP Set , <i>molecular biology grade</i>	Polymerasekettenreaktion	Fermentas, Vilnius, Litauen
Eppendorf <i>Research</i> Pipetten 1-10µl, 10-10µl, 100-1000µl	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf GmbH, Hamburg
Mastercycler Gradient	Thermocycler	Eppendorf GmbH, Hamburg
PCR Softstrips 0,2 ml farblos	Reverse Transkription	Eppendorf GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen RNase-frei Biosphere Quality Tips (1000 µl, 200 µl, 10 µl)	Pipettierung der Reagenzien	Sarstedt AG, Nümbrecht
Random Hexamer Primer	Reverse Transkription	Applied Biosystems, Foster City, USA
RNA 6000 Nano LabChips	Qualitätsbestimmung der RNA	
RNase H	Eliminierung der verbliebenen RNA	New England BioLabs, Ipswich, USA
RNase Inhibitor	Reverse Transkription	Fermentas, Vilnius, Litauen
<i>Super Script II Reverse Transkriptase</i>	Reverse Transkription	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Für die quantitative Genexpression wurde RNA aus immortalisierten humanen Lymphozyten isoliert. Da die Qualität des Ausgangsmaterials für quantitative Untersuchungen von großer Bedeutung ist, wurde die RNA hinsichtlich ihrer Degradation untersucht, und alle Proben wurden mittels eines *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Firma Agilent Technologies, Böblingen) quantifiziert und qualifiziert. Dabei wurde die gesamt- RNA unter Verwendung von *RNA 6000 Nano LabChips* (Firma Agilent Technologies, Böblingen) kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und detektiert. Anhand der resultierenden Elektropherogramme wurden die Mengen an 18S- und 28S- RNA quantifiziert und so die RNA-Qualität beurteilt. Letztlich wurden die sechs hochwertigsten RNAs ausgewählt.

Die cDNA- Synthese wurde mittels reverser Transkription mit je 100ng gesamt- RNA unter Verwendung der *Superscript II* Reversen Transkriptase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und *Random Hexamer Primern* (Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt. Zuerst wurden jeweils 100ng RNA in PCR- Streifen vorgelegt und mit

RNase-freiem Wasser ad 6,0 μl ergänzt. Zu dieser Vorlage wurden jeweils 14 μl Mastermix addiert (Tabelle 4-21).

Tabelle 4-21: Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkription

Komponente	Volumen eine Reaktion
<i>5x First Strand Buffer</i>	4,00 μl
0,1M DTT	2,00 μl
dNTP Mix, 10mM	1,00 μl
<i>Random Hexamer Primer</i>	1,00 μl
<i>Super Script II Reverse Transkriptase</i>	1,00 μl
RNase Inhibitor	0,50 μl
Aqua dest, RNase frei	4,50 μl

Die Inkubation erfolgte in einem *Mastercycler Gradient* (Firma Eppendorf, Hamburg) nach folgendem Programm:

1. 10min bei 25°C
2. 50min bei 42°C
3. 15min bei 70°C
4. 4°C *forever*.

4.14.2 Multiplex *Real Competitive* PCR

Tabelle 4-22: Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die multiplex *real competitive* PCR

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
Centrifuge 5810 R	Zentrifugation der 96- und 384-well Platten	Eppendorf GmbH, Hamburg
Dan Klorix	Verhinderung von DNA-Kontaminationen	Colgate-Palmolive, Hamburg
dNTP Set, 100mM	Real Competitive PCR	ABene, Hamburg
Easy Peel Heat Sealing Foil	Verschluss der 96- und 384-well Platten	ABgene, Hamburg
Eppendorf Research Pipetten	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf GmbH, Hamburg
e.T.I.P.S. Pipettenspitzen (0,5-20µl; 2-200µl, 50-1000µl)	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf GmbH, Hamburg
Gene Amp PCR System 9700	Real Competitive PCR	Applied Biosystems, Foster City, USA
Heat Sealer ALPS-300	Verschluss der 96- und 384-well Platten	ABgene, Hamburg
HotStar Taq DNA Polymerase (5U/µl)	Real Competitive PCR	Qiagen, Hilden
Kompetitoren	Real Competitive PCR	Metabion, Martinsried
MgCl ₂ , 25mM	Real Competitive PCR	Qiagen, Hilden
MICROLAB MPH 96	Pipettierroboter	Hamilton, Reno, USA
Mikrotestplatte 96 K	Pipettierung des Real Competitive PCR-Mastermix	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettierwanne für Mehrkanalpipetten	Pipettierung des Real Competitive PCR-Mastermix	Ratiolab, Dreieich
PCR-Primer	Real Competitive PCR	Metabion, Martinsried
PCR-Puffer 10x	Qiagen, Hilden	Qiagen, Hilden
Purelab Ultra	Reinstwasseranlage	ELGA, Celle
Spritzen, 50ml	Wasserfiltration	BD Bioscience GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter, 0,22µM	Wasserfiltration	Qualilab, Olivet, Frankreich
Thermo Fast 384 Well Plate	Real Competitive PCR	ABgene, Hamburg

4.14.2.1 Herstellung der Kompetitorplatte

Für die *real competitive* PCR wurde zunächst eine Kompetitorverdünnungsreihe mit relativ großen Abständen erstellt, um einen möglichst breiten Konzentrationsbereich abzudecken und eine grobe Vorstellung der Expression der einzelnen *housekeeping* Gene zu erhalten. Diese Information sollte in einem zweiten Experiment genutzt werden, um eine feinere Kompetitorverdünnungsreihe einzusetzen und so genauere Resultate zu erzielen. Dazu wurden zunächst alle Kompetitoren bei Raumtemperatur aufgetaut und gemischt (Tabelle 4-25).

Tabelle 4-25: Verwendete Kompetitoren für die *real competitive* PCR

Genname	Kompetitor
GAPDH-6	GTTGTCATGGATGACCTTGGCCAGGGGTGCTAAGCT T GTTGGTGGTGCAGGAGGC ATTGCTGATGATCT
UBC-4	ATCTGCATTGTCAAGTGACGATCACAGCGATCCACAAACA T GAACTGCGACCCAA ATCCCGGCTGCGACGGAA
HPTR1-4	ATCACTAATCACGACGCCAGGGCTGCGGGTCGCCATAACGG T GCCGGCCGGCG CGCGGGCTGACTGCTCAGGAGGAGGAAG
TBP-5	TGTTCTTCACTCTTGGCTCCTGTGCACACC T TTTTCCGAACTGAAAATCAGTGC CGTGGTTCGTGGCTCTCTTAT
ACTB-6	ATGCCACCATCACGCCCTGGTGCCTGGGGCGCCCCACGATGG T GGGGAAGAC GGCCCCGGGGGCATCGTCGCCCGCAAGCCGGCCTTGACAT
B2M-4	CTTACATGTCTCGATCCCACTTAACTATCTTGGGCTGTGACAAAGTCACA A GGTTC ACACGGCAGGCATACTCATCTTT
HMBS-7	TTCTCAGGGTGCAGGATCTGCCCCACCCGGTTGTGCC T GCCCATGCGCTGCAG GCCAGCTGTTGCCAGGATGATGGCACTGAACT
RPL13A-4	GTACCTGTTTAGCCACGATGGCCGCCAGGCGGCCAGG T GATGGCCTCGACCAT CAAGCACCAGGACCTGCACCT
SDHA-4	TGATCATGGCCGTGCCGTGCCAGTGTGGTGTGGGCAGACGTGC T GCTGAAGT AGGTGCGCCGTAGCCTCCTGTGGCAACAACAGT
YWHAZ-4	CGACAATCCCTTTCTTGTGCATCACCAGCGGCAACCTCAGCCAAG A AACGGTAGTA ATCTCCTTTCATTTTCAAATAGAAGACTTTGCTCTCTGCTTGTG

(polymorphe Base fett markiert), verwendet wurde das Sequenom *Normalization Panel* (Sequenom, 2005)

Alle Kompetitoren wurde in einem ersten Schritt zu einer äquimolaren Lösung vereinigt, in der jeder Kompetitor in einer Konzentration von 1µM vertreten war. Diese Lösung wurde nun mehrfach um den Faktor zehn mit Reinstwasser verdünnt, bis eine Endkonzentration von 100pM (1×10^{-11} M) erreicht war. Für die Verdünnungsreihe wurden in einer 96 *well* Mikrottestplatte (Firma Sarstedt, Nürnberg) in den Vertiefungen A1 bis G6 jeweils 90µl Wasser vorgelegt. In die Vertiefungen H1 bis H6 wurden darauf jeweils 100µl der vorbereiteten Kompetitorverdünnung einpipettiert. Mit einer Zwölfkanalpipette (Firma Eppendorf, Hamburg) wurden aus den Vertiefungen H1 bis H6 jeweils 10µl entnommen, in die Vertiefungen G1 bis G6 einpipettiert und mit dem vorgelegten Wasser gemischt. Diese Verdünnungsreihe um den Faktor 10 wurde bis in die Reihe B fortgeführt, Reihe A blieb ohne Kompetitor und diente als Negativkontrolle.

4.14.2.2 Herstellung der cDNA- Mastermixplatte

Für die im folgenden Schritt für jede cDNA angesetzten Mastermixe wurden alle Komponenten mit Ausnahme der Taq- Polymerase bei Raumtemperatur aufgetaut und gemischt. Dazu wurde zunächst eine Primerlösung erstellt, in der alle PCR-Primer in einer Konzentration von 1µM vorlagen (Tabelle 4-26).

Tabelle 4-26: Verwendete PCR- Primer für die *real competitive* PCR; ; X= ACGTTGGATG (MassTag)

Genname	Forward PCR-Primer	Reverse PCR-Primer
GAPDH-6	XGTTGTCATGGATGACCTTGG	XAGATCATCAGCAATGCCTCC
UBC-4	XTTCCGTCGCAGCCGGGATTT	XATCTGCATTGTCAAGTGACG
HPTR1-4	XCTTCCTCCTCCTGAGCAGTC	XATCACTAATCACGACGCCAG
TBP-5	XATAAGAGAGCCACGAACCAC	XTGTTCTTCACTCTTGGCTCC
ACTB-6	XATGCCACCATCACGCCCTG	XATGTGCAAGGCCGGCTTCG
B2M-4	XCTTACATGTCTCGATCCCAC	XAAAGATGAGTATGCCTGCCG
HMBS-7	XAGTTCAGTGCCATCATCCTG	XTTCTCAGGGTGCAGGATCT
RPL13A-4	XAGGTGCAGGTCCTGGTGCTT	XGTACCTGTTTAGCCACGATG
SDHA-4	XTGATCATGGCCGTGCCGTC	XACTGTTGTTGCCACAGGAGG
YWHAZ-4	XCACAAGCAGAGAGCAAAGTC	XCGACAATCCCTTTCTTGTC

Diese Primerlösung wurde nun zusammen mit den übrigen Komponenten verwendet, um für jede der sechs cDNAs einen Mastermix für die *real competitive* PCR zu erstellen (Tabelle 4-27).

Tabelle 4-27: Zusammensetzung des Mastermix für die *real competitive* PCR

Reagenz	Volumen für ein well	Volumen für 8 wells incl. Überhang
Wasser	1,750µl	17,50µl
10xPCR-Puffer	3,125µl	31,25µl
MgCl ₂ 25mM	1,625µl	16,25µl
dNTP Mix, 25mM	0,500µl	5,000µl
Primer Mix, 1µM each	2,500µl	25,00µl
cDNA	5,000µl	50,00µl
Hotstar Taq Polymerase, 5U/µl	0,500µl	5,000µl
Total	15,00µl	150,0µl

In eine weitere 96 well Mikrottestplatte (Firma Sarstedt, Nürnberg) wurden in die Vertiefungen A1 bis H1 jeweils 15µl Mastermix mit cDNA1 einpipettiert, in die wells A2 bis H2 jeweils 15µl des Mastermix mit cDNA2 pipettiert, etc.

4.14.2.3 Herstellung der Mastermix- Kompetitorplatte

Zu dieser Mastermixplatte wurden mit Hilfe einer Zwölfkanalpipette (Firma Eppendorf, Hamburg) aus der Kompetitorplatte jeweils 10µl aus den *wells* A1 bis A6 in die entsprechenden *wells* der Mastermixplatte übertragen und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt. Mit den Reihen B bis H wurde äquivalent verfahren, so dass sich folgende cDNA- Kompetitor- Kombinationen ergaben:

Tabelle 4-28: Zusammensetzung der Kompetitorverdünnungsplatte

Position	1	2	3	4	5	6
A	(blind) cDNA1	(blind) cDNA2	(blind) cDNA3	(blind) cDNA4	(blind) cDNA5	(blind) cDNA6
B	1×10^{-17} M cDNA1	1×10^{-17} M cDNA2	1×10^{-17} M cDNA3	1×10^{-17} M cDNA4	1×10^{-17} M cDNA5	1×10^{-17} M cDNA6
C	1×10^{-16} M cDNA1	1×10^{-16} M cDNA2	1×10^{-16} M cDNA3	1×10^{-16} M cDNA4	1×10^{-16} M cDNA5	1×10^{-16} M cDNA6
D	1×10^{-15} M cDNA1	1×10^{-15} M cDNA2	1×10^{-15} M cDNA3	1×10^{-15} M cDNA4	1×10^{-15} M cDNA5	1×10^{-15} M cDNA6
E	1×10^{-14} M cDNA1	1×10^{-14} M cDNA2	1×10^{-14} M cDNA3	1×10^{-14} M cDNA4	1×10^{-14} M cDNA5	1×10^{-14} M cDNA6
F	1×10^{-13} M cDNA1	1×10^{-13} M cDNA2	1×10^{-13} M cDNA3	1×10^{-13} M cDNA4	1×10^{-13} M cDNA5	1×10^{-13} M cDNA6
G	1×10^{-12} M cDNA1	1×10^{-12} M cDNA2	1×10^{-12} M cDNA3	1×10^{-12} M cDNA4	1×10^{-12} M cDNA5	1×10^{-12} M cDNA6
H	1×10^{-11} M cDNA1	1×10^{-11} M cDNA2	1×10^{-11} M cDNA3	1×10^{-11} M cDNA4	1×10^{-11} M cDNA5	1×10^{-11} M cDNA6

Die vollständige Mastermix- Kompetitor-Platte wurde mit einem Pipettierroboter (Firma Hamilton, Reno) in vier Replikatpipettierungen auf eine 384 *well* Platte (Firma ABgene, Hamburg) übertragen und in einem *Thermocycler* (Firma Applied Biosystems, Foster City) weiter prozessiert:

Real competitive PCR-Programm

- | | |
|--------------------|-------------|
| 7. 94°C für 15 min | } 45 Zyklen |
| 8. 94°C für 20 sec | |
| 9. 56°C für 30 sec | |
| 10. 72°C für 1 min | |
| 11. 72°C für 3 min | |
| 12. 4°C forever | |

4.14.3 Primerextensionsreaktion**Tabelle 4-29:** Verbrauchsmaterialien, Puffer und Reagenzien für die Multiplex Extensionsreaktion

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
<i>Centrifuge 5810 R</i>	Zentrifugation der 96- und 384- <i>well</i> Platten	Eppendorf GmbH, Hamburg
<i>Easy Peel Heat Sealing Foil</i>	Verschluss der 96- und 384- <i>well</i> Platten	ABgene, Hamburg
Eppendorf Research Pipetten	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf GmbH, Hamburg
e.T.I.P.S. Pipettenspitzen (0,5-20µl; 2-200µl, 50-1000µl)	Pipettierung der Reagenzien	Eppendorf GmbH, Hamburg
<i>Gene Amp PCR System 9700</i>	Multiplex Extensionsreaktion	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Heat Sealer ALPS-300</i>	Verschluss der 384- <i>well</i> Platten	ABgene, Hamburg
<i>iPLEX Buffer Plus</i>	Multiplex Extensionsreaktion	Sequenom, San Diego, USA
<i>iPLEX Enzyme</i>	Multiplex Extensionsreaktion	Sequenom, San Diego, USA
<i>iPLEX Termination Mix</i>	Multiplex Extensionsreaktion	Sequenom, San Diego, USA
Mikrotestplatte 96 K	Pipettierung des Multiplex Extensionsmastermix	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Multimek Pipettierroboter	Zugabe des Extensionsmastermix zum PCR- Produkt	Beckmann, Fullerton, USA
Pipettierwanne für Mehrkanalpipetten	Pipettierung des Multiplex Extend-Mastermix	Ratiolab, Dreieich
<i>Purelab Ultra</i>	Reinstwasseranlage	ELGA, Celle
Spritzen, 50ml	Wasserfiltration	BD Bioscience GmbH, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter, 0,22µM	Wasserfiltration	Qualilab, Olivet, Frankreich
<i>Thermo Fast 384 Well Plate</i>	Multiplex Extensionsreaktion	ABgene, Hamburg

Im Anschluss an die *real competitive* PCR wurden die Produkte nach dem iPLEX Protokoll mit SAP behandelt, um die nicht inkorporierten dNTPs zu dephosphorylieren (Kapitel 4.8). Die so für die SBE vorbereiteten PCR- Produkte wurden nun, ebenfalls nach iPLEX- Protokoll, weiter prozessiert. Auch hier wurden die Primer ihrer Masse nach in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Dazu wurde ein Primermix erstellt, der die einzelnen Extensionsprimer in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt (Tabelle 4-30).

Tabelle 4-30: Verwendete Extendprimer und ihre eingesetzten Konzentrationen für die Quantitative Genexpression

Gen	Extendprimer	Eingesetzte Konzentration	Mögliche Verlängerungen
GAPDH-6	CCTCCTGCACCACCAAC	7,00µM	A/T
UBC-4	ACAGCGATCCACAAACA	7,00µM	A/T
HPTR1-4	TGCGGGTCGCCATAACGG	9,33µM	A/T
TBP-5	CTTGGCTCCTGTGCACACC	9,33µM	A/T
ACTB-6	CCCCCGGGCCGTCTTCCCC	11,66µM	A/T
B2M-4	GTATGCCTGCCGTGTGAACC	11,66µM	A/T
HMBS-7	TCTGCCCCACCCGGTTGTGCC	11,66µM	A/T
RPL13A-4	GATGGCCGCCAGGCGGCCAGG	14,00µM	A/T
SDHA-4	GCTACGGGCGCACCTACTTCAGC	14,00µM	A/T
YWHAZ-4	ATCACCAGCGGCAACCTCAGCCAAG	14,00µM	A/T

Der Mastermix für die Primerextensionsreaktion wurde wie in Kapitel 4.9 beschrieben zusammengestellt, zu den PCR- Produkten gegeben und in einem Mastercycler prozessiert (Tabelle 4-31).

Tabelle 4-31: Zusammensetzung des SBE Mastermix für die Quantitative Genexpression

Reagenz	Conc in 9µl	Volumen für eine Reaktion (incl. Überhang)	Volumen für 256 Reaktionen (incl. Überhang)
Wasser	NA	0,875µl	325,5µl
<i>i</i> PLEX Buffer Plus	0,222x	0,200µl	74,40µl
<i>i</i> PLEX Termination Mix	1x	0,100µl	37,20µl
Primer Mix (7µM bis 14µM)	0,625µM bis 1,25µM	0,804µl	299,10µl
<i>i</i> PLEX Enzym	1x	0,021µl	7,82µl
Total		2,000µl	743,00µl

Analog zur Genotypisierung wurden im Anschluss an die SBE die Extensionsprodukte entsalzt (Kapitel 4.10) auf Probenträger aufgebracht und in das MALDI- TOF MS (Firma Bruker Daltonics, Bremen) eingeschleust.

4.14.4 Messung der Extensionsprodukte im MALDI- TOF MS

Tabelle 4-32: Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software für die Messung der Extensionsprodukte im MALDI-TOF MS

Material, Reagenz, Gerät	Verwendungszweck	Hersteller
<i>3 Point Calibrant</i>	Kalibrierung der Massenspektren	Sequenom, San Diego, USA
<i>AssayEditor 3.4.0.7</i>	Assayimport	Sequenom, San Diego, USA
FLEXControl	MALDI- Steuerung	Bruker Daltonics, Bremen
MassARRAY POINT Nanodispenser	Applikation der Extensionsprodukte auf SpectroCHIPs	Sequenom, San Diego, USA
MNL 200 Stickstofflaser	Massenspektrometrische Analyse der Extensionsprodukte	LTP Laser Technik, Berlin
Autoflex Massenspektrometer	Massenspektrometrische Analyse der Extensionsprodukte	Bruker Daltonics, Bremen
<i>Nitrogen Generator</i>	Stickstoffversorgung des Lasers	Parker Balston, Haverhill, USA
<i>QGE PlateEditor 3.4.0.48</i>	Plattenzusammenstellung	Sequenom, San Diego, USA
<i>RT Workstation 3.4, Chiplinker</i>	Datenbankverlinkung	Sequenom, San Diego, USA
<i>SpectroAcquire 3.3.1.3</i>	MALDI- Steuerung	Sequenom, San Diego, USA
SpectroCHIPs	Probenträger mit Matrixdroplets	Sequenom, San Diego, USA
SpectroTARGET	Träger für SpectroCHIPs	Sequenom, San Diego, USA
<i>Mass Array Quantitative Gene Expression Analyzer 3.4.0.1</i>	Spektrenauswertung	Sequenom, San Diego, USA

Die Messung der Extensionsprodukte erfolgte wie in Kapitel 4.11.1 beschrieben. Nach Abschluss der Messung konnten die erhaltenen Spektren und EC50- Werte im QGE Analyzer (Firma Sequenom, San Diego) überprüft werden.

4.14.5 Quantitative Genexpression mit Kompetitorfeinverdünnung

Anhand der bisher erhaltenen Ergebnisse konnten die Bereiche, die mit den Kompetitorverdünnungen abzudecken waren, eingegrenzt werden. Dies ermöglichte es in einem zweiten Experiment individuell für jedes Gen den Bereich abzudecken, der für die Ermittlung des EC50- Wertes nötig war. Erneut wurde eine Kompetitorplatte entworfen, die sieben Verdünnungen enthielt (Tabelle 4-33).

Tabelle 4-33: Konkretorkonzentrationen der *housekeeping* Gene für die Feinverdünnung

Gen	Konz1	Konz2	Konz3	Konz4	Konz5	Konz8	Konz7
GAPDH-6	1×10^{-12}	$3,33 \times 10^{-13}$	$1,11 \times 10^{-13}$	$3,70 \times 10^{-14}$	$1,23 \times 10^{-14}$	$4,11 \times 10^{-15}$	$1,37 \times 10^{-15}$
UBC-4	1×10^{-12}	$3,33 \times 10^{-13}$	$1,11 \times 10^{-13}$	$3,70 \times 10^{-14}$	$1,23 \times 10^{-14}$	$4,11 \times 10^{-15}$	$1,37 \times 10^{-15}$
HPTR1-4	1×10^{-14}	$3,33 \times 10^{-15}$	$1,11 \times 10^{-15}$	$3,70 \times 10^{-16}$	$1,23 \times 10^{-16}$	$4,11 \times 10^{-17}$	$1,37 \times 10^{-17}$
TBP-5	1×10^{-14}	$3,33 \times 10^{-15}$	$1,11 \times 10^{-15}$	$3,70 \times 10^{-16}$	$1,23 \times 10^{-16}$	$4,11 \times 10^{-17}$	$1,37 \times 10^{-17}$
ACTB-6	1×10^{-12}	$3,33 \times 10^{-13}$	$1,11 \times 10^{-13}$	$3,70 \times 10^{-14}$	$1,23 \times 10^{-14}$	$4,11 \times 10^{-15}$	$1,37 \times 10^{-15}$
B2M-4	1×10^{-12}	$3,33 \times 10^{-13}$	$1,11 \times 10^{-13}$	$3,70 \times 10^{-14}$	$1,23 \times 10^{-14}$	$4,11 \times 10^{-15}$	$1,37 \times 10^{-15}$
HMBS-7	1×10^{-14}	$3,33 \times 10^{-15}$	$1,11 \times 10^{-15}$	$3,70 \times 10^{-16}$	$1,23 \times 10^{-16}$	$4,11 \times 10^{-17}$	$1,37 \times 10^{-17}$
RPL13A-4	1×10^{-12}	$3,33 \times 10^{-13}$	$1,11 \times 10^{-13}$	$3,70 \times 10^{-14}$	$1,23 \times 10^{-14}$	$4,11 \times 10^{-15}$	$1,37 \times 10^{-15}$
SDHA-4	1×10^{-14}	$3,33 \times 10^{-15}$	$1,11 \times 10^{-15}$	$3,70 \times 10^{-16}$	$1,23 \times 10^{-16}$	$4,11 \times 10^{-17}$	$1,37 \times 10^{-17}$
YWHAZ-4	1×10^{-12}	$3,33 \times 10^{-13}$	$1,11 \times 10^{-13}$	$3,70 \times 10^{-14}$	$1,23 \times 10^{-14}$	$4,11 \times 10^{-15}$	$1,37 \times 10^{-15}$

Mit diesen Konzentrationen wurde ein zweites Experiment nach dem oben beschriebenen Ablauf durchgeführt.

4.14.6 Qualitätskontrolle

Alle generierten Spektren und Kurven wurden im *QGE Analyzer* (Firma Sequenom, San Diego) gesichtet und auf ihre Qualität überprüft. Dabei war ein ausschlaggebendes Kriterium, ob die erhaltenen, den cDNA- Frequenzen entsprechenden Datenpunkte näherungsweise eine sigmoide Kurve bildeten. Nur so konnte gewährleistet werden, dass ausreichen Datenpunkte um den angenommenen EC50- Wert herum für eine exakte Berechnung vorhanden waren (Abbildung 4-8).

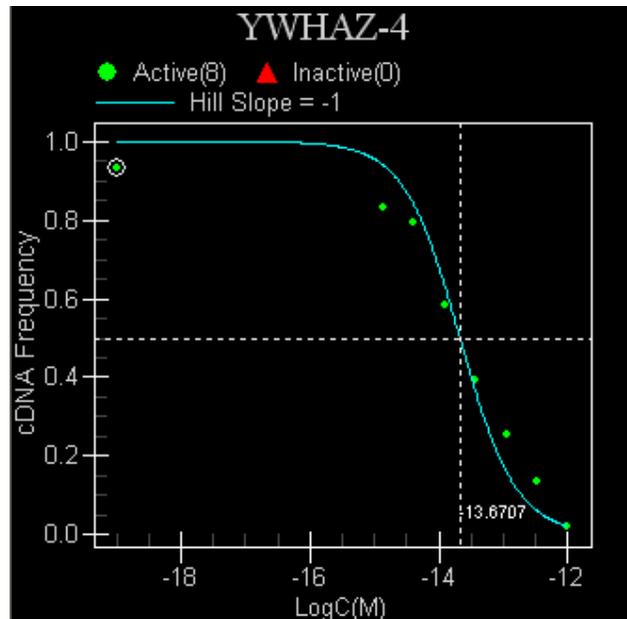


Abbildung 4-8: Annähernd sigmoide Kurve aus den generierten Datenpunkten für das Gen YWHAZ-4 einer cDNA

Außerdem wurden durch die *QGE Analyzer* Software noch statistische Größen ausgegeben, die eine genauere Qualitätskontrolle ermöglichten. Anhand des Standardfehlers der EC50- Berechnung ($SE(\log EC_{50})$) konnte die Güte der Ergebnisse abgeschätzt werden. Bei einem Überschreiten des $SE(\log EC_{50})$ von 0,10 wurden die entsprechenden Werte verworfen.

Der angegebene R^2 - Wert diente als Beurteilungskriterium, wie weit die tatsächlichen Datenpunkte von der ermittelten sigmoiden Kurve abwichen. R^2 - Werte unter 0,90 wiesen auf Ungleichmässigkeiten der Datenpunkte hin und die zugehörigen Ergebnisse wurden ebenfalls verworfen.

5 Ergebnisse

5.1 Das HTR2A Gen in der Schizophrenie

In dieser Arbeit sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Serotonin- 2A-Rezeptorgen (HTR2A) und der Schizophrenie untersucht werden. Dazu wurden 11 Marker in Form vom Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) ausgewählt, die innerhalb des HTR2A Gens oder in seiner Promoterregion lokalisiert sind.

Diese Marker wurden an einem kaukasisches Kollektiv von bis zu 513 schizophrenen Patienten (64,5% Männer, 35,5% Frauen) sowie 1325 gesunden Kontrollen (45,3% Männer, 54,7% Frauen) genotypisiert und hinsichtlich signifikanter Unterschiede in Allel- und Genotypfrequenzen sowie der Häufigkeiten der aus den 11 Markern ermittelten Haplotypen untersucht (Abbildung 5-1).

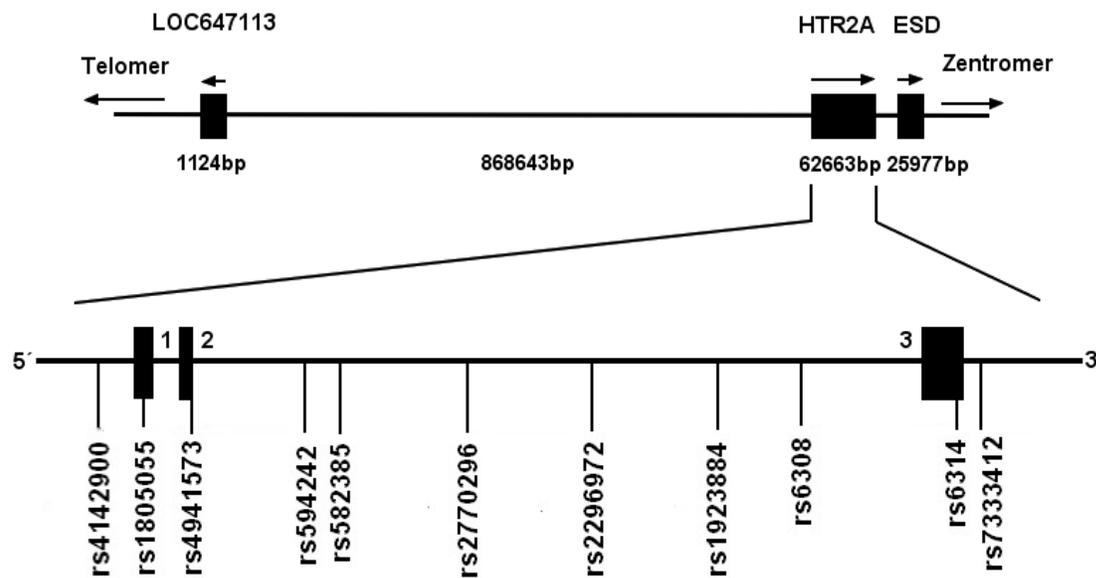


Abbildung 5-1: Lage der untersuchten HTR2A- SNPs im Gen

5.1.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) besagt, dass die prozentuale Genotypverteilung in Abhängigkeit von der jeweiligen Allelhäufigkeit in einer idealen Population über viele Generationen hinweg konstant bleibt. In einer modellhaften, nicht realen idealen Population, in der Panmixie vorherrscht und keine Phänomene wie Migration, Selektion oder Mutation auftreten, sind die einzelnen Genotypen immer innerhalb des HWG verteilt. In einem realen Kollektiv an Probanden trifft dies allerdings nur bedingt zu, da hier weder Panmixie anzunehmen ist, noch Migration, Selektion und Mutation ausgeschlossen werden können. Dennoch lässt sich die Grundannahme des Hardy-Weinberg-Gesetzes gerade bei größeren Stichproben anwenden und bildet die Grundlage für populationsgenetische Berechnungen.

Alle in dieser Arbeit ermittelten Genotypverteilungen wurden auf das HWG geprüft und es zeigen sich keine signifikanten Abweichungen der beobachteten von der erwarteten Verteilung (Tabelle 5-1).

Tabelle 5-1: Prüfung der Genotypverteilungen auf Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, die p-Werte wurden nach Pearson ermittelt (Freiheitsgrade $df=1$); MAF=*minor allele frequency*, F= Inzuchtkoeffizient

SNP	Chrom. Position	Allele		Patienten		Kontrollen	
		1	2	MAF	p-Wert (F)	MAF	p-Wert (F)
rs7333412	46301361	A	G	0,220	0,155 (-0,064)	0,198	0,382 (0,024)
rs6314	46307035	C	T	0,083	0,851 (-0,009)	0,067	0,498 (0,019)
rs6308	46307049	C	T	0,002	0,965 (-0,002)	0,003	0,923 (-0,003)
rs1923884	46319837	C	T	0,136	0,192 (-0,058)	0,128	0,566 (0,016)
rs2296972	46326472	G	T	0,294	0,836 (0,009)	0,300	0,920 (-0,003)
rs2770296	46338561	C	T	0,274	0,454 (0,038)	0,275	0,334 (0,027)
rs582385	46343995	C	T	0,186	0,176 (-0,060)	0,198	0,476 (-0,020)
rs594242	46356053	C	G	0,200	0,973 (-0,002)	0,203	0,266 (0,032)
rs4941573	46362858	A	G	0,419	0,057 (0,085)	0,411	0,548 (0,017)
rs1805055	46367969	A	C	0,026	0,553 (-0,026)	0,020	0,467 (-0,020)
rs4142900	46371551	G	T	0,468	0,134 (0,068)	0,492	0,341 (0,020)

5.1.2 Analyse der Einzelmarker auf eine Assoziation mit Schizophrenie

Um zu klären, ob Marker im HTR2A Gen grundsätzlich mit der Erkrankung im hier untersuchten Probandenkollektiv assoziiert sind, wurden alle Patienten in Bezug auf die gesunden Kontrollen analysiert. Hierzu wurden die Genotypverteilungen der 11 SNPs in bis zu 513 schizophrenen Patienten und bis zu 1325 gesunden Kontrollpersonen verglichen (Tabelle 5-2).

Tabelle 5-2: Genotypverteilung der 11 SNPs in gesunden Kontrollen und schizophrenen Patienten.

SNP	a1	a2	Kontrollen						Patienten						χ^2	p
			N1 / %		N2 / %		N3 / %		N1 / %		N2 / %		N3 / %			
rs7333412	A	G	811	64,7	388	31	54	4,3	287	59,7	176	36,6	18	3,7	5,054	0,079
rs6314	C	T	1067	87,0	156	12,7	4	0,3	406	84,1	74	15,3	3	0,6	2,827	0,243
rs6308	C	T	1318	99,5	7	0,5	0	0	511	99,6	2	0,4	0	0	0,145	0,102
rs1923884	C	T	1004	76,2	290	22	24	1,8	377	73,9	127	24,9	6	1,2	2,533	0,281
rs2296972	G	T	644	48,9	555	42,1	118	9	256	50,1	210	41,1	45	8,8	0,213	0,898
rs2770296	C	T	103	8,1	492	38,8	672	53	41	8,7	193	38,4	268	53,4	0,023	0,988
rs582385	C	T	47	3,6	422	32,4	834	64	13	2,5	164	32,0	335	65,4	1,398	0,497
rs594242	C	G	759	64,1	371	31,3	55	4,6	321	64	161	32,1	20	4	0,409	0,815
rs4941573	A	G	445	35,1	603	47,6	219	17,3	181	35,8	225	44,6	99	19,6	1,848	0,396
rs1805055	A	C	0	0	51	4	1227	96	0	0	26	5,1	479	94,9	1,174	0,278
rs4142900	G	T	332	26,5	609	48,6	311	24,8	147	29,9	228	46,4	116	23,6	2,072	0,354

Die Genotypen ergeben sich aus den Allelkombinationen homozygot Allel 1 (Genotyp 1), heterozygot Allel 1 und Allel 2 (Genotyp 2), homozygot Allel 2 (Genotyp 3). a1= Allel 1; a2= Allel2.

Aus Tabelle 5-2 geht hervor, dass keiner der individuellen Genotypen in der vorliegenden Stichprobe mit Schizophrenie assoziiert zu sein scheint. Lediglich der SNP rs7333412 zeigt mit einem p- Wert von 0,0798 einen Trend zu einer Assoziation (Abbildung 5-2).

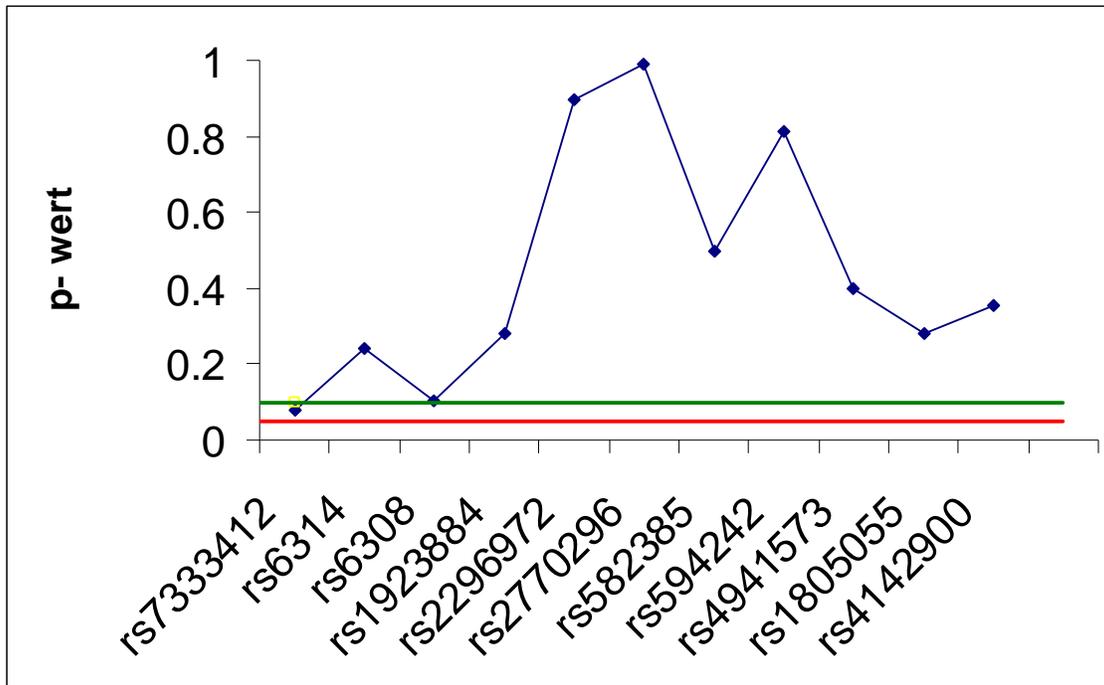


Abbildung 5-2: p-Werte der Chi- Quadrat- Tests (Pearson). Der Grenzwert für eine signifikante Assoziation wird durch die dicke Linie, der Grenzwert für einen Trend zu Assoziation wird durch die feinere Linie angezeigt. Nur rs7333412 zeigte einen Trend zur Assoziation.

Weiterhin wurde untersucht, ob eines der beiden Allele eines SNPs im Vergleich zum anderen Allel überzufällig häufig im Patientenkollektiv vorkommt und so eine Assoziation mit der Schizophrenie zeigt. Dabei wurden die Träger des Allels 1 (Homozygot Allel 1 + Heterozygot Allel 1 und Allel 2) den Individuen ohne Allel 1 (Homozygot Allel 2) gegenübergestellt (Tabelle 5-3).

Tabelle 5-3: Anteil der Träger des Allels 1 (Homozygot Allel 1 + Heterozygot Allel 1 und Allel 2) versus Nichtträger Allel 1 (Homozygot Allel 2)

SNP ID	Kontrollen		Patienten		Chi- Quadrat- Test	
	N1	N2	N1	N2	χ^2	p
rs7333412	1199	54	463	18	0,281	0,595
rs6314	1223	4	480	3	0,740	0,389
rs6308	1325	--	513	--	-----	-----
rs1923884	1294	24	504	6	0,940	0,330
rs2296972	1199	118	466	45	0,011	0,917
rs2770296	595	672	234	268	0,017	0,894
rs582385	469	834	177	335	0,325	0,568
rs594242	1130	55	482	20	0,359	0,549
rs4941573	1048	219	406	99	1,319	0,250
rs1805055	51	1227	26	479	1,174	0,278
rs4142900	941	311	375	116	0,281	0,595

Ebenso wurden die Träger des Allels 2 (homozygot Allel 2 + heterozygot Allel 1 und Allel 2) den Individuen ohne Allel 2 (homozygot Allel 2) gegenübergestellt. (Tabelle 5-4)

Tabelle 5-4: Anteil der Träger des Allels 2 (Homozygot Allel 2 + Heterozygot Allel 1 und Allel 2) versus Nichtträger Allel 2 (Homozygot Allel 1)

SNP ID	Kontrollen		Patienten		χ^2	p-Wert
	N2	N1	N2	N1		
rs7333412	811	442	287	194	3,828	0,050
rs6314	1067	160	406	77	2,445	0,118
rs6308	1318	7	511	2	0,145	0,703
rs1923884	1004	314	377	133	1,012	0,315
rs2296972	644	673	256	255	0,212	0,645
rs2770296	103	1164	41	461	0,001	0,979
rs582385	47	1256	13	499	1,312	0,252
rs594242	759	426	321	181	0,002	0,967
rs4941573	445	822	181	324	0,082	0,775
rs1805055	--	1278	--	505	--	--
rs4142900	332	920	147	344	2,072	0,150

Auch bei der Gegenüberstellung der Allelträger zeigt sich keine Assoziation mit der Schizophrenie. Allerdings ergab sich auch hier bei rs7333412 ein Trend zur Assoziation mit der Erkrankung (Abbildung 5-3).

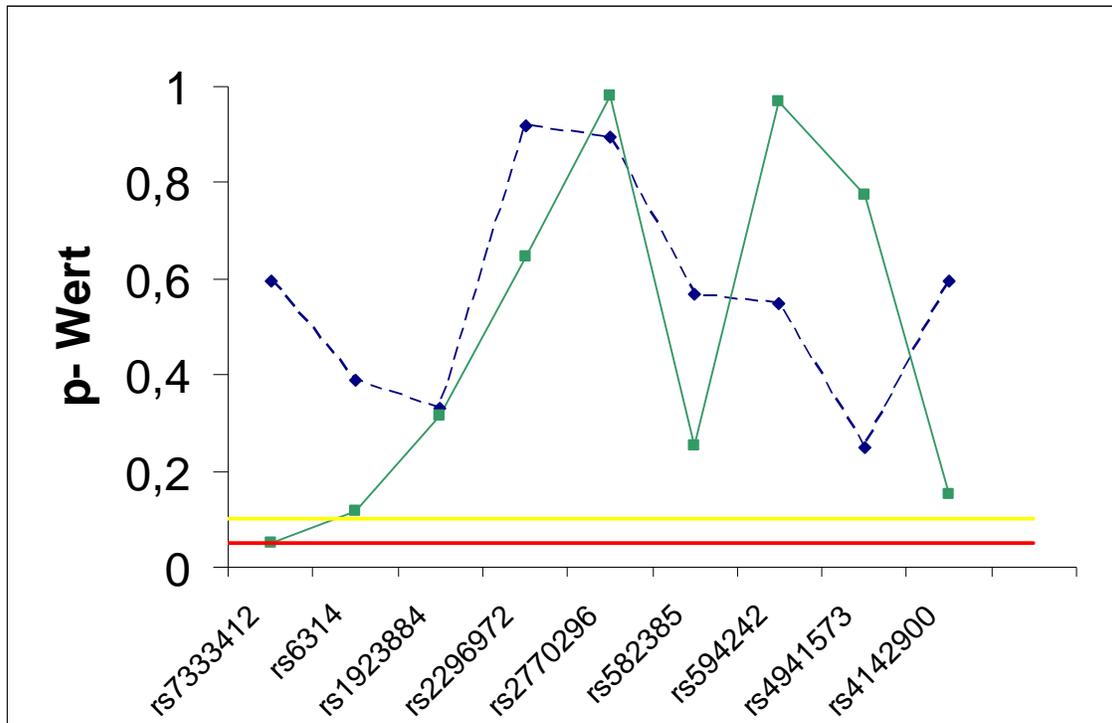


Abbildung 5-3: p-Werte der Chi-Quadrat-Tests (Pearson) der Allelträger 1 (gestrichelte Linie) und Allelträger 2 (durchgezogene Linie). Der Grenzwert für eine signifikante Assoziation wird durch die rote Linie, der Grenzwert für einen Trend zu Assoziation wird durch die gelbe Linie angezeigt. Nur rs7333412 zeigte einen Trend zur Assoziation. rs6308 und rs1805055 werden aufgrund ihrer geringen minoren Allelfrequenz nicht gezeigt.

Des Weiteren wurde die absolute Verteilung der Allele innerhalb der Gruppen betrachtet. Dabei wurde die Anzahl der Allele in Bezug auf ihr diploides Vorkommen untersucht (Tabelle 5.6).

Tabelle 5-6: Allelverteilung des Gesamtallels in Patienten und Kontrollen

SNP ID	Kontrollen		Patienten		χ^2	p-Wert
	N1	N2	N1	N2		
rs7333412	2010	496	750	212	2,156	0,1420
rs6314	2290	164	886	80	2,674	0,1020
rs6308	2643	7	1024	2	0,145	0,7033
rs1923884	2298	338	881	139	0,420	0,5169
rs2296972	1843	791	722	300	0,161	0,6884
rs2770296	698	1836	275	729	0,009	0,9259
rs582385	516	2090	190	834	0,728	0,3935
rs594242	1889	481	803	201	0,033	0,8555
rs4941573	1493	1041	587	423	0,191	0,6624
rs1805055	51	2505	26	984	1,149	0,2838
rs4142900	1273	1231	522	460	1,518	0,2180

Dabei konnte keine signifikante Assoziation nachgewiesen werden.

5.1.3 Haplotypblockstruktur des humanen Genoms

Bestimmte Allele eines Gens werden mit proportional zu ihrer physikalischen Nähe steigenden Häufigkeit gemeinsam vererbt, da die Wahrscheinlichkeit eines *crossing overs* in der Meiose zwischen zwei eng benachbarten Genorten sehr gering ist. Solche von Rekombinationsprozessen verschonten und somit gemeinsam vererbten Allele liegen dann im Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD). Die Existenz eines Kopplungsungleichgewichtes bedeutet, dass aus dem Wissen über das Vorliegen der ersten Variante mit einer erheblichen Wahrscheinlichkeit auf das Vorliegen der zweiten Variante geschlossen werden kann. Kopplungsungleichgewichte erstrecken sich häufig über große genomische Distanzen mit zahlreichen Markern und werden als Haplotypblöcke bezeichnet.

Alle 11 Marker wurden in paarweiser Kombination auf ihr LD untersucht, und es konnten zwei Haplotypblöcke identifiziert werden.

Die jeweils zu einem Block zugehörigen SNPs befinden sich sowohl in der gesamten Stichprobe, als auch in den einzelnen Subgruppen, schizophrenen Patienten und gesunde Kontrollen, im Kopplungsungleichgewicht.

Block 1 umfasst mit den SNPs rs2770296 und rs582385 einen rund fünf Kilobasenpaare (kbp) großen Genombereich, während Block 2 mit den SNPs rs4941573, rs1805055 und rs4142900 einen acht kbp großen Bereich abdeckt (Abbildung 5-4).

Block 1 ist in dem großen Intron 2 des HTR2A- Gens lokalisiert und enthält keine exonischen Genbereiche. Block 2 umspannt einen Teil der Promoterregion, das gesamte Exon1, sowie Intron1, Exon2 und einen kleinen Bereich des Intron2. Er enthält mit dem kodierenden SNP rs1805055 einen Polymorphismus, der zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin nach Thyrosin in der Aminosäuresequenz des Rezeptors führt.

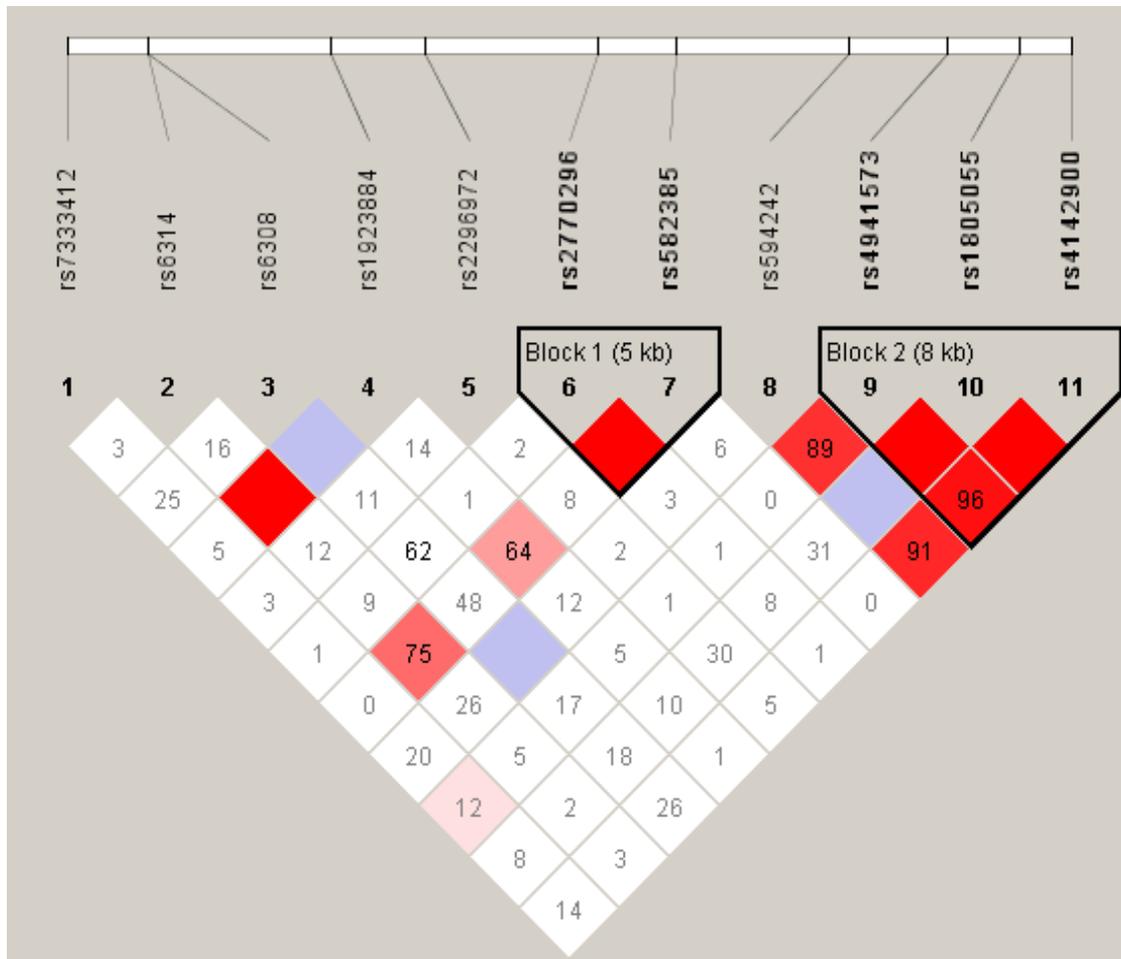


Abbildung 5-4: Blockstruktur der untersuchten Marker mit den *haploscores* für das Kopplungsungleichgewicht. Rote Kästchen ohne Zahl entsprechen einem Wert von 100.

SNP10 (rs1805055) wurde aufgrund einer geringen minoren Allelfrequenz von 2% von der weiteren Haplotypanalyse ausgeschlossen.

5.1.4 Analyse der Haplotypen auf eine Assoziation mit Schizophrenie

Hinsichtlich der Verteilung der Haplotypfrequenzen zeigen sich beim Vergleich von schizophrenen Patienten mit gesunden Kontrollen keine signifikanten Unterschiede für die Haplotypen in Block 1 (rs2770296, rs582385) (Tabelle 5-7).

Tabelle 5-7: Geschätzte Haplotypfrequenzen in schizophrenen Patienten und gesunden Kontrollen

Haplotyp			geschätzte Häufigkeiten		χ^2	p
Block 1	rs2770296	rs582385	Patienten	Kontrollen		
(1)	T	T	0,54	0,535	0,416	0,5188
(2)	C	T	0,277	0,27	0,023	0,8783
(3)	T	C	0,182	0,195	0,977	0,3229
Block2	rs4941573	rs4142900	Patienten	Kontrollen	χ^2	p
(1)	A	T	0,471	0,475	0,546	0,4601
(2)	G	G	0,399	0,399	0,207	0,6488
(3)	A	G	0,123	0,098	3,542	0,0598

Die Allelkombination 3 (AG) der SNPs rs4941573 und rs4142900 in Haplotypblock 2 war jedoch überzufällig häufiger bei Patienten zu finden ($\chi^2= 3,542$, $p=0,0598$) (Abbildung 5-5).

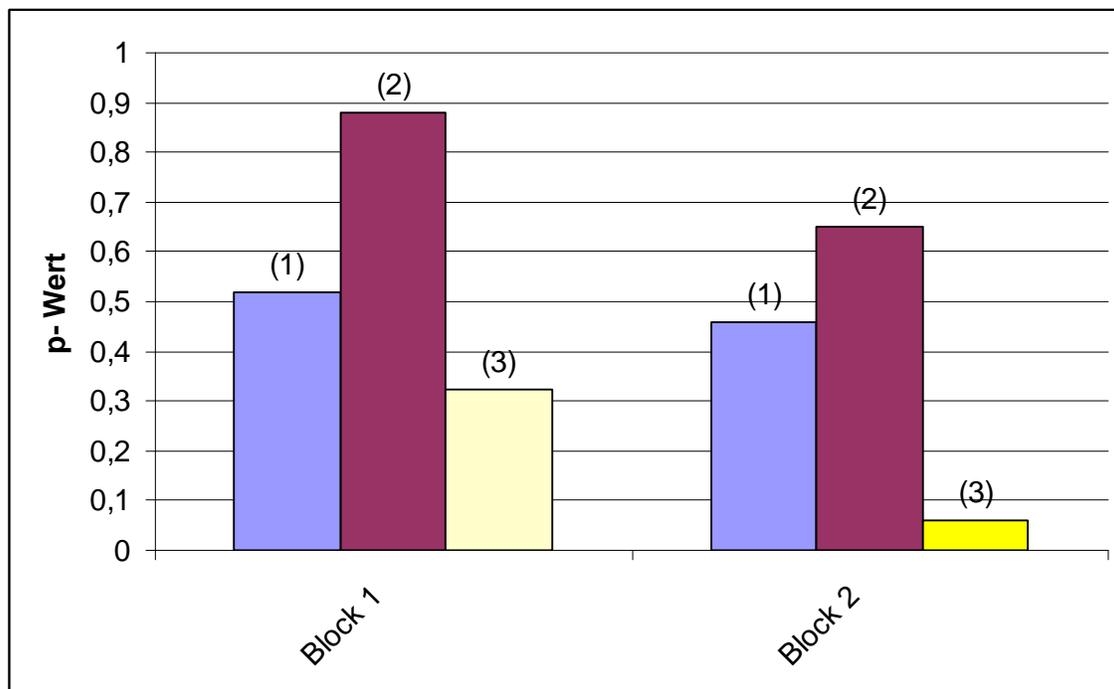


Abbildung 5-5: p- Werte der Haplotypblöcke 1 (rs2770296, rs582385) und Halotypblock 2 (rs4941573, rs4142900). Die Allelkombination (3) von Haplotypblock 2 war überzufällig häufiger bei Patienten zu finden.

5.2 Quantitative Genexpression

Ziel dieser Arbeit war außerdem die Etablierung der Quantitativen Genexpression (QGE)- Applikation von mit MALDO- TOF Massenspektrometrie für die spätere funktionelle Untersuchung des HTR2A- Gens. Dabei sollten folgende Qualitätskriterien zu eingehalten werden:

1. Standardabweichung der Replikate unter 10%
2. SE(logEC50) kleiner 0,10
3. R^2 - Wert größer 0,90
4. Replizierbarkeit der Ergebnisse über mehrere Experimente hinweg

Die Etablierung mit einem von Sequenom entworfenen 10- Plex mit humanen *housekeeping* Genen durchgeführt. Dazu wurde humane RNA aus Lymphozyten exprimiert und die QGE- Anwendung nach dem iPLEX- Protokoll durchgeführt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde eine logarithmische Kompetitorverdünnungsreihe prozessiert. Anhand dieser konnte der grobe Bereich festgelegt werden, in welchem die einzelnen *housekeeping* Gene im verwendeten Probenmaterial exprimiert wurden. In diesem Experiment wurden durchgehend sehr hohe R^2 - Werte erzielt, jedoch zeigte sich in etwa zwei Drittel der Fälle eine höhere Standardabweichung zwischen den Replikate. Da dieses Experiment nur als Orientierung dienen sollte, wurden diese Ergebnisse aber nicht verworfen, solange sie einen R^2 - Wert über 0,90 und eine Standardabweichung des EC(50)- Wertes unter 0,10 aufwiesen.

Tabelle 5-9: Ergebnisse der logarithmischen Kompetitorverdünnungsreihe für fünf der verwendeten RNAs

Probe	Gen	MW (EC50)	STABW(EC50)	STABW(%)
RNA1	ACTB-6	9,12E-15	2,65E-15	29,01
RNA1	B2M-4	6,27E-14	1,88E-14	29,92
RNA1	GAPDH-6	1,46E-13	3,56E-14	24,36
RNA1	HMBS-7	2,94E-17	8,16E-18	27,76
RNA1	HPTR1-4	1,72E-16	8,28E-17	48,13
RNA1	RPL13A-4	3,78E-14	3,17E-15	8,38
RNA1	SDHA-4	3,73E-15	3,27E-16	8,75
RNA1	TBP-5	1,74E-16	1,86E-17	10,66
RNA1	UBC-4	2,81E-14	1,13E-15	4,01
RNA1	YWHAZ-4	9,56E-15	4,51E-16	4,72
RNA2	ACTB-6	3,87E-15	1,69E-17	0,44
RNA2	B2M-4	2,28E-14	4,37E-16	1,92
RNA2	GAPDH-6	7,45E-14	2,67E-15	3,59
RNA2	HMBS-7	1,22E-17	3,07E-18	25,07
RNA2	HPTR1-4	5,15E-17	2,06E-17	39,94
RNA2	RPL13A-4	1,88E-14	4,97E-15	26,51
RNA2	SDHA-4	6,83E-16	2E-16	29,32
RNA2	TBP-5	9,36E-17	2,82E-17	30,09
RNA2	UBC-4	1,38E-14	6,44E-16	4,67
RNA2	YWHAZ-4	3,45E-15	9,64E-16	27,97
RNA3	ACTB-6	2,22E-17	8,05E-18	36,23
RNA3	B2M-4	3,53E-17	9,06E-18	25,70
RNA3	GAPDH-6	1,36E-16	4,53E-20	0,03
RNA3	HMBS-7	4,5E-20	9,87E-21	21,93
RNA3	RPL13A-4	3,28E-17	7,54E-18	22,99
RNA3	UBC-4	2,79E-17	6,42E-18	23,03
RNA3	YWHAZ-4	5,78E-18	2,01E-18	34,85
RNA6	ACTB-6	2,77E-14	2,45E-15	8,85
RNA6	B2M-4	2,46E-14	1,78E-15	7,23
RNA6	GAPDH-6	1,36E-13	1,29E-14	9,51
RNA6	HMBS-7	1,18E-17	1,57E-18	13,26
RNA6	HPTR1-4	7,45E-17	5,7E-18	7,65
RNA6	RPL13A-4	1,35E-14	1,05E-15	7,77
RNA6	SDHA-4	1,44E-15	5,96E-17	4,14
RNA6	TBP-5	1,51E-16	7,74E-18	5,14
RNA6	UBC-4	1,95E-14	1,6E-15	8,18
RNA6	YWHAZ-4	4,8E-15	7,72E-16	16,08
RNA5	GAPDH-6	1,14E-13	3,55E-14	31,09
RNA5	HMBS-7	8,48E-18	8,34E-19	9,84
RNA5	RPL13A-4	2,24E-14	8,73E-15	39,01
RNA5	SDHA-4	1,08E-15	4,43E-16	40,87
RNA5	TBP-5	1,64E-16	5,37E-17	32,74
RNA5	UBC-4	1,61E-14	3,89E-15	24,10
RNA5	YWHAZ-4	4,47E-15	1,63E-15	36,35

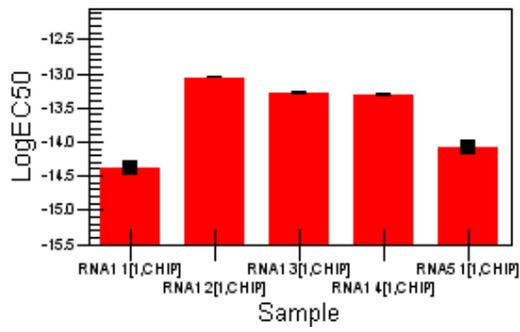
MW (EC50)= Mittelwert der einbezogenen Replikate (min: 2, max:4); STABW(EC50)= Standardabweichung der einbezogenen Replikate; STABW(%)= prozentuale Standardabweichung der Replikate vom Mittelwert; Werte mit $R^2 < 0,90$ wurden nicht miteinbezogen..

Anhand der Ergebnisse aus diesem Experiment wurde mit einer Kompetitorfeinverdünnungsreihe die Expression der *housekeeping* Gene in fünf

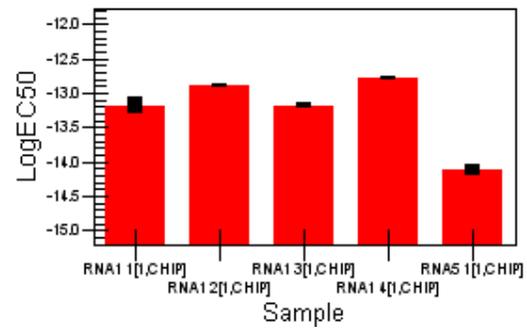
verschiedenen humanen Lymphozytenlinien bestimmt. Während in diesem Fall die Standardabweichung der Replikate gering gehalten werden konnte, mussten mehr Daten aufgrund mangelhafter R^2 -Werte entfernt werden.

Zur graphischen Auswertung wurde das *Data Analysis Tool* der QGE-Analyzer Software herangezogen. Diese Anwendung ermöglicht es, den aus den in die Berechnung einbezogene Replikaten die gemittelten Log(EC50)-Wert mit der automatisch berechneten Standardabweichung graphisch darzustellen (Abbildung 5-6).

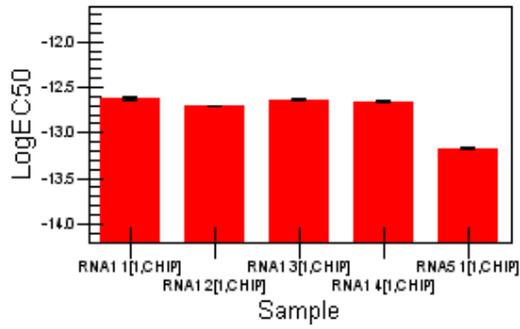
ACTB-6



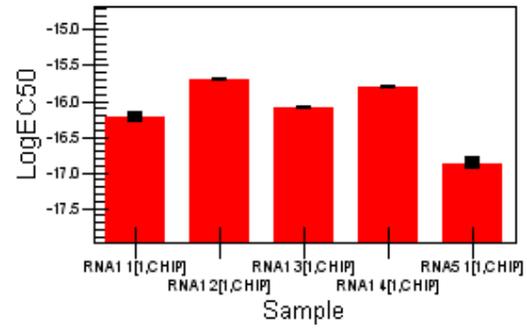
B2M-4



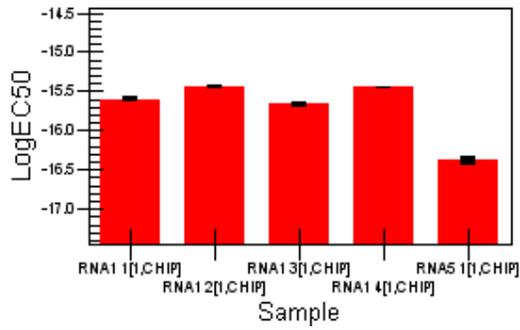
GAPDH-6



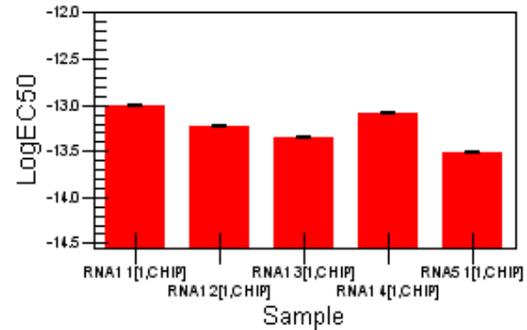
HMBS-7



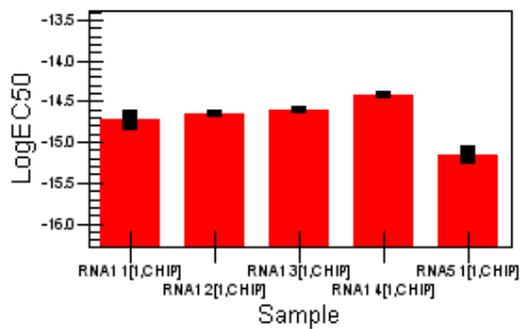
HPTR1-4



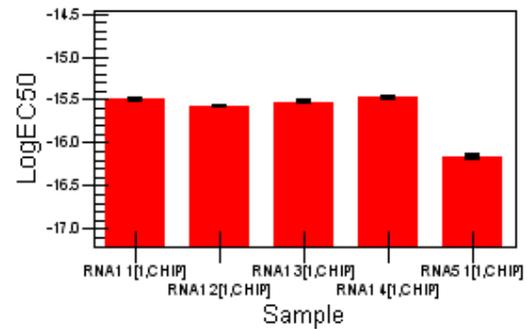
RPL13A-4



SDHA-4



TBP-5



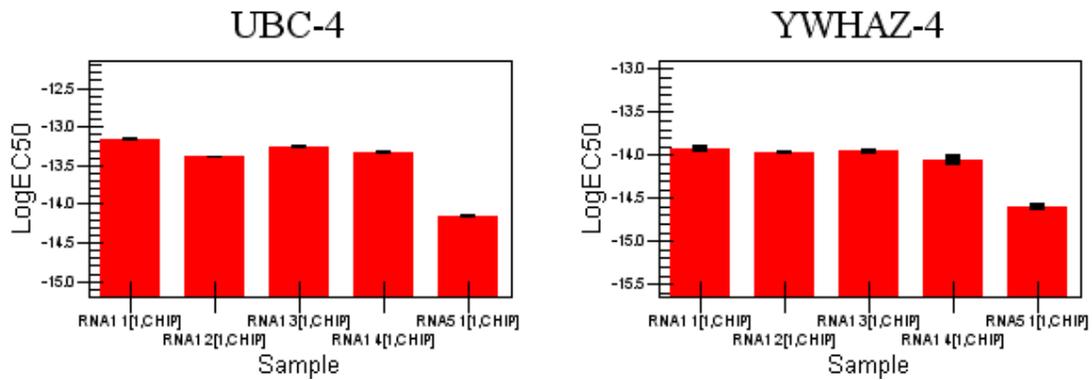


Abbildung 5-6: Grafische Darstellung der LogEC50- Werte für die Expression der 10 untersuchten Gene in humanen Lymphozyten

Anhand der ermittelten EC50- Werte konnte nach folgender Formel die Menge der ursprünglich vorhandene Kopienanzahl der jeweiligen Gene berechnet werden (Tabelle 5-10).

$$N_{(\text{Copy})} = (\text{EC50} / 1 \times 10^{-18}) \times 3$$

Tabelle 5-10: Berechnete Kopienanzahl der jeweiligen Gene in den verwendeten RNAs.

Probe	Gen	EC50	LOGEC50	Kopienanzahl
RNA1	GAPDH-6	2,24E-13	-12,650	672360
RNA1	HPTR1-4	2,49E-16	-15,604	746
RNA1	RPL13A-4	9,88E-14	-13,005	296450
RNA1	TBP-5	3,06E-16	-15,514	918
RNA1	UBC-4	6,94E-14	-13,159	208168
RNA1	YWHAZ-4	1,16E-14	-13,934	34895
RNA2	ACTB-6	8,65E-14	-13,063	259560
RNA2	B2M-4	1,22E-13	-12,914	365859
RNA2	GAPDH-6	1,84E-13	-12,734	553050
RNA2	HMBS-7	2,05E-16	-15,688	615
RNA2	HPTR1-4	3,53E-16	-15,452	1059
RNA2	RPL13A-4	5,86E-14	-13,232	175717
RNA2	SDHA-4	2,27E-15	-14,645	6797
RNA2	TBP-5	2,52E-16	-15,598	756
RNA2	UBC-4	4,04E-14	-13,394	121134
RNA2	YWHAZ-4	1,08E-14	-13,968	32279
RNA3	ACTB-6	5,10E-14	-13,292	153101
RNA3	B2M-4	6,22E-14	-13,206	186737
RNA3	GAPDH-6	2,14E-13	-12,669	643362
RNA3	HMBS-7	7,54E-17	-16,123	226
RNA3	HPTR1-4	2,15E-16	-15,668	644
RNA3	RPL13A-4	4,49E-14	-13,348	134767
RNA3	SDHA-4	2,49E-15	-14,603	7485
RNA3	TBP-5	2,85E-16	-15,546	854
RNA3	UBC-4	5,56E-14	-13,255	166772
RNA3	YWHAZ-4	1,10E-14	-13,960	32881
RNA4	ACTB-6	4,81E-14	-13,318	144385
RNA4	B2M-4	1,58E-13	-12,802	473598
RNA4	GAPDH-6	2,08E-13	-12,682	623709
RNA4	HMBS-7	1,56E-16	-15,807	468
RNA4	HPTR1-4	3,52E-16	-15,454	1055
RNA4	RPL13A-4	8,31E-14	-13,081	249241
RNA4	TBP-5	3,18E-16	-15,498	953
RNA4	UBC-4	4,71E-14	-13,327	141325
RNA5	GAPDH-6	6,40E-14	-13,194	192004
RNA5	HPTR1-4	4,13E-17	-16,384	124
RNA5	RPL13A-4	3,02E-14	-13,521	90470
RNA5	TBP-5	6,56E-17	-16,183	197
RNA5	UBC-4	6,88E-15	-14,162	20652
RNA5	YWHAZ-4	2,51E-15	-14,601	7520

Werte mit $R^2 < 0,90$ wurden entfernt.

Um diese Ergebnisse zu validieren, wurde ein zweites Experiment unter gleichen Versuchsbedingungen durchgeführt. Hierbei betrug die Standardabweichung der Ergebnisse beider Experimente bis auf eine Ausnahme weniger als 10% (Tabelle 5-11).

Tabelle 5-11: Vergleich der Ergebnisse aus Experiment 1 und 2; SE= Standardfehler, Werte mit R² < 0,90 wurden entfernt.

Probe	Gen	Experiment1				Experiment2				Mittelwert		
		EC50	LOGEC50	SE (LOGEC50)	R ²	EC50	LOGEC50	SE (LOGEC50)	R ²	MW(EC(50))	STABW(EC59)	STAB(%)
RNA1	GAPDH-6	2,24E-13	-12,650	0,03	0,976	2,20E-13	-12,658	0,03	0,970	2,22E-13	2,93E-15	1,32
RNA1	HPTR1-4	2,49E-16	-15,604	0,04	0,970	2,57E-16	-15,590	0,04	0,966	2,53E-16	5,74E-18	2,27
RNA1	RPL13A-4	9,88E-14	-13,005	0,03	0,981	1,05E-13	-12,980	0,03	0,975	1,02E-13	4,1E-15	4,03
RNA1	TBP-5	3,06E-16	-15,514	0,04	0,972	3,04E-16	-15,517	0,04	0,970	3,05E-16	1,55E-18	0,51
RNA1	UBC-4	6,94E-14	-13,159	0,02	0,986	7,32E-14	-13,135	0,02	0,984	7,13E-14	2,71E-15	3,80
RNA1	YWHAZ-4	1,16E-14	-13,934	0,04	0,964	1,35E-14	-13,871	0,04	0,949	1,25E-14	1,3E-15	10,34
RNA2	ACTB-6	8,65E-14	-13,063	0,02	0,989	9,53E-14	-13,021	0,02	0,991	9,09E-14	6,17E-15	6,79
RNA2	B2M-4	1,22E-13	-12,914	0,03	0,975	1,17E-13	-12,930	0,03	0,977	1,20E-13	3,23E-15	2,70
RNA2	GAPDH-6	1,84E-13	-12,734	0,02	0,990	2,05E-13	-12,688	0,02	0,986	1,95E-13	1,47E-14	7,57
RNA2	HMBS-7	2,05E-16	-15,688	0,03	0,982	2,03E-16	-15,694	0,03	0,981	2,04E-16	1,78E-18	0,87
RNA2	HPTR1-4	3,53E-16	-15,452	0,02	0,988	3,57E-16	-15,447	0,02	0,992	3,55E-16	3,03E-18	0,85
RNA2	RPL13A-4	5,86E-14	-13,232	0,02	0,986	6,26E-14	-13,204	0,02	0,990	6,06E-14	2,84E-15	4,68
RNA2	SDHA-4	2,27E-15	-14,645	0,04	0,918	2,25E-15	-14,647	0,04	0,917	2,26E-15	9,09E-18	0,40
RNA2	TBP-5	2,52E-16	-15,598	0,02	0,990	2,54E-16	-15,595	0,03	0,979	2,53E-16	1,28E-18	0,50
RNA2	UBC-4	4,04E-14	-13,394	0,02	0,988	4,05E-14	-13,392	0,02	0,989	4,05E-14	1,09E-16	0,27
RNA2	YWHAZ-4	1,08E-14	-13,968	0,03	0,984	1,02E-14	-13,992	0,03	0,973	1,05E-14	4,13E-16	3,95
RNA3	ACTB-6	5,10E-14	-13,292	0,03	0,965	5,28E-14	-13,278	0,03	0,974	5,19E-14	1,23E-15	2,37
RNA3	B2M-4	6,22E-14	-13,206	0,04	0,956	5,87E-14	-13,231	0,04	0,952	6,05E-14	2,48E-15	4,10
RNA3	GAPDH-6	2,14E-13	-12,669	0,02	0,985	2,14E-13	-12,670	0,02	0,986	2,14E-13	3,39E-16	0,16
RNA3	HMBS-7	7,54E-17	-16,123	0,03	0,968	8,08E-17	-16,093	0,04		7,81E-17	3,84E-18	4,91
RNA3	HPTR1-4	2,15E-16	-15,668	0,03	0,985	2,15E-16	-15,667	0,02	0,990	2,15E-16	3,57E-19	0,17
RNA3	RPL13A-4	4,49E-14	-13,348	0,02	0,990	4,53E-14	-13,344	0,02	0,993	4,51E-14	2,37E-16	0,53
RNA3	SDHA-4	2,49E-15	-14,603	0,04	0,909	2,50E-15	-14,602	0,04	0,945	2,50E-15	4,43E-18	0,18
RNA3	TBP-5	2,85E-16	-15,546	0,03	0,986	2,86E-16	-15,543	0,03	0,983	2,86E-16	1,2E-18	0,42
RNA3	UBC-4	5,56E-14	-13,255	0,02	0,988	5,62E-14	-13,250	0,02	0,989	5,59E-14	4,31E-16	0,77
RNA3	YWHAZ-4	1,10E-14	-13,960	0,03	0,969	1,10E-14	-13,957	0,03	0,976	1,10E-14	5,49E-17	0,50

Probe	Gen	Experiment1				Experiment2				Mittelwert		
		EC50	LOGEC50	SE (LOGEC50)	R ²	EC50	LOGEC50	SE (LOGEC50)	R ²	MW(EC(50))	STABW(EC59)	STAB(%)
RNA4	ACTB-6	4,81E-14	-13,318	0,02	0,991	4,72E-14	-13,326	0,02	0,993	4,77E-14	6,48E-16	1,36
RNA4	B2M-4	1,58E-13	-12,802	0,02	0,986	1,53E-13	-12,816	0,03	0,973	1,55E-13	3,6E-15	2,32
RNA4	GAPDH-6	2,08E-13	-12,682	0,02	0,991	2,15E-13	-12,668	0,02	0,986	2,11E-13	4,9E-15	2,32
RNA4	HMBS-7	1,56E-16	-15,807	0,03	0,984	1,56E-16	-15,806	0,03	0,984	1,56E-16	2,91E-19	0,19
RNA4	HPTR1-4	3,52E-16	-15,454	0,02	0,992	3,67E-16	-15,435	0,02	0,991	3,60E-16	1,1E-17	3,05
RNA4	RPL13A-4	8,31E-14	-13,081	0,02	0,987	8,83E-14	-13,054	0,02	0,992	8,57E-14	3,67E-15	4,28
RNA4	TBP-5	3,18E-16	-15,498	0,02	0,989	3,20E-16	-15,495	0,02	0,988	3,19E-16	1,63E-18	0,51
RNA4	UBC-4	4,71E-14	-13,327	0,02	0,987	4,91E-14	-13,309	0,02	0,986	4,81E-14	1,41E-15	2,93
RNA5	GAPDH-6	6,40E-14	-13,194	0,02	0,986	6,74E-14	-13,172	0,02	0,987	6,57E-14	2,37E-15	3,62
RNA5	HPTR1-4	4,13E-17	-16,384	0,05	0,913	3,94E-17	-16,405	0,06	0,903	4,03E-17	1,33E-18	3,29
RNA5	RPL13A-4	3,02E-14	-13,521	0,02	0,989	3,03E-14	-13,518	0,02	0,987	3,02E-14	1,23E-16	0,41
RNA5	TBP-5	6,56E-17	-16,183	0,04	0,965	5,96E-17	-16,225	0,04	0,944	6,26E-17	4,26E-18	6,81
RNA5	UBC-4	6,88E-15	-14,162	0,03	0,983	6,97E-15	-14,157	0,03	0,978	6,93E-15	6,22E-17	0,90
RNA5	YWHAZ-4	2,51E-15	-14,601	0,04	0,960	2,53E-15	-14,596	0,04	0,944	2,52E-15	2,01E-17	0,80

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 11 SNPs des HTR2A- Gens an 513 schizophrenen Patienten sowie 1325 gesunden Kontrollen in Hinblick auf eine eventuelle Assoziation mit der Erkrankung Schizophrenie untersucht.

Das HTR2A- Gen kodiert für den Serotonin- 2A- Rezeptor, der als wichtiger Zielrezeptor für atypische Neuroleptika dient und deshalb ein potentielles Kandidatengen für die Schizophrenie darstellt. Durch Polymorphismen in den translatierten Bereichen des Gens, wie sie in dieser Arbeit untersucht wurden, wird die Aminosäureabfolge der Rezeptorproteine verändert, was seine Bindungseigenschaften für Serotonin, aber auch für synthetische Substanzen, wie zum Beispiel Clozapin, verändern könnte.

Des weiteren wurden auch SNPs in nicht- codierenden und im Promoterbereich untersucht. Diese Polymorphismen könnten im Kopplungsungleichgewicht mit funktionellen Varianten liegen oder direkt die Genregulation und so die Expression des Serotonin- 2A- Rezeptors beeinflussen, während intronische SNPs die DNA-Sequenz so verändern könnten, dass neue Spleißvarianten entstehen, die wiederum die Eigenschaften des Rezeptors beeinflussen.

Von den in dieser Arbeit untersuchten 11 SNPs des HTR2A- Gens zeigte keiner dieser Marker eine Assoziation mit Schizophrenie. Lediglich bei SNP rs7333412 war ein Trend dahingehend erkennbar, dass ein Genotyp ($p= 0,0798$) und ein Allel ($p= 0,050$) bei Erkrankten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen gehäuft auftritt.

Die Erkrankung Schizophrenie äußert sich in einem sehr komplexen Phänotyp, bei dem nicht alle Symptome zwingend vorhanden sein müssen oder zumindest unterschiedlich ausgeprägt sein können. So handelt es sich auch bei den in dieser Studie einbezogenen Patienten um ein phänotypisch heterogenes Patientenkollektiv, in dem verschiedene Subtypen und Erscheinungsformen der Erkrankung zu einem Kollektiv zusammengefasst sind. Nur aufgrund der Tatsache, dass keiner der hier untersuchten SNPs mit der Erkrankung assoziiert ist, kann somit noch nicht der Schluss gezogen werden, dass auch keine Assoziation mit einem bestimmten Subtyp oder einem bestimmten Symptomkomplex bestehen könnte. Aufgrund der Heterogenität der Erkrankung ist es schwierig, einem bestimmten Subtypen einen Genotypen zuzuordnen. Im Umkehrschluss könnte auch bei einer Assoziation eines

oder mehrerer Marker nicht vermutet werden, dass diese in jedem individuellen Fall der Erkrankung eine Rolle bei der Ausbildung einer Psychose spielen. Derzeit wird angenommen, dass es sich bei der Schizophrenie auch um eine genetisch heterogene Erkrankung handelt. So könnte das HTR2A- Gen in einer bestimmten Population mit der Erkrankung assoziiert sein, in einer weiteren Population könnte es dagegen keine signifikante Rolle spielen (Owen et al., 2005).

rs7333412 liegt in der nicht codierenden 3'-Region, bereits außerhalb der mRNA und der poly(A)-Sequenz des HTR2A- Gens, wodurch eine Rolle bei der Genregulation oder auch ein Einfluss auf das Spleißen des Genprodukts mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann. Es ist aber durchaus denkbar, dass dieser SNP als Marker für einen anderen, funktionellen SNP dient, der mit der Erkrankung assoziiert ist. So zeigt rs7333412 ein vollständiges LD ($D' = 1,0$) mit den beiden intronischen SNPs rs7322347 und rs1923882, die beide nahe dem Übergang von Intron2 zu Exon3 lokalisiert sind (Hapmap, 2009). Diese beiden Polymorphismen könnten mit ihren Allelen zu alternativem Spleißen führen oder aber die Faltung der DNA im Bereich des Gens verändern, was die Bindung der für die Transkription notwendigen Enzyme erschweren oder auch erleichtern könnte. Welcher dieser SNPs oder Mechanismen letztlich für den Trend zur Assoziation verantwortlich ist, kann im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht geklärt werden. Auch die Möglichkeit eines falsch-positiven Befundes kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Für die restlichen zehn Polymorphismen konnte in unserer Stichprobe kein Hinweis auf eine Assoziation gefunden werden. Dafür könnte es mehrere Gründe geben. Das HTR2A- Gen ist mit etwa 62 600 bp ein moderat großes Gen, in dem mittlerweile 424 SNPs annotiert sind. Davon sind nur zehn SNPs in kodierenden Bereichen lokalisiert, von denen wiederum nur fünf zu einem Aminosäureaustausch führen. Unter den funktionellen SNPs befinden sich auch die in dieser Arbeit untersuchten Marker rs6314 (His452Tyr), rs6308 (Val447Ala), rs1805055 (Asn2Thr). Auch wenn keiner der hier untersuchten SNPs mit der Schizophrenie an sich assoziiert war, so ist es durchaus denkbar, dass andere, vielleicht noch nicht identifizierte oder sehr seltene Polymorphismen des HTR2A- Gens mit der Erkrankung oder einer ihrer Subtypen assoziiert sind.

Eine weitere Ursache für die negativen Befunde liegt möglicherweise in der Auswahl des untersuchten Probandenkollektivs begründet. Obwohl die Probanden gleicher ethnischer Herkunft waren und strengen Ausschlusskriterien, wie zum Beispiel

Substanzabusus oder organischen Psychosen, unterworfen wurden und auch die Diagnose sehr sorgfältig validiert wurde, erfolgte keine Auswahl nach bestehendem Subtypus der Erkrankung. Da auch keine Auswahl der Patienten nach Alter oder Erkrankungsdauer erfolgte, ist es durchaus denkbar, dass der altersbedingte Rückgang der Serotonin- 2A- Rezeptoren zu falsch negativen Ergebnissen führen könnte.

Neben der Auswahl der Patientengruppe ist auch die Wahl der Kontrollgruppe ein ganz entscheidender Faktor. In der vorliegenden Fall- Kontroll- Studie wurde eine gesunde Vergleichsgruppe unter strengen Ein- und Ausschlusskriterien gewählt. Vorteil gesunder Kontrollprobanden ist, dass sich Assoziationen zu krankheitsrelevanten Phänotypen leichter detektieren lassen. Der Nachteil besteht allerdings darin, dass im Falle einer Assoziation nicht zwangsläufig differenzierbar ist, ob diese im Zusammenhang mit Schizophrenie (Arranz et al., 1995) selbst oder einer komorbiden psychiatrischen Störung steht.

Die Größe des Probandenkollektivs ist ebenfalls ein wesentlicher Faktor, der dazu führen kann, dass Varianten mit lediglich kleinem Effekt nicht detektiert werden.

Aufgrund der hier untersuchten Stichprobengröße scheint dies als Ursache für die negativen Ergebnisse jedoch eher unwahrscheinlich.

Zuletzt ist es auch durchaus möglich, dass Polymorphismen im HTR2A- Gen tatsächlich nicht mit Schizophrenie assoziiert sind und es sich bei dem positiven Befund für rs7333412 im Zusammenhang mit der Erkrankung um ein falsch-positives Ergebnis handelt. Dagegen sprechen allerdings die vielen positiven Befunde in der Literatur, welche auf eine Rolle des HTR2A- Gens bei der Ätiologie der Schizophrenie hindeuten.

Neben der Überprüfung einer möglichen Assoziation der untersuchten Einzelmarker mit Schizophrenie wurde auch eine Haplotypanalyse durchgeführt. Dabei ergaben sich zwei Haplotypblöcke, deren zugehörige SNPs sich sowohl in der gesamten Stichprobe, als auch in den einzelnen Subgruppen, schizophrenen Patienten und gesunden Kontrollen, im Kopplungsungleichgewicht befinden.

Hinsichtlich der Verteilung der Haplotypfrequenzen zeigen sich beim Vergleich von schizophrenen Patienten mit gesunden Kontrollen keine signifikanten Unterschiede für die Haplotypen in Block 1 (rs2770296, rs582385).

Die Allelkombination 3 (AG) der SNPs rs4941573 und rs4142900 in Haplotypblock 2 war jedoch häufiger bei Patienten zu finden ($\chi^2 = 3,542$, $p = 0,0598$), dabei konnte aber nur ein Trend festgestellt werden, eine statistische Signifikanz mit $p < 0,05$ konnte nicht erreicht werden. Damit bestätigen die Ergebnisse der Haplotypanalyse die Befunde zu den Einzelmarkern, denn auch hier zeigt sich keine signifikante Assoziation mit der Erkrankung Schizophrenie.

Der Ansatz der Haplotypanalyse wurde in Bezug auf das HTR2A- Gen im Zusammenhang mit Schizophrenie bisher nur einmal verfolgt. Fanous und Mitarbeiter untersuchten zehn HapMap tagSNPs und zwei der häufig publizierten HTR2A-SNPs in einer großen irischen familienbasierten Stichprobe. Sie identifizierten dabei zwei Haplotypblöcke. Haplotyp 1 umfasste die vier SNPs rs3125, rs6314 (His542Tyr), rs659734 und rs1745837, während Haplotyp 2 sich aus den Polymorphismen rs6314 (His542Tyr), rs659734, rs1745837 und rs1928042 zusammen setzte. Auch diese Arbeitsgruppe konnte keine signifikante Assoziation bestimmter Haplotypen mit der Erkrankung selbst feststellen. Allerdings waren zwei Haplotypen signifikant mit dem Symptom Psychose assoziiert (Fanous et al., 2009).

Die Ergebnisse von Fanous und Mitarbeitern könnten einen Hinweis auf die Ursache des in der vorliegenden Arbeit gefundenen Trends zu einer Assoziation mit der Erkrankung geben. So wäre es auch hier möglich, dass zwar kein Zusammenhang zwischen dem genannten Haplotypen und der Schizophrenie selbst vorliegt, dafür aber mit dem Symptom Psychose. Allerdings wurden in der irischen Arbeitsgruppe andere htSNPs untersucht, als in der vorliegenden Arbeit, so dass sich die Ergebnisse beider Studien nur bedingt vergleichen lassen.

Das HTR2A- Gen ist Gegenstand intensiver Forschung. Besonders ausgiebig wurden die Polymorphismen rs6313 (T102C), rs6311 (A(-1438)G) und rs6314 (His452Tyr) im Zusammenhang mit der Schizophrenie untersucht. Während der SNP rs6314 in der vorliegenden Arbeit direkt untersucht wurde, wurden die anderen beiden häufig publizierten Polymorphismen nicht genotypisiert. Statt dessen wurden jedoch ein Marker miteinbezogen (rs4941573), der mit rs6311 und rs6313 im vollständigen Kopplungsungleichgewicht ($D' = 1,0$; $R^2 = 1,0$) liegt (Hapmap, 2009). Deshalb soll auch auf diese beiden Polymorphismen im Folgenden genauer eingegangen werden.

Eine asiatische Arbeitsgruppe lenkte bereits 1996 das Interesse auf den exonischen, stillen Polymorphismus T102C. In diese frühe Untersuchung wurden 62 japanische schizophrene Patienten und 96 gesunde, nicht verwandte japanische Kontrollpersonen eingeschlossen (Inayama et al., 1996). Als Ergebnis zeigte sich ein signifikant häufigeres Vorkommen des C- Allels ($p < 0,05$) sowie des C/C- Genotyps ($p < 0,05$) bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Das relative Risiko von Trägern des C/C- Genotyps wurde mit 2,86 angegeben ($p < 0,01$).

Die Ergebnisse der japanischen Studie konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, denn der mit dem T102C- Polymorphismus im vollständigen LD liegende rs4941573 zeigte keine signifikanten Assoziationen mit der Schizophrenie.

Dafür kommen mehrere Gründe in Frage. Zum einen wurden zwei ethnisch sehr divergente Populationen untersucht, die sich auch durch die Allelfrequenzen des T102C-Polymorphismus deutlich unterscheiden (T= 0,50, C= 0,50 bei Japanern; T= 0,55, C= 0,45 bei Kaukasiern), zum anderen wurde bei Inayama und Mitarbeitern eine sehr kleine Stichprobe untersucht. Des Weiteren fällt bei der Stichprobenauswahl bei Inayama et. al auf, dass der männliche Anteil an schizophrenen Probanden mit 59% deutlich höher als der Anteil an weiblichen Probanden war. In der Kontrollstichprobe überwogen dagegen weibliche Studienteilnehmer mit 60%.

Auch in der vorliegenden Stichprobe sind die Geschlechter in der Patienten- und Kontrollgruppe nicht homogen verteilt. So beträgt der Frauenanteil bei den schizophrenen Studienteilnehmern 35,5%, bei den gesunden Kontrollprobanden jedoch 54,7%.

Wird von geschlechtsspezifischen Risikofaktoren ausgegangen, dann könnten diese Ungleichgewichte in der Geschlechterverteilung zu einer heterogenen Stichprobe und somit zu falsch- positiven bzw. falsch- negativen Ergebnissen geführt haben.

Erdmann und Mitarbeiter führten ein systematisches *screening* nach Mutationen im HTR2A- Gen durch und genotypisierten letztlich die vier SNPs Tyr25Asn, T102C, Tyr25Asn und die bis *dato* noch nicht annotierte Variante C516T, die zu keinem Aminosäureaustausch führt (Erdmann et al., 1996).

Die Genotypisierung erfolgte zunächst an 45 schizophrenen Patienten und 46 gesunden Kontrollpersonen. Die schizophrenen Patienten erfüllten die Diagnosekriterien nach DSM- III, etwa die Hälfte berichtete von Fällen von

Depression bei erst- oder zweitgradig Verwandten. Für die 46 teilnehmenden Kontrollpersonen wurden als Ausschlusskriterium Fälle von Schizophrenie oder bipolaren affektiven Erkrankungen in der näheren Familie festgelegt. Eine weitere psychiatrische Charakterisierung erfolgte nicht.

Außerdem wurde noch eine weitere Stichprobe aus 278, nicht näher charakterisierten schizophrenen Patienten und 207 Kontrollpersonen herangezogen. Diese Kontrollgruppe bestand aus anonymen Probanden, von denen jeweils nur die ethnische Herkunft, das Geburtsjahr und das Geschlecht bekannt waren. Alle Studienteilnehmer waren nicht verwandt und deutschen Ursprungs.

Es konnte keine Assoziation für die Marker Tyr25Asn, His452Tyr und C516T gefunden werden. Das Allel 102C- Allels war jedoch bei schizophrenen Patienten häufiger zu finden als bei den Kontrollpersonen ($p=0,041$), so dass die Autoren von einer Assoziation des T102C- Polymorphismus mit Schizophrenie ausgingen.

Die Ergebnisse in Bezug auf den SNP T102C konnten in dieser Arbeit, vertreten durch den mit T102C im vollständigen LD befindenden rs4941573 nicht bestätigt werden, obwohl beide verwendeten Stichproben deutschen Ursprungs waren. Ein Grund hierfür könnte die unterschiedliche Stichprobengröße sein, da Erdmann und Mitarbeiter nur etwa die Hälfte an schizophrenen Probanden und etwa ein Drittel an Kontrollpersonen zur Verfügung stand. Ein zweiter Hinweis könnten die unterschiedlich strengen Auswahlkriterien bezüglich der Probandenrekrutierung sein. Während in der vorliegenden Arbeit nur Kontrollpersonen miteinbezogen wurden, die sowohl selbst, als auch in der engeren Familie keine psychiatrischen Erkrankungen aufwiesen, waren bei Erdmann et al. 2/5 der Kontrollpersonen anonym, so dass keinerlei psychiatrische Anamnese möglich war. Bei den übrigen 3/5 wurden nur schizophrene Erkrankungen ausgeschlossen.

Eine groß angelegte Untersuchung zum T102C- Polymorphismus wurde von Williams und Mitarbeitern durchgeführt (Williams et al., 1996). In einer *multicenter* Studie wurden aus sechs europäischen Nationen insgesamt 571 Patienten mit der Diagnose Schizophrenie oder schizoaffektiver Störung und 639 Kontrollpersonen rekrutiert.

Tabelle 6-1: Studienteilnehmer, Allel- und Genotypverteilung bei Williams et al, 1996

Nation		Studien- teilnehmer	T-Allel (%)	C-Allel (%)	T/T (%)	T/C (%)	C/C (%)
Österreich	Patienten	42	44	56	13,9	61,1	25,0
	Kontrollen	57	49	51	19,3	59,6	21,1
Frankreich	Patienten	101	35	65	6,9	55,4	37,6
	Kontrollen	122	45	55	20,5	49,2	30,3
Deutschland	Patienten	100	38	63	11,0	53,0	36,0
	Kontrollen	100	47	53	22,0	50,0	28,0
Irland	Patienten	37	30	70	10,8	37,8	51,4
	Kontrollen	89	39	61	13,5	51,7	34,8
Italien	Patienten	100	44	56	18,0	52,0	30,0
	Kontrollen	103	50	50	26,2	46,6	27,2
Schweden	Patienten	67	29	71	4,5	49,3	46,3
	Kontrollen	74	34	66	9,5	48,6	41,9
Großbritannien	Patienten	94	44	56	18,1	51,1	30,9
	Kontrollen	94	41	59	17,0	47,9	35,1

Williams et al. konnten die Genotypen 102C/T und 102C/C signifikant häufiger bei Patienten als bei Kontrollen nachweisen ($p=0,008$), ebenso wie das 102C- Allel ($p=0,003$). Interessant ist hierbei, dass schon diese frühe Studie einen Zusammenhang zwischen geographischer Herkunft der Stichprobe und der Allelverteilung zeigt, wie sie später von Baritaki et al. (2004) bestätigt wurden. Auch hier steigt die Häufigkeit des 102C- Allels mit nördlicher Lage an.

Die Ergebnisse aus dieser Studie widersprechen denen aus der vorliegenden Arbeit. Bei der Interpretation dieser Befunde ist jedoch zu beachten, dass es einen entscheidenden Unterschied in beiden Studiendesigns gibt. Während bei der Gruppe um Williams sowohl Patienten mit Schizophrenie als auch mit schizoaffektiven Störungen mit einbezogen wurden, wurde in dieser Arbeit streng darauf geachtet, dass die Patienten die Diagnosekriterien der Schizophrenie nach DSM- IV erfüllen. Somit könnte es möglich sein, dass die Ergebnisse der beiden Arbeiten nicht miteinander vergleichbar sind und keine Schlüsse bezüglich der Validität gezogen werden können.

Mit einer relativ großen Stichprobe untersuchte Golimbet ebenfalls den T102C- SNP. An dieser Untersuchung nahmen 919 Patienten und 500 psychisch gesunde Kontrollpersonen teil. Die Patientengruppe umfasste dabei 777 nach ICD 10 als

schizophren einzustufende Individuen und 142 Patienten mit schizoaffektiven Störungen. Alle registrierten Genotypfrequenzen entsprachen den Anforderungen des HWE, und die Allelfrequenzen der Gesamtstichprobe entsprachen denen der meisten europäischen Populationen. Zwischen den Subgruppen zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied der Allel- und Genotypfrequenzen. So waren sowohl das C- Allel als auch der T/C- und C/C- Genotyp überzufällig häufig bei schizophrenen und schizoaffektiven Patienten anzutreffen als bei Kontrollen (jeweils $p=0,02$).

Grundsätzlich zeigen sich neben der unterschiedlichen ethnischen Herkunft der Probanden auch einige Differenzen im Studienaufbau zur vorliegenden Arbeit. So wurden bei der Probandenauswahl in der russischen Stichprobe weniger strenge Auswahlkriterien gewählt. Die Diagnosestellung Schizophrenie erfolgt im System ICD 10 bereits bei einem Vorhandensein der Symptomatik von vier Wochen, während das Diagnosesystem DSM- IV eine Mindestdauer von sechs Monaten verlangt. Kürzer andauernde Symptomatik wird dagegen in DSM- IV als schizophreniforme Störung interpretiert. Außerdem bezogen die russische Arbeitsgruppe sowohl schizophrene Patienten als auch Individuen mit schizoaffektiven Psychosen mit ein, während in dieser Arbeit nur Probanden berücksichtigt wurden, die nach DSM- IV als schizophren diagnostiziert wurden.

Kürzlich wurden in einer relativ kleinen rumänischen Stichprobe die drei Polymorphismen T102C, A-1436G und His452Tyr untersucht. Die genotypisierte Population umfasste 82 männliche Patienten mit Diagnosestellung nach DSM- IV und 82 gesunde männliche Kontrollpersonen (Procopciuc et al., 2009). Für zwei der drei Polymorphismen wurde dabei eine signifikante Assoziation mit Schizophrenie festgestellt. So betrug das Risiko, eine Schizophrenie zu entwickeln, das 1,52-fache für 102C/T- Träger ($p=0,29$) und das 3,02-fache für 102C/C- Träger ($p=0,001$) im Vergleich zu Individuen mit 102T/T- Genotyp. Das C- Allel war signifikant häufiger bei Schizophrenen als bei gesunden Kontrollen zu finden ($p=0,01$). Ähnliche Resultate konnten für den A-1438G SNP festgestellt werden. So barg der A/G- Genotyp ein 1,31- faches Risiko ($p=0,4$) und der G/G- Genotyp ein 2,43- faches Risiko ($p=0,03$) im Vergleich zu A/A- Trägern. Das G- Allel war bei Patienten häufiger als bei Kontrollen ($p=0,001$).

Für den His452Tyr konnten kein Zusammenhang mit der Erkrankung festgestellt werden.

Die Befunde dieser Arbeitsgruppe stehen im Widerspruch zu den hier vorliegenden Ergebnissen. Es gibt jedoch sehr starke Unterschiede zwischen den Studiendesigns. So wurden in die rumänische Studie nur Männer einbezogen. Eine weitere Auffälligkeit ist, dass die beiden Polymorphismen T102G und A-1438G in dieser Stichprobe nicht im Kopplungsungleichgewicht liegen, wie in anderen kaukasischen Stichproben. Das könnte darauf hinweisen, dass die Ergebnisse aus dieser Stichprobe nicht mit anderen kaukasischen Stichproben verglichen werden können.

Neben den publizierten Assoziationen des C- Allels des T102C Polymorphismus mit Schizophrenie wurden auch gegenteilige Befunde berichtet. Die Arbeitsgruppe um Baritaki genotypisierte dazu diesen SNP an einer relativ kleinen griechischen Stichprobe aus 114 schizophrenen Patienten und 182 gesunden Kontrollpersonen (Baritaki et al., 2004). Im Gegensatz zum überwiegenden Anteil der Assoziationsstudien an kaukasischen Stichproben war hier das C- Allel in der Kontrollgruppe signifikant häufiger vertreten als das T- Allel ($p < 0,001$). Analog hierzu zeigte sich in der gleichen Stichprobe eine signifikante Assoziation des T-Allels mit der Erkrankung ($p < 0,0001$) und eine überzufällige Häufung des TT- Genotyps in der Patientengruppe ($p = 0,0001$, odds ratio= 3,59).

Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch eine spanische Arbeitsgruppe. Sie untersuchte eine kleine Stichprobe aus 114 spanischen Patienten und 142 gesunden spanischen Kontrollpersonen ohne psychiatrische Vorgeschichte in Bezug auf den T102C- Polymorphismus. Dabei konnten sie eine Allelfrequenz des T- Allels von 0,54 im Patientenkollektiv feststellen, die signifikant höher war, als bei der Kontrollgruppe (Frequenz= 0,44) (Penas-Lledo et al., 2007). Neben der geringen Individuenanzahl könnte sich hier auch die diskordante Geschlechterverteilung als problematisch erwiesen haben. Während der Frauenanteil in der Kontrollgruppe bei 50% lag, wurden im Patientenkollektiv nur 11% Frauen eingeschlossen. Außerdem lag das Durchschnittsalter der Patienten mit 55 Jahren deutlich über dem Durchschnittsalter von 30 Jahren der Kontrollen.

Diese gegenteiligen Befunde lassen sich nur schwer mit dem überwiegenden Anteil der Studien zum T102C Polymorphismus in Einklang bringen. Zwar schließen die Autoren Störfaktoren wie verwandtschaftliche Beziehungen und den Subtyp der

Erkrankung, die zu einem falsch-positiven Ergebnis führen könnten, aus, jedoch darf hier bei der Interpretation die geringe Stichprobengröße in beiden Studien nicht außer Acht gelassen werden. Ein weiterer Anhaltspunkt ist die geographische Lokalisation untersuchten Populationen. Während in Südeuropa die Frequenz des C-Allels bei 0,51 (Griechenland) liegt, beträgt sie in Nordeuropa bereits 0,67 (Schweden). Diese Geographische Verteilung könnte zum einem zu einem falsch-positiven Ergebnis in den südländischen Stichproben führen, zum anderen könnte dies aber auch das häufige Ausbleiben einer Assoziation des Polymorphismus mit Schizophrenie erklären.

Eine weitere Untersuchung, die eher einen Zusammenhang mit dem T- Allel als mit dem C- Allel des T102C Polymorphismus feststellen konnte, wurde von Herken und seinen Mitarbeitern durchgeführt. Sie schlossen 141 nicht verwandte schizophrene Patienten und 79 gesunde Kontrollpersonen in ihre Untersuchung ein. Alle Studienteilnehmer waren türkischen Ursprungs und zeigten keine Unterschiede in ihrer geographischen oder ethnischen Herkunft. Alle schizophrenen Patienten erfüllten die Kriterien einer Diagnose nach DSM- IV.

In dieser Studie konnten keine signifikanten Assoziationen des T102C-Polymorphismus mit der Erkrankung selbst, mit einer eventuellen familiären Vorbelastung, dem Ersterkrankungsalter oder der Erkrankungsdauer registriert werden. Allerdings schien die Frequenz der Klinikaufenthalte bei der Gruppe schizophrener Patienten mit T/T- und T/C- Genotyp signifikant höher als bei Patienten mit dem C/C- Genotyp ($p=0,02$). Herken schloss daraus, dass das der T102C- Polymorphismus auch als Prädiktor für den Schweregrad der Erkrankung dienen könnte.

Während bei einem Großteil der Untersuchungen mit positivem Ergebnis das C- Allel mit der Erkrankung selbst, oder mit der Prognose assoziiert zu sein scheinen, ist hier für Träger des C- Allels das Risiko eines schwereren Verlaufs geringer. Dieser Widerspruch könnte zum einen mit der geringen Stichprobengröße und daraus resultierenden falsch-positiven Ergebnissen zusammenhängen. Zum anderen liegt mit 35% weiblichen Teilnehmern sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollstichprobe bei dieser Untersuchung ein starkes Ungleichgewicht in der Geschlechterverteilung vor. Die Teilnehmer der Stichprobe waren mit einem Durchschnittsalter von 34 Jahren relativ jung, und unter Berücksichtigung der

vermuteten protektive Wirkung des Östrogens könnte es sein, dass diese bei dem geringen Frauenanteil nur unzureichend zu Tragen gekommen sind.

Bisher berichteten eine größere Anzahl an Studien eine positive Assoziation von Polymorphismen im HTR2A- Gen mit der Erkrankung Schizophrenie, vorwiegend in westeuropäischen Kohorten (Baritaki et al., 2004; Erdmann et al., 1996; Penas-Lledo et al., 2007; Williams et al., 1996), aber auch in osteuropäischen (Golimbet et al., 2007; Procopciuc et al., 2009) und asiatischen (Inayama et al., 1996) Stichproben. Bemerkenswert ist dabei die Tatsache, dass in Stichproben mit ähnlicher Ethnizität sowohl das C- Allel, als auch das T- Allel mit eine signifikante Assoziation mit der Erkrankung zeigte. (Tabelle 6-2)

Damit widersprechen diese Befunde denen der vorliegenden Arbeit, in der kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem HTR2A- Gen und der Erkrankung hergestellt werden konnte. Auffällig sind hierbei aber die zum Teil stark divergierenden Studienbedingungen. So wurden Stichproben mit gänzlich unterschiedlichem ethnischen Hintergrund verwendet (Inayama et al., 1996), weniger stringente Diagnosekriterien bei der Patientenwahl eingesetzt (Erdmann et al., 1996; Golimbet et al., 2007; Williams et al., 1996) oder keine weiblichen Studienteilnehmer eingeschlossen (Procopciuc et al., 2009). In diesen unterschiedlichen Studienbedingungen könnte die Ursache dafür liegen, dass in der vorliegenden Arbeit keine positive Assoziation nachgewiesen werden konnte.

Den publizierten Ergebnissen mit positiven Assoziationsbefunden steht eine vergleichbare Anzahl von negativen Studien gegenüber.

Eine frühe Studie untersuchte den T102C- Polymorphismus des HTR2A an einem relativ kleinen Kollektiv (Arranz et al., 1995). Dabei genotypisierten sie eine Gruppe von 149 mit Clozapin behandelten Patienten im Vergleich zu 99 gesunden Kontrollpersonen. Die teilnehmenden Patienten erfüllten die Diagnosekriterien nach DSM- IIR und waren gegen mindestens zwei Neuroleptikaklassen resistent. Alle Studienteilnehmer waren westeuropäischer Herkunft. Während in dieser Veröffentlichung zwar eine Assoziation des T102C- Polymorphismus mit der Clozapin- *response* gefunden werden konnte, ergab sich keine Assoziation mit der Schizophrenie selbst.

In einer zweiten Studie untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe den Zusammenhang zwischen dem His452Tyr Polymorphismus und der Erkrankung (Arranz et al., 1996a). Sie untersuchten 153 nach DSM- IIR als schizophren eingestufte Clozapin-behandelte Patienten mit verschiedenen Neuroleptikaresistenzen und 178 gesunde Kontrollpersonen. Auch hier waren alle Teilnehmer westeuropäischen Ursprungs. Während ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des Tyr-Allels und schlechter Clozapin- *response* gezeigt werden konnte, ergab sich auch hier keine Assoziation des SNPs mit Schizophrenie.

Anhand der gleichen Stichprobe wurde in einer dritten Studie der Promoter-Polymorphismus -1438A/G genotypisiert. Da dieser SNP ein striktes Kopplungsungleichgewicht mit dem T102C Polymorphismus zeigt, ist es nicht überraschend, dass auch hier eine Assoziation mit der Clozapin- *response* nachgewiesen werden konnte, aber keine Assoziation mit Schizophrenie (Arranz et al., 1998a).

Die Gruppe um Arranz konnte in keiner der drei durchgeführten Studien eine Assoziation mit Schizophrenie feststellen. Da die dort verwendete Stichprobe dieselbe ethnische Herkunft zeigte wie die Stichprobe dieser Arbeit, kann davon ausgegangen werden, dass mit den vorliegenden Befunden die Ergebnisse von Arranz und Mitarbeitern bestätigt werden. Allerdings ist zu beachten, dass die Probandenanzahl der Arbeitsgruppe um Arranz relativ klein war.

Gegen eine Assoziation mit Schizophrenie sprechen auch die Ergebnisse einer italienischen Arbeitsgruppe um Verga. Sie genotypisierten den T102C-Polymorphismus am italienischen *subset* der bereits beschriebenen Multicenterstichprobe und konnten im Gegensatz zu Williams keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen feststellen (Verga et al., 1997).

Auch in einer großen irischen Stichprobe konnten keine signifikanten Befunde in Bezug auf die Polymorphismen T102C und His452Tyr gefunden werden (Fanous et al., 2004). Für diese Studie wurden 1425 Individuen, darunter 595 Patienten, aus 270 Kernfamilien genotypisiert, die mehr als ein schizophrene Mitglied aufwiesen. Sie konnten keine Kopplung der beiden Polymorphismen mit der Schizophrenie aufzeigen, jedoch wurden Hinweise darauf gefunden, dass der His452Tyr Polymorphismus mit affektiver Symptomatik assoziiert sein könnte ($p= 0,02$). In dieser Studie wurden sowohl schizophrene als auch affektive Patienten untersucht, was darauf hindeuten könnte, dass der SNP nicht mit einer bestimmten Erkrankung

per se assoziiert ist, sondern mit einer nicht nur für eine Erkrankung spezifischen Symptomatik oder einem bestimmten Endophänotypen (Tabelle 6-2).

Grundsätzlich stimmen die bisher publizierten negativen Ergebnisse mit den Befunden der vorliegenden Arbeit überein. Dennoch gab es auch hier Unterschiede im Studiendesign, vor allem in Bezug auf die Stichprobengröße und Ethnizität, aber auch Alter und Geschlechterverteilung zu den in dieser Arbeit vorliegenden Studienbedingungen. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Übereinstimmung zufällig zustande gekommen ist.

Tabelle 6-2: Ergebnisse der publizierten Fall-Kontroll-Studien des HTR2A-Gens in Bezug auf Schizophrenie

Studie	-1438A/G (rs6311)	Tyr25Asn rs1805055	T102C (rs6313)	His452Tyr (rs6314)
(Arranz et al., 1995) Westeuropäer			Keine Assoziation	
(Arranz et al., 1996b) Westeuropäer				Keine Assoziation
(Arranz et al., 1998a)Westeuropäer	Keine Assoziation			
(Baritaki et al., 2004) Griechen			T- Allel assoziiert	
(Erdmann et al., 1996) Deutsche		Keine Assoziation	C- Allel assoziiert	Keine Assoziation
(Fanous et al., 2004), Iren			Keine Assoziation	Keine Assoziation
(Golimbet et al., 2007), Russen			C- Allel assoziiert	
(Herken et al., 2003), Türken			Keine Assoziation	
(Inayama et al., 1996) Japaner			C- Allel assoziiert	
(Penas-Lledo et al., 2007), Spanier			T-Allel assoziiert	
(Procopciuc et al., 2009), Rumänen	G- Allel assoziiert		C- Allel assoziiert	Keine Assoziation
(Williams et al., 1996), Kaukasier			C- Allel assoziiert	
(Verga et al., 1997), Italiener			Keine Assoziation	

Für diese insgesamt kontroversen Befunde in Bezug auf die Polymorphismen T102C, -1438A/G und His452Tyr kommen mehrere Begründungen in Frage. Zunächst lässt sich nicht zweifelsfrei ausschließen, dass zumindest ein Teil der gefundenen Assoziationen falsch- positiv sein könnten (Vaquero et al., 2006).

Außerdem ist anzunehmen, dass jedes Gen und jeder Polymorphismus eine nur sehr kleine *a priori* Wahrscheinlichkeit für eine wirkliche Assoziation besitzt, und auch die Signifikanz dafür nur gering ausfällt. Eine weitere Ursache könnte sein, dass die SNPs, für die widersprüchliche Ergebnisse gefunden wurden, in einigen Stichproben für andere benachbarte Polymorphismen als Marker dienen könnten, die ein wirkliches Risikoallele für die Schizophrenie darstellen (Clifford and Nunez, 1996; Malhotra et al., 1996a). Aber auch die Studienbedingungen oder genetische und phänotypische Heterogenität können zu divergierenden Ergebnissen führen:

Ethische Abstammung der einbezogenen Stichprobe

Ein bedeutender Unterschied zwischen den hier diskutierten Referenzstudien ist in der Ethnizität der Studienteilnehmer zu finden. Grundsätzlich könnte es sein, dass Effekte, die das Serotonin- 2A- Rezeptorgen auf die Suszeptibilität für Schizophrenie ausübt, nur sehr gering sind und dass diese auch nicht immer und nicht in jeder Population zum Tragen kommen (Dean, 2003). Einen Hinweis hierauf gibt die Allelverteilung des T102C in europäischen Populationen. Die Allelfrequenzen des T102C- Polymorphismus unterliegen einer deutlichen geographischen Verschiebung (Baritaki et al., 2004). So haben südeuropäische Länder mit ähnlichem Breitengrad eine Frequenz des C-Allels von 0,505 (Griechenland) bis 0,51 (Italien). Diese Frequenz steigt mit der nördlichen Herkunft der Stichprobe (Frankreich: 0,55; Großbritannien: 0,59; Schweden: 0,67) (Williams et al., 1996). Es wäre möglich, dass mit der Allelfrequenz des C- Allels auch der Einfluss in Hinblick auf die Erkrankung Schizophrenie steigt. Auch eine Heterogenität innerhalb einer Stichprobe und Populationsstratifikationseffekte, können zu falsch- positiven oder auch falsch- negativen Ergebnissen führen.

Diagnosestellung und Einschlusskriterien

Ein weiterer Faktor, der die Befunde von Assoziationsstudien beeinflussen kann, sind die Kriterien, anhand derer Probanden in die jeweilige Studie eingeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Patienten einbezogen, die nach DSM-

IV als schizophren eingestuft werden. DSM- IV verlangt für die Diagnosestellung Schizophrenie die stringente Erfüllung bestimmter Kriterien, wie zum Beispiel das Vorliegen psychotischer Symptome für eine Dauer von sechs Monaten. Das Klassifikationssystem ICD 10, das in einigen Referenzstudien verwendet wurde, erfordert in mancher Hinsicht eine weniger dauerhafte Symptomatik.

Im Gegensatz zu dieser Studie wurde bei manchen Arbeitsgruppen auch Patienten des schizophrenen Spektrums, wie schizoaffektive Störungen oder andere psychotische Erkrankungen mit eingeschlossen. Es ist anzunehmen, dass diesen Erkrankungen und der Schizophrenie eine gemeinsame genetische Basis zu Grunde liegt (Maier et al., 1999). Somit wurden über die einzelnen Studien hinweg sehr heterogene Populationen untersucht, was die Inkonsistenz der Ergebnisse mit bedingen könnte.

Neben der Patientengruppe ist auch die Auswahl der Kontrollpersonen von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurden nur psychiatrisch unauffällige Individuen eingeschlossen, während in einigen Referenzstudien keinerlei Begutachtung der Kontrollpersonen erfolgte und bereits das Fehlen einer Schizophrenie als Einschlusskriterium ausreichend war. Es ist außerdem wichtig, ein ausgewogenes Verhältnis zwischen den Geschlechtern einzuhalten, damit eventuellen geschlechtsspezifischen Einflüssen, wie zum Beispiel die protektive Wirkung des Östrogens nicht zu geringen oder zu starken Einfluss auf die Ergebnisse nehmen können.

Des Weiteren sollten die Kontrollpersonen nicht zu jung sein, da vor Erreichen des 35. Lebensjahres die Möglichkeit besteht, dass auch hier eine Schizophrenie ausbricht. Außerdem spielt das Alter auch dann eine entscheidende Rolle, wenn Gene untersucht werden, deren Produkte eine Altersabhängigkeit zeigen, wie das beim 5-HT_{2A}- Rezeptor der Fall ist. Bei diesem Rezeptorsubtyp tritt ab dem 20. Lebensjahr ein fortschreitender Verlust der Rezeptordichte um bis zu 70% auf, der in der fünften Lebensdekade ein Plateau mit etwa 30% der juvenilen Rezeptordichte erreicht (Papassotiropoulos et al., 2005). Ist das Durchschnittsalter der Probanden zu hoch, so könnten Phänotypeneffekte, die nur in juvenilen Lebensphasen messbar sind, übersehen werden.

Genetische und phänotypische Heterogenität

Die Begründung für die widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur könnte auch in der phänotypischen Heterogenität der Erkrankung und der für die Erkrankung verantwortlichen Gene liegen. Wie bereits erwähnt, ist das Krankheitsbild der Schizophrenie sehr heterogen. Dies macht es problematisch, einen bestimmten Genotypen einem Phänotypen zuzuordnen. Die Möglichkeit, dass ein bestimmter Genotyp in einer Subgruppe schizophrener Patienten die Suszeptibilität beeinflusst, in einer anderen Subgruppe aber nicht, ist nicht von der Hand zu weisen. Grundsätzlich muss auch in Betracht gezogen werden, dass die untersuchten Polymorphismen keinen Einfluss auf die Erkrankung selbst nehmen, sondern nur auf einen bestimmten Teilaspekt, wie zum Beispiel die Stimmungslage oder die negativen Symptome (Abdolmaleky et al., 2004). In Einklang mit dieser Vermutung befinden sich einige Studien, die für den T102C- SNP zwar keine Assoziation mit der Erkrankung selbst, dafür aber mit Neuroleptikaantwort und Tardiver Dyskinesie zeigen konnten (Basile et al., 2001; Segman et al., 2001; Tan et al., 2001).

Es besteht also die Möglichkeit, dass Gene nicht für die Schizophrenie *per se* kodieren, sondern für intermediäre Phänotypen (Endophänotypen), wie zum Beispiel neurokognitive Defizite (de Quervain et al., 2003; Papassotiropoulos et al., 2005) oder Psychosen (Craddock and Owen, 2007). Die Verwendung von Endophänotypen bei genetischen Studien könnte die ätiologische Homogenität verbessern und so das Problem der schlechten Replizierbarkeit von Assoziationsbefunden lösen (Owen et al., 2007).

Nicht zuletzt muss aber auch in Betracht gezogen werden, dass die bisherige Hypothese von vielen häufigen Variationen mit nur jeweils kleinem Effekt nicht zur Aufklärung der genetischen Ursachen der Schizophrenie führt. McClellan und Mitarbeiter (2007) schlagen vor, die Schizophrenie nicht als Ergebnis kombinierter Effekte von multiplen und nur schwach penetranten Polymorphismen zu betrachten, sondern als eine hoch heterogene genetische Entität, die durch multiple, hoch penetrante, aber sehr seltene Mutationen, den *copy number variations* (CNV), verursacht wird. Diese seltenen CNVs können dabei für Familien oder sogar Individuen spezifisch sein. Nach diesem „*common disease – rare alleles*“ Modell bedingen viele verschiedene sehr seltene Mutationen in vielen Genen den gleichen Phänotypen der Schizophrenie.

Ein anderes Modell, das für die Schizophrenie in Betracht gezogen wird, ist epigenetischer Natur. So könnte die Erkrankung nicht durch Veränderungen in der DNA-Sequenz, sondern durch erbliche Veränderungen in der Genexpression verursacht werden (Crow, 2007). Petronis et al. vermuteten in Bezug auf den T102C Polymorphismus, dass epigenetische Faktoren, wie zum Beispiel genomische Prägung durch den Polymorphismus beeinflusst werden (Petronis, 2000). Sie schlugen vor, dass das Vorkommen des C-Allels an der Position 102 zu einer Methylierung und damit zu einem *imprinting* führen muss (Clifford und Nunez, 1996). Aus epigenetischer Sicht ist das 102C-Allel wahrscheinlicher das ursprüngliche Allel (Nukleotidfolge CCG) als das T-Allel (Nukleotidfolge CTG). Denn Mutationen in Richtung CCG → CTG finden 4,5 mal häufiger statt als Mutationen in Richtung CTG → CCG (Clifford und Nunez, 1996). Unterstützung erhält diese Theorie durch die Tatsache, dass bei Schimpansen an der Position 102 ein C zu finden ist (Petronis, 2000). Es könnte sein, dass der T102C-SNP genomisches Imprinting beeinflusst und damit die Expression des Serotonin-2A-Rezeptors.

Auch wenn die epigenetische Betrachtungsweise vielversprechend scheint, so ist das Verständnis für die entsprechenden Vorgänge noch sehr lückenhaft (Mill et al., 2008).

6.1 Diskussion funktioneller Konsequenzen

Obwohl bisher nicht abschließend geklärt werden konnte, ob Polymorphismen im HTR2A-Gen mit der Erkrankung Schizophrenie assoziiert sind, gibt es dennoch Hinweise darauf, dass SNPs funktionelle Konsequenzen und damit Auswirkungen auf den Phänotypen der Erkrankungen nehmen könnten. Dies wirft die Frage auf, in wie fern solche Variationen das Genprodukt soweit verändern können, dass es seine Eigenschaften entscheidend beeinflusst werden.

Die Proteinhelix des 5-HT_{2A}-Rezeptors durchzieht die Doppellipidschicht der Zellmembran sieben mal, so dass sich sieben Transmembrandomänen (TMD) ergeben. In seinem Grundzustand ist der Rezeptor relativ inaffin für seinen Liganden, den Agonisten Serotonin, etwas stärker affin für den Agonisten (1-(2,5-Dimethoxy-4-Iodophenyl)-2-Aminopropan) (DOI) und hoch affin für die Antagonisten Ketanserin, Spiperone und Mianserin (Wang et al., 1993).

Frühe Bindungsstudien konnten zeigen, dass alle Rezeptortypen, deren natürliche aktivierende Liganden eine geladene Aminogruppe besitzen, einen Asparaginsäurerest in TMDIII aufweisen (Chen et al, 1993). Sowohl bei α -adrenergen, als auch bei β -adrenergen und muskarinischen Rezeptoren ist die Bindungsstelle für Agonisten in TMDIII lokalisiert, wobei davon ausgegangen wird, dass die positive Aminogruppe der Liganden einen Komplex mit dem negativen Aspartatrest in TMDIII eingeht. Dieser Bindungsmechanismus ist in allen G-proteingekoppelten Rezeptoren konserviert und scheint einen entscheidenden Beitrag zur erfolgreichen Ligandenbindung zu leisten (Wang et al., 1993). Der entsprechende Asparaginsäurerest ist in 5-HT_{2A}-Rezeptoren an Position 155 lokalisiert (Julius et al, 1988; Pritchett et al, 1988; Saltzmann et al, 1991; Yang et al, 1992). Diesen Aspartatrest tauschten Wang und Mitarbeiter durch Asparagin aus und untersuchten die Bindungsaffinitäten der so entstandenen Asn155-Mutante für die Agonisten Serotonin (5-HT), LSD und DOI und die Antagonisten Ketanserin, Mianserin und Spiperone (Wang et al., 1993). Die Asn155-Mutante wies dabei eine auf ein Fünftel verringerte Affinität für den Agonisten LSD und auch eine signifikant schwächere Bindung des natürlichen Liganden 5-HT auf. Deutlich stärker war der Affinitätsverlust für die Antagonisten Spiperone (14fach herabgesetzt), Mianserin (54fach herabgesetzt) und Ketanserin (75fach herabgesetzt). Damit zeigte sich bei der Asn155-Mutante die geringste Affinität für Agonisten und Antagonisten der drei untersuchten Mutanten Asn 120, Asn155 und Asn 172. Da alle drei Mutationen ein ähnliches Expressionsmuster wie der Wildtyp aufwiesen, konnten Affinitätsverluste nicht einfach durch eine geringere Rezeptoranzahl erklärt werden, sondern wiesen auf eine funktionelle Veränderung des Rezeptors hin (Wang et al., 1993).

Neben der Rezeptorbindung selbst untersuchte die Arbeitsgruppe auch das Vermögen der eingesetzten Substanzen, eine *second messenger* Kaskade bei Vorhandensein von Asn155 einzuleiten bzw. zu unterdrücken. Alle verwendeten Agonisten waren zwar in der Lage, die Phosphoinositid (PI)-Hydrolyse einzuleiten, jedoch war ihre Potenz vor allem bei DOI deutlich herabgesetzt. Während die Fähigkeit von Ketanserin, einen PI-Umsatz zu unterdrücken, kaum beeinflusst war, wurde die Potenz von Spiperone deutlich herabgesetzt.

Diese Befunde deuten auf eine wichtige Rolle von Asn155 bei der Ligandenbindung hin. Da die Asn155-Mutante zwar stark veränderte Bindungsaffinitäten aufwies, aber trotzdem zur intrazellulären Signalweiterleitung in der Lage war, scheint die Position

155 des Rezeptors einen direkten Einfluss auf die Ligandenbindung zu nehmen. Durch den Verlust der negativ geladenen Aspartat- Seitenkette fehlt dem Rezeptor das Gegenion für die positiv geladene Amingruppe, wodurch der Rezeptor- Ligand-Komplex abgeschwächt werden könnte. Wang und Mitarbeiter konnten damit zeigen, dass durch den Austausch bereits einer einzigen Aminosäure die Rezeptoreigenschaften merklich verändert werden können (Wang et al., 1993).

Die gleiche Amingruppe aktivierender Liganden, die mit Asp155 interagiert, bildet wahrscheinlich auch eine Wasserstoffbrückenbindung zu einer zweiten Aminosäure in TMDIII, dem Serin an Position 159 (Ser159) (Almaula et al., 1996). Liganden, deren Amingruppe in einen Benzolring eingebettet ist, können jedoch keine Wasserstoffbrücke zu Ser159 ausbilden (Choudhary et al, 1995). Almaula und Mitarbeiter untersuchten die funktionelle Relevanz dieser Aminosäure, indem sie sie durch Alanin (Ala159) und Cystein (Cys159) austauschten und die Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Liganden maßen (Almaula et al., 1996). Dabei ergab sich ein stärkerer Affinitätsverlust für 5-HT (18fach herabgesetzt), aber keine Beeinflussung der Liganden LSD und Ketanserin bei Vorhandensein der Ala159-Mutation. Die Cys159- Mutation beeinflusste die Bindungsaffinitäten kaum. Damit bestätigte die Arbeitsgruppe die Theorie, dass Ser159 an der Ligandenbindung beteiligt ist. Der große Affinitätsverlust für den natürlichen Liganden 5-HT rührt wahrscheinlich vom Verlust der Wasserstoffbrücke zwischen Ser159 und der Amingruppe des Liganden. Die kationische Amingruppe im Liganden LSD ist dagegen in einen Ring eingebettet und kann auch im Wildtyp keine Wasserstoffbrücke zu Ser159 ausbilden, so dass es hier zu keinem Affinitätsverlust kommt. Diese Befunde zeigen, dass eine einzige Aminosäure auch durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke Einfluss auf die Bindungseigenschaften eines Rezeptors ausüben kann.

Eine weitere, für G-Protein- gekoppelte Rezeptoren bedeutsame Asparaginsäure ist in TMDII lokalisiert und besetzt im 5-HT_{2A}- Rezeptor die Position 120 (Wang et al., 1993). Der Austausch des entsprechenden Aspartatrestes durch Asparagin führt in β - adrenergen (Chung et al, 1998) und α - adrenergen (Wang et al, 1991) Rezeptoren zum Verlust der Fähigkeit, die *second messenger* Kaskade auszulösen. Wang und Mitarbeiter untersuchten die Asn120- Mutante des 5-HT_{2A}- Rezeptors und stellten

eine moderat geringere Bindungsaffinität zu Serotonin im Vergleich zum Wildtyp, ebenso wie für die Antagonisten Mianserin, Ketanserin und Spiperone fest. Die LSD-Bindung war dagegen nicht verändert.

Im Kontrast dazu verlor der Asn120- Rezeptor gänzlich die Fähigkeit, PI- Umsatz zu stimulieren (Wang et al., 1993). Asp120 scheint essentiell für die Agonist- stimulierte intrazelluläre Signalweiterleitung bei 5-HT_{2A}- Rezeptoren zu sein. Es könnte sein, dass durch den Verlust des negativ geladenen Aspartats gegen die Stimulierung durch Agonisten unempfindlicher wird, oder dass er nicht mehr mit dem G- Protein kompatibel ist.

Eine vierte, in allen G- Protein- gekoppelten Rezeptoren konservierte Asparaginsäure liegt an der Grenzfläche von TMDIII und der zweiten zytoplasmatischen Schleife. Auch diese in 5- HT_{2A}- Rezeptoren an Position 172 lokalisierte Aminosäure tauschten Wang und Mitarbeiter durch Asparagin aus und untersuchten die Bindungseigenschaften des mutierten Rezeptors (Wang et al., 1993). Die Bindungsaffinitäten sowohl für Agonisten als auch für Antagonisten waren von dieser Mutation nur gering verändert, und auch die Fähigkeit zum PI- Umsatz blieb annähernd uneingeschränkt erhalten.

So scheint der Aspartatrest an Position 172 zwar nötig, um die vollständigen Wildtypeigenschaften auszubilden, er spielt aber keine größere Rolle bei der Ligandenbindung und der Einleitung der intrazellulären Signalweitergabe. Wahrscheinlicher ist hier eher eine Veränderung der dreidimensionalen Rezeptoreigenschaften, so dass eine Ligandenbindung durch sterische Hinderung verändert werden könnte.

Braden und Mitarbeiter erzeugten mit gerichteter Punktmutagenese zwei weitere Mutationen, die sie auf ihre funktionellen Konsequenzen untersuchten. Die beiden Positionen 339 und 340 sind im 5-HT_{2A}- Rezeptor jeweils mit einem Phenylalanin (F339, F340) besetzt und in der Bindungstasche des Rezeptors in TMDVI lokalisiert (Choudhary et al, 1993; Roth et al, 1997) Beide Positionen wurden jeweils durch Lysin ersetzt. Die Lys339- Mutante zeigte eine nur wenig veränderte Bindungsaffinität für die Agonisten 5-HT, LSD, Psilocin und Mescaline, während die Affinität für Benzylanaloga stärker herabgesetzt war (Braden et al., 2006). Lys339 wirkte sich stärker auf die Fähigkeit der eingesetzten Agonisten aus, PI- Hydrolyse zu

stimulieren. So war die Potenz von LSD (4-fach herabgesetzt), Mescaline (10fach herabgesetzt) und den beiden Tryptaminen 5-HT und Psilocin (jeweils 18fach herabgesetzt) moderat verändert, während die N- Benzylanaloga nur noch etwa 1/100 der Effektivität des Wildtyps erreichten.

Auch Lys340 zeigte eine kaum veränderte Bindungsaffinität für Mescaline, aber eine deutliche Abschwächung für Psilocin (160fach herabgesetzt), 5- HT (1000fach) und N- Benzylanaloga (1000fach). Außerdem war die PI-Hydrolyse bei allen eingesetzten Agonisten stark gehemmt, am stärksten bei 5- HT (1900fach herabgesetzt) (Braden et al., 2006).

Es scheint also, dass F340, und in einem geringeren Umfang auch F339, in TMDVI intensiv mit verschiedenen Agonisten interagiert. Durch den Austausch des neutralen Phenylalanins an Position 340 durch die basische Aminosäure Lysin werden Agonisten zu partiellen Antagonisten, was eventuell auf eine ligandenabstoßende Wirkung der Mutation hinweisen könnte. Die sechste Transmembrandomäne des 5-HT_{2A}- Rezeptors ist direkt an eine intrazelluläre Schleife (IL3) gekoppelt, welche eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von G- Proteinen spielt (Kubo et al, 1998; Wessel et al, 1989). Braden und Mitarbeiter konnten mit diesen Ergebnissen zeigen, dass eine einzige Aminosäure in TMDVI die Fähigkeit des Rezeptors, mit bestimmten Liganden zu interagieren, entscheidend verändern kann.

Ozaki und Mitarbeiter untersuchten die funktionellen Eigenschaften des natürlich vorkommenden His452Tyr- Polymorphismus, der auch in dieser Arbeit genotypisiert wurde (Ozaki et al., 1997). Dazu verwendeten sie humane Blutplättchen. Wie auch im Gehirn führt die Aktivierung von 5-HT_{2A}- Rezeptoren in Blutplättchen zu vermehrtem PI- Umsatz, worauf intrazelluläres Kalzium mobilisiert wird. Diese Kalziummobilisierung gibt Auskunft über die Funktion der Signaltransduktion des *second messenger* Systems (Kagaya et al, 1990). Die Arbeitsgruppe um Ozaki untersuchte die durch 5-HT ausgelöste Kalziumfreisetzung in acht His/His Homozygoten und acht His/Tyr Heterozygoten. Dabei wiesen His/Tyr Träger bei der Kalziummobilisierung eine kleinere Amplitude mit verzögertem Anstieg und Abfall auf (Ozaki et al., 1997).

Die Aminosäure Histidin an Position 452 ist am C- terminalen Ende des 5-HT_{2A}-Rezeptors in einer intrazellulären Domäne lokalisiert. Ozaki und Mitarbeiter konnten zeigen, dass diese intrazelluläre Domäne eine wichtige Rolle bei der

Signalweitergabe durch Kalziumfreisetzung einnimmt. Eine veränderte Kalziummobilisierung kann wiederum Einfluss auf nachgeschaltete Proteinkinasen und damit auch auf die posttranslationale Modifizierung von Proteinen, Rezeptoren und Ionenkanälen haben, die für synaptische Plastizität und Gedächtnisbildung bedeutsam sein können.

Neben der direkten Beeinflussung der Aminosäureabfolge können Polymorphismen auch indirekt zu Veränderungen führen. Parsons und Mitarbeiter untersuchten die Auswirkungen des -1438A/G- SNPs, der unmittelbar stromaufwärts der Promoterregion des HTR2A- Gens lokalisiert ist (Parsons et al., 2004). Sie konnten zeigen, dass der Promoter des Gens aktiver ist, wenn das A- Allel vorhanden ist. Damit bestätigten sie die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Polesskaya, die den T102C- Polymorphismus untersuchten. Der T102C- SNP liegt im vollständigen Kopplungsungleichgewicht mit A(-1438)G und ist eine stille Variante in Exon1, die zu keinem Aminosäureaustausch führt (Polesskaya and Sokolov, 2002). Polesskaya und Mitarbeiter maßen die allelabhängigen mRNA- Konzentrationen in *post mortem* Gewebe von 15 Heterozygoten Individuen und stellten ein Verhältnis von C- Allel zu T- Allel von 0,79 fest. Außerdem sanken in einer Stichprobe mit Homo- und Heterozygoten sowohl die Gesamt- HTR2A- mRNA- als auch der 5-HT2A- Proteinkonzentration mit der Reihenfolge der Genotypen TT > CT > CC. Ob dieser Genotypeneffekt durch den T102C- Polymorphismus oder durch -1438A/G verursacht wird, konnte nicht geklärt werden (Polesskaya and Sokolov, 2002).

Diese Studien konnten zeigen, dass ein Phänotyp auch indirekt durch Beeinflussung der mRNA- und Proteinexpression verändert werden kann.

6.2 Quantitative Genexpression

Eine Möglichkeit, die erwähnten funktionellen Konsequenzen der Polymorphismen im HTR2A- Gen zu untersuchen, ist es die mRNA- Konzentration im humanen Hirngewebe zu untersuchen. Dazu sollte dieser Arbeit neben der Genotypisierung von Markern in HTR2A- Gen mittels MALDI-TOF auch die quantitative Genexpression mit der MassARRAY Plattform etabliert werden.

Daher wurde ein bereits existierender 10- Plex aus *housekeeping* Genen mit dem iPLEX- Verfahren (Hapmap, 2009) an fünf humanen Lymphozytenstämmen getestet.

Plexgröße

Eine wichtige Variable im Versuchsdesign ist, wie auch bei der Genotypisierung, die Anzahl der zeitgleich untersuchten Gene. Während der Vorteil von größeren Multiplexen sicherlich in der Zeit- und Kostenersparnis liegt, so steigt mit der Anzahl der verschiedenen PCRs auch das Risiko für Nebenreaktionen. Außerdem ist es so wahrscheinlicher, dass schwächere Reaktionen zu Gunsten von stärkeren ausfallen und so für gering exprimierte Gene keine Ergebnisse erzielt werden.

Bisher gibt es nur wenige publizierte Ergebnisse zur quantitativen Genexpression in Multiplexen. Uniplexe konnten jedoch von mehreren Arbeitsgruppen erfolgreich prozessiert werden (McCullough et al, 2005). Die Gruppe um Atienza untersuchte in einem Uniplex ein mit Brustkrebs assoziiertes Gen und konnten differentielle Genexpression um bis zum 9,8fachen feststellen (Atienza et al., 2005).

Ding und Mitarbeiter etablierten die QGE Methode anhand der Expression von drei Genen in humanen Zelllinien (Ding und Cantor, 2003) zunächst im Uniplex. Danach führten sie mit den gleichen Primern einen Triplex durch. Dabei wurde keine signifikante Verschlechterung der Ergebnisse festgestellt. Die Arbeitsgruppe um Elvidge untersuchte 12 Gene in Zelllinien mit veränderten Wachstumsbedingungen und erzielten in Biplexen gute Ergebnisse. Die maximale Plexrate, die zu zufriedenstellenden Ergebnissen führte, lag bei vier assays in einem Plex (Elvidge et al, 2004).

Startmaterial und Enzymatik

Entscheidend für den Erfolg einer Expressionsanalyse ist auch die Qualität des Startmaterials (Oeth et al., 2005). Nur gut erhaltene mRNA liefert eine vollständige cDNA, die zu zufriedenstellenden Resultaten führt, wohingegen degradierte mRNA, die zum Beispiel mehrfach aufgetaut wurde, keine validen Resultate mehr liefern kann.

Für den humanen Testplex wurde die RNA aus frischen, lebenden Lymphozyten extrahiert und unmittelbar nach der Quantifizierung und qualitativer Beurteilung der reversen Transkription zugeführt, so dass hier eine Degradierung ausgeschlossen werden kann.

Expressionslevel

Für eine gelungene Quantifizierung im Multiplex ist von Bedeutung, dass besonders bei gering exprimierten Genen die Gene eines Multiplexes etwa das gleiche Expressionsniveau haben (Sequenom, mündliche Mitteilung, 2007). Bei zu großen Konzentrationsunterschieden der *templates* eines Multiplexes besteht sonst die Gefahr, dass gering exprimierte Gene gegenüber stärker exprimierten Genen bei der exponentiellen Amplifikation in der PCR vernachlässigt werden und so nicht mehr detektierbar sind bzw. zu geringe und nicht reproduzierbare Ergebnisse produzieren. Die Arbeitsgruppe um Turakulov untersuchte hierzu das Expressionsniveau von sechs Genen in der Sojabohne und konnte die besten Multiplex- Ergebnisse gewinnen, wenn die mRNA- Konzentrationen im Ursprungsgewebe nicht mehr als um den Faktor zehn variierten (Turakulov et al., 2007).

Bei einer Untersuchung von 12 humanen Genen in Zelllinien, die unter unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen gezüchtet wurden, konnte die Expression dieser Gene erfolgreich im Bereich von 100fM bis 1fM bestimmt werden. Dabei wurden die Plexe so ausgewählt, dass die zusammen prozessierten Gene in etwa im gleichen cDNA- Konzentrationsniveau lagen (Elvidge et al, 2004).

Die humanen Housekeeping Gene waren erwartungsgemäß stark exprimiert und umfassten Konzentrationsbereiche von 10fM bis 1pM. Damit ist die Streuung relativ groß, jedoch scheint hier höchstens eine geringe Auswirkung auf die Ergebnisse erfolgt zu sein.

Ob die Differenzen in der Konzentration und damit in der Expression sich tatsächlich in größerem Umfang auf die Qualität der Resultate auswirken, kann mit den vorliegenden Daten nicht abschließend beurteilt werden.

Standardabweichung der Replikate und Wiederholungen

Um die Messgenauigkeit zu erhöhen wurde in dieser Arbeit jeder Messpunkt in vier Replikaten prozessiert. Damit sollte kontrolliert werden, ob zum Beispiel Pipettierfehler vorlagen oder eventuelle Schwankungen in der Laserintensität die Ergebnisse beeinflussen. Dabei sollte die Standardabweichung der Replikate nicht höher als 10% sein. Bei höherer Standardabweichung können die erzielten Mittelwerte nicht mehr als valide angesehen werden. In die Auswertung wurden immer mindestens zwei Replikate mit einbezogen, Ergebnisse mit R^2 -Werten kleiner als 0,90 oder offensichtliche Ausreißer aus der sigmoidalen Kurve wurden verworfen. Der Kurvenverlauf der einzelnen Gene des verwendeten 10- Plexes war bei der logarithmischen Kompetitorverdünnungsreihe in fast allen Fällen annähernd sigmoidal und es konnten sehr gute R^2 -Werte erzielt werden. Es zeigte sich aber, dass die Kurven mit kleineren Kompetitorverdünnungsschritten unruhiger wurden und die R^2 -Werte geringer waren als bei der logarithmischen Verdünnungsreihe. Im Gegensatz dazu waren die Standardabweichungen zwischen den einzelnen Replikaten geringer.

Ding und Mitarbeiter konnten in drei Uniplexen eine Standardabweichung zwischen einer unbekanntem Anzahl an Replikaten von weniger als 3% erreichen (Ding and Cantor, 2003). Zu beachten ist hierbei, dass die Expression der von dieser Arbeitsgruppe verwendeten Gene mit 10^{-6} – 10^{-7} im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Genen um ein Vielfaches höher lagen. Bei allen anderen publizierten QGE- Studien liegt die Standardabweichung mit unter 10% im gleichen Größenbereich wie in der vorliegenden Arbeit (McCullough et al, 2005)

PCR- und Primeroptimierung

Schwankungen in der Extensionsprimerumsetzung innerhalb der einzelnen Replikate weisen auf eine instabile PCR- Reaktion hin. Während die Extensionsprimerreaktion sehr robust funktioniert, sind Multiplex PCR- Reaktionen sehr anfällig für Störfaktoren. Deshalb scheint es nötig, sowohl die einzelnen PCR-Reaktionen als

auch den ganzen QGE-Multiplex dahingehend zu optimieren, dass für jedes Gen multiple PCR- Primerkombinationen getestet werden, und nur sehr stabile PCR-Reaktionen zu einem Multiplex zusammengesetzt werden können. Nur dann kann eine kompetitive PCR im Multiplex quantitativ ablaufen (Sequenom 2008, mündliche Mitteilung).

6.2.1 Abschließende Beurteilung

Die quantitative Genexpressionsanalyse mittels kompetitiver PCR (rcPCR) und anschließender massenspektrometrischer Bestimmung bietet den großen Vorteil, dass das *gene of interest* zusammen mit dem internen Standard, in der Regel einem *housekeeping* Gen, auf das später normalisiert werden soll, zusammen in einer Reaktion prozessiert werden können. Somit werden Schwankungen zwischen einzelnen Versuchen vermieden, die eine Normalisierung erschweren könnten. Quantitative Untersuchungen mit *real time* PCR ermöglichen moderaten Durchsatz, und Multiplexen ist nur bedingt möglich, da nur eine begrenzte Anzahl an Fluoreszenzfarbstoffen zur Verfügung steht. Die in der vorliegenden Arbeit validierte rcPCR verzichtet auf die Verwendung von Farbstoffen oder Sonden, die Bestimmung erfolgt direkt anhand der Intensitäten im MALDI- TOF, was die Flexibilität der Methode steigert und Multiplexen möglich macht.

Bei der Planung eines QGE- Experiments sind einige Besonderheiten zu beachten, um reliable Ergebnisse zu erzielen. Von besonderer Bedeutung ist die Qualität des Startmaterials. Es empfiehlt sich, nur frische mRNA zu verwenden, da jegliche Degradierung zu schlechteren Ergebnissen und verringerter Reduzierbarkeit führt.

Im Vorfeld muss abgeklärt werden, auf welchem Expressionslevel sich die zu untersuchenden Gene bewegen. Dies kann entweder durch Datenbankrecherche basierend auf bereits bekannten Expressionsdaten geschehen, oder aber experimentell, indem die einzelnen Gene mit der QGE- Methode in einem initialen Experiment untersucht werden, und dann die einzelnen assays, abhängig von ihren mRNA- Konzentrationen, miteinander kombiniert werden.

Die mRNA- Konzentrationen sollten hierbei den Bereich von 10fM bis 10pM einhalten, geringere Konzentrationen könnten dazu führen, dass sich eventuelle Pipettierungenauigkeiten zu stark auf die Ergebnisse auswirken.

Für alle durchzuführenden PCR- Reaktionen empfiehlt es sich, mehr als eine Primerkombination zu testen, und nur stabile PCR- Reaktionen in einen Multiplex

aufzunehmen. Gegebenfalls kann eine PCR- Optimierung mit variabler Primermenge hilfreich sein, ebenso wie ein vergrößertes PCR- Volumen, um Pipettierfehler abzuschwächen (Elvidge et al, 2004).

Bei der Zusammenstellung der Plexe bietet sich zu Beginn ein geringes Plexlevel an, um Interferenzen zwischen den einzelnen PCR- Reaktionen zu vermeiden. Eventuell ist dann eine sukzessive Erhöhung der Plexrate möglich. Dabei sind die zu untersuchenden Genen so zusammenzustellen, dass ihre mRNA- Konzentrationen im verwendeten Gewebe nicht um mehr als den Faktor zehn schwanken. So kann vermieden werden, dass stark exprimierte Gene schwächere während der PCR unterdrücken.

Unter Beachtung dieser Besonderheiten bietet die QGE- Methode eine vielversprechende Alternative zur herkömmlichen *real time* PCR (rtPCR), um Kandidatengene wie HTR2A auf ihre funktionelle Relevanz zu untersuchen. Um die Reproduzierbarkeit und Funktionalität über verschiedene Gewebe oder auch Spezies hinweg zu gewährleisten, werden allerdings noch weitergehende Untersuchungen von Nöten sein. Das Serotonin- 2A- Rezeptorgen könnte sich hier als geeignet erweisen, da zum einen bereits Expressionsdaten aus verschiedenen Gehirnregionen bekannt sind (Genecards, 2009) und zum anderen differentielle Genexpression bei schizophrenen Patienten berichtet wurde (z.B.: (Burnet et al., 1996b; Hernandez und Sokolov, 2000; Lopez-Figueroa et al., 2004; Polesskaya und Sokolov, 2002).

6.3 Ausblick

Bisher konnten keine zweifelsfreien Belege für oder gegen eine Beteiligung des HTR2A- Gens und seiner Polymorphismen an der Schizophrenie erbracht werden. Die Ergebnisse bisheriger Studien dazu sind inkonsistent und werfen wichtige Fragen für zukünftige Studien auf:

1. Beruhen die inkonsistenten Ergebnisse bezüglich der Polymorphismen im HTR2A- Gen eventuell auf noch unbekanntem genetischen Unterschieden?
2. Wie verhalten sich die durch die codierenden SNPs verursachten strukturellen Veränderungen phänotypischen Veränderungen?
3. Wie sind die molekularen Pfade, die zu Veränderungen im Gehirn einiger Patienten führen?

Der eindeutige Nachweis einer Beteiligung des Serotonin- 2A- Rezeptorgens sollte das Ziel weiterer Studien sein. Hierbei ist es wichtig, Sorgfalt bei der Auswahl der einbezogenen Individuen anzuwenden, um die Homogenität der Stichprobe zu gewährleisten und Populationsstratifikationen zu vermeiden. Des Weiteren sollte auf eine ausreichende Größe der Stichprobe geachtet werden. Möglicherweise war der Umfang der bisher untersuchten Populationen nicht groß genug, um statistisch gesicherte Aussagen zu treffen. Außerdem kann eine strenge Diagnosestellung der Patienten und der Ausschluss von Patienten mit anderen psychiatrischen Erkrankungen die Aussagekräftigkeit der Ergebnisse vergrößern.

Im überwiegenden Anteil der bisher zum HTR2A- Gen veröffentlichten Studien wurde nur eine sehr geringe Anzahl isolierter Polymorphismen untersucht. Im Gen sind derzeit 424 polymorphe Loci bekannt, von denen viele im Kopplungsungleichgewicht stehen und nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können. Der Einfluss eines einzigen SNPs ist quantitativ oft äußerst gering und wurde erst im Zusammenhang mit anderen SNPs deutlich. Die Haplotypanalyse, wie sie in dieser Arbeit angewandt wurde, berücksichtigt die Zusammenhänge einzelner Allele und verbessert die statistische Aussagekraft der Ergebnisse aus Assoziationsstudien oder deckt sie erst auf. Die Untersuchung isolierter SNPs könnte deshalb zu Fehlinterpretationen führen und für die häufige Nichtreproduzierbarkeit von

genetischen Studien für komplexe Erkrankungen wie der Schizophrenie verantwortlich sein.

Es könnte sich als hilfreich herausstellen, die Stichproben nicht mehr nach dem Kriterium einer strengen Diagnose zusammenzustellen, sondern eine Subklassifizierung im Sinne von Endophänotypen durchzuführen. So gibt es für das HTR2A- Gen Hinweise darauf, in die Gedächtnisleistung bei verschiedenen Erkrankungen involviert zu sein. Durch die Untersuchung solcher Endophänotypen konnte es einfacher werden, die funktionelle Rolle eines Polymorphismus zu identifizieren.

Neben der klassischen Genotypisierung von Polymorphismen geraten auch epigenetische Mechanismen immer mehr in den Fokus der Forschung. Die Identifizierung genomisch geprägter Gene könnte helfen, funktionelle Mechanismen zu verstehen, aber auch helfen, die Inkonsistenz der Assoziationsergebnisse zu verstehen, wenn zum Beispiel nur ein Gen im diploiden Chromosomensatz exprimiert wird und die zweite Kopie durch Methylierung inaktiviert wurde.

Im Anschluss an die Identifizierung eines assoziierten Polymorphismus steht die Untersuchung seiner funktionellen Relevanz. Hierzu könnte die QGE- Methode einen wichtigen Beitrag leisten, da mit ihr neben der gesamt- mRNA- Konzentration auch die allelspezifische Expression eines funktionellen Polymorphismus bestimmt werden könnte.

7 Verzeichnis der Fachbegriffe und Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
μ	micro
3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
5-HIES	Hydroxyindolessigsäure
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
AADC	Aminosäuredecarboxylase
AMELX	<i>Amelogenin Y-linked</i>
AMELY	<i>Amelogenin X-linked</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>Brain-Derived-Neurotrophic-Factor</i>
BNST	<i>Bed nucleus of Stria terminalis</i>
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CENTG2	<i>ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 1</i>
CEPH	<i>Centre d'Etude du Polymorphisme Humain</i>
Cl	Chlor
CNV	<i>copy number variation</i>
COMT	Catecholamin-O-Methyltransferase
CT	Computertomographie
DAG	Diacylglycerol
ddNTP	Didesoxynukleotid
DISC1	<i>Disrupted-in-Schizophrenia 1</i>
DMT	N,N-Dimethyltryptamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DOI	1-(2,5-Dimethoxy-4-Iodophenyl)-2-Aminopropan
DSM IV	<i>Diagnostic and Statistic Manual for Mental Disorders, Version vier</i>
DTNBP1	<i>dystrobrevin binding protein 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalografie
EPS	extrapyramidalmotorisches Syndrom
f	femto
FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GHCI	Guanidiniumhydrochlorid
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HCl	Hydrogenchlorid, Salzsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HTR2A	Serotonin- 2A- Rezeptorgen
htSNP	<i>haplotype tagSNP</i>
Hz	Hertz
ICD-10	<i>International Classification of Diseases, Version 10</i>
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat

Abkürzung	Bedeutung
ISC	<i>International Schizophrenia Consortium</i>
K	Kalium
LD	Kopplungsungleichgewicht, <i>linkage Disequilibrium</i>
LOD	logarithm of odds
LSD	Lysergsäurediethylamid
m	mol
M	molar
M	Molar
MAF	minore Allelfrequenz
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MAO	Monoaminoxidase
Met	Methionin
Mg	Magnesium
MGS	<i>molecular genetics of schizophrenia</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>messenger- RNA</i>
MRT/MRI	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometer
MYO18B	myosin XVIIIB
n	nano
Na	Natrium
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NRG1	Neuregulin 1
NRGN	Neurogranin
p	pico
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCP	Phencyclidine
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PET	Positronen- Emissions- Tomographie
PLC	Phospholipase C
PMI	<i>post mortem</i> Intervall
PPI	Präpulsinhibition
PRKCA	Proteinkinase C, alpha
QGE	quantitative Genexpression
RELN	Reelin
REM	<i>rapid eye movement</i>
RGS4	<i>Regulator of G-Protein signaling 4</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>
SAP	<i>Shrimp alkaline phosphatase</i>
SBE	Einzelbasenverlängerung
SD	Standardabweichung
SERT	Serotonintransporter
SGENE	<i>schizophrenia gene consortium</i>

Verzeichnis der Fachbegriffe und Abkürzungen

SKID	strukturiertes klinisches Interview
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelbasenpolymorphismus
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TBE	Tris-Borat-Na ₂ EDTA Puffer
TCF4	<i>transcription factor 4</i>
TD	Tardive Dyskinesie
TE	Tris-EDTA Puffer
TMD	Transmembrandomäne
TOF	time of flight
TPH1	Tryptophanhydroxylase, Isoform 1
TPH2	Tryptophanhydroxylase, Isoform 2
UV	Ultraviolett
Val	Valin
ZNF804A	<i>zinc finger protein 804A</i>
ZNS	Zentralnervensystem

8 Literatur

1. Abdolmaleky, HM, S V Faraone, S J Glatt, M T Tsuang, 2004, Meta-analysis of association between the T102C polymorphism of the 5HT2a receptor gene and schizophrenia: *Schizophr.Res.*, v. 67, p. 53-62.
2. Abi-Dargham, A, R Gil, J Krystal, R M Baldwin, J P Seibyl, M Bowers, C H van Dyck, D S Charney, R B Innis, M Laruelle, 1998, Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort: *Am.J.Psychiatry*, v. 155, p. 761-767.
3. Abi-Dargham, A, M Laruelle, G K Aghajanian, D Charney, J Krystal, 1997, The role of serotonin in the pathophysiology and treatment of schizophrenia: *J.Neuropsychiatry Clin.Neurosci.*, v. 9, p. 1-17.
4. Adler, CM, A K Malhotra, I Elman, T Goldberg, M Egan, D Pickar, A Breier, 1999, Comparison of ketamine-induced thought disorder in healthy volunteers and thought disorder in schizophrenia: *Am.J.Psychiatry*, v. 156, p. 1646-1649.
5. Akbarian, S, W E Bunney, Jr., S G Potkin, S B Wigal, J O Hagman, C A Sandman, E G Jones, 1993, Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 50, p. 169-177.
6. Aleman, A, R S Kahn, J P Selten, 2003, Sex differences in the risk of schizophrenia: evidence from meta-analysis: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 60, p. 565-571.
7. Alex, KD, E A Pehek, 2007, Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission: *Pharmacol.Ther.*, v. 113, p. 296-320.

8. Almula,N, B J Ebersole, D Zhang, H Weinstein, S C Sealton, 1996, Mapping the binding site pocket of the serotonin 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptor. Ser3.36(159) provides a second interaction site for the protonated amine of serotonin but not of lysergic acid diethylamide or bufotenin: *J.Biol.Chem.*, v. 271, p. 14672-14675.
9. Andreasen,NC, S Olsen, 1982, Negative v positive schizophrenia. Definition and validation: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 39, p. 789-794.
10. Anttila,S, O Kampman, A Illi, R Rontu, T Lehtimäki, E Leinonen, 2007, Association between 5-HT_{2A}, TPH1 and GNB3 genotypes and response to typical neuroleptics: a serotonergic approach: *BMC.Psychiatry*, v. 7, p. 22.
11. Arolt,V, P Ohrmann, M Rothermundt, 2006, Schizophrenie und verwandte Störungen — Neurobiologie, *Neurobiologie psychischer Störungen*: p. 345-386.
12. Arora,RC, H Y Meltzer, 1991, Serotonin₂ (5-HT₂) receptor binding in the frontal cortex of schizophrenic patients: *J.Neural Transm.Gen.Sect.*, v. 85, p. 19-29.
13. Arranz,M, D Collier, M Sodhi, D Ball, G Roberts, J Price, P Sham, R Kerwin, 1995, Association between clozapine response and allelic variation in 5-HT_{2A} receptor gene: *Lancet*, v. 346, p. 281-282.
14. Arranz,MJ, D A Collier, J Munro, P Sham, G Kirov, M Sodhi, G Roberts, J Price, R W Kerwin, 1996a, Analysis of a structural polymorphism in the 5-HT_{2A} receptor and clinical response to clozapine: *Neurosci.Lett.*, v. 217, p. 177-178.
15. Arranz,MJ, M W Lin, J Powell, R Kerwin, D Collier, 1996b, 5HT_{2a} receptor T102C polymorphism and schizophrenia: *Lancet*, v. 347, p. 1831-1832.
16. Arranz,MJ, J Munro, M J Owen, G Spurlock, P C Sham, J Zhao, G Kirov, D A Collier, R W Kerwin, 1998a, Evidence for association between polymorphisms

- in the promoter and coding regions of the 5-HT_{2A} receptor gene and response to clozapine: *Mol.Psychiatry*, v. 3, p. 61-66.
17. Arranz,MJ, J Munro, P Sham, G Kirov, R M Murray, D A Collier, R W Kerwin, 1998b, Meta-analysis of studies on genetic variation in 5-HT_{2A} receptors and clozapine response: *Schizophr.Res*, v. 32, p. 93-99.
 18. Ashdown,H, Y Dumont, M Ng, S Poole, P Boksa, G N Luheshi, 2006, The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia: *Mol.Psychiatry*, v. 11, p. 47-55.
 19. Atienza,JM, R B Roth, C Rosette, K J Smylie, S Kammerer, J Rehbock, J Ekblom, M F Denissenko, 2005, Suppression of RAD21 gene expression decreases cell growth and enhances cytotoxicity of etoposide and bleomycin in human breast cancer cells: *Mol.Cancer Ther.*, v. 4, p. 361-368.
 20. Azmitia,EC, 2001, Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis: *Brain Res Bull.*, v. 56, p. 413-424.
 21. Baiano,M, A David, A Versace, R Churchill, M Balestrieri, P Brambilla, 2007, Anterior cingulate volumes in schizophrenia: a systematic review and a meta-analysis of MRI studies: *Schizophr.Res*, v. 93, p. 1-12.
 22. Bailer,U, F Leisch, K Meszaros, E Lenzinger, U Willinger, R Strobl, A Heiden, C Gebhardt, E Doge, K Fuchs, W Sieghart, S Kasper, K Hornik, H N Aschauer, 2002, Genome scan for susceptibility loci for schizophrenia and bipolar disorder: *Biol.Psychiatry*, v. 52, p. 40-52.
 23. Baritaki,S, E Rizos, A Zafiropoulos, G Soufla, K Katsafouros, V Gourvas, D A Spandidos, 2004, Association between schizophrenia and DRD3 or HTR2 receptor gene variants: *Eur.J.Hum.Genet*, v. 12, p. 535-541.
 24. Basile,VS, V Ozdemir, M Masellis, H Y Meltzer, J A Lieberman, S G Potkin, F M Macciardi, A Petronis, J L Kennedy, 2001, Lack of association between

- serotonin-2A receptor gene (HTR2A) polymorphisms and tardive dyskinesia in schizophrenia: *Mol.Psychiatry*, v. 6, p. 230-234.
25. Beavis,RC, J Bridson, 1993, Epitaxial protein inclusion in sinapic acid crystals: *J.Phys.D: Appl.Phys*, v. 26, p. 447.
 26. Beavis,RC, B T Chait, 1989, Factors affecting the ultraviolet laser desorption of proteins: *Rapid Commun.Mass Spectrom.*, v. 3, p. 233-237.
 27. Benmessaoud,D, N Hamdani, C Boni, N Ramoz, M Hamon, F Kacha, P Gorwood, 2008, Excess of transmission of the G allele of the -1438A/G polymorphism of the 5-HT2A receptor gene in patients with schizophrenia responsive to antipsychotics: *BMC.Psychiatry*, v. 8, p. 40.
 28. Bennett,JP, Jr., S J Enna, D B Bylund, J C Gillin, R J Wyatt, S H Snyder, 1979, Neurotransmitter receptors in frontal cortex of schizophrenics: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 36, p. 927-934.
 29. Benson,MA, S E Newey, E Martin-Rendon, R Hawkes, D J Blake, 2001, Dysbindin, a novel coiled-coil-containing protein that interacts with the dystrobrevins in muscle and brain: *J.Biol.Chem.*, v. 276, p. 24232-24241.
 30. Bleich,A, S L Brown, R Kahn, H M van Praag, 1988, The role of serotonin in schizophrenia: *Schizophr.Bull.*, v. 14, p. 297-315.
 31. Bleuer,E, 1911, *Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien*, Leipzig - Wien, Deuticke.
 32. Bleuler,E, 1911, *Dementia praecox oder Gruppe der Schizophrenien*, Leipzig, Franz Deuticke.
 33. Blouin,JL, B A Dombroski, S K Nath, V K Lasseter, P S Wolyniec, G Nestadt, M Thornquist, G Ullrich, J McGrath, L Kasch, M Lamacz, M G Thomas, C Gehrig, U Radhakrishna, S E Snyder, K G Balk, K Neufeld, K L Swartz, N DeMarchi, G N Papadimitriou, D G Dikeos, C N Stefanis, A Chakravarti, B Childs, D E Housman, H H Kazazian, S Antonarakis, A E Pulver, 1998,

- Schizophrenia susceptibility loci on chromosomes 13q32 and 8p21: *Nat Genet*, v. 20, p. 70-73.
34. Blum, BP, J J Mann, 2002, The GABAergic system in schizophrenia: *Int.J.Neuropsychopharmacol.*, v. 5, p. 159-179.
 35. Boadle-Biber, MC, 1993, Regulation of serotonin synthesis: *Prog.Biophys.Mol.Biol.*, v. 60, p. 1-15.
 36. Bogerts, B, M Ashtari, G Degreef, J M Alvir, R M Bilder, J A Lieberman, 1990, Reduced temporal limbic structure volumes on magnetic resonance images in first episode schizophrenia: *Psychiatry Res*, v. 35, p. 1-13.
 37. Boke, O, S Gunes, N Kara, S Aker, A R Sahin, Y Basar, H Bagci, 2007, Association of serotonin 2A receptor and lack of association of CYP1A2 gene polymorphism with tardive dyskinesia in a Turkish population: *DNA Cell Biol.*, v. 26, p. 527-531.
 38. Braden, MR, J C Parrish, J C Naylor, D E Nichols, 2006, Molecular interaction of serotonin 5-HT_{2A} receptor residues Phe339(6.51) and Phe340(6.52) with superpotent N-benzyl phenethylamine agonists: *Mol.Pharmacol.*, v. 70, p. 1956-1964.
 39. Bradley, PB, G Engel, W Feniuk, J R Fozard, P P Humphrey, D N Middlemiss, E J Mylecharane, B P Richardson, P R Saxena, 1986, Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine: *Neuropharmacology*, v. 25, p. 563-576.
 40. Bray, NJ, P R Buckland, H Hall, M J Owen, M C O'Donovan, 2004, The serotonin-2A receptor gene locus does not contain common polymorphism affecting mRNA levels in adult brain: *Mol.Psychiatry*, v. 9, p. 109-114.
 41. Bray, NJ, P R Buckland, N M Williams, H J Williams, N Norton, M J Owen, M C O'Donovan, 2003, A haplotype implicated in schizophrenia susceptibility is

- associated with reduced COMT expression in human brain: *Am.J.Hum.Genet*, v. 73, p. 152-161.
42. Breier,A, 1995, Serotonin, schizophrenia and antipsychotic drug action: *Schizophr.Res*, v. 14, p. 187-202.
 43. Brzustowicz,LM, K A Hodgkinson, E W Chow, W G Honer, A S Bassett, 2000, Location of a major susceptibility locus for familial schizophrenia on chromosome 1q21-q22: *Science*, v. 288, p. 678-682.
 44. Brzustowicz,LM, W G Honer, E W Chow, D Little, J Hogan, K Hodgkinson, A S Bassett, 1999, Linkage of familial schizophrenia to chromosome 13q32: *Am.J.Hum.Genet*, v. 65, p. 1096-1103.
 45. Buhot,MC, S Martin, L Segu, 2000, Role of serotonin in memory impairment: *Ann.Med.*, v. 32, p. 210-221.
 46. Buka,SL, M T Tsuang, E F Torrey, M A Klebanoff, D Bernstein, R H Yolken, 2001, Maternal infections and subsequent psychosis among offspring: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 58, p. 1032-1037.
 47. Bunzel,R, I Blumcke, S Cichon, S Normann, J Schramm, P Propping, M M Nothen, 1998, Polymorphic imprinting of the serotonin-2A (5-HT2A) receptor gene in human adult brain: *Brain Res Mol.Brain Res*, v. 59, p. 90-92.
 48. Burnet,PW, C P Chen, S McGowan, M Franklin, P J Harrison, 1996a, The effects of clozapine and haloperidol on serotonin-1A, -2A and -2C receptor gene expression and serotonin metabolism in the rat forebrain: *Neuroscience*, v. 73, p. 531-540.
 49. Burnet,PW, S L Eastwood, P J Harrison, 1996b, 5-HT1A and 5-HT2A receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia: *Neuropsychopharmacology*, v. 15, p. 442-455.
 50. Cahn,W, H E Hulshoff Pol, E B Lems, N E van Haren, H G Schnack, J A van der Linden, P F Schothorst, H van Engeland, R S Kahn, 2002, Brain volume

- changes in first-episode schizophrenia: a 1-year follow-up study: Arch.Gen.Psychiatry, v. 59, p. 1002-1010.
51. Cannon,TD, J Kaprio, J Lonqvist, M Huttunen, M Koskenvuo, 1998, The genetic epidemiology of schizophrenia in a Finnish twin cohort. A population-based modeling study: Arch.Gen.Psychiatry, v. 55, p. 67-74.
 52. CARLSSON,A, 1967, Neurohumoral transmission and neuropsychiatric disorders: Int.J.Psychiatry, v. 4, p. 218-219.
 53. CARLSSON,A, M LINDQVIST, 1963, EFFECT OF CHLORPROMAZINE OR HALOPERIDOL ON FORMATION OF 3METHOXYTYRAMINE AND NORMETANEPHRINE IN MOUSE BRAIN: Acta Pharmacol.Toxicol.(Copenh), v. 20, p. 140-144.
 54. Carroll,LS, N M Williams, V Moskvina, E Russell, N Norton, H J Williams, T Peirce, L Georgieva, S Dwyer, D Grozeva, E Greene, A Farmer, P McGuffin, D W Morris, A Corvin, M Gill, D Rujescu, P Sham, P Holmans, I Jones, G Kirov, N Craddock, M C O'Donovan, M J Owen, 2009, Evidence for rare and common genetic risk variants for schizophrenia at protein kinase C, alpha: Mol.Psychiatry.
 55. Cassel,JC, H Jeltsch, 1995, Serotonergic modulation of cholinergic function in the central nervous system: cognitive implications: Neuroscience, v. 69, p. 1-41.
 56. Chen,CH, Y R Lee, F C Wei, F J Koong, H G Hwu, K J Hsiao, 1997, Lack of allelic association between 102T/C polymorphism of serotonin receptor type 2A gene and schizophrenia in Chinese: Psychiatr.Genet, v. 7, p. 35-38.
 57. Chen,RY, P Sham, E Y Chen, T Li, E F Cheung, T C Hui, C L Kwok, F Lieh-Mak, J H Zhao, D Collier, R Murray, 2001, No association between T102C polymorphism of serotonin-2A receptor gene and clinical phenotypes of Chinese schizophrenic patients: Psychiatry Res, v. 105, p. 175-185.

58. Chen,SF, Y C Shen, C H Chen, 2009, HTR2A A-1438G/T102C polymorphisms predict negative symptoms performance upon aripiprazole treatment in schizophrenic patients: *Psychopharmacology (Berl)*.
59. Cheng,SW, T W Chan, 1996, Use of ammonium halides as co-matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization studies of oligonucleotides: *Rapid Commun.Mass Spectrom.*, v. 10, p. 907-910.
60. Clifford,CP, D J Nunez, 1996, 5HT 2a receptor T102C polymorphism and schizophrenia: *Lancet*, v. 347, p. 1830.
61. Coccaro,EF, L J Siever, H M Klar, G Maurer, K Cochrane, T B Cooper, R C Mohs, K L Davis, 1989, Serotonergic studies in patients with affective and personality disorders. Correlates with suicidal and impulsive aggressive behavior: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 46, p. 587-599.
62. Cook,EH, Jr., K E Fletcher, M Wainwright, N Marks, S Y Yan, B L Leventhal, 1994, Primary structure of the human platelet serotonin 5-HT_{2A} receptor: identify with frontal cortex serotonin 5-HT_{2A} receptor: *J.Neurochem.*, v. 63, p. 465-469.
63. Craddock,N, M J Owen, 2007, Rethinking psychosis: the disadvantages of a dichotomous classification now outweigh the advantages: *World Psychiatry*, v. 6, p. 84-91.
64. Crow,TJ, 2007, How and why genetic linkage has not solved the problem of psychosis: review and hypothesis: *Am.J.Psychiatry*, v. 164, p. 13-21.
65. Dalman,C, P Allebeck, J Cullberg, C Grunewald, M Koster, 1999, Obstetric complications and the risk of schizophrenia: a longitudinal study of a national birth cohort: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 56, p. 234-240.
66. Davis,KL, R S Kahn, G Ko, M Davidson, 1991, Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization: *Am.J.Psychiatry*, v. 148, p. 1474-1486.

67. de Bakker,PI, R Yelensky, I Pe'er, S B Gabriel, M J Daly, D Altshuler, 2005, Efficiency and power in genetic association studies: *Nat Genet*, v. 37, p. 1217-1223.
68. de Paulis,T, 2001, M-100907 (Aventis): *Curr.Opin.Investig.Drugs*, v. 2, p. 123-132.
69. de Quervain,DJ, K Henke, A Aerni, D Coluccia, M A Wollmer, C Hock, R M Nitsch, A Papassotiropoulos, 2003, A functional genetic variation of the 5-HT2a receptor affects human memory: *Nat Neurosci.*, v. 6, p. 1141-1142.
70. Dean,B, 2003, The cortical serotonin2A receptor and the pathology of schizophrenia: a likely accomplice: *J.Neurochem.*, v. 85, p. 1-13.
71. Dean,B, W Hayes, 1996, Decreased frontal cortical serotonin2A receptors in schizophrenia: *Schizophr.Res*, v. 21, p. 133-139.
72. del Mistro,M, P Oeth, 2005, Determination of molecular concentration (EC50) using MassARRAY QGE Analyzer Software: Sequenom Application Note.
73. DeLisi,LE, S H Shaw, T J Crow, G Shields, A B Smith, V W Larach, N Wellman, J Loftus, B Nanthakumar, K Razi, J Stewart, M Comazzi, A Vita, T Heffner, R Sherrington, 2002, A genome-wide scan for linkage to chromosomal regions in 382 sibling pairs with schizophrenia or schizoaffective disorder: *Am.J.Psychiatry*, v. 159, p. 803-812.
74. Dickerson,FB, J J Boronow, C Stallings, A E Origoni, I Ruslanova, R H Yolken, 2003, Association of serum antibodies to herpes simplex virus 1 with cognitive deficits in individuals with schizophrenia: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 60, p. 466-472.
75. Ding,C, C R Cantor, 2003, A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 100, p. 3059-3064.

76. Dominguez,E, M I Loza, F Padin, A Gesteira, E Paz, M Paramo, J Brenlla, E Pumar, F Iglesias, A Cibeira, M Castro, H Caruncho, A Carracedo, J Costas, 2007, Extensive linkage disequilibrium mapping at HTR2A and DRD3 for schizophrenia susceptibility genes in the Galician population: *Schizophr.Res*, v. 90, p. 123-129.
77. du Bois,TM, C Deng, X F Huang, 2005, Membrane phospholipid composition, alterations in neurotransmitter systems and schizophrenia: *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry*, v. 29, p. 878-888.
78. Du,L, D Bakish, Y D Lapierre, A V Ravindran, P D Hrdina, 2000, Association of polymorphism of serotonin 2A receptor gene with suicidal ideation in major depressive disorder: *Am.J.Med.Genet.*, v. 96, p. 56-60.
79. Dubertret,C, P Gorwood, J Ades, J Feingold, J C Schwartz, P Sokoloff, 1998, Meta-analysis of DRD3 gene and schizophrenia: ethnic heterogeneity and significant association in Caucasians: *Am.J.Med.Genet*, v. 81, p. 318-322.
80. Eastwood,SL, P W Burnet, R Gittins, K Baker, P J Harrison, 2001, Expression of serotonin 5-HT(2A) receptors in the human cerebellum and alterations in schizophrenia: *Synapse*, v. 42, p. 104-114.
81. Egan,CT, K Herrick-Davis, K Miller, R A Glennon, M Teitler, 1998, Agonist activity of LSD and lisuride at cloned 5HT2A and 5HT2C receptors: *Psychopharmacology (Berl)*, v. 136, p. 409-414.
82. Egan,MF, T E Goldberg, B S Kolachana, J H Callicott, C M Mazzanti, R E Straub, D Goldman, D R Weinberger, 2001, Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 98, p. 6917-6922.
83. Ehring,H, M Karas, F Hillenkamp, 1992, Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: *Organic Mass Spectrometry*, v. 27, p. 472-480.

84. Erdmann,J, D Shimron-Abarbanell, M Rietschel, M Albus, W Maier, J Korner, B Bondy, K Chen, J C Shih, M Knapp, P Propping, M M Nothen, 1996, Systematic screening for mutations in the human serotonin-2A (5-HT_{2A}) receptor gene: identification of two naturally occurring receptor variants and association analysis in schizophrenia: *Hum.Genet*, v. 97, p. 614-619.
85. Falkai,P, W Maier, 2006, Fortschritte in der neurobiologischen Erforschung der Schizophrenie: *Nervenarzt*, v. 77 Suppl 2, p. S65-S74.
86. Falkai,P, T Schneider-Axmann, W G Honer, K Vogele, H Schonell, U Pfeiffer, H Scherk, W Block, F Traber, H H Schild, W Maier, R Tepest, 2003, Influence of genetic loading, obstetric complications and premorbid adjustment on brain morphology in schizophrenia: a MRI study: *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.*, v. 253, p. 92-99.
87. Fanous,AH, X Chen, X Wang, R Amdur, F A O'Neill, D Walsh, K S Kendler, 2009, Genetic variation in the serotonin 2A receptor and suicidal ideation in a sample of 270 Irish high-density schizophrenia families: *Am.J.Med.Genet B Neuropsychiatr.Genet*, v. 150B, p. 411-417.
88. Fanous,AH, M C Neale, R E Straub, B T Webb, A F O'Neill, D Walsh, K S Kendler, 2004, Clinical features of psychotic disorders and polymorphisms in HT_{2A}, DRD₂, DRD₄, SLC6A3 (DAT1), and BDNF: a family based association study: *Am.J.Med.Genet B Neuropsychiatr.Genet*, v. 125B, p. 69-78.
89. Faraone,SV, T Matise, D Svrakic, J Pepple, D Malaspina, B Suarez, C Hampe, C T Zambuto, K Schmitt, J Meyer, P Markel, H Lee, F J Harkavy, C Kaufmann, C R Cloninger, M T Tsuang, 1998, Genome scan of European-American schizophrenia pedigrees: results of the NIMH Genetics Initiative and Millennium Consortium: *Am.J.Med.Genet*, v. 81, p. 290-295.
90. Farmer,AE, P McGuffin, I I Gottesman, 1987, Twin concordance for DSM-III schizophrenia. Scrutinizing the validity of the definition: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 44, p. 634-641.

91. Filippini,N, C Scassellati, M Boccardi, M Pievani, C Testa, L Bocchio-Chiavetto, G B Frisoni, M Gennarelli, 2006, Influence of serotonin receptor 2A His452Tyr polymorphism on brain temporal structures: a volumetric MR study: *Eur.J.Hum.Genet*, v. 14, p. 443-449.
92. Frankle,WG, M Laruelle, 2002, Neuroreceptor imaging in psychiatric disorders: *Ann.Nucl.Med.*, v. 16, p. 437-446.
93. Franzek,E, H Beckmann, 1996, [Genetic heterogeneity of schizophrenia. Results of a systematic twin study]: *Nervenarzt*, v. 67, p. 583-594.
94. Frazer,A, J Hensler, 1999, Serotonin, in G Siegel, B Agranoff, and W Albers (eds), *Basic Neurochemistry*.
95. Gabriel,SB, S F Schaffner, H Nguyen, J M Moore, J Roy, B Blumenstiel, J Higgins, M DeFelice, A Lochner, M Faggart, S N Liu-Cordero, C Rotimi, A Adeyemo, R Cooper, R Ward, E S Lander, M J Daly, D Altshuler, 2002, The structure of haplotype blocks in the human genome: *Science*, v. 296, p. 2225-2229.
96. Glennon,RA, 1990, Do classical hallucinogens act as 5-HT₂ agonists or antagonists?: *Neuropsychopharmacology*, v. 3, p. 509-517.
97. Goldberg,TE, M F Egan, T Gscheidle, R Coppola, T Weickert, B S Kolachana, D Goldman, D R Weinberger, 2003, Executive subprocesses in working memory: relationship to catechol-O-methyltransferase Val158Met genotype and schizophrenia: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 60, p. 889-896.
98. Golimbet,VE, O M Lavrushina, V G Kaleda, L I Abramova, T V Lezheiko, 2007, Supportive evidence for the association between the T102C 5-HTR2A gene polymorphism and schizophrenia: a large-scale case-control and family-based study: *Eur.Psychiatry*, v. 22, p. 167-170.

99. Govitrapong,P, J Chagkutip, W Turakitwanakan, A Srikiatkachorn, 2000, Platelet 5-HT(2A) receptors in schizophrenic patients with and without neuroleptic treatment: *Psychiatry Res*, v. 96, p. 41-50.
100. Griebel,E, B Meckelein, K Schulz, P Seransi, E Setzke, 2002, Isolierung von DNA, in G Schimpf (ed), *Gentechnische Methoden: Spektrum Akademischer Verlag*.
101. Gruber,O, P Falkai, T Schneider-Axmann, S G Schwab, M Wagner, W Maier, 2008, Neuregulin-1 haplotype HAP(ICE) is associated with lower hippocampal volumes in schizophrenic patients and in non-affected family members: *J.Psychiatr.Res.*
102. Guilhaus,M, 1995, Principles and instrumentation in time-of-flight mass spectrometry. Physical and instrumental concepts: *Journal of Mass Spectrometry*, v. 30, p. 1519-1532.
103. Gunes,A, M G Scordo, P Jaanson, M L Dahl, 2007, Serotonin and dopamine receptor gene polymorphisms and the risk of extrapyramidal side effects in perphenazine-treated schizophrenic patients: *Psychopharmacology (Berl)*, v. 190, p. 479-484.
104. Gurevich,EV, J N Joyce, 1997, Alterations in the cortical serotonergic system in schizophrenia: a postmortem study: *Biol.Psychiatry*, v. 42, p. 529-545.
105. Gurling,HM, G Kalsi, J Brynjolfson, T Sigmundsson, R Sherrington, B S Mankoo, T Read, P Murphy, E Blaveri, A McQuillin, H Petursson, D Curtis, 2001, Genomewide genetic linkage analysis confirms the presence of susceptibility loci for schizophrenia, on chromosomes 1q32.2, 5q33.2, and 8p21-22 and provides support for linkage to schizophrenia, on chromosomes 11q23.3-24 and 20q12.1-11.23: *Am.J.Hum.Genet*, v. 68, p. 661-673.
106. Haff,LA, I P Smirnov, 1997, Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry: *Genome Res.*, v. 7, p. 378-388.

107. Hafner,H, 1995, Was ist Schizophrenie?, Stuttgart, Jena, New York, Fischer.
108. Harrison,PJ, 1999, The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation: *Brain*, v. 122 (Pt 4), p. 593-624.
109. Harvey,L, R E Reid, C Ma, P J Knight, T A Pfeifer, T A Grigliatti, 2003, Human genetic variations in the 5HT2A receptor: a single nucleotide polymorphism identified with altered response to clozapine: *Pharmacogenetics*, v. 13, p. 107-118.
110. Hawi,Z, M V Myakishev, R E Straub, A O'Neill, K S Kendler, D Walsh, M Gill, 1997, No association or linkage between the 5-HT2a/T102C polymorphism and schizophrenia in Irish families: *Am.J.Med.Genet*, v. 74, p. 370-373.
111. Hazelwood,LA, E Sanders-Bush, 2004, His452Tyr polymorphism in the human 5-HT2A receptor destabilizes the signaling conformation: *Mol.Pharmacol.*, v. 66, p. 1293-1300.
112. He,L, T Li, C Melville, S Liu, G Y Feng, N F Gu, H Fox, D Shaw, G Breen, X Liu, P Sham, J Brown, D Collier, D St Clair, 1999, 102T/C polymorphism of serotonin receptor type 2A gene is not associated with schizophrenia in either Chinese or British populations: *Am.J.Med.Genet*, v. 88, p. 95-98.
113. Herken,H, M E Erdal, N Erdal, S Aynacioglu, 2003, T102C polymorphisms at the 5-HT2A receptor gene in Turkish schizophrenia patients: a possible association with prognosis: *Neuropsychobiology*, v. 47, p. 27-30.
114. Hernandez,I, B P Sokolov, 2000, Abnormalities in 5-HT2A receptor mRNA expression in frontal cortex of chronic elderly schizophrenics with varying histories of neuroleptic treatment: *J.Neurosci.Res*, v. 59, p. 218-225.
115. Hirose,A, M Sasa, A Akaike, S Takaori, 1990, Inhibition of hippocampal CA1 neurons by 5-hydroxytryptamine, derived from the dorsal raphe nucleus and the 5-hydroxytryptamine1A agonist SM-3997: *Neuropharmacology*, v. 29, p. 93-101.

116. Holliday,EG, B J Mowry, D R Nyholt, 2008, A reanalysis of 409 European-Ancestry and African American schizophrenia pedigrees reveals significant linkage to 8p23.3 with evidence of locus heterogeneity: *Am.J.Med.Genet.B Neuropsychiatr.Genet.*, v. 147B, p. 1080-1088.
117. Holmans,PA, B Riley, A E Pulver, M J Owen, D B Wildenauer, P V Gejman, B J Mowry, C Laurent, K S Kendler, G Nestadt, N M Williams, S G Schwab, A R Sanders, D Nertney, J Mallet, B Wormley, V K Lasseter, M C O'Donovan, J Duan, M Albus, M Alexander, S Godard, R Ribble, K Y Liang, N Norton, W Maier, G Papadimitriou, D Walsh, M Jay, A O'Neill, F B Lerer, D Dikeos, R R Crowe, J M Silverman, D F Levinson, 2009, Genomewide linkage scan of schizophrenia in a large multicenter pedigree sample using single nucleotide polymorphisms: *Mol.Psychiatry*, v. 14, p. 786-795.
118. Hoyer,D, D E Clarke, J R Fozard, P R Hartig, G R Martin, E J Mylecharane, P R Saxena, P P Humphrey, 1994, International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin): *Pharmacol.Rev.*, v. 46, p. 157-203.
119. Hsieh,CL, A M Bowcock, L A Farrer, J M Hebert, K N Huang, L L Cavalli-Sforza, D Julius, U Francke, 1990, The serotonin receptor subtype 2 locus HTR2 is on human chromosome 13 near genes for esterase D and retinoblastoma-1 and on mouse chromosome 14: *Somat.Cell Mol.Genet*, v. 16, p. 567-574.
120. Huber,G, 1963, Pneumoencephalographic findings and psychiatric diseases.: *Nervenarzt*, v. 34, p. 414-416.
121. Hurlemann,R, C Boy, P T Meyer, H Scherk, M Wagner, H Herzog, H H Coenen, K Vogeley, P Falkai, K Zilles, W Maier, A Bauer, 2005, Decreased prefrontal 5-HT_{2A} receptor binding in subjects at enhanced risk for schizophrenia: *Anat.Embryol.(Berl)*, v. 210, p. 519-523.

122. Hwu,HG, M W Lin, P C Lee, S F Lee, W C Ou-Yang, C M Liu, 2000, Evaluation of linkage of markers on chromosome 6p with schizophrenia in Taiwanese families: *Am.J.Med.Genet*, v. 96, p. 74-78.
123. Inayama,Y, H Yoneda, T Sakai, T Ishida, Y Nonomura, Y Kono, R Takahata, J Koh, J Sakai, A Takai, Y Inada, H Asaba, 1996, Positive association between a DNA sequence variant in the serotonin 2A receptor gene and schizophrenia: *Am.J.Med.Genet*, v. 67, p. 103-105.
124. International HapMap Consortium., 2005, A haplotype map of the human genome: *Nature*, v. 437, p. 1299-1320.
125. Iritani,S, 2007, Neuropathology of schizophrenia: a mini review: *Neuropathology.*, v. 27, p. 604-608.
126. Ishigaki,T, 1996, Intact 5-HT_{2A} receptor exons and the adjoining intron regions in schizophrenia: *Neuropsychopharmacology*, v. 15, p. 323.
127. Jablensky,A, S W Cole, 1997, Is the earlier age at onset of schizophrenia in males a confounded finding? Results from a cross-cultural investigation: *Br.J.Psychiatry*, v. 170, p. 234-240.
128. Jakab,RL, P S Goldman-Rakic, 1998, 5-Hydroxytryptamine_{2A} serotonin receptors in the primate cerebral cortex: possible site of action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 95, p. 735-740.
129. Johnson,GC, L Esposito, B J Barratt, A N Smith, J Heward, G Di Genova, H Ueda, H J Cordell, I A Eaves, F Dudbridge, R C Twells, F Payne, W Hughes, S Nutland, H Stevens, P Carr, E Tuomilehto-Wolf, J Tuomilehto, S C Gough, D G Clayton, J A Todd, 2001, Haplotype tagging for the identification of common disease genes: *Nat Genet*, v. 29, p. 233-237.

130. Johnstone,EC, T J Crow, C D Frith, J Husband, L Kreel, 1976, Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia: *Lancet*, v. 2, p. 924-926.
131. Jokisch,D, D Bellebaum, I Daum, 2005, Das serotonerge System und Kognition, in H Prunzek and T Müller (eds), *Das serotonerge System aus neurologischer und psychiatrischer Sicht*: Darmstadt, Steinkopff Verlag.
132. Jones,HM, L S Pilowsky, 2002, Dopamine and antipsychotic drug action revisited: *Br.J.Psychiatry*, v. 181, p. 271-275.
133. Jonnakuty,C, C Gagnoli, 2008, What do we know about serotonin?: *J.Cell Physiol*, v. 217, p. 301-306.
134. Jonsson,E, M M Nothen, R Bunzel, P Propping, G Sedvall, 1996, 5HT 2a receptor T102C polymorphism and schizophrenia: *Lancet*, v. 347, p. 1831.
135. Joobar,R, C Benkelfat, K Brisebois, A Toulouse, G Turecki, S Lal, D Bloom, A Labelle, P Lalonde, D Fortin, M Alda, R Palmour, G A Rouleau, 1999, T102C polymorphism in the 5HT2A gene and schizophrenia: relation to phenotype and drug response variability: *J.Psychiatry Neurosci.*, v. 24, p. 141-146.
136. Joyce,JN, A Shane, N Lexow, A Winokur, M F Casanova, J E Kleinman, 1993, Serotonin uptake sites and serotonin receptors are altered in the limbic system of schizophrenics: *Neuropsychopharmacology*, v. 8, p. 315-336.
137. Jurinke,C, P Oeth, B D van den, 2004, MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis: *Mol.Biotechnol.*, v. 26, p. 147-164.
138. Kapur,S, G Remington, 1996, Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia: *Am.J.Psychiatry*, v. 153, p. 466-476.
139. Kapur,S, R B Zipursky, G Remington, 1999, Clinical and theoretical implications of 5-HT2 and D2 receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia: *Am.J.Psychiatry*, v. 156, p. 286-293.

140. Karas,M, F Hillenkamp, 1988, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons: *Anal.Chem.*, v. 60, p. 2299-2301.
141. Keller,A, F X Castellanos, A C Vaituzis, N O Jeffries, J N Giedd, J L Rapoport, 2003, Progressive loss of cerebellar volume in childhood-onset schizophrenia: *Am.J.Psychiatry*, v. 160, p. 128-133.
142. Kendler,KS, A M Gruenberg, D K Kinney, 1994, Independent diagnoses of adoptees and relatives as defined by DSM-III in the provincial and national samples of the Danish Adoption Study of Schizophrenia: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 51, p. 456-468.
143. Kendler,KS, M McGuire, A M Gruenberg, D Walsh, 1995, Schizotypal symptoms and signs in the Roscommon Family Study. Their factor structure and familial relationship with psychotic and affective disorders: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 52, p. 296-303.
144. Keshavan,MS, R Tandon, N N Boutros, H A Nasrallah, 2008, Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: neurobiology: *Schizophr.Res.*, v. 106, p. 89-107.
145. Kety,SS, P H Wender, B Jacobsen, L J Ingraham, L Jansson, B Faber, D K Kinney, 1994, Mental illness in the biological and adoptive relatives of schizophrenic adoptees. Replication of the Copenhagen Study in the rest of Denmark: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 51, p. 442-455.
146. Khait,VD, Y Y Huang, G Zalsman, M A Oquendo, D A Brent, J M Harkavy-Friedman, J J Mann, 2005, Association of serotonin 5-HT_{2A} receptor binding and the T102C polymorphism in depressed and healthy Caucasian subjects: *Neuropsychopharmacology*, v. 30, p. 166-172.
147. Kim,JS, H H Kornhuber, W Schmid-Burgk, B Holzmuller, 1980, Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia: *Neurosci.Lett.*, v. 20, p. 379-382.

148. Kirov,G, I Zaharieva, L Georgieva, V Moskvina, I Nikolov, S Cichon, A Hillmer, D Toncheva, M J Owen, M C O'Donovan, 2009, A genome-wide association study in 574 schizophrenia trios using DNA pooling: *Mol.Psychiatry*, v. 14, p. 796-803.
149. Koch,M, 2006, Neuropharmakologie, in H Forstl, M Hautzinger, and M Roth (eds), *Neurobiologie psychischer Störungen: Berlin Heidelberg*, Springer Berlin Heidelberg, p. 177-219.
150. Konradi,C, S Heckers, 2003, Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment: *Pharmacol.Ther.*, v. 97, p. 153-179.
151. Kouzmenko,AP, W L Hayes, A M Pereira, B Dean, P W Burnet, P J Harrison, 1997, 5-HT_{2A} receptor polymorphism and steady state receptor expression in schizophrenia: *Lancet*, v. 349, p. 1815.
152. Kouzmenko,AP, A Scaffidi, A M Pereira, W L Hayes, D L Copolov, B Dean, 1999, No correlation between A(-1438)G polymorphism in 5-HT_{2A} receptor gene promoter and the density of frontal cortical 5-HT_{2A} receptors in schizophrenia: *Hum.Hered.*, v. 49, p. 103-105.
153. Kraepelin,E, 1896, *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*, Leipzig, Johann Ambrosius Barth.
154. Kunugi,H, S Nanko, R M Murray, 2001, Obstetric complications and schizophrenia: prenatal underdevelopment and subsequent neurodevelopmental impairment: *Br.J.Psychiatry Suppl*, v. 40, p. s25-s29.
155. Lachenmayer,L, H Baumgarten, 2005, Zentrales Serotoninsystem und Serotonin-Neurotoxine, in H Prunzek and T Müller (eds), *Das serotonerge System aus neurologischer und psychiatrischer Sicht*.

156. Lane, HY, Y C Chang, C C Chiu, M L Chen, M H Hsieh, W H Chang, 2002, Association of risperidone treatment response with a polymorphism in the 5-HT(2A) receptor gene: *Am.J.Psychiatry*, v. 159, p. 1593-1595.
157. Laruelle, M, A Abi-Dargham, M F Casanova, R Toti, D R Weinberger, J E Kleinman, 1993, Selective abnormalities of prefrontal serotonergic receptors in schizophrenia. A postmortem study: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 50, p. 810-818.
158. Laruelle, M, A Abi-Dargham, R Gil, L Kegeles, R Innis, 1999, Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases: *Biol.Psychiatry*, v. 46, p. 56-72.
159. Laruelle, M, A Abi-Dargham, C H van Dyck, R Gil, C D D'Souza, J Erdos, E McCance, W Rosenblatt, C Fingado, S S Zoghbi, R M Baldwin, J P Seibyl, J H Krystal, D S Charney, R B Innis, 1996, Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 93, p. 9235-9240.
160. Lerer, B, R H Segman, A Hamdan, K Kanyas, O Karni, Y Kohn, M Korner, M Lanktree, M Kaadan, N Turetsky, A Yakir, B Kerem, F Macciardi, 2003, Genome scan of Arab Israeli families maps a schizophrenia susceptibility gene to chromosome 6q23 and supports a locus at chromosome 10q24: *Mol.Psychiatry*, v. 8, p. 488-498.
161. Lerer, B, R H Segman, E C Tan, V S Basile, R Cavallaro, H N Aschauer, R Strous, S A Chong, U Heresco-Levy, M Verga, J Scharfetter, H Y Meltzer, J L Kennedy, F Macciardi, 2005, Combined analysis of 635 patients confirms an age-related association of the serotonin 2A receptor gene with tardive dyskinesia and specificity for the non-orofacial subtype: *Int.J.Neuropsychopharmacol.*, v. 8, p. 411-425.
162. Levinson, DF, P Holmans, R E Straub, M J Owen, D B Wildenauer, P V Gejman, A E Pulver, C Laurent, K S Kendler, D Walsh, N Norton, N M Williams, S G Schwab, B Lerer, B J Mowry, A R Sanders, S E Antonarakis, J L Blouin, J F DeLeuze, J Mallet, 2000, Multicenter linkage study of

- schizophrenia candidate regions on chromosomes 5q, 6q, 10p, and 13q: schizophrenia linkage collaborative group III: *Am.J.Hum.Genet.*, v. 67, p. 652-663.
163. Leweke,FM, C W Gerth, D Koethe, J Klosterkotter, I Ruslanova, B Krivogorsky, E F Torrey, R H Yolken, 2004, Antibodies to infectious agents in individuals with recent onset schizophrenia: *Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci.*, v. 254, p. 4-8.
164. Lewis,CM, D F Levinson, L H Wise, L E DeLisi, R E Straub, I Hovatta, N M Williams, S G Schwab, A E Pulver, S V Faraone, L M Brzustowicz, C A Kaufmann, D L Garver, H M Gurling, E Lindholm, H Coon, H W Moises, W Byerley, S H Shaw, A Mesen, R Sherrington, F A O'Neill, D Walsh, K S Kendler, J Ekelund, T Paunio, J Lonqvist, L Peltonen, M C O'Donovan, M J Owen, D B Wildenauer, W Maier, G Nestadt, J L Blouin, S E Antonarakis, B J Mowry, J M Silverman, R R Crowe, C R Cloninger, M T Tsuang, D Malaspina, J M Harkavy-Friedman, D M Svrakic, A S Bassett, J Holcomb, G Kalsi, A McQuillin, J Brynjolfson, T Sigmundsson, H Petursson, E Jazin, T Zoega, T Helgason, 2003, Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia: *Am.J.Hum.Genet.*, v. 73, p. 34-48.
165. Lewis,MS, 1989, Age incidence and schizophrenia: Part I. The season of birth controversy: *Schizophr.Bull.*, v. 15, p. 59-73.
166. Lewis,R, S Kapur, C Jones, J DaSilva, G M Brown, A A Wilson, S Houle, R B Zipursky, 1999, Serotonin 5-HT₂ receptors in schizophrenia: a PET study using [¹⁸F]setoperone in neuroleptic-naive patients and normal subjects: *Am.J.Psychiatry*, v. 156, p. 72-78.
167. Li,D, Y Duan, L He, 2006, Association study of serotonin 2A receptor (5-HT_{2A}) gene with schizophrenia and suicidal behavior using systematic meta-analysis: *Biochem.Biophys.Res Commun.*, v. 340, p. 1006-1015.
168. Li,L, S He, J M Sun, J R Davie, 2004, Gene regulation by Sp1 and Sp3: *Biochem.Cell Biol.*, v. 82, p. 460-471.

169. Lidow,MS, G V Williams, P S Goldman-Rakic, 1998, The cerebral cortex: a case for a common site of action of antipsychotics: Trends Pharmacol.Sci., v. 19, p. 136-140.
170. Lin,CH, S J Tsai, Y W Yu, H L Song, P C Tu, C B Sim, C P Hsu, K H Yang, C J Hong, 1999, No evidence for association of serotonin-2A receptor variant (102T/C) with schizophrenia or clozapine response in a Chinese population: Neuroreport, v. 10, p. 57-60.
171. Lopez-Figueroa,AL, C S Norton, M O Lopez-Figueroa, D Armellini-Dodel, S Burke, H Akil, J F Lopez, S J Watson, 2004, Serotonin 5-HT1A, 5-HT1B, and 5-HT2A receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia: Biol.Psychiatry, v. 55, p. 225-233.
172. Mackay,AV, A Doble, E D Bird, E G Spokes, M Quik, L L Iversen, 1978, 3H-Spiperone binding in normal and schizophrenic post-mortem human brain: Life Sci., v. 23, p. 527-532.
173. Maier,W, D Lichtermann, M Rietschel, T Held, P Falkai, M Wagner, S Schwab, 1999, Genetik schizophrener Störungen Neuere Konzepte und Befunde: Nervenarzt, v. 70, p. 955-969.
174. Malhotra,AK, D Goldman, R Buchanan, A Breier, D Pickar, 1996a, 5HT 2a receptor T102C polymorphism and schizophrenia: Lancet, v. 347, p. 1830-1831.
175. Malhotra,AK, D Goldman, N Ozaki, A Breier, R Buchanan, D Pickar, 1996b, Lack of association between polymorphisms in the 5-HT2A receptor gene and the antipsychotic response to clozapine: Am.J.Psychiatry, v. 153, p. 1092-1094.
176. Marcusson,JO, D G Morgan, B Winblad, C E Finch, 1984, Serotonin-2 binding sites in human frontal cortex and hippocampus. Selective loss of S-2A sites with age: Brain Res, v. 311, p. 51-56.

177. Marneros,A, A Deister, A Rohde, 1991, Affektive, schizoaffektive und schizophrene Psychosen. Eine vergleichende Langzeitstudie: Monogr Gesamtgeb.Psychiatr.Psychiatry Ser., v. 65, p. 1-454.
178. Masellis,M, V Basile, H Y Meltzer, J A Lieberman, S Sevy, F M Macciardi, P Cola, A Howard, F Badri, M M Nothen, W Kalow, J L Kennedy, 1998, Serotonin subtype 2 receptor genes and clinical response to clozapine in schizophrenia patients: Neuropsychopharmacology, v. 19, p. 123-132.
179. Matsumoto,I, Y Inoue, T Iwazaki, G Pavey, B Dean, 2005, 5-HT_{2A} and muscarinic receptors in schizophrenia: a postmortem study: Neurosci.Lett., v. 379, p. 164-168.
180. McClellan,JM, E Susser, M C King, 2007, Schizophrenia: a common disease caused by multiple rare alleles: Br.J.Psychiatry, v. 190, p. 194-199.
181. McGrath,J, S Saha, J Welham, O El Saadi, C MacCauley, D Chant, 2004, A systematic review of the incidence of schizophrenia: the distribution of rates and the influence of sex, urbanicity, migrant status and methodology: BMC.Med., v. 2, p. 13.
182. McGue,M, I I Gottesman, 1991, The genetic epidemiology of schizophrenia and the design of linkage studies: Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci., v. 240, p. 174-181.
183. McNeil,TF, E Cantor-Graae, K Sjostrom, 1994, Obstetric complications as antecedents of schizophrenia: empirical effects of using different obstetric complication scales: J.Psychiatr.Res, v. 28, p. 519-530.
184. Meador-Woodruff,JH, S M Clinton, M Beneyto, R E McCullumsmith, 2003, Molecular abnormalities of the glutamate synapse in the thalamus in schizophrenia: Ann.N.Y.Acad.Sci., v. 1003, p. 75-93.

185. Meltzer,H, A Deutch, 1999, Neurochemistry of Schizophrenia, in G Siegel, B Agranoff, and W Albers (eds), Basic Neurochemistry: Lippincott Williams and Wilkins.
186. Meltzer,HY, 1997, Treatment-resistant schizophrenia--the role of clozapine: *Curr.Med.Res Opin.*, v. 14, p. 1-20.
187. Meltzer,HY, S Park, R Kessler, 1999, Cognition, schizophrenia, and the atypical antipsychotic drugs: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 96, p. 13591-13593.
188. Meneses,A, 1999, 5-HT system and cognition: *Neurosci.Biobehav.Rev.*, v. 23, p. 1111-1125.
189. Meyer,U, P J Murray, A Urwyler, B K Yee, M Schedlowski, J Feldon, 2008, Adult behavioral and pharmacological dysfunctions following disruption of the fetal brain balance between pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory signaling: *Mol.Psychiatry*, v. 13, p. 208-221.
190. Mill,J, T Tang, Z Kaminsky, T Khare, S Yazdanpanah, L Bouchard, P Jia, A Assadzadeh, J Flanagan, A Schumacher, S C Wang, A Petronis, 2008, Epigenomic profiling reveals DNA-methylation changes associated with major psychosis: *Am.J.Hum.Genet.*, v. 82, p. 696-711.
191. Mirnics,K, F A Middleton, G D Stanwood, D A Lewis, P Levitt, 2001, Disease-specific changes in regulator of G-protein signaling 4 (RGS4) expression in schizophrenia: *Mol.Psychiatry*, v. 6, p. 293-301.
192. Mita,T, S Hanada, N Nishino, T Kuno, H Nakai, T Yamadori, Y Mizoi, C Tanaka, 1986, Decreased serotonin S2 and increased dopamine D2 receptors in chronic schizophrenics: *Biol.Psychiatry*, v. 21, p. 1407-1414.
193. Mitelman,SA, L Shihabuddin, A M Brickman, E A Hazlett, M S Buchsbaum, 2003, MRI assessment of gray and white matter distribution in Brodmann's areas of the cortex in patients with schizophrenia with good and poor outcomes: *Am.J.Psychiatry*, v. 160, p. 2154-2168.

194. Moises,HW, L Yang, H Kristbjarnarson, C Wiese, W Byerley, F Macciardi, V Arolt, D Blackwood, X Liu, B Sjogren, ., 1995, An international two-stage genome-wide search for schizophrenia susceptibility genes: Nat Genet, v. 11, p. 321-324.
195. Möller,HJ, G Leaux, A Deister, 2005, Schizophrenie, Psychiatrie und Psychotherapie: Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
196. Molliver,ME, 1987, Serotonergic neuronal systems: what their anatomic organization tells us about function: J.Clin.Psychopharmacol., v. 7, p. 3S-23S.
197. Moore,H, A R West, A A Grace, 1999, The regulation of forebrain dopamine transmission: relevance to the pathophysiology and psychopathology of schizophrenia: Biol.Psychiatry, v. 46, p. 40-55.
198. Moore,TH, S Zammit, A Lingford-Hughes, T R Barnes, P B Jones, M Burke, G Lewis, 2007, Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review: Lancet, v. 370, p. 319-328.
199. Morris,DW, K A McGhee, S Schwaiger, P Scully, J Quinn, D Meagher, J L Waddington, M Gill, A P Corvin, 2003, No evidence for association of the dysbindin gene [DTNBP1] with schizophrenia in an Irish population-based study: Schizophr.Res, v. 60, p. 167-172.
200. NCBI, Database of Single Nucleotide Polymorphisms (dbSNP). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine. (dbSNP Build ID: {build ID}). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
200. Nelson,MD, A J Saykin, L A Flashman, H J Riordan, 1998, Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study: Arch.Gen.Psychiatry, v. 55, p. 433-440.
201. Ng,MY, D F Levinson, S V Faraone, B K Suarez, L E DeLisi, T Arinami, B Riley, T Paunio, A E Pulver, Irmansyah, P A Holmans, M Escamilla, D B Wildenauer, N M Williams, C Laurent, B J Mowry, L M Brzustowicz, M

- Maziade, P Sklar, D L Garver, G R Abecasis, B Lerer, M D Fallin, H M Gurling, P V Gejman, E Lindholm, H W Moises, W Byerley, E M Wijsman, P Forabosco, M T Tsuang, H G Hwu, Y Okazaki, K S Kendler, B Wormley, A Fanous, D Walsh, F A O'Neill, L Peltonen, G Nestadt, V K Lasseter, K Y Liang, G M Papadimitriou, D G Dikeos, S G Schwab, M J Owen, M C O'Donovan, N Norton, E Hare, H Raventos, H Nicolini, M Albus, W Maier, V L Nimgaonkar, L Terenius, J Mallet, M Jay, S Godard, D Nertney, M Alexander, R R Crowe, J M Silverman, A S Bassett, M A Roy, C Merette, C N Pato, M T Pato, J L Roos, Y Kohn, D Amann-Zalcenstein, G Kalsi, A McQuillin, D Curtis, J Brynjolfson, T Sigmundsson, H Petursson, A R Sanders, J Duan, E Jazin, M Myles-Worsley, M Karayiorgou, C M Lewis, 2009, Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia: *Mol.Psychiatry*, v. 14, p. 774-785.
202. Ngan,ET, L N Yatham, T J Ruth, P F Liddle, 2000, Decreased serotonin 2A receptor densities in neuroleptic-naive patients with schizophrenia: A PET study using [(18)F]setoperone: *Am.J.Psychiatry*, v. 157, p. 1016-1018.
203. Niesler,B, B Frank, J Kapeller, G A Rappold, 2003, Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT3 serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E: *Gene*, v. 310, p. 101-111.
204. Niesler,B, J Walstab, S Combrink, D Moller, J Kapeller, J Rietdorf, H Bonisch, M Gothert, G Rappold, M Bruss, 2007, Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT3C,5-HT3D, and 5-HT3E: *Mol.Pharmacol.*, v. 72, p. 8-17.
205. Nordhoff,E, R Cramer, M Karas, F Hillenkamp, F Kirpekar, K Kristiansen, P Roepstorff, 1993, Ion stability of nucleic acids in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: *Nucleic Acids Res.*, v. 21, p. 3347-3357.
206. Nordhoff,E, A Ingendoh, R Cramer, A Overberg, B Stahl, M Karas, F Hillenkamp, P F Crain, 1992, Matrix-assisted laser desorption/ionization mass

- spectrometry of nucleic acids with wavelengths in the ultraviolet and infrared: *Rapid Commun.Mass Spectrom.*, v. 6, p. 771-776.
207. Norton,N, M J Owen, 2005, HTR2A: association and expression studies in neuropsychiatric genetics: *Ann.Med.*, v. 37, p. 121-129.
208. Nothen,MM, M Rietschel, J Erdmann, H Oberlander, H J Moller, D Nober, P Propping, 1995, Genetic variation of the 5-HT2A receptor and response to clozapine: *Lancet*, v. 346, p. 908-909.
209. O'Callaghan,E, P Sham, N Takei, G Glover, R M Murray, 1991, Schizophrenia after prenatal exposure to 1957 A2 influenza epidemic: *Lancet*, v. 337, p. 1248-1250.
210. O'Donovan,MC, N Craddock, N Norton, H Williams, T Peirce, V Moskvina, I Nikolov, M Hamshere, L Carroll, L Georgieva, S Dwyer, P Holmans, J L Marchini, C C Spencer, B Howie, H T Leung, A M Hartmann, H J Moller, D W Morris, Y Shi, G Feng, P Hoffmann, P Propping, C Vasilescu, W Maier, M Rietschel, S Zammit, J Schumacher, E M Quinn, T G Schulze, N M Williams, I Giegling, N Iwata, M Ikeda, A Darvasi, S Shifman, L He, J Duan, A R Sanders, D F Levinson, P V Gejman, S Cichon, M M Nothen, M Gill, A Corvin, D Rujescu, G Kirov, M J Owen, N G Buccola, B J Mowry, R Freedman, F Amin, D W Black, J M Silverman, W F Byerley, C R Cloninger, 2008, Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up: *Nat.Genet.*, v. 40, p. 1053-1055.
211. Oeth,P, M Beaulieu, C Park, D Kosman, G del Mistro, D van den Boom, C Jurinke, 2005, iPLEX Assay: Increased Plexing Efficiency and Flexibility for MassARRAY System Through Singl Base Primer Extension with Mass-Modified Terminators: *Sequenom Application Note*.
212. Ohara,K, M Nagai, K Tani, T Tsukamoto, K Ohara, 1999, Schizophrenia and the serotonin-2A receptor promoter polymorphism: *Psychiatry Res*, v. 85, p. 221-224.

213. Okubo,Y, T Suhara, K Suzuki, K Kobayashi, O Inoue, O Terasaki, Y Someya, T Sassa, Y Sudo, E Matsushima, M Iyo, Y Tateno, M Toru, 2000, Serotonin 5-HT2 receptors in schizophrenic patients studied by positron emission tomography: *Life Sci.*, v. 66, p. 2455-2464.
214. Olney,JW, N B Farber, 1995, Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 52, p. 998-1007.
215. Onstad,S, I Skre, S Torgersen, E Kringlen, 1991, Twin concordance for DSM-III-R schizophrenia: *Acta Psychiatr.Scand.*, v. 83, p. 395-401.
216. Owen,MJ, 2000, Molecular genetic studies of schizophrenia: *Brain Res Brain Res Rev.*, v. 31, p. 179-186.
217. Owen,MJ, N Craddock, A Jablensky, 2007, The genetic deconstruction of psychosis: *Schizophr.Bull.*, v. 33, p. 905-911.
218. Owen,MJ, N Craddock, M C O'Donovan, 2005, Schizophrenia: genes at last?: *Trends Genet*, v. 21, p. 518-525.
219. Ozaki,N, H Manji, V Lubierman, S J Lu, J Lappalainen, N E Rosenthal, D Goldman, 1997, A naturally occurring amino acid substitution of the human serotonin 5-HT2A receptor influences amplitude and timing of intracellular calcium mobilization: *J.Neurochem.*, v. 68, p. 2186-2193.
220. Pae,CU, P Artioli, A Serretti, T S Kim, J J Kim, C U Lee, S J Lee, C Lee, I H Paik, 2005, No evidence for interaction between 5-HT2A receptor and serotonin transporter genes in schizophrenia: *Neurosci.Res*, v. 52, p. 195-199.
221. Papassotiropoulos,A, K Henke, A Aerni, D Coluccia, E Garcia, M A Wollmer, K D Huynh, A U Monsch, H B Stahelin, C Hock, R M Nitsch, D J de Quervain, 2005, Age-dependent effects of the 5-hydroxytryptamine-2a-receptor polymorphism (His452Tyr) on human memory: *Neuroreport*, v. 16, p. 839-842.

222. Parsons,MJ, U M D'Souza, M J Arranz, R W Kerwin, A J Makoff, 2004, The -1438A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity: *Biol.Psychiatry*, v. 56, p. 406-410.
223. Paulman,RG, M D Devous, Sr., R R Gregory, J H Herman, L Jennings, F J Bonte, H A Nasrallah, J D Raese, 1990, Hypofrontality and cognitive impairment in schizophrenia: dynamic single-photon tomography and neuropsychological assessment of schizophrenic brain function: *Biol.Psychiatry*, v. 27, p. 377-399.
224. Paunio,T, J Ekelund, T Varilo, A Parker, I Hovatta, J A Turunen, K Rinard, A Foti, J D Terwilliger, H Juvonen, J Suvisaari, R Arajärvi, J Suokas, T Partonen, J Lonnqvist, J Meyer, L Peltonen, 2001, Genome-wide scan in a nationwide study sample of schizophrenia families in Finland reveals susceptibility loci on chromosomes 2q and 5q: *Hum.Mol.Genet*, v. 10, p. 3037-3048.
225. Penas-Lledo,EM, P Dorado, M C Caceres, R A de la, A Llerena, 2007, Association between T102C and A-1438G polymorphisms in the serotonin receptor 2A (5-HT_{2A}) gene and schizophrenia: relevance for treatment with antipsychotic drugs: *Clin.Chem.Lab Med.*, v. 45, p. 835-838.
226. Penner,JD, A S Brown, 2007, Prenatal infectious and nutritional factors and risk of adult schizophrenia: *Expert.Rev.Neurother.*, v. 7, p. 797-805.
227. Petronis,A, 2000, The genes for major psychosis: aberrant sequence or regulation?: *Neuropsychopharmacology*, v. 23, p. 1-12.
228. Piles,U, W Zurcher, M Schar, H E Moser, 1993, Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides: *Nucleic Acids Res.*, v. 21, p. 3191-3196.
229. Poleskaya,OO, C Aston, B P Sokolov, 2006, Allele C-specific methylation of the 5-HT_{2A} receptor gene: evidence for correlation with its expression and expression of DNA methylase DNMT1: *J.Neurosci.Res*, v. 83, p. 362-373.

230. Poleskaya,OO, B P Sokolov, 2002, Differential expression of the "C" and "T" alleles of the 5-HT_{2A} receptor gene in the temporal cortex of normal individuals and schizophrenics: *J.Neurosci.Res*, v. 67, p. 812-822.
231. Pralong,D, E Tomaskovic-Crook, K Opeskin, D Copolov, B Dean, 2000, Serotonin(2A) receptors are reduced in the planum temporale from subjects with schizophrenia: *Schizophr.Res*, v. 44, p. 35-45.
232. Prasad,KM, K V Chowdari, V L Nimgaonkar, M E Talkowski, D A Lewis, M S Keshavan, 2005, Genetic polymorphisms of the RGS4 and dorsolateral prefrontal cortex morphometry among first episode schizophrenia patients: *Mol.Psychiatry*, v. 10, p. 213-219.
233. Procopciuc,L, L Fodoreanu, C Crisan, I Olteanu, 2009, Polymorphisms in the human serotonin 5-HT_{2A} receptor gene and schizophrenia. Influence of the genotypes in the response to drug treatment: *Infomedica*, v. 147.
234. Pulver,AE, J Mulle, G Nestadt, K L Swartz, J L Blouin, B Dombroski, K Y Liang, D E Housman, H H Kazazian, S E Antonarakis, V K Lasseter, P S Wolyniec, M H Thornquist, J A McGrath, 2000, Genetic heterogeneity in schizophrenia: stratification of genome scan data using co-segregating related phenotypes: *Mol.Psychiatry*, v. 5, p. 650-653.
235. Purcell,SM, N R Wray, J L Stone, P M Visscher, M C O'Donovan, P F Sullivan, P Sklar, 2009, Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder: *Nature*, v. 460, p. 748-752.
236. Qiagen, 2002, Handbuch für QIAamp® DNA Mini Kits und QIAamp DNA Blood Mini Kits.
237. Quednow,BB, M Wagner, R Mossner, W Maier, K U Kuhn, 2008, Sensorimotor Gating of Schizophrenia Patients Depends on Catechol O-Methyltransferase Val158Met Polymorphism: *Schizophr.Bull.*

238. Rajarethinam,RP, J R DeQuardo, R Nalepa, R Tandon, 2000, Superior temporal gyrus in schizophrenia: a volumetric magnetic resonance imaging study: *Schizophr.Res.*, v. 41, p. 303-312.
239. RAPPORT,MM, A A GREEN, I H PAGE, 1948, Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization: *J.Biol.Chem.*, v. 176, p. 1243-1251.
240. Raz,S, N Raz, 1990, Structural brain abnormalities in the major psychoses: a quantitative review of the evidence from computerized imaging: *Psychol.Bull.*, v. 108, p. 93-108.
241. Rengarajan,K, S M Cristol, M Mehta, J M Nickerson, 2002, Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores: *Mol.Vis.*, v. 8, p. 416-421.
242. Reynolds,GP, M N Rossor, L L Iversen, 1983, Preliminary studies of human cortical 5-HT₂ receptors and their involvement in schizophrenia and neuroleptic drug action: *J.Neural Transm.Suppl.*, v. 18, p. 273-277.
243. Riley,B, D Thiselton, B S Maher, T Bigdeli, B Wormley, G O McMichael, A H Fanous, V Vladimirov, F A O'Neill, D Walsh, K S Kendler, 2010, Replication of association between schizophrenia and ZNF804A in the Irish Case-Control Study of Schizophrenia sample: *Mol.Psychiatry*, v. 15, p. 29-37.
244. Rodenbeck,A, G Hüther, E Rüter, 2005, Die Lust am serotonergen System, Das serotonerge System aus neurologischer und psychiatrischer Sicht: Steinkopff Verlag.
245. Roth,BL, H Meltzer, 1995, The Role of Serotonin in schizophrenia, in F Bloom and D Kupfer (eds), *Psychopharmacology; the fourth generation of progress*: New York, Raven Press.
246. Rothenhäusler,H, K Täschner, 2007, 6. Schizophrenie, schizotype und wahnhaftige Störungen, *Kompandium Praktische Psychiatrie*: Wien, Springer.

247. Saha,S, D Chant, J Welham, J McGrath, 2005, A systematic review of the prevalence of schizophrenia: PLoS.Med., v. 2, p. e141.
248. Saha,S, J Welham, D Chant, J McGrath, 2006, Incidence of schizophrenia does not vary with economic status of the country: evidence from a systematic review: Soc.Psychiatry Psychiatr.Epidemiol., v. 41, p. 338-340.
249. Sanders,AR, J Duan, D F Levinson, J Shi, D He, C Hou, G J Burrell, J P Rice, D A Nertney, A Olincy, P Rozic, S Vinogradov, N G Buccola, B J Mowry, R Freedman, F Amin, D W Black, J M Silverman, W F Byerley, R R Crowe, C R Cloninger, M Martinez, P V Gejman, 2008, No significant association of 14 candidate genes with schizophrenia in a large European ancestry sample: implications for psychiatric genetics: Am.J.Psychiatry, v. 165, p. 497-506.
250. Sasaki,T, M Hattori, R Fukuda, H Kunugi, S Nanko, 1996, 5HT 2a receptor T102C polymorphism and schizophrenia: Lancet, v. 347, p. 1832.
251. Sawa,A, S H Snyder, 2002, Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease: Science, v. 296, p. 692-695.
252. Schneider,K, 1957, Primäre und sekundäre Symptome in der Schizophrenie: Fortschr.Neurol.Psychiatr., v. 25, p. 487-490.
253. Schwab,SG, J Hallmayer, M Albus, B Lerer, G N Eckstein, M Borrmann, R H Segman, C Hanses, J Freymann, A Yakir, M Trixler, P Falkai, M Rietschel, W Maier, D B Wildenauer, 2000, A genome-wide autosomal screen for schizophrenia susceptibility loci in 71 families with affected siblings: support for loci on chromosome 10p and 6: Mol.Psychiatry, v. 5, p. 638-649.
254. Segman,RH, U Heresco-Levy, B Finkel, T Goltser, R Shalem, M Schlafman, A Dorevitch, A Yakir, D Greenberg, A Lerner, B Lerer, 2001, Association between the serotonin 2A receptor gene and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia: Mol.Psychiatry, v. 6, p. 225-229.

255. Sequenom, 2005, MassARRAY® Assay Design 3.1 Software User's Guide, San Diego.
256. Shenton,ME, C C Dickey, M Frumin, R W McCarley, 2001, A review of MRI findings in schizophrenia: *Schizophr.Res.*, v. 49, p. 1-52.
257. Shenton,ME, R Kikinis, F A Jolesz, S D Pollak, M LeMay, C G Wible, H Hokama, J Martin, D Metcalf, M Coleman, ., 1992, Abnormalities of the left temporal lobe and thought disorder in schizophrenia. A quantitative magnetic resonance imaging study: *N.Engl.J.Med.*, v. 327, p. 604-612.
258. Shi,J, D F Levinson, J Duan, A R Sanders, Y Zheng, I Pe'er, F Dudbridge, P A Holmans, A S Whittemore, B J Mowry, A Olincy, F Amin, C R Cloninger, J M Silverman, N G Buccola, W F Byerley, D W Black, R R Crowe, J R Oksenberg, D B Mirel, K S Kendler, R Freedman, P V Gejman, 2009, Common variants on chromosome 6p22.1 are associated with schizophrenia: *Nature*, v. 460, p. 753-757.
259. Shifman,S, M Johannesson, M Bronstein, S X Chen, D A Collier, N J Craddock, K S Kendler, T Li, M O'Donovan, F A O'Neill, M J Owen, D Walsh, D R Weinberger, C Sun, J Flint, A Darvasi, 2008, Genome-wide association identifies a common variant in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women: *PLoS.Genet.*, v. 4, p. e28.
260. Shinkai,T, O Ohmori, H Kojima, T Terao, T Suzuki, K Abe, 1998, Negative association between T102C polymorphism of the 5-HT2a receptor gene and schizophrenia in Japan: *Hum.Hered.*, v. 48, p. 212-215.
261. Silverman,JM, D A Greenberg, L D Altstiel, L J Siever, R C Mohs, C J Smith, G Zhou, T E Hollander, X P Yang, M Kedache, G Li, M L Zaccario, K L Davis, 1996, Evidence of a locus for schizophrenia and related disorders on the short arm of chromosome 5 in a large pedigree: *Am.J.Med.Genet.*, v. 67, p. 162-171.
262. Spurlock,G, A Heils, P Holmans, J Williams, U M D'Souza, A Cardno, K C Murphy, L Jones, P R Buckland, P McGuffin, K P Lesch, M J Owen, 1998, A

- family based association study of T102C polymorphism in 5HT2A and schizophrenia plus identification of new polymorphisms in the promoter: *Mol.Psychiatry*, v. 3, p. 42-49.
263. Steen,RG, R M Hamer, J A Lieberman, 2005, Measurement of brain metabolites by 1H magnetic resonance spectroscopy in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis: *Neuropsychopharmacology*, v. 30, p. 1949-1962.
264. Stefansson,H, R A Ophoff, S Steinberg, O A Andreassen, S Cichon, D Rujescu, T Werge, O P Pietilainen, O Mors, P B Mortensen, E Sigurdsson, O Gustafsson, M Nyegaard, A Tuulio-Henriksson, A Ingason, T Hansen, J Suvisaari, J Lonqvist, T Paunio, A D Borglum, A Hartmann, A Fink-Jensen, M Nordentoft, D Hougaard, B Norgaard-Pedersen, Y Bottcher, J Olesen, R Breuer, H J Moller, I Giegling, H B Rasmussen, S Timm, M Mattheisen, I Bitter, J M Rethelyi, B B Magnusdottir, T Sigmundsson, P Olauson, G Masson, J R Gulcher, M Haraldsson, R Fossdal, T E Thorgeirsson, U Thorsteinsdottir, M Ruggeri, S Tosato, B Franke, E Strengman, L A Kiemeny, I Melle, S Djurovic, L Abramova, V Kaleda, J Sanjuan, R de Frutos, E Bramon, E Vassos, G Fraser, U Ettinger, M Picchioni, N Walker, T Touloupoulou, A C Need, D Ge, J L Yoon, K V Shianna, N B Freimer, R M Cantor, R Murray, A Kong, V Golimbet, A Carracedo, C Arango, J Costas, E G Jonsson, L Terenius, I Agartz, H Petursson, M M Nothen, M Rietschel, P M Matthews, P Muglia, L Peltonen, D St Clair, D B Goldstein, K Stefansson, D A Collier, 2009, Common variants conferring risk of schizophrenia: *Nature*, v. 460, p. 744-747.
265. Stefansson,H, E Sigurdsson, V Steinthorsdottir, S Bjornsdottir, T Sigmundsson, S Ghosh, J Brynjolfsson, S Gunnarsdottir, O Ivarsson, T T Chou, O Hjaltason, B Birgisdottir, H Jonsson, V G Gudnadottir, E Gudmundsdottir, A Bjornsson, B Ingvarsson, A Ingason, S Sigfusson, H Hardardottir, R P Harvey, D Lai, M Zhou, D Brunner, V Mutel, A Gonzalo, G Lemke, J Sainz, G Johannesson, T Andresson, D Gudbjartsson, A Manolescu, M L Frigge, M E Gurney, A Kong, J R Gulcher, H Petursson, K Stefansson, 2002, Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia: *Am.J.Hum.Genet*, v. 71, p. 877-892.

266. Straub,RE, Y Jiang, C J MacLean, Y Ma, B T Webb, M V Myakishev, C Harris-Kerr, B Wormley, H Sadek, B Kadambi, A J Cesare, A Gibberman, X Wang, F A O'Neill, D Walsh, K S Kendler, 2002, Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia: *Am.J.Hum.Genet.*, v. 71, p. 337-348.
267. Straub,RE, C J MacLean, F A O'Neill, J Burke, B Murphy, F Duke, R Shinkwin, B T Webb, J Zhang, D Walsh, ., 1995, A potential vulnerability locus for schizophrenia on chromosome 6p24-22: evidence for genetic heterogeneity: *Nat Genet.*, v. 11, p. 287-293.
268. Straub,RE, D R Weinberger, 2006, Schizophrenia genes - famine to feast: *Biol.Psychiatry*, v. 60, p. 81-83.
269. Suarez,BK, J Duan, A R Sanders, A L Hinrichs, C H Jin, C Hou, N G Buccola, N Hale, A N Weilbaecher, D A Nertney, A Olincy, S Green, A W Schaffer, C J Smith, D E Hannah, J P Rice, N J Cox, M Martinez, B J Mowry, F Amin, J M Silverman, D W Black, W F Byerley, R R Crowe, R Freedman, C R Cloninger, D F Levinson, P V Gejman, 2006, Genomewide linkage scan of 409 European-ancestry and African American families with schizophrenia: suggestive evidence of linkage at 8p23.3-p21.2 and 11p13.1-q14.1 in the combined sample: *Am.J.Hum.Genet.*, v. 78, p. 315-333.
270. Sullivan,PF, 2005, The genetics of schizophrenia: *PLoS.Med.*, v. 2, p. e212.
271. Sullivan,PF, K S Kendler, M C Neale, 2003, Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 60, p. 1187-1192.
272. Tan,EC, S A Chong, R Mahendran, F Dong, C H Tan, 2001, Susceptibility to neuroleptic-induced tardive dyskinesia and the T102C polymorphism in the serotonin type 2A receptor: *Biol.Psychiatry*, v. 50, p. 144-147.

273. Tandon,R, M S Keshavan, H A Nasrallah, 2008, Schizophrenia, "just the facts" what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology: Schizophr.Res, v. 102, p. 1-18.
274. Tang,K, D Fu, S Kotter, R J Cotter, C R Cantor, H Koster, 1995, Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of immobilized duplex DNA probes: Nucleic Acids Res., v. 23, p. 3126-3131.
275. Tay,AH, L C Lim, W L Lee, K E Wong, L Y Wong, W F Tsoi, 1997, Association between allele 1 of T102C polymorphism, 5-hydroxytryptamine 2a receptor gene and schizophrenia in Chinese males in Singapore: Hum.Hered., v. 47, p. 298-300.
276. Tepest,R, L Wang, M I Miller, P Falkai, J G Csernansky, 2003, Hippocampal deformities in the unaffected siblings of schizophrenia subjects: Biol.Psychiatry, v. 54, p. 1234-1240.
277. Thompson,PM, C Vidal, J N Giedd, P Gochman, J Blumenthal, R Nicolson, A W Toga, J L Rapoport, 2001, Mapping adolescent brain change reveals dynamic wave of accelerated gray matter loss in very early-onset schizophrenia: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 98, p. 11650-11655.
278. Tork,I, 1990, Anatomy of the serotonergic system: Ann.N.Y.Acad.Sci., v. 600, p. 9-34.
279. Torrey,EF, A E Bowler, 1990, The seasonality of schizophrenic births: a reply to Marc S. Lewis: Schizophr.Bull., v. 16, p. 1-3.
280. Trichard,C, M L Paillere-Martinot, D Attar-Levy, J Blin, A Feline, J L Martinot, 1998, No serotonin 5-HT2A receptor density abnormality in the cortex of schizophrenic patients studied with PET: Schizophr.Res, v. 31, p. 13-17.
281. Tsai,GE, P Yang, L C Chung, I C Tsai, C W Tsai, J T Coyle, 1999, D-serine added to clozapine for the treatment of schizophrenia: Am.J.Psychiatry, v. 156, p. 1822-1825.

282. Tsuang,MT, W S Stone, S V Faraone, 2001, Genes, environment and schizophrenia: Br.J.Psychiatry Suppl, v. 40, p. s18-s24.
283. Tsuang,MT, M Tohen, 2002, Textbook in Psychiatric Epidemiology, 2nd Edition.
284. Turakulov,R, S Nontachaiyapoom, K R Mitchelson, P M Gresshoff, A E Men, 2007, Ultrasensitive determination of absolute mRNA amounts at attomole levels of nearly identical plant genes with high-throughput mass spectrometry (MassARRAY): Plant Cell Physiol, v. 48, p. 1379-1384.
285. Turecki,G, R Briere, K Dewar, T Antonetti, A D Lesage, M Seguin, N Chawky, C Vanier, M Alda, R Jooper, C Benkelfat, G A Rouleau, 1999, Prediction of level of serotonin 2A receptor binding by serotonin receptor 2A genetic variation in postmortem brain samples from subjects who did or did not commit suicide: Am.J.Psychiatry, v. 156, p. 1456-1458.
286. Van Oekelen,D, A Megens, T Meert, W H Luyten, J E Leysen, 2003, Functional study of rat 5-HT_{2A} receptors using antisense oligonucleotides: J.Neurochem., v. 85, p. 1087-1100.
287. Vaquero,LC, E Baca-Garcia, M Diaz-Hernandez, C Botillo-Martin, M M Perez-Rodriguez, C Fernandez-Ramos, M D Saiz-Gonzalez, F J Quintero-Gutierrez, J Saiz-Ruiz, P J Fernandez, J L Gonzalez de Rivera, J de Leon, 2006, Association between the T102C polymorphism of the serotonin-2A receptor gene and schizophrenia: Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry, v. 30, p. 1136-1138.
288. Verga,M, F Macciardi, S Cohen, S Pedrini, E Smeraldi, 1997, No association between schizophrenia and the serotonin receptor 5HTR_{2a} in an Italian population: Am.J.Med.Genet, v. 74, p. 21-25.
289. Vogeley,K, P Falkai, 1998, The cortical dysconnectivity hypothesis of schizophrenia: Neurol PsychiatryBrain Res, v. 6, p. 97-106.

290. von Bohlen und Halbach, O, R Dermietzel, 2003, Neuromodulators, Neurotransmitters and Neuromodulators: Wiley-VCH Verlag, p. 116-271.
291. Wang, CD, T K Gallaher, J C Shih, 1993, Site-directed mutagenesis of the serotonin 5-hydroxytryptamine₂ receptor: identification of amino acids necessary for ligand binding and receptor activation: *Mol.Pharmacol.*, v. 43, p. 931-940.
292. Warren, JT, Jr., M L Peacock, L C Rodriguez, J K Fink, 1993, An MspI polymorphism in the human serotonin receptor gene (HTR2): detection by DGGE and RFLP analysis: *Hum.Mol.Genet.*, v. 2, p. 338.
293. Watson, CG, T Kucala, C Tilleskjoer, L Jacobs, 1984, Schizophrenic birth seasonality in relation to the incidence of infectious diseases and temperature extremes: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 41, p. 85-90.
294. Weinberger, DR, 1987, Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 44, p. 660-669.
295. Whitaker, PM, T J Crow, I N Ferrier, 1981, Tritiated LSD binding in frontal cortex in schizophrenia: *Arch.Gen.Psychiatry*, v. 38, p. 278-280.
296. Williams, J, G Spurlock, P McGuffin, J Mallet, M M Nothen, M Gill, H Aschauer, P O Nylander, F Macciardi, M J Owen, 1996, Association between schizophrenia and T102C polymorphism of the 5-hydroxytryptamine type 2a-receptor gene. European Multicentre Association Study of Schizophrenia (EMASS) Group: *Lancet*, v. 347, p. 1294-1296.
297. Williams, NM, N Norton, H Williams, B Ekholm, M L Hamshere, Y Lindblom, K V Chowdari, A G Cardno, S Zammit, L A Jones, K C Murphy, R D Sanders, G McCarthy, M Y Gray, G Jones, P Holmans, V Nimgaonkar, R Adolfson, U Osby, L Terenius, G Sedvall, M C O'Donovan, M J Owen, 2003, A systematic genomewide linkage study in 353 sib pairs with schizophrenia: *Am.J.Hum.Genet.*, v. 73, p. 1355-1367.

298. Wittchen,H-U, M Zaudig, T Fydrich, 1997, SKID-I und SKID-II, Strukturiertes Klinisches Interview für DSM-IV, Hogrefe Verlag.
299. Wong,AH, I I Gottesman, A Petronis, 2005, Phenotypic differences in genetically identical organisms: the epigenetic perspective: *Hum.Mol.Genet*, v. 14 Spec No 1, p. R11-R18.
300. Yamanouchi,Y, N Iwata, T Suzuki, T Kitajima, M Ikeda, N Ozaki, 2003, Effect of DRD2, 5-HT2A, and COMT genes on antipsychotic response to risperidone: *Pharmacogenomics.J.*, v. 3, p. 356-361.
301. Yu,YW, S J Tsai, K H Yang, C H Lin, M C Chen, C J Hong, 2001, Evidence for an association between polymorphism in the serotonin-2A receptor variant (102T/C) and increment of N100 amplitude in schizophrenics treated with clozapine: *Neuropsychobiology*, v. 43, p. 79-82.
302. Zavitsanou,K, X F Huang, 2002, Decreased [(3)H]spiperone binding in the anterior cingulate cortex of schizophrenia patients: an autoradiographic study: *Neuroscience*, v. 109, p. 709-716.

9 Danksagung

Allen voran möchte ich Herrn Prof. Dr. Dan Rujescu, dem Leiter der Sektion molekulare und klinische Neurobiologie für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit in einem anregenden und äußerst professionellen Umfeld danken. Er war zu jeder Zeit ein hilfsbereiter und kompetenter Ansprechpartner, der mir hervorragende wissenschaftliche Förderung zuteil werden ließ.

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 für ihre freundschaftliche Unterstützung und die geduldige Beantwortung all meiner statistischen und organisatorischen Fragen bedanken. Das detaillierte molekularbiologische Wissen und die zeitnahen Korrekturen von Frau Dr. Annette Hartmann und die Beantwortung aller Fragen zur Technik der Massenspektrometrie durch Herrn Dr. Andreas Ruppert haben ganz entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke für die vielen anregenden Diskussionen.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Sektion Molekulare Neurobiologie für den herzlichen Umgang und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Mein besonderer Dank geht an Birgit Burde, Isabell Heinz, Martin Friedl und Dirk Bauer.

Großer Dank gilt meiner Familie für all die aufmunternden Worte, die mir immer wieder neue Energie beim Verfassen dieser Arbeit gaben. Meinem Mann Martin und meinem Bruder Jochen Boxleitner möchte ich vielmals für all die Geduld auch in weniger einfachen Phasen der letzten Jahre danken.

10 Lebenslauf

Name: Marion Anna – Maria Friedl, geb. Boxleitner
Geburtsdatum: 14.07.1980
Geburtsort: Landeshauptstadt München
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: von-der-Pfordten-Str. 58
80686 München
email: marion.friedl@gmx.de

Schullaufbahn:

1986-1990 Volksschule an der Ernst-Reuter Strasse, München
1990-2000 Staatliches Max-Josef-Stift-Gymnasium, München

Studium:

10/2000-12/2005 Studiengang für das Lehramt an öffentlichen
Schulen, Fächerkombination Biologie/ Chemie
(Gymnasium)
Ludwig-Maximilians-Universität München

Promotion:

Seit 02/2006 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Klinik für
Psychiatrie der LMU München in der Sektion
molekulare und klinische Neurobiologie bei Prof Dr.
Dan Rujescu