

# **Die Arg219Leu-Variante des humanen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors: Kein Nachweis bei Tourette-Patienten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**Judith Lange**

aus Rheinbach

2020

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. em. Dr. rer. nat. Heinz Bönisch
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd Pöttsch

Tag der Mündlichen Prüfung: 02.12.2019

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Pfeifer

ehem. Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Göthert

Meinen lieben Eltern Rosemarie und Hans-Jürgen Lange  
und meiner lieben Freundin Claudia Andreosso



## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Das Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT)-System: Biochemische und funktionelle Grundlagen als Rahmen für eigene Untersuchungen .....	10
1.1.1 Vorkommen, Biosynthese, Metabolismus und Funktion .....	10
1.1.2 Transporter-vermittelte Inaktivierung und Speicherung sowie Freisetzung von vesikulär gespeichertem Serotonin .....	14
1.2 Serotoninrezeptoren: Heterogenität, Klassifikation, genetische Varianten .....	15
1.2.1 5-HT-Rezeptoren: Familien, Typen und Subtypen sowie funktionelle und pathophysiologische Implikationen .....	15
1.2.2 Rezeptor-Typ/Subtyp-selektive Liganden von Nicht-5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptoren: Beispiele für Fortschritte in der Arzneimittel-Therapie .....	17
1.2.3 Genetische Rezeptor-Varianten: Zunahme der Heterogenität.....	18
1.3 Spezielle Aspekte des 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptors als Basis eigener Untersuchungen .....	18
1.3.1 Lokalisation des 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptors.....	20
1.3.2 Physiologische, pharmakologische Eigenschaften und mögliche therapeutische Bedeutung des 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptors.....	21
1.4 Tourette-Syndrom (TS): Wichtige Eigenschaften als Grundlage eigener Untersuchungen .....	23
1.4.1 Epidemiologie, Symptomatik, Pathophysiologie und Therapie .....	23
<b>2. Fragestellung der eigenen molekulargenetischen Untersuchungen</b> .....	<b>33</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>34</b>
3.1 Material .....	34
3.2 Patienten und Kontrollgruppe .....	36

3.3	PCR.....	37
3.3.1	Durchführung der PCR .....	39
3.3.2	Auswertung der gelelektrophoretischen Auftrennung .....	42
3.4	Quantitative PCR und TaqMan-Assay.....	43
3.4.1	Statistik .....	48
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
4.1	Genotypisierung der Patienten und Kontrollen mittels Restriktionsanalyse von PCR-Produkten .....	49
4.2	Genotypisierung der Patienten und Kontrollen mittels fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide (TaqMan-Sonden) .....	50
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>57</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
<b>8.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
<b>9.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>61</b>
<b>10.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>73</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADHD	<i>Attention Deficit Hyperactivity Disorder</i> (Aufmerksamkeitsdefizit Hyperaktivitätssyndrom)
Asp	Asparaginsäure
Arg	Arginin
BDNF	<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CGA	Cytosin, Guanin, Adenin (als Basentriplett)
CGRP	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
CTA	Cytosin, Thymin, Adenin (als Basentriplett)
Ct-Wert	Der PCR Zyklus, in dem ein bestimmtes Fluoreszenzniveau über dem Hintergrundsignal erreicht wird
dbSNP	Database Single Nucleotide Polymorphism
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder</i>
dRn Last	Mittelwerte und Standardabweichung für die Fluoreszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
FAM	6-Carboxy-Fluorescein R 488 518
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
FspB I	Restriktionsenzym
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
G- Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
Gi-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Adenylatzyklase hemmendes Protein
Gi/o- Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Adenylatzyklase stimulierendes Protein
Gq-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Phospholipase stimulierendes Protein

G <sub>s</sub> -Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Adenylatzyklase stimulierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HEK Zellen	<i>Human Embryonic Kidney</i> –Zellen (Humane embryonale Nierenstammzellen)
HEX	Hexachloro-6-carboxyfluorescein
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
[ <sup>3</sup> H]8-OH-DPAT	Tritiumwasserstoff markiertes 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
5-HTP	5-Hydroxytryptophan
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i> (Frequenz des selteneren Allels)
MBG	<i>Minor Groove Binder</i> (kleine Furche Binder)
MW	Mittelwert
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NKA	Neurokinin A
NTC	<i>No Template Control</i> (Negativkontrolle)
OCD	<i>Obsessive Compulsive Disorder</i> (Zwangsstörung)
8-OH-DPAT	8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pIC <sub>50</sub> Wert	Konzentration eines Inhibitors, bei der eine halbmaximale Inhibition beobachtet wird
PKC	Proteinkinase C
QPCR, qPCR	<i>Real Time PCR</i> (Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion)
R219L	Arginin an Position 219 zu Leucin
RNA	Ribonukleinsäure
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin P
R-SAT	Receptor Selection and Amplification Assay
SERT	<i>Serotonin Reuptake Transporter</i> (Serotonintransporter)



[ <sup>35</sup> S]GTPγS	Mit radioaktivem Schwefel markiertes Guanosin 5'-O-[gamma-thio]triphosphat)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ( Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SP	Substanz P
SSRI	<i>Selective Serotonin Reuptake Inhibitor</i> (Selektiver Serotoninwiederaufnahmehemmer)
SW	Standardabweichung
SYBRGreen I	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1 <i>H</i> -chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA- Puffer
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
TS	Tourette –Syndrom
U	<i>Unit</i>
UV	Ultraviolett
VIC	Farbstoff, keine Angabe, Patent von Applied Biosystems
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
Way 100 135	N-tert-butyl-3-(4-(2-methoxyphenyl)-piperazin-1-yl)-2-phenylpropanamide
ZNS	Zentralnervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT)-System: Biochemische und funktionelle Grundlagen als Rahmen für eigene Untersuchungen

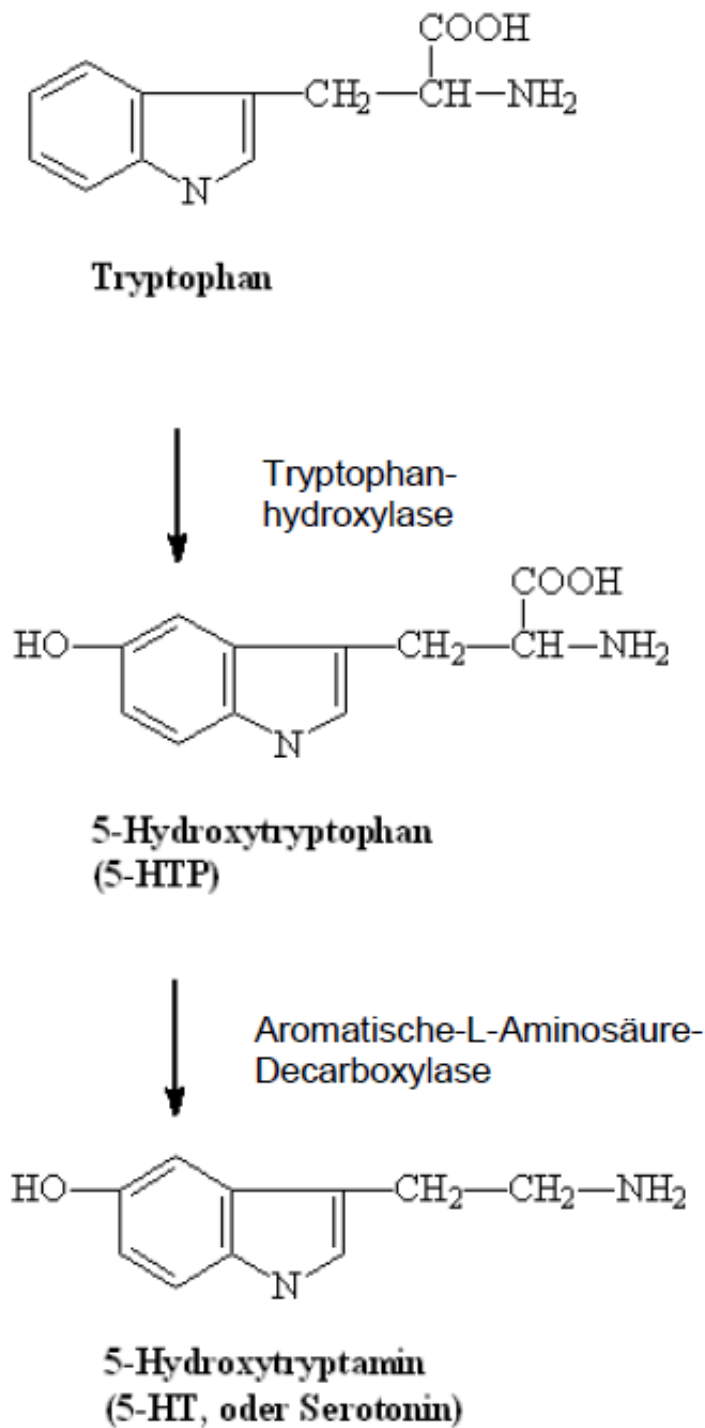
Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) beeinflusst in vielfältiger Weise zahlreiche Funktionen im Organismus von Säugetieren einschließlich des Menschen. Im Gehirn und Rückenmark spielt es eine bedeutende Rolle als Neurotransmitter. Die Zellkörper der serotoninergen Nerven des zentralen Nervensystems (ZNS) befinden sich in den Raphekerne des Hirnstamms. Ihre Axone projizieren sowohl in alle Regionen des Gehirns als auch in das Rückenmark. Eine Rolle im ZNS wurde zunächst relativ lange Zeit angezweifelt (Rapport, 1997; Göthert, 2013). Sie ist aber jetzt, abgesichert durch viele wissenschaftliche Studien, unumstritten (Hoyer et al., 1994; Baumgarten und Göthert, 1997; Barnes und Sharp, 1999; Hannon und Hoyer, 2008; Filip und Bader, 2009). Serotonin-Neurone und weitere intrinsische Neurone, z. B. GABAerge und histaminerge Neurone mit feinregulatorischer Wirkung auf die Darmfunktion, kommen im enterischen Nervensystem vor. Abgesehen von dieser Neurotransmitter-Funktion, ist Serotonin als parakrine Substanz an der Regulation der Darmmotilität beteiligt, die glatte Muskulatur der Blutgefäße reagiert auf Serotonin mit einer Kontraktion. Serotonin erregt ferner Baro- und Chemorezeptoren, sowie die Endigungen vagaler afferenter Nerven in den Koronargefäßen und es bewirkt eine Thrombozytenaktivierung.

#### 1.1.1 Vorkommen, Biosynthese, Metabolismus und Funktion

Der Hauptanteil des im Organismus vorhandenen Serotonins (ca. 90 %) befindet sich in den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut, in denen es in Vesikeln gespeichert wird und aus denen es zuerst isoliert wurde (Erspamer und Vialli, 1937). Sympathische und parasympathische Nerven sowie die intrinsischen Neurone des Darms sind an der Kontrolle der Serotoninfreisetzung aus diesen Zellen beteiligt (Racké et al., 1996). Auch Thrombozyten, zellkernlose Fragmente der Megakaryozyten, enthalten Serotonin. Das thrombozytäre Serotonin stammt letztendlich aus den enterochromaffinen Zellen, aus denen es freigesetzt wird und in die benachbarten Kapillaren der Darmschleimhaut diffundiert. Die Zellmembran der Thrombozyten ist mit einem spezifischen

Serotonintransporter (SERT) ausgestattet. Dieser bewirkt die Aufnahme von Serotonin aus dem Blutplasma in die Thrombozyten und sorgt auf diese Weise für die Inaktivierung des in das Blut gelangten Serotonins.

Bereits in der ersten Hälfte des zwanzigsten Jahrhunderts begann die Aufklärung der Biosynthese und des Metabolismus von Serotonin. Der erste Schritt der Biosynthese besteht in der Hydroxylierung der essentiellen Aminosäure Tryptophan unter der katalytischen Wirkung der substratspezifischen Tryptophanhydroxylase (Udenfriend et al., 1956; Cooper und Melcer, 1961; Renson et al., 1962; Jequier et al., 1969; Ichiyama et al., 1970; Frazer und Hensler, 1994). Im Anschluss daran erfolgt die Decarboxylierung zu 5-Hydroxytryptamin, wobei die relativ unspezifische L-Aminosäure-Decarboxylase katalytisch wirkt (Clark et al., 1954; Udenfriend et al., 1956; Buzard und Nytch, 1957; Frazer und Hensler, 1994). Beide Schritte werden in Abbildung 1 dargestellt.

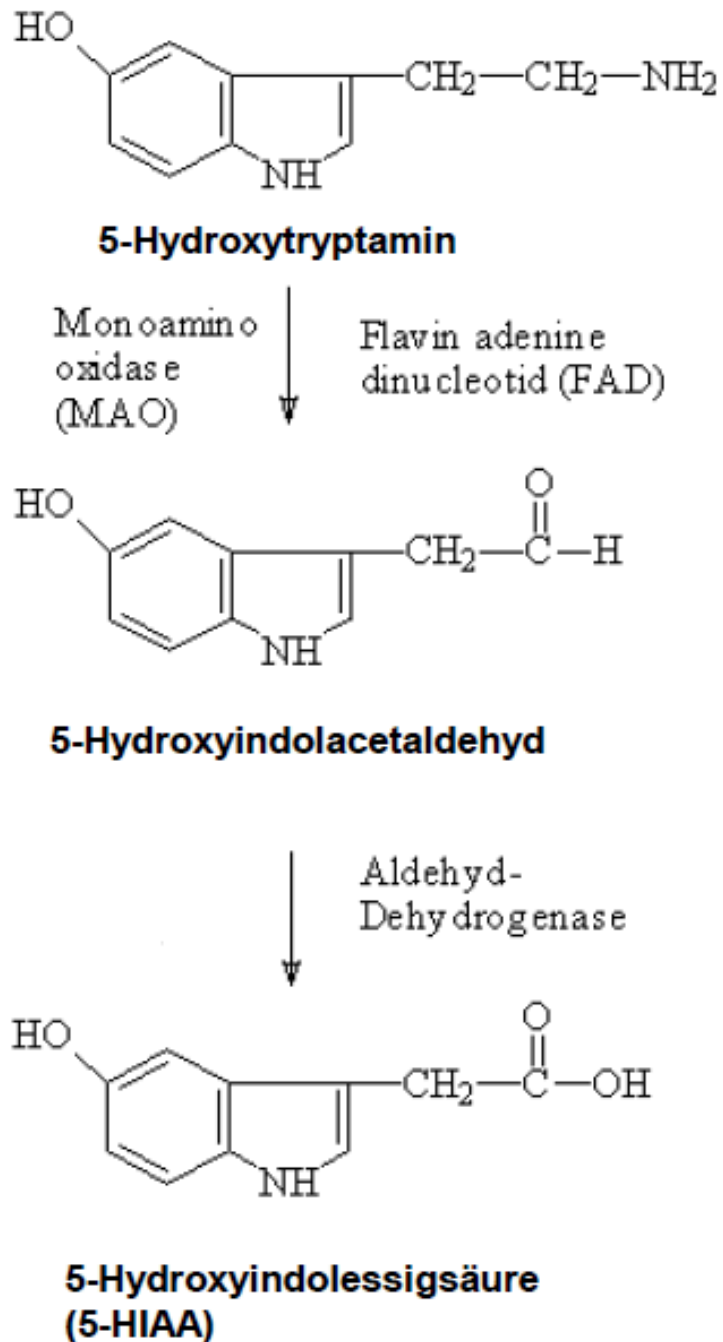


**Abb. 1:** Biosynthese von 5- Hydroxytryptamin (Serotonin)

Die Metabolisierung von 5-Hydroxytryptamin beginnt mit der Umwandlung dieses Monoamins – katalysiert durch die mitochondriale Monoaminoxidase A – zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd. Dieses wird, wie in Abbildung 2 dargestellt, als Substrat der Aldehyddehydrogenase zum Hauptmetaboliten 5-Hydroxyindolessigsäure (HIAA) abgebaut (Uden-

friend et al., 1956; Frazer und Hensler, 1994). Diese Metaboliten, an Glucuronsäure oder Schwefelsäure gebunden und dadurch besser wasserlöslich, werden über die Niere ausgeschieden.

Ein weiterer Stoffwechselweg von Serotonin besteht in seiner Substrateigenschaft für die Melatonin-Synthese (Frazer und Hensler, 1994).



**Abb. 2:** Abbau von 5-Hydroxytryptamin (Serotonin)

### 1.1.2 Transporter-vermittelte Inaktivierung und Speicherung sowie Freisetzung von vesikulär gespeichertem Serotonin

Die Zellmembran der zentralnervösen und peripheren Serotonin–Neurone enthält einen spezifischen Serotonintransporter (SERT), der mit dem thrombozytären Serotonintransporter identisch ist, nicht aber mit einem Transporter, der sich in der Membran der Speichervesikel befindet. Es ist der relativ unspezifische vesikuläre Monoamin-Transporter (VMAT2), der 5-Hydroxytryptamin aus dem Zytosol in die Speichervesikel überführt (Eiden et al., 2004).

Die Freisetzung des vesikulär gespeicherten Serotonins beginnt mit der Ausbreitung von Aktionspotentialen entlang den Axonen der Neurone in die freien (nicht mit einer Myelinscheide isolierten) Axonendigungen. Fortgeleitete Aktionspotentiale führen an den Axonendigungen serotoninerger Neurone durch den Einstrom von  $\text{Na}^+$  zur Depolarisation und Öffnung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, wodurch es zur exozytotischen Freisetzung des vesikulär gespeicherten Serotonins in den synaptischen Spalt kommt. Dort stimuliert Serotonin prä- und postsynaptische Serotonin-Rezeptoren.

Analog der bereits für den thrombozytären Transporter beschriebenen Aufnahme von 5-HT in die Blutplättchen, besteht die Wiederaufnahme von Serotonin aus dem synaptischen Spalt in das Zytosol der Nervenendigung durch den SERT in einer Inaktivierung dieses Monoamins. Das in das perivesikuläre Zytosol der Speichervesikel gelangte 5-HT wird entweder metabolisiert oder erneut in die Speichervesikel transportiert. Es steht dort für einen erneuten Freisetzungs- und Wiederaufnahmezyklus zur Verfügung. Die Transporter vermittelte Inaktivierung durch den spezifischen Zellmembran-Transporter wird durch selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer (*selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRI) blockiert, eine Medikamentengruppe, die häufig zur Behandlung von Depressionen eingesetzt wird. Durch SSRI wird entsprechend der Hemmung der Wiederaufnahme die 5-HT-Konzentration im synaptischen Spalt, bzw. in der Biophase der 5-HT-Rezeptoren erhöht.

## 1.2 Serotoninrezeptoren: Heterogenität, Klassifikation, genetische Varianten

Die Wirkungen des Serotonins im ZNS und in peripheren Geweben wird durch 14 verschiedene 5-HT-Rezeptoren innerhalb von sieben übergeordneten Rezeptorfamilien vermittelt (5-HT<sub>1</sub> – 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren).

Nur die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren sind Ligand-gesteuerte Ionenkanäle für Na<sup>+</sup>; der durch Serotonin geöffnete Kationenkanal ist aber auch für Ca<sup>2+</sup> und in geringem Ausmaß auch für K<sup>+</sup> permeabel. Sie sind aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt und verfügen über Erkennungsstellen für 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorliganden. Die Bindung eines Agonisten an diese Erkennungsstelle bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins, wodurch der betreffende Kanal für das Ion geöffnet wird. Alle übrigen 5-HT-Rezeptortypen, einschließlich der als 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> und 5-HT<sub>1F</sub> klassifizierten 5-HT-Rezeptoren sind an G-Proteine gekoppelt und geben das Signal durch biochemisch gebildete nachgeordnete zweite Botenstoffe weiter. Beispielsweise sind die 5-HT<sub>1</sub>-Rezeptorsubtypen an G<sub>i/o</sub>-Protein gekoppelt und hemmen die Adenylatcyclase (Göthert, 1994; Hoyer und Martin, 1996; Baumgarten und Göthert, 1997; Barnes und Sharp, 1999; Bockaert et al., 2006; Hannon und Hoyer, 2008; Nichols und Nichols, 2008; Filip und Bader, 2009; Pitahadia und Jain, 2009).

### 1.2.1 5-HT-Rezeptoren: Familien, Typen und Subtypen sowie funktionelle und pathophysiologische Implikationen

Entsprechend der Thematik der vorliegenden Arbeit werden spezielle Eigenschaften des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors sowie seine klinische und therapeutische Bedeutung in einem eigenen Unterabschnitt besprochen. Erfolgreiche Entwicklungen neuartiger therapeutischer Substanzen auf der Grundlage anderer als 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren werden zunächst anhand einiger Beispiele relativ kurz besprochen. So ist die Heterogenität der 5-HT-Rezeptoren nicht nur von theoretischem Interesse. Vielmehr kann sich die Bindung eines selektiven Liganden nur an einen bestimmten 5-HT-Rezeptor(sub)typen durch ein günstigeres Wirkungs-/Nebenwirkungsprofil manifestieren. Die Bedeutung der Selektivität und Heterogenität von 5-HT-Rezeptoren soll zunächst anhand einzelner Beispiele für andere als 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren verdeutlicht werden.

So spielen 5-HT<sub>1B</sub>- und 5-HT<sub>1D</sub>-Rezeptoren für die Akuttherapie der Migräne eine große Rolle (Ensink und Soyka, 1994). Der pulsative Kopfschmerz – das Hauptsymptom einer akuten Migräneattacke – beruht auf einer äußerst starken Erschlaffung der Arterien der Dura mater. Diese Vasodilatation wird durch die Freisetzung von Neuropeptiden aus afferenten Nervenfasern des Ganglion trigeminale hervorgerufen. Bei diesen Neuropeptiden handelt es sich um Substanz P (SP), *Calcitonin gene related peptide* (CGRP) sowie Neurokinin A (NKA). Diese Komponenten zusammen bilden eine funktionelle Einheit, die als trigeminovaskuläres System bezeichnet wird (May und Goadsby, 1999; Meents et al., 2010). Monoklonale Antikörper gegen CGRP oder seinen Rezeptor (z.B. Erenumab) werden neuerdings als spezifische Arzneimittel zur Migräneprophylaxe eingesetzt (Sacco et al., 2019).

Aufgrund der pathophysiologischen Bedeutung der Dilatation der duralen Arterien liegt die Therapie dieser Störung auf der Hand: Diese besteht in der Applikation von Pharmaka mit Selektivität, die zur Kontraktion der glatten Muskelzellen duraler Arterien führen. Als erster Vertreter einer Gruppe verwandter Substanzen, die diese beiden Kriterien erfüllen, ist das Sumatriptan, ein 5-HT<sub>1B/D</sub>-Rezeptoragonist, der in die Therapie eingeführt wurde (Humphrey und Goadsby, 1994). Die Selektivität dieser Wirkung auf die glatte Muskulatur duraler Arterien ist nicht absolut, denn 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptoren kommen nicht nur in den glatten Muskelzellen vor, die an der Konstriktion der duralen Arterien beteiligt sind, sondern auch an funktionell analogen 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptoren der Koronararterien. Dementsprechend sind in der Literatur Fälle von ischämischen koronaren Schmerzen und sogar von Myokardinfarkten beschrieben worden (Kaumann und Levy, 2006).

Ein weiteres Problem besteht darin, dass in den genannten glatten Muskelzellen – abgesehen von den konstriktorisches 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptoren – auch 5-HT<sub>1D</sub>-Rezeptoren vorkommen, die indirekt dilatatorisch wirken. Diese Wirkung ergibt sich aus der Tatsache, dass die postganglionären sympathischen Axonendigungen mit präsynaptischen 5-HT<sub>1D</sub>-Rezeptoren ausgestattet sind. Deren Aktivierung durch Triptane bewirkt eine Hemmung der Freisetzung von Noradrenalin. Dieses steht aufgrund der Freisetzungshemmung in verminderter Konzentration an den postsynaptischen vasokonstriktorisches  $\alpha_1$ -Rezeptoren zur Verfügung. Mit anderen Worten, wird der therapeutisch günstige Ef-



fekt der 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptor vermittelten Kontraktion duraler Arterien durch verminderte 5-HT<sub>1D</sub> vermittelte Verfügbarkeit von vasokonstriktorischem Noradrenalin abgeschwächt. Ferner wird den 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptoren eine Rolle bei der Regulation aggressiven Verhaltens zugeschrieben (Brunner et al., 1997; Bortolato, 2013).

### **1.2.2 Rezeptor-Typ/Subtyp-selektive Liganden von Nicht-5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren: Beispiele für Fortschritte in der Arzneimittel-Therapie**

Die 5-HT<sub>2A</sub>-, 5-HT<sub>2B</sub>- und 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptoren vermitteln ihre Effekte über G<sub>q/11</sub>-Proteine. Über diese G-Proteine erfolgt die Aktivierung der Phospholipase C. Diese vermittelt die Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> bewirkt eine Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum und damit einen zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Anstieg. 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren auf glatten Muskelzellen von Blutgefäßen bewirken so eine Vasokonstriktion oder auf Thrombozyten deren Aktivierung. 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren kommen auf glatten Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen vor, weshalb sie eine Rolle für Herz-Kreislauf-Funktionen spielen. Die heptahelikale Struktur des 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptorproteins konnte durch Röntgen-Kristallstrukturanalysen nachgewiesen werden (Wang et al., 2013). Der 5-HT<sub>2C</sub>-Rezeptor kommt fast ausschließlich im ZNS vor, und zwar im Kortex, Hypothalamus, Pallidum, Septum und in der Substantia nigra sowie im Rückenmark. Sein Einfluss erstreckt sich auf das Sexual- und Essverhalten (Pompeiano et al., 1994).

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ist ein Ligand gesteuerter Ionenkanal, der für Natrium-, Kalium- und Kalzium-Ionen permeabel ist. Die Erregung des Rezeptors führt zur Steigerung der Darmmotilität und löst u.a. auch den Brechreflex aus. 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten werden hoch wirksam zur Unterdrückung des Zytostatika-induzierten Erbrechens eingesetzt. Selektive Antagonisten sind Ondansetron, Granisetron und Dolasetron (Rex et al., 2007).

Die 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren befinden sich in der Peripherie, z.B. im Darm und in der Harnblase, im ZNS sind sie im Neokortex, im Hippokampus und an den Basalganglien lokalisiert. Sie sind G<sub>s</sub>-Protein-gekoppelt und stimulieren die Adenylatcyclase. Die Magen- und Darmmotilität wird gesteigert, ferner wird ihnen eine Rolle bei der Gedächtnisbildung zugesprochen (Bockaert et al., 2004). Der 5-HT<sub>5</sub>- und der 5-HT<sub>6</sub>-Rezeptor scheinen eine Rolle bei Lernvorgängen zu spielen. Zu finden sind die Rezeptoren im ZNS, im limbi-

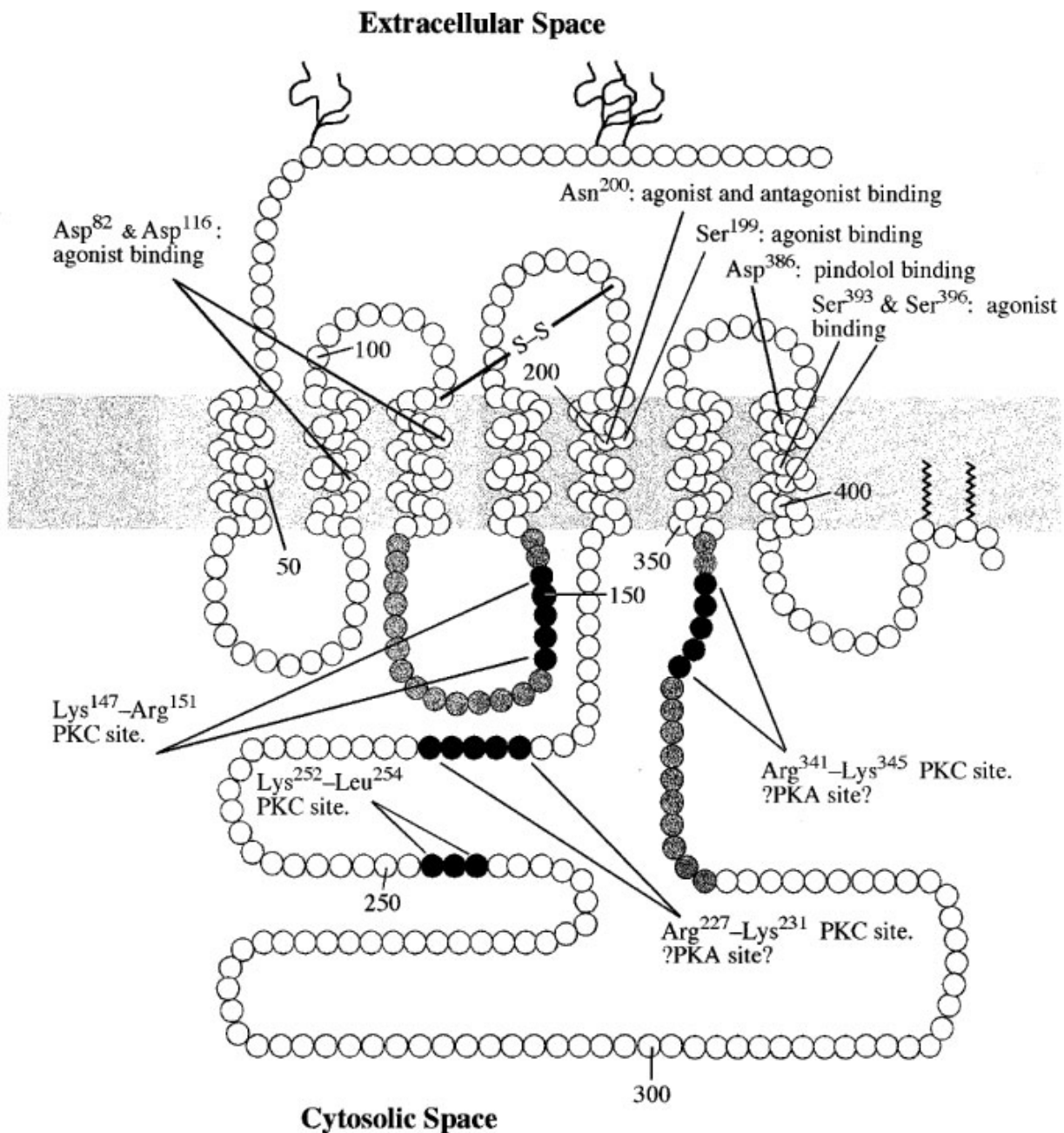
schen System und in kortikalen Regionen (Woolley et al., 2004). Die 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren sind wahrscheinlich an der Regulation der zirkadianen Rhythmik beteiligt (Thomas und Hagan, 2004).

### **1.2.3 Genetische Rezeptor-Varianten: Zunahme der Heterogenität**

Die bereits ungewöhnlich stark ausgeprägte Heterogenität der 5-HT-Rezeptoren wird noch stärker ausgeprägt, wenn man an die Möglichkeit von Mutationen denkt, die zu *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) führen. Solche SNPs können zu anderen Eigenschaften des Genprodukts im Vergleich zum Wildtyp führen. SNPs sind für viele Gene, welche z.B. auch bei psychiatrischen oder neurologischen Erkrankungen eine Rolle spielen, bekannt; darunter finden sich auch SNPs für eine Vielzahl diverser Rezeptoren. Diese genetische Variabilität kann eine Rolle in der Entstehung psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen spielen und für unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften verantwortlich sein (Göthert et al., 1998). Umfassende Übersichten über derartige Veränderungen sind publiziert worden (Malhotra et al., 2007; Yevtushenko und Reynolds, 2010; Kitts und Sherry, 2011; Reynolds et al., 2014; Baou et al., 2015). In diesen thematischen Bereich ist auch die Problematik der vorliegenden Arbeit einzuordnen.

## **1.3 Spezielle Aspekte des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors als Basis eigener Untersuchungen**

Der im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stehende und daher hier in einem eigenen Unterabschnitt besprochene 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor wird durch das HTR<sub>1A</sub> Gen kodiert. Dieses befindet sich auf Chromosom 5, Locus 5q11.2-q13 (Fargin et al., 1989; Kobilka et al., 1987).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung des humanen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors (modifiziert nach Raymond et al., 1999).

Der Rezeptor ist aus insgesamt 422 Aminosäuren einschließlich sieben Transmembrandomänen zusammengesetzt (Abb. 3). Letztere weisen 20-26 hydrophobe Aminosäuren auf, eine typische G-Protein-gekoppelte Struktur. Die Transmembrandomänen sind durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen verbunden. Die Aminosäure Serin in Position 199, 393 und 396 und Aspartat in Position 82 und 116 stellen den Ort für die Bindung von zahlreichen Agonisten dar: Threonin in Position 200 dient der Bin-

dung von Antagonisten und Agonisten, Aspartat in Position 386 erlaubt die Bindung von  $\beta$ -Rezeptorantagonisten. Zwischen der ersten und der zweiten extrazellulären Schleife besteht eine Disulfidbrücke. Der Nachweis erfolgte mittels gerichteter Mutagenese (Chanda et al., 1993; Guan et al., 1992; Ho et al., 1992). Die zweite und dritte intrazelluläre Schleife ist an der G-Proteinkopplung beteiligt und erhalten Erkennungssequenzen für die Phosphorylierung durch die Proteinkinase C (Lys147-Arg151, Lys252-Leu254, Arg227, Lys231) und A (Arg227-Lys231, Arg341-Lys345). Die Phosphorylierung der Aminosäure Threonin und Serin in dieser Region wirkt sich auf die Aktivität des Rezeptors aus (Raymond et al., 1999). Vom 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorprotein wurde mittels „molecular modeling“ auch die 3D-Struktur ermittelt (Xu et al., 2013).

### 1.3.1 Lokalisation des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors

Mittels radioaktiv markierten selektiven Liganden wurde die Verteilung der Rezeptoren im ZNS nachgewiesen. Die dabei verwendeten Substanzen waren die Radioliganden [3H]-8-OH-DPAT und [3H]WAY100135 (Barnes und Sharp, 1999; Lanfumey und Hamon, 2000; Marcinkiewicz et al., 1984; Pazos und Palacios, 1985; Radja et al., 1992; Vergé et al., 1986). Die höchste Dichte der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren konnte im Gyrus dentatus, im lateralen Septum, im entorhinalen und frontalen Kortex sowie in den dorsalen Raphekernen und in der C1 Region des Hippokampus gefunden werden. Geringer erschien die Dichte in der Amygdala, im Thalamus, im Hypothalamus, im dorsalen Horn des Rückenmarks und im lateralen Striatum. Im Pallidum, im Cerebellum und in der Substantia nigra ließen sich keine oder nur sehr wenige 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren nachweisen. Immunhistochemische Untersuchungen mit einem spezifischen Rezeptorantikörper konnten die Ergebnisse bestätigen (Lanfumey und Hamon, 2000). Weitere Lokalisationsstudien führten auf, dass die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren der dorsalen Raphekerne sich hier ausschließlich auf den neuronalen Zellkörpern und den Dendriten befinden. Die medianen Raphekerne enthalten die Rezeptoren auf den serotoninergen Neuronen. Bei Pyramiden- und Körnerzellen des Hippocampus lassen sich diese Rezeptoren auf dem Soma und den Dendriten nachweisen (Burnet et al., 1995; Pompeiano et al., 1992). Als inhibitorische somadendritische Autorezeptoren sind diese 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren an der Regulation ihrer eigenen Aktivität beteiligt. Postsynaptisch üben sie ihre Funktion als

Heterorezeptoren an nicht-serotoninergen Neuronen aus und vermitteln so zahlreiche Effekte wie die Einflussnahme auf andere Transmittersysteme.

### **1.3.2 Physiologische, pharmakologische Eigenschaften und mögliche therapeutische Bedeutung des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors**

5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren inhibieren die Adenylatcyclase; die Kopplung erfolgt über G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>-Proteine (Doupnik et al., 1997; Hamon et al., 1990; Haj-Dahmane et al., 1991; Oleskevich, 1995; Raymond et al., 1993). Des Weiteren konnte eine Aktivierung der Phospholipase C nachgewiesen werden (Boddeke et al., 1992; Fargin et al., 1989; Raymond et al., 1992).

Die Verteilung des Rezeptors konnte mit Hilfe von Radioligand-Bindungsstudien durch den selektiven, Tritium-markierten 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonisten 8-OH-DPAT ermittelt werden (Hjorth et al., 1982). Buspiron, ein 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonist mit zusätzlicher Affinität zum  $\alpha_2$ -Adrenozeptor wurde in der Klinik als Anxiolytikum eingesetzt (Taylor und Moon, 1991). Flesinoxan, ein selektiver und potenter Agonist, stimuliert zentrale 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren und führt zur Hemmung der Sympathikusaktivität mit der Folge einer Blutdrucksenkung. Außerdem wurde versucht, Flesinoxan zur Beendigung von Panikattacken zu verwenden (van Vliet et al., 1996). Agonistische Eigenschaften zeigte auch das Antihypertensivum Urapidil, das jedoch nicht nur an den somadendritischen 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren angreift, sondern auch als  $\alpha$ -Adrenorezeptorantagonist blutdrucksenkend wirkt (Sanders et al., 1988).

Weitere geprüfte Substanzen erwiesen sich als partielle Agonisten. WAY100135 ist ein reiner selektiver Antagonist an den somadendritischen 5-HT<sub>1A</sub>-Autorezeptoren (Fletcher et al., 1993).

Die postsynaptischen 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren wurden im entorhinalen und frontalen Kortex, im Hippokampus und im Mandelkern sowie im Septum und im Hypothalamus nachgewiesen. Hemmende somadendritische Autorezeptoren befinden sich in den Zellgruppen der Raphekerne und wirken regulatorisch durch eine negative Rückkopplung.

Mehrere Transmittersysteme werden durch 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren beeinflusst. In der Übersichtsarbeit von Barnes und Sharp (1999) wurde aufgeführt, dass 8-OH-DPAT die Ace-

tylcholinfreisetzung sowohl im Hippokampus als auch im Kortex erhöht. Der Effekt konnte durch selektive und nicht selektive Antagonisten aufgehoben werden. Weiterhin wurden 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoren an den Zellkörpern cholinergischer Neurone des Septums gefunden, die in den Kortex und den Hippokampus projizieren (Barnes und Sharp, 1999; Kia et al., 1996).

8-OH-DPAT bewirkt auch eine gesteigerte Freisetzung von Noradrenalin in vielen Hirnregionen, so im Hypothalamus, Hippokampus sowie im frontalen und im tegmentalen Kortex (Chen und Reith, 1995; Done und Sharp, 1994; Suzuki et al., 1995).

Außerdem konnte nach Gabe von 5-HT<sub>1A</sub>-Agonisten erhöhte Nahrungsaufnahme, Hypothermie und verändertes Sexualverhalten beobachtet werden (Green und Grahame-Smith, 1976; Lucki, 1992; Millan et al., 1991). Ferner wurde durch Gabe von 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonisten die Plasma-ACTH-Konzentration erhöht; wobei in den einzelnen Studien einerseits prä- andererseits postsynaptische Mechanismen verantwortlich gemacht wurden (Gilbert et al., 1988).

Ebenso wurden die anxiolytischen Eigenschaften in einigen Modellen der Aktivierung somadendritischer Autorezeptoren zugeschrieben, andere wiederum verwiesen auf postsynaptische Mechanismen (Handley, 1995).

Versuche mit 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor Knockout- und Wildtyp-Mäusen ergaben nach Knockout des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors ein erhöhtes Angstverhalten. Die Tiere vermieden eine neue und unbekannte Umgebung, Stress wurde aus dem Weg gegangen (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1998). Dieses Verhalten könnte durch eine gesteigerte Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt erklärt werden (Ramboz et al., 1998). Gewebsspezifisch konnte in einem Experiment das „Ausknocken“ des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors während der frühen postnatalen Periode im Hippokampus und im Kortex verhindert werden (Cross et al., 2002). Hier wurde die Erhöhung des Angstverhaltens durch die frühe postnatale Expression des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors im Hippokampus und im Kortex nicht konstatiert.

Auch eine neurotrophe Rolle konnte dem Rezeptor zugeschrieben werden. So beobachtet man nach Stimulation der Rezeptoren in der Folge eine Freisetzung der neurotro-

phen Faktoren *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) und S-100 (Galter und Unsicker, 1990; Whitaker-Azmitia et al., 1990).

## **1.4 Tourette-Syndrom (TS): Wichtige Eigenschaften als Grundlage eigener Untersuchungen**

### **1.4.1 Epidemiologie, Symptomatik, Pathophysiologie und Therapie**

Das Tourette-Syndrom (TS) ist eine bereits in der Kindheit beginnende neuropsychiatrische Störung, die durch Tics gekennzeichnet ist. Sie ist benannt nach dem Erstbeschreiber Georges Albert Edouard Brutus Gilles de la Tourette (1857-1904, „Tourette“), einem Schüler Charcots an der berühmten Pariser Klinik „Salpêtrière“. Die weltweite Prävalenzrate der Krankheit beträgt etwa 1 % (Robertson, 2008). Das Tourette-Syndrom kommt in allen Ländern, Kulturen und Rassen vor (Robertson, 2000; Staley et al., 1997).

Ein relativ kleines Kollektiv französischer Patientinnen und Patienten mit charakteristischen Symptomen war Grundlage der ersten Publikationen von Tourette (Gilles de la Tourette, 1885) über die von ihm als „maladie des tics“ bezeichnete Erkrankung. Er beschrieb als Manifestationsformen der Tics unkontrollierte Bewegungen und Geräusche, sowie Ausstoßen von Lauten und Flüchen (siehe hierzu auch Goetz und Klawans, 1982; Ludolph et al., 2012).

Entsprechend der gegenwärtigen Klassifikation werden die Tics in zwei Kategorien eingeteilt, nämlich in motorische und vokale Tics. Diese werden ihrerseits jeweils in einfache und komplexe Ausprägung unterteilt, wie in Tabelle 1 dargestellt wird. In diesem Raster kommen im Einzelnen zahlreiche Manifestationsformen vor, die synoptisch in der Tabelle zusammengestellt sind. Im hier folgenden Text werden für jede Form der Tics nur maximal zwei Beispiele genannt, im Übrigen sei auf die Tabelle verwiesen. Beispiele von Bewegungen im Rahmen einfacher motorischer Tics sind Kontraktionen der Nacken- und Schultermuskulatur, sowie im Rahmen einfacher vokaler Tics Räuspern und Bellen. Hiervon zu unterscheiden sind nach Lees et al. (1984) die komplexen, analog motorischen Tics (z. B. das Hand- und Armdrehen oder die Echopraxie, das zwanghafte Nachahmen und Wiederholen von Handlungen und Bewegungen) und vokalen Tics (z. B. neuropsychologische Störungen wie die Echolalie, ein automatisches und zwanghaf-

tes Nachsprechen von Gehörtem und die Koprolalie, ein zwanghafter Drang zum Aussprechen vulgärer Wörter). Häufig wirken die Tics in der Ausführung wie beabsichtigt, außerdem verlaufen sie relativ langsam (Riederer et al., 2002).

Im Zusammenhang mit der oben bereits erwähnten frühen Manifestation bei Kindern gehen neue Schätzungen davon aus, dass einfache motorische und transiente Tics bei bis zu 10 - 15 % der Grundschüler auftreten. Die Erstmanifestation der Tics zeigt sich im Alter zwischen 6 und 8 Jahren. Motorische Tics treten dabei im Mittel zwischen zwei bis drei Jahre früher in Erscheinung als die vokalen Tics. Die stärkste Ausprägung der Tics zeigt sich zwischen dem zehnten und zwölften Lebensjahr. Etwa 90 % der Patienten zeigen dann im weiteren Verlauf ihres Lebens eine deutliche Verbesserung der Erkrankung (Freeman et al., 2000; Knight et al., 2012; Robertson, 2008).

Jungen und Männer sind etwa viermal häufiger betroffen als Mädchen und Frauen. Der Schweregrad, die Frequenz und auch die Komplexität der Symptome unterliegen Veränderungen, die auch als „*wax and wane*“ beschrieben werden. Kriterien, die zu Beginn der Erkrankung eine Prognose bezüglich der Schwere und der Symptomatik des Verlaufs zulassen, sind bis heute nicht bekannt. Emotionale Spannung führt zur Zunahme der Tics. Konzentration, Fokussierung auf andere Objekte und Ablenkung reduzieren die Tic-Symptomatik. Im Schlaf sistieren sie ganz (Jancovic, 1997). Tics sind suggestibel und lassen sich durch externe Stimuli auslösen, beispielsweise als Gegenstand der Unterhaltung innerhalb einer Sprechstunde. Dem Auftreten der Tics geht häufig ein Vorgefühl („*premonitory urge*“) voraus. Wird der Tic dann manifest, klingt dieses Gefühl ab und wird wahrnehmbar als Erleichterung der Symptomatik. Ein Charakteristikum der Erkrankung besteht in der Möglichkeit, den Tic willentlich zu supprimieren (Banaschewski et al., 2003).



**Tab. 1:** Einfache und komplexe Tics, die bei Tourette-Patienten vorkommen  
(nach Hebebrand et al., 1998)

*A. Einfache und komplexe motorische Tics*

Einfache motorische Tics	Komplexe motorische Tics
Augenblinzeln	Hand- und Armdrehen
Augenzwinkern	Berührtics
Grimassieren	Echopraxie
Kopfrucken	Kopropraxie
Kopfschütteln	
Schulterzucken	
Rumpftics	

*B. Einfache und komplexe vokale Tics*

Einfache vokale Tics	Komplexe vokale Tics
Hüsteln	Schreie
Räuspern	Echolalie
Grunzen	Koprolalie
Bellen	
Schnäuzen	
Piepsen	
Summen	

Die Diagnose einer Tic-Störung ist anhand einer detaillierten Anamnese, einer psychiatrischen als auch einer neurologischen Untersuchung zu stellen. Abgegrenzt werden muss die Erkrankung gegenüber „nicht näher bezeichneten“ Tic-Störungen, die sich nach dem 18. Lebensjahr manifestieren. Hierzu gehören auch die Dystonien; diese lassen sich als eher langsam ablaufende Bewegungen erkennen, und sie sind nicht willentlich zu supprimieren. Ein Apoplex oder ein Schädel-Hirn-Trauma kann auch zu einer Tourette ähnlichen Symptomatik führen (Riederer et al., 2002).

Zur Diagnose des Tourette-Syndroms müssen folgende Kriterien, die im "*Diagnostic and statistical manual of mental disorders IV*" (DSM-IV) der amerikanischen Gesellschaft für Psychiatrie aufgelistet sind, erfüllt sein:

Kriterium A: Multiple motorische Tics und mindestens ein vokaler Tic treten im Verlauf der Erkrankung auf, jedoch nicht unbedingt gleichzeitig.

Kriterium B: Die Tics treten mehrmals täglich (gewöhnlich anfallsweise), entweder fast jeden Tag oder intermittierend in einem Zeitraum von über einem Jahr auf. In diesem Zeitraum gibt es keine Tic-freie Phase, die länger als drei aufeinander folgende Monate dauert.

Kriterium C: Die Störung führt zu starker innerer Anspannung oder verursacht in bedeutsamer Weise Beeinträchtigungen in sozialen, beruflichen oder anderen wichtigen Funktionsbereichen.

Kriterium D: Der Beginn liegt vor dem 18. Lebensjahr.

Kriterium E: Die Störung beruht nicht auf der direkten körperlichen Wirkung einer Substanz (z. B. Stimulanzien) oder einer Krankheit (z. B. Huntingtonsche Erkrankung oder postvirale Enzephalitis).

Bei 80 - 90 % aller Patienten mit TS bestehen nicht nur, wie in Tabelle 1 aufgeführt, die Tics, sondern es zeigt sich auch eine Komorbidität mit psychiatrischen Erkrankungen (Khalifa und Knorrning, 2006), welche in Tabelle 2 dargestellt werden. Zu nennen sind hier das Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHD), Zwangssymptome (durchaus auch mit Autoaggression), Depressionen, Schlafstörungen, sowie seltener auch Erkrankungen, die dem Spektrum der Autismusstörungen oder der Sucht zuzuordnen sind.

**Tab. 2:** Komorbiditäten und deren Häufigkeit bei TS  
(nach Rieder et al., 2002)

assozierte Krankheit	Häufigkeit
ADHD	50 - 70 %
Zwangsstörungen	30 - 40 %
Lernschwierigkeiten	23 - 24 %
affektive Störungen	20 - 23 %
Angststörungen	19 %

Viele Patienten zeigen lediglich eine leicht ausgeprägte Tic-Störung, die keiner Behandlung bedarf. Die Patienten, die Familie und das soziale Umfeld der Betroffenen sollten über die Erkrankung aufgeklärt werden, um eine Stigmatisierung zu vermeiden. Behandlungsoptionen bei schwerer Symptomatik, z. B. Beeinträchtigung der Alltagsgestaltung, des Soziallebens und des Erwerbslebens, werden im weiteren Verlauf der Einleitung dargestellt.

Wie in der Diskussion noch weiter ausgeführt, gibt es neben der unten beschriebenen Dopamin- und Serotoninhypothese auch neuere Erkenntnisse und Hypothesen zur Pathophysiologie des Tourette-Syndroms. Aus dem Übersichtsartikel von Paschou (2013) ist ersichtlich, dass neben den Rezeptoren für Dopamin und Serotonin auch Synthesenzyme und am Metabolismus und der Inaktivierung dieser Monoamine beteiligte Genprodukte bzw. Gene als Kandidatengene untersucht wurden oder solche für Glutamat oder für Neurexin und Neuroligine. In jüngster Zeit rückte auch Histamin und eine gestörte Funktion des H<sub>3</sub>-Histamin-Rezeptors in den Fokus der pathophysiologischen Erklärung (Rapanelli, 2017; Rapanelli und Pittenger, 2016).

Pathophysiologisch stellen die Dopamin- und Serotoninhypothese ein Erklärungsmodell dar. Bewegungsabläufe und ihre Feinabstimmung werden in den Basalganglien verschaltet. Dabei wird das Kleinhirn über die Substantia nigra einbezogen, da dort die Propriozeption ihre Verschaltung findet und so intentionale Bewegungen über Tonusinformationen aus der Peripherie abstimmt. Daher ist der Mensch mit geschlossenen Augen in der Lage zu wissen, wie sich seine Extremitäten im Raum gerade bewegen.

Neben Gamma-Aminobuttersäure (GABA) als hemmende Substanz findet die Verschaltung in den Basalganglien und in der Substantia nigra maßgeblich über dopaminerge Neurone ihren Ausdruck. Unterschiedliche Defekte in diesem System führen entweder zu hyperkinetischen Pathologien, wie z.B. Chorea Huntington, einem Defekt im Striatum, oder zu hypokinetischen Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Parkinson, einem Defekt in der Substantia nigra (Kaneoke und Vitek, 1995; Rondot und Bathien, 1994).

Bislang sind fünf verschiedene Dopaminrezeptoren (D<sub>1</sub>-D<sub>5</sub>) beschrieben (Civelli et al., 1993), teilweise noch untergruppiert mit jeweils unterschiedlicher Reizweiterleitung, angefangen von Agonismus und Antagonismus, über Partial(ant)agonismus bis hin zu in-versem Agonismus (Hall und Strange, 1997), so dass schlussendlich die genaue Verschaltung nicht vollständig erforscht ist und verschiedene Hypothesen in Bezug auf das TS existieren. Hypothesen wären hier beispielsweise überempfindliche postsynaptische Rezeptoren oder Überinnervation im Striatum (Singer et al., 1991; Singer, 1994).

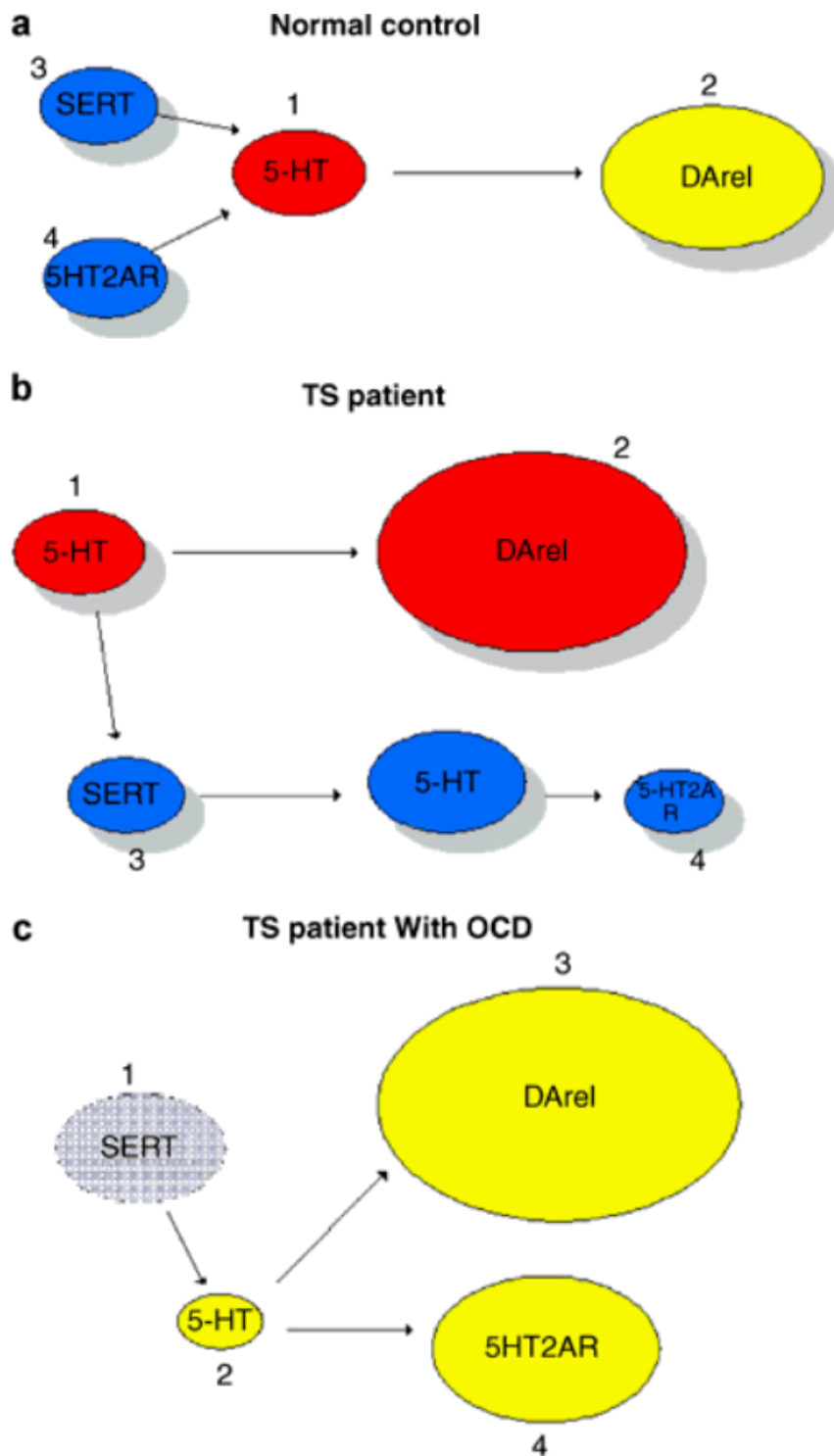
Wong et al. (2008) brachten, bezogen auf die D<sub>2</sub>-Rezeptoren, die vier Variablen Dichte, Affinität, Bindungspotential und Ausschüttung in Bezug zu einem von Grace (1991) beschriebenen tonisch-phasischen Modell.

Daneben wird angenommen, dass zwei Arten von Dopaminbewegungen im Allgemeinen existieren: Der Langzeitanteil oder der homöostatische Anteil im Sinne eines dopaminergen Basislevels, extrazellulär gelegen und von geringer Konzentration und Schwankung (O'Donnell und Grace, 1994), im Gegensatz zum phasischen Anteil, innerhalb der Synapse liegend und in der Ausschüttung zum Teil auch von anderen Stimulanzen – wie etwa Amphetamin – abhängig (Wightman und Robinson, 2002). Der Dopaminhaushalt wird durch den Basislevel des tonischen Dopamins moduliert (Grace, 1991; 1995). TS-Patienten zeigen eine abgeschwächte tonische Regulation auf eine phasische Antwort, es kommt zu einer Spitzenausschüttung und Überantwort (Wong et al., 2008).

Die Gruppe um Wong (2008) fand bei TS Patienten ein verringertes Bindungspotential des Serotonintransporters, vorrangig im Mittelhirn, Nucleus caudatus und Putamen. Das Bindungspotential des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptors zeigte sich erhöht in Regionen des präfrontalen, temporalen und zingulären Kortex bei Patienten mit TS und komorbider *obsessive compulsive disorder* (OCD). Neben dem gesteigerten Bindungspotential fand sich bei

Patienten mit TS und OCD auch eine gesteigerte Dopaminfreisetzung. Weizmann et al. (1992) entwickelten hierzu die Hypothese, dass ein serotonerges Defizit ursächlich zu einem kompensatorischen Anstieg des 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor Bindungspotentials führt und so weiterhin zu einer Reduktion der Serotonintransporter.

Wong (2008) postulierte eine mögliche Interaktion zwischen dem Serotonindefizit und der phasischen Dopaminausschüttung: Bei serotoninermem Defizit erfolgt eine Down-Regulation der Transporter SERT zum Ausgleich des Defizits innerhalb des synaptischen Spalts. Postsynaptisch stellt sich allerdings eine Up-Regulation des Rezeptors zur vollständigen Ausschöpfung des serotoninergen Potentials ein. Diese Effekte scheinen sich steigernd auf die Dopaminfreisetzung auszuwirken. TS-Patienten ohne OCD zeigten allein durch den reduzierten Serotoninspiegel eine gesteigerte Dopaminsekretion. Die Abbildung 4 beschreibt drei Modelle dieser Hypothese von Wong (2008).



**Abb. 4:** Dynamik des Dopamins und des Serotonins bei Patienten mit TS und OCD sowie bei Patienten mit TS ohne OCD (modifiziert nach Wong, 2008).

In Abbildung 4a reguliert der Serotoninspiegel die Dopaminsekretion herunter, dies ist der Normalfall. Abbildung 4b zeigt ein TS ohne OCD. Das primäre Defizit ist der vermin-

derte Serotoninspiegel mit einer konsekutiv gesteigerten Dopaminsekretion. In Abbildung 4c liegt das TS und OCD vor, der Serotonintransporter verfehlt die Kompensation, es stellt sich ein niedriger Serotoninspiegel mit gesteigerter Dopaminsekretion ein.

Die Behandlung des TS gestaltet sich multidisziplinär. Sie umfasst neben der medikamentösen Behandlung eine intensive Betreuung der Patienten im Rahmen von psychologischen Therapien wie Entspannungstechniken, Biofeedback-Verfahren und kognitiven Therapieansätzen (Klug et al., 1999). Die pharmakologische Behandlung des TS ist nach Schwere der Symptome und ihrer funktionellen Beeinträchtigung für den Patienten ausgerichtet. Eine kurative Therapie existiert noch nicht.

Die pharmakologische Therapie konzentriert sich auf die Dopamin-Rezeptorenblocker wie Haloperidol und Risperidon, welche in zahlreichen Studien auf ihre Wirksamkeit hin untersucht wurden (Gilbert, 2006). Typische Neuroleptika haben leider ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil mit Gewichtszunahme, Sedation, Tachykardien, Verlängerung der QTc-Zeit im EKG und extrapyramidalen motorischen Störungen. Geringere Langzeitnebenwirkungen zeigen hier die atypischen Neuroleptika wie Risperidon und Olanzapin und werden aus diesem Grunde vorgezogen (Bruun und Budmann, 1996; Scahill et al., 2003). Die Therapie sollte mit einer geringen Dosis begonnen werden. Atypische Neuroleptika werden mit dem metabolischen Syndrom in Verbindung gebracht. Fettleibigkeit, Insulinresistenz, Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie sowie Hyperlipoproteinämie können die Folgen sein (Sarafides und Nilsson, 2006). Kleinere Studien wurden mit Aripiprazol durchgeführt, es zeigte sich ein schwächeres Nebenwirkungsprofil (Davies et al., 2006; Seo et al., 2008). Eine kleine Pilotstudie mit Ziprasidon, einem neueren atypischen Neuroleptikum, zeigte effektive Wirkung in Bezug auf die Reduktion der Tics und führte nicht zur ausgeprägten Gewichtszunahme. Ferner zeigt dieses Medikament eine Hemmung der Wiederaufnahme des Serotonins und des Noradrenalins. Der genaue Wirkmechanismus ist noch unbekannt. Es zeigten sich weniger extrapyramidal-motorische Störungen, wie Spätdyskinesien oder Akathisie (Sallee et al., 2000). Eine weitere Option stellt Tetrabenazin dar. Es reduziert die Dopaminausschüttung; ein Risiko für Spätdyskinesien ist bei geringer Dosis kaum vorhanden. Nach Zheng et al. (2006) hemmt Tetrabenazin den vesikulären Monoamin-Transporter (VMAT). Das

Nebenwirkungsprofil umfasst vorrangig Depressionen, aber auch Akathisie, Sedation und in höherer Dosierung Parkinsonismus (Robertson, 2000).

Neben den genannten Therapieoptionen existieren weitere Studien mit unterschiedlichsten D<sub>1</sub>-D<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten wie etwa Pergolid, Levetiracetam (Awaad et al., 2005), Cannabinoiden, Baclofen und Botulinumtoxin, die alle einen positiven Einfluss auf die Ticsymptomatik zeigen, jedoch immer nur eine geringe Patientenzahl einschließen (Singer, 2000).

Eine weitere Option bei ausgeprägter Symptomatik des TS stellt die „Tiefe Hirnstimulation“ dar. Die stimulierenden Elektroden projizieren auf den ventralen oralen thalamischen Kern und zentromedianen parafaszikulären Komplex des Thalamus. Die untersuchten Patienten (Servello et al., 2008) zeigten in der Folge eine Reduktion der Medikation, auch Komorbiditäten wie OCD, Angst und Selbstverletzung erschienen einen Benefit zu erfahren. Nach Servello et al. (2008) manifestierten sich Nebenwirkungen in Form von Schwindel, Flaherty et al. (2005) berichten Stimmungsschwankungen. Ferner wird von Houeto und Mitarbeitern (2005) Gewichtsverlust beschrieben.



## 2. Fragestellung der eigenen molekulargenetischen Untersuchungen

In einer Publikation von Lam et al. (1996) wurde in einem Kollektiv von Tourette-Patienten eine natürlich vorkommende Variante des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors beschrieben. Ein Basenaustausch in der DNA führte zu einem Aminosäureaustausch, in diesem Fall Arginin 219 zu Leucin (R219L). Der Aminosäureaustausch befindet sich in der dritten zytoplasmatischen Schleife, einer Region, die in die Bindung des G-Proteins involviert ist. Mögliche veränderte Bindungseigenschaften im Hinblick auf Rezeptor und Ligand könnten zu einer Änderung der G-Proteinkopplung bzw. des Signaltransduktionsprozesses führen und damit das Wirkprofil eingesetzter pharmakologischer Stoffe beeinflussen. Hierzu erfolgten Untersuchungen durch Brüss et al. (2005), die tatsächlich einen veränderten Signaltransduktionsprozess erkennen ließen.

Da im Hinblick auf die Tourette-Patienten nur ein kleines Kollektiv auf den Polymorphismus untersucht wurde, sollten in dieser Arbeit weitere Proben entsprechender Patienten geprüft werden. Zur Detektion wurde die Quantitative PCR herangezogen. Gleichzeitig sollten gesunde Kontrollen auf den interessierenden Polymorphismus hin untersucht werden, um die Häufigkeit des Auftretens in der Patienten- und Kontrollgruppe miteinander zu vergleichen. Dabei wurde von der Hypothese ausgegangen, dass sich beide Gruppen diesbezüglich unterscheiden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

Im Folgenden werden tabellarisch die Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Arbeitsgeräte dargestellt, die in der Nachweismethode zum Einsatz kamen.

**Tab. 3:** Die verwendeten Arbeitsgeräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Thermocycler	Trio Thermoblock	Biometra
Zentrifuge	5415C	Eppendorf
Wasserbad mit Thermostat	A100	Anfertigung Instituts- werkstatt Lauda
Pipetten	Research (10, 100, 1000 µl, variabel)	Eppendorf
Elektrophoresekammern (horizontal)		Anfertigung Instituts- werkstatt
Geldokumentationssystem umfasst:		MWG Biotech
■ UV/VIS- Leuchttisch	■ TFP-MWL	■ Vilber Lourmat
■ Bildschirm	■ IM400-E	■ Javelin Electronics
■ Kamera	■ KP-M1U	■ Hitachi
■ Thermoprinter	■ P66E	■ Mitsubishi
Netzgerät	3000 V Power Supply	Appligene
Real-Time-PCR-System	Mx 3000P	Stratagene

**Tab. 4:** Die Chemikalien und die verwendeten Verbrauchsmaterialien

<b>Chemikalien und Hersteller</b>		
Agarose für DNA Elektrophorese	Serva	
Borsäure	Merck	
Bromphenolblau	Merck	
EDTA	Merck	
Ethidiumbromid	Boehringer Mannheim GmbH	
Tris	Roth	
<b>Lösungen, Enzyme, Primer, Größenmarker</b>		
Polymerase	Taq DNA Polymerase	Invitrogen
Restriktionsendonukleasen	FspB I	Fermentas
PCR Puffer	Fail Safe PCR Premix G	Epicentre
Größenmarker	Fermentas Gene Ruler	Fermentas
Oligonukleotide		MWG
Oligonukleotide und Sonden für TaqMan SNP Genotyping		Applied Biosystems
Real-Time PCR Puffer	Absolute QPCR Mix	Abgene
<b>Kit</b>		
SpinPrep™ PCR Clean-Up Kit	Novagen	
<b>Verbrauchsmaterialien</b>		
Reaktionsgefäße	SafeLock 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Pipettenspitzen	10, 100, 1000 µl	Sarstedt
PCR-Platten Deckelfolien	0990 Thermo-Fast 96 PCR-plate 1170 Absolute QPCR Seal	Abgene
Filmrolle für Thermoprinter	K65HM	Mitsubishi

### 3.2 Patienten und Kontrollgruppe

Die untersuchten DNA-Proben stammen aus der Kinder- und Jugendpsychiatrie des Universitätsklinikums Marburg und wurden aus Blutproben gewonnen. Im Rahmen einer wissenschaftlichen Zusammenarbeit erfolgte die diagnostische Einordnung der Patienten und Probanden durch den Kinder- und Jugendpsychiater Prof. Dr. med. Johannes Hebebrand. Nach dem Klassifikationssystem der *American Psychiatric Association* wiesen alle Patienten die Diagnose *Tourette's Disorder* (nach DSM IV/Code 307.23) auf. Bei der Kontrollgruppe handelte es sich um gesunde Probanden. Die Studie mit dem Studientitel "Genetische Untersuchung zum Gilles-de-la Tourette-Syndrom" wurde am 24.04.1991 durch die Ethikkommission der Universität Marburg genehmigt (Aktenzeichen 04/1991). Antragsteller war damals Prof. Dr. med. Helmut Remschmidt, Direktor der Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universität Marburg. Alle Studienteilnehmer haben eine Einwilligungserklärung unterschrieben. Die DNA-Isolierung erfolgte im molekulargenetischen Labor des Instituts für Humangenetik der Universität Bonn. Im Rahmen einer wissenschaftlichen Zusammenarbeit unseres Instituts mit dem Institut für Humangenetik der Universität Bonn wurden uns insgesamt 150 DNA-Proben (75 Patienten und 75 Kontrollen) zur Verfügung gestellt. Von den 75 Patientenproben wurden 25 Proben von der Auswertung ausgeschlossen. 16 Proben wurden aufgrund familiärer Zugehörigkeit exkludiert, darüber hinaus acht Proben aufgrund unvollständiger Datenlage, eine Probe aufgrund schlechter DNA-Qualität. Eine Probe der Kontrollgruppe musste aufgrund schlechter DNA-Qualität verworfen werden. Somit wurden 50 DNA-Proben der Patientengruppe und 74 DNA-Proben der Kontrollgruppe in die Analyse einbezogen.

**Tab. 5:** Alter und Geschlecht des Patienten- und Kontrollkollektivs

	Patienten				Kontrollkollektiv			
	Gesamt (n = 50)				Gesamt (n = 74)			
Geschlecht	Männer		Frauen		Männer		Frauen	
	n=43		n = 7		n = 62		n= 12	
Alter in Jahren	MW	SW	MW	SW	MW	SW	MW	SW
	31,30	6,06	42,0	9,45	54,42	11,82	39,2	11,42
Gesamt (Alter)	MW		SW		MW		SW	
	32,80		7,52		52,07		11,62	

MW = Mittelwert, SW = Standardabweichung.

### 3.3 PCR

Die Methode der in-vitro Amplifikation von DNA wurde von K. B. Mullis in Form der Polymerase-Kettenreaktion etabliert (Mullis und Faloona, 1987).

Seither gelang es, genau definierte Sequenzen einer isolierten DNA zu vervielfältigen und diese weiteren Analysen zuzuführen. Katalysiert wird diese Reaktion unter Zuhilfenahme einer DNA-Polymerase.

Man unterscheidet drei Phasen der PCR Reaktion:

#### 1. Denaturierung der DNA

Zunächst werden die beiden komplementären DNA-Stränge voneinander getrennt, bezeichnet als Denaturierung. Dies geschieht bei einer Temperatur von über 90 °C. Die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen werden dabei aufgebrochen, die Stränge liegen nun einzeln vor.

#### 2. Primerhybridisierung („*primer annealing*“)

Im zweiten Schritt kommt es beim Abkühlen des Reaktionsansatzes zur Hybridisierung sequenzspezifischer Oligonukleotide, sogenannter Primer, an komplementäre Abschnitte der DNA. Sie bieten die Ausgangsposition für die DNA-Polymerase. Diese Hybridisierung, auch Primer Annealing genannt, erfolgt bei einer Temperatur von

ca. 60 °C, wobei die exakte Temperatur ca. 7°C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen soll.

### 3. Elongation

Der letzte Schritt beschreibt die Elongation. Hierbei verlängert eine hitzestabile DNA-Polymerase die angelagerten Primer komplementär zum jeweiligen Einzelstrang in 5`-3`-Richtung. Benötigt werden ferner Desoxy-Nukleosidtriphosphate.

Die Elongationstemperatur muss so gewählt werden, dass sie dem Temperaturoptimum der eingesetzten DNA-Polymerase entspricht, dieses liegt etwa bei 72 °C. Die eingesetzte Taq-Polymerase wird aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen.

Der nun neu synthetisierte Doppelstrang dient im nächsten PCR-Zyklus als Template (Matrize). Die PCR Reaktionsabfolge wird zyklisch durchlaufen, wodurch es zur exponentiellen Amplifikation des spezifischen DNA-Abschnitts kommt.

### 3.3.1 Durchführung der PCR

Zur Durchführung der PCR wurde ein Thermocycler der Firma Biometra verwendet. Die DNA wurde in einer Konzentration von je 2,0 ng/ $\mu$ l eingesetzt.

#### Ansatz

- 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 25  $\mu$ l PCR-Puffer
- 1  $\mu$ l Primer sense 200 ng
- 1  $\mu$ l Primer antisense 200 ng
- 2  $\mu$ l Vektor DNA 2,0 ng
- 1  $\mu$ l Taq Polymerase

Der 50  $\mu$ l Reaktionsansatz wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß (0,5 ml) pipettiert und anschließend im Thermocycler amplifiziert.

**Tab. 6:** Die Sequenzen und Schmelztemperaturen der Primer zur Durchführung der PCR des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorgens

	Sequenz	Temperatur (°C)
Primer sense	5`-CTG CAC CTC ATC CAT CTT GCA C-3`	62,1
Primer antisense	5`-CGG TGC ACC TCG ATC ACC TC-3`	63,5

**Tab. 7:** Das Temperaturprogramm der PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
1. Denaturierung	94	5
2. Denaturierung	94	1
3. Annealing	56	1
4. Elongation	72	1

Die Schritte 2-4 wurden 42 x wiederholt.

### *Aufreinigung der PCR Produkte:*

Nach erfolgter PCR muss das amplifizierte Produkt aufgereinigt werden. Dieser Schritt erfolgt, um alle angefallenen Nukleotide, Salze, Primer und die DNA-Polymerase zu entfernen. Diese Produkte könnten in weiteren Reaktionsschritten zu Interferenzen führen. Die Aufreinigung wurde mit Hilfe des SpinPrep™ PCR Clean- Up Kit Novagen nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Aufgereinigt wurden 30 µl des PCR-Produktes. Zunächst wurde der Ansatz mit 120 µl Bindungspuffer vermischt, auf eine Säule mit einem Filter gegeben und eine Minute bei 10.000 Umdrehungen zentrifugiert. Die Produkte werden dabei an die Matrix der Aufreinigungssäule gebunden. Unerwünschte Salze werden ausgewaschen, indem im nächsten Schritt zunächst 400 µl Bindungspuffer zugegeben werden und eine weitere Zentrifugation erfolgt. Dieser Schritt wird mit ethanolhaltigem Waschpuffer wiederholt. Der letzte Schritt umfasst die Zugabe von auf 70 °C erwärmtem Elutionspuffer auf die Säule. Das Gemisch wird für drei Minuten inkubiert und dann erneut zentrifugiert. Die gelöste DNA steht nun weiteren Analyseschritten zur Verfügung.

### *Restriktionsanalyse Prinzip:*

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ist es möglich, die DNA in gewünschte Bruchstücke zu spalten, bei denen die Basensequenzen an den Enden entsprechend der Spezifität der jeweils benutzten Enzyme genau definiert sind. Die Nukleotide werden dabei unter Trennung der Phosphodiesterbindungen enzymatisch gespalten. Es können gerade geschnittene Fragmente („*blunt ends*“) oder Fragmente mit um einige Nukleotide versetztem Schnitt (sogenannte „*sticky ends*“) entstehen. Die häufigsten in der Natur vorkommenden DNA-Polymorphismen sind SNPs (*single nucleotide polymorphisms*). Sie sind durch alternative Nukleotide in einer definierten Basenposition gekennzeichnet. Es wurde das 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorgen untersucht, welches die R219L-Variante kodiert. Der Basenaustausch befindet sich in Position 657. Das Tripletts weist die Basensequenz CTA (für Leucin, Leu) anstelle von CGA (für Arginin, Arg) auf. Die veränderte Basensequenz stellt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Bfal (5`-...CTA G-...3`) dar. Der Wildtyp, der das Tripletts CGA enthält, wird jedoch nicht geschnitten.



### *Durchführung des Restriktionsverdau*

Die amplifizierte und gereinigte DNA wird dem Verdau unter Verwendung des Enzyms Bfal zugeführt. Per Definitionem entspricht eine Einheit des Enzyms genau der Menge, die 1 µg DNA innerhalb einer Stunde bei 37 °C vollständig verdaut. Um die Vollständigkeit des Vorgangs der Verdauung zu gewährleisten, wurden 10 U/µl verwendet. Die Reaktion läuft im Wasserbad ab, welches eine Temperatur von 37 °C hat.

Hinzugefügt wird noch der entsprechende Puffer, der zusammen mit dem Enzym geliefert wurde. Inkubiert wird für 4 Stunden nach folgendem Reaktionsansatz:

- 6 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl Pufferlösung
- 20 µl aufgereinigte PCR-Probe
- 1 µl Restriktionsenzym

### *Agarose Gelelektrophorese Prinzip*

Um die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen, bedient man sich der Agarose-Gelelektrophorese. Das Prinzip beschreibt die Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Nukleinsäuremoleküle besitzen negative Ladungen, sie wandern also zur positiv geladenen Anode. Die Auftrennung nach der Größe beruht auf den Eigenschaften des Agarose-Gels. Sie wird in einer Pufferlösung erhitzt und bildet bei Abkühlung eine Gelmatrix. Kleine Moleküle passieren diese Matrix schneller als große, daher erreicht man mit dieser Methode die Auftrennung nach der Größe.

### *Durchführung*

Die Agarose-Gele wurden hergestellt, indem 1 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer in einem Mikrowellengerät aufgeköcht und anschließend 5 µl Ethidiumbromidlösung hinzugegeben wurde. Bei dem genannten Puffer handelt es sich um TRIS-Borat-EDTA-Puffer als Laufpuffer. Durch die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid, der in die

DNA interkaliert, wird die DNA unter UV-Licht bei 254 nm sichtbar. In eine Gelkammer wurde ein sogenannter Kamm eingelegt, wodurch das ausgehärtete Gel kleine Kammern (Geltaschen) erhielt, die mit der jeweiligen Probe beschickt werden konnten. Die Elektrophoresekammer wurde mit TBE-Puffer gefüllt. Das nach einer Stunde im Kühlschrank ausgehärtete Agarosegel wurde eingesetzt. Im folgenden Schritt wurden die Geltaschen mit je 20 µl der Ansätze und 5 µl Probenpuffer, der Bromphenolblau und Ficoll enthielt, befüllt. Durch die Zugabe von Bromphenolblau ist es möglich, den Wanderungsvorgang der DNA während der Elektrophorese sichtbar darzustellen. Ficoll erhöht die Dichte der DNA-Lösung und verhindert eine Diffusion in den Laufpuffer. Eine Geltasche wurde mit einem Größenmarker befüllt. Bei einer Spannung von 50 mA erfolgte nun der Prozess der gelelektrophoretischen Auftrennung.

### **3.3.2 Auswertung der gelelektrophoretischen Auftrennung**

Nach der Gelelektrophorese zeigte das Gel unter einer UV-Lampe (254 nm) die nach Größe aufgetrennten DNA-Fragmente (siehe Abb. 7, S. 49). Bei der DNA der Mutante sollten durch den Restriktionsverdau Fragmente von 233 bp und 301 bp Größe sichtbar werden. Das Allel A (Wildtyp) sollte hingegen nur eine Bande von 534 bp aufweisen.

### 3.4 Quantitative PCR und TaqMan-Assay

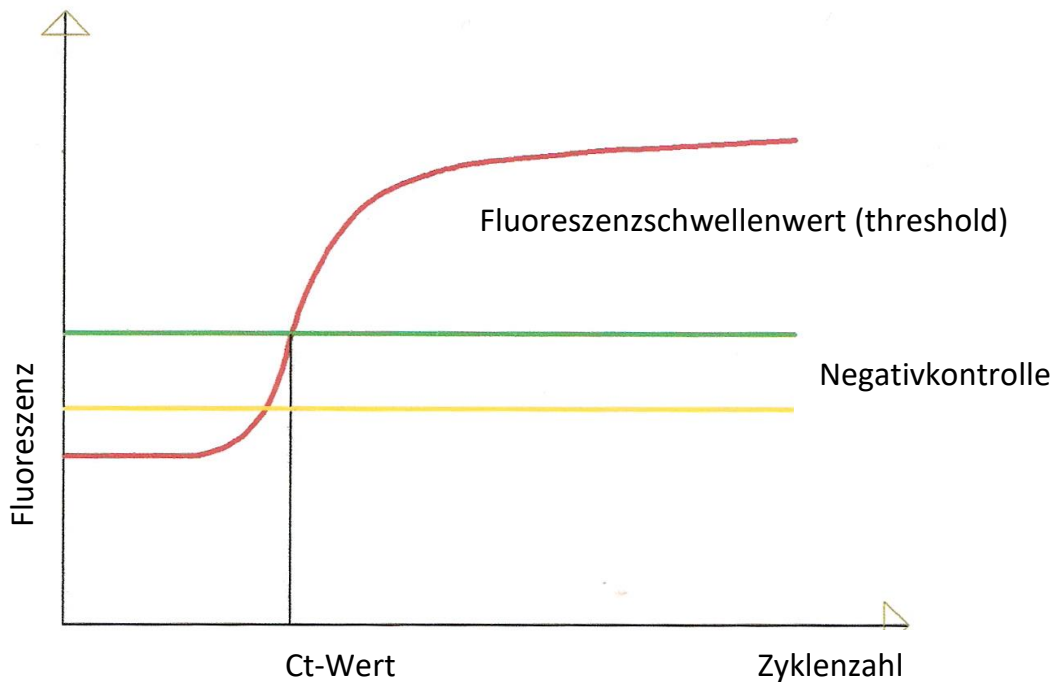
Eine Weiterentwicklung der PCR-Technik ist die quantitative PCR (qPCR), welche die Amplifikation einer spezifischen Nukleinsäuresequenz und die gleichzeitige Detektion des PCR-Produktes durch Fluoreszenzmessung während eines PCR-Zyklus, also in Echtzeit („real-time“), ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgt bei jedem PCR-Zyklus während der exponentiellen Phase der PCR-Reaktion. Zur Detektion des entstandenen PCR-Produktes wird häufig der Cyaninfarbstoff SYBRGreen I verwendet.

Eine Variante dieses Verfahrens ist die sondenbasierte Detektion mit Hilfe von Hydrolyse-Sonden. Diese sogenannten TaqMan-Sonden sind sequenzspezifische Oligonukleotide, die am 5'-Ende einen fluoreszierenden Reporter Farbstoff (z.B. FAM oder VIC) enthalten. Dem Reporter steht am 3'-Ende ein Quencher gegenüber. Bei Anregung der intakten Sonde mit der Exzitationswellenlänge des Reporters wird die Fluoreszenz durch einen Fluoreszenz-Energie-Transfer (FRET) durch den Quencher unterdrückt. Der räumliche Abstand ist hierbei ein wichtiger Aspekt. Die DNA-Polymerase synthetisiert während der Elongationsphase den komplementären Strang und spaltet durch ihre 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die Sonde, wodurch der Reporter freigesetzt und damit die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher aufgehoben wird. Mit jedem PCR-Zyklus und entsprechend der Anreicherung des PCR-Produktes nimmt somit das Fluoreszenzsignal des Reporters zu. In Abb. 6 ist eine qPCR mit dem sigmoiden Anstieg der Stärke des Fluoreszenzsignals mit steigender Zykluszahl schematisch dargestellt. Die Abbildung zeigt auch einen Schwellenwert (threshold) der etwas oberhalb des Hintergrundrauschens einer Negativkontrolle liegt und durch die Software des Gerätes festgelegt wird. Die Zykluszahl, bei welcher die Stärke des Fluoreszenzsignals den Schwellenwert überschreitet, wird als Ct-Wert bezeichnet (Abb. 5). Der Ct-Wert ist umso höher je niedriger die Konzentration der zu amplifizierenden DNA ist. Exponentiell bleibt eine PCR nur bis etwa 30 Zyklen, entsprechend 12 bis 400 Ausgangskopien im Reaktionsansatz. Wenn der ursprüngliche RNA-Gehalt einer Probe nach reverser Transkription durch eine qPCR ermittelt werden soll (was hier nicht der Fall war), dann wird der Ct-Wert der Probe mit dem Ct-Wert für ein mitgeführtes Referenzgen („house-keeping gene“) in Beziehung gesetzt (Übersicht, siehe Holzapfel und Wickert 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode des TaqMan-Assays zur qualitativen Detektion der R219L-Variante und des Wildtyps des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorgens eingesetzt. Um eine Allel-Differenzierung zu erhalten, wurden zwei Allel-spezifische Sonden mit verschiedenen fluoreszierenden Reporter-Farbstoffen benutzt. Die Sonde für die Variante war an ihrem 5`-Ende mit dem grün leuchtenden Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxyfluorescein) markiert, die des Wildtyps mit dem rot leuchtenden Fluoreszenzfarbstoff VIC (siehe Tabelle 10, S. 47). Die Spezifität des Assays wird durch Einfügung eines MBG-Moleküls am 3`-Ende der Sonde erhöht. MBG (ein so genannter „minor groove binder“) lagert sich in die kleine Furche der DNA ein. Des Weiteren enthält der Assay den fluoreszierenden Referenzfarbstoff ROX. Tabelle 8 zeigt die für die Messung der Fluoreszenzfarbstoffe gewählten Anregungs- und Emissions-Wellenlängen.

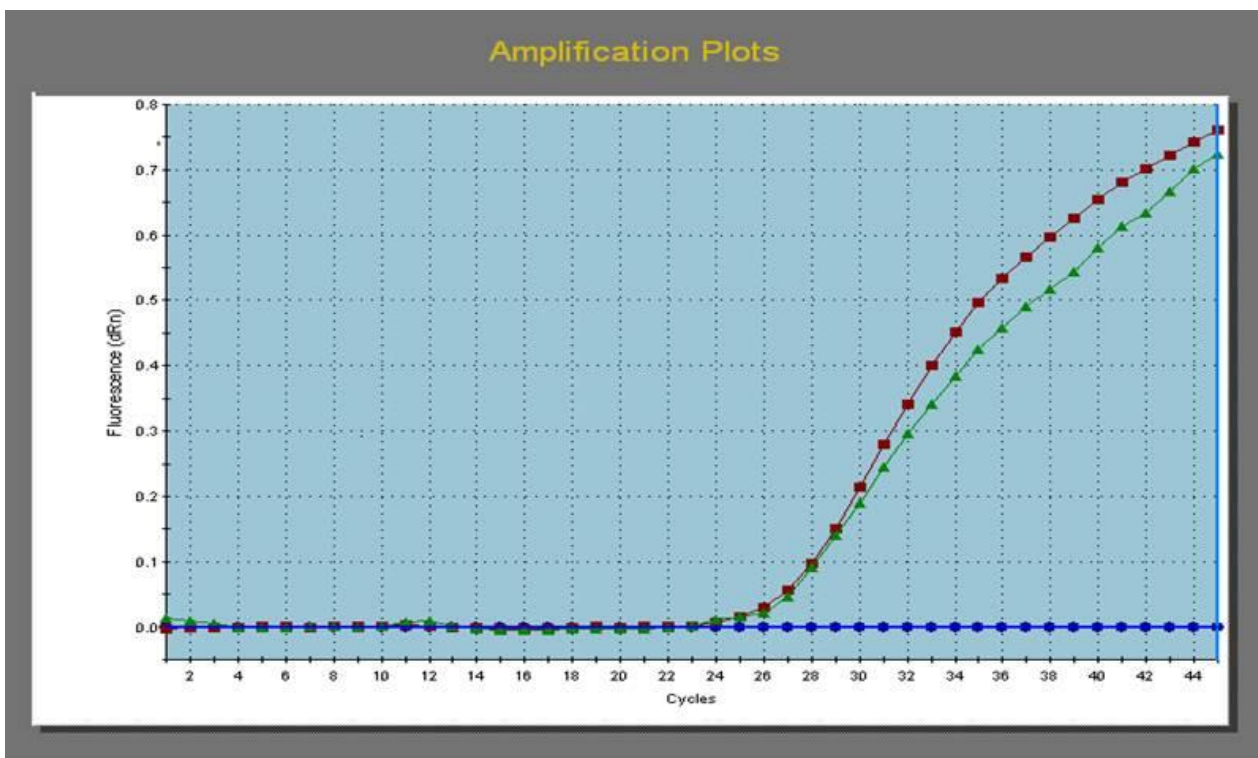
**Tab. 8:** Die Anregungs- und Emissionswellenlängen der gewählten Filterkombinationen (Gerät: Mx 3000 P, Stratagene) zur Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Anregung (nm)	Emission (nm)
VIC	535	555
ROX	585	610
FAM	492	516



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Zunahme des Fluoreszenzsignals mit ansteigender Zyklenzahl bei einer qPCR (Erklärung, siehe Text zuvor)

Nach Anlagerung der Sonde gibt die messbare Fluoreszenz Auskunft, ob es sich in der Probe um die Variante oder den Wildtyp handelt. Mittels vorhandener cDNAs des Wildtyps und der Mutante wurde eine artifizielle „heterozygote“ Probe erstellt und im TaqMan-Assay vermessen. Abbildung 6 zeigt die Fluoreszenzzunahme für beide Allele (Wildtyp und Variante) mit Zunahme der qPCR-Zyklen. Dieses Beispiel belegt eindeutig, dass die qPCR mit den gewählten TaqMan-Sonden einwandfrei funktioniert und dass die beiden Allele nebeneinander klar und problemlos zu bestimmen sind. Mit diesem TaqMan-Assay wurden die 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Allele aller DNA-Proben vermessen.



**Abb. 6:** Ein typisches Beispiel für die Vermessung einer DNA-Probe mittels qPCR (TaqMan-Assay) unter Verwendung der spezifischen TaqMan-Sonden für Wildtyp und Variante des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorgens. Die DNA-Probe wurde hier mit einer Mischung der cDNA von Wildtyp und der cDNA der Variante des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors als artifizielle „heterozygote“ Probe hergestellt. Die blauen Symbole zeigen die Schwellenwerte an, Die rote Kurve zeigt die Fluoreszenzwerte (dRn) des Wildtyps, die grüne Kurve die der Variante an. Das Beispiel zeigt sehr klar, dass der TaqMan-Assay mit den spezifischen Sonden einwandfrei funktioniert.

### Durchführung der quantitativen PCR

Das Gerät Mx 3000P der Firma Stratagene diente zur Durchführung des TaqMan Assays. Die Auswertung erfolgte mit der Mx Pro-Software von Stratagene.

Reaktionsansatz:

- Template DNA            1,00 µl (60 ng)
- Primermix                0,25 µl (je Primer 300 nM)
- QPCR Mastermix        5,00 µl
- H<sub>2</sub>O                      3,75 µl

Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes belief sich auf 10 µl, es wurde in eine 96-Well-Mikroterplatte pipettiert und mit dazugehörigen Abdeckfolien verschlossen. Auf jeder Platte wurden NTC's (*no template controls*), interne Positivkontrollen (Variante) und Negativkontrollen (Wildtyp) mitgeführt. Das Temperaturprogramm findet sich in Tabelle 10.

**Tab. 9:** Das Temperaturprogramm des TaqMan Assays (qPCR)

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Minuten
1. Initiale Denaturierung	95	15
2. Denaturierung	95	0,5
3. Annealing	63	0,5
4. Elongation	72	0,5

Die Schritte 2 bis 4 wurden 44 x wiederholt.

**Tab.10:** Die Sequenzen der Primer und der TaqMan-Sonden für die qPCR

Primer-Typ	Sequenz
TaqMan-Sonde 1 (für Wildtyp)	-VIC-CGC AGC TCG GAA TA-NFQ-
TaqMan-Sonde 2 (für Variante)	-FAM-CGC AGC TAG GAA TA-NFQ-
Primer sense	TGC TCA TGC TGG TTC TCT ATG G
Primer antisense	TCT CCA CCT TTT TGA CCG TCT TG

### **3.4.1 Statistik**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Exakten Tests nach Fisher unter der Verwendung des Computerprogramms GraphPad Prism 4.0. Der Exakte Test nach Fisher wird bei ähnlichen Fragestellungen wie der Chi-Quadrat-Test eingesetzt, liefert jedoch auch bei kleineren Fallzahlen zuverlässige Resultate. Er wurde benutzt, um die Genotypverteilung zwischen Erkrankten und Kontrollen zu vergleichen. Als statistisch relevantes Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von  $< 0,05$  angenommen.





#### **4.2 Genotypisierung der DNA-Proben von Patienten und Kontrollen mittels fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide (TaqMan-Sonden)**

Als zweite Methode wurde eine qPCR zum Nachweis des Rezeptorpolymorphismus angewendet. Hierzu wurden TaqMan-Sonden eingesetzt, die entweder mit dem rot fluoreszierenden Farbstoff VIC (Wildtyp) oder dem grün fluoreszierenden Farbstoff FAM (Variante) markiert waren. Durch die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale war es möglich die amplifizierten DNA-Proben eindeutig einem Genotyp zuzuordnen.

Die Auswertung der PCR-Kurven konnte mittels der gemessenen Fluoreszenz bzw. anhand der ermittelten Ct-Werte erfolgen. Die Differenz der normalisierten Fluoreszenz im als letzten festgelegten PCR-Zyklus (PCR-Zyklus 35 in unseren Untersuchungen) und der anfänglich normalisierten Fluoreszenz, ergaben die Fluoreszenzwerte, die zur Auswertung gewählt wurden. Der Begriff „normalisiert“ bedeutet in diesem Zusammenhang, dass die Fluoreszenzwerte um die Basislinie und die gemessenen Werte für den Referenzfarbstoff ROX korrigiert wurden. Um unspezifische Anlagerungen der TaqMan-Sonden nicht mit in die Daten einzubeziehen, wurde der PCR-Zyklus 35 als letzter Zyklus festgelegt. Die FAM-markierte Sonde (für die Variante) generierte etwa gleich gute Fluoreszenzsignale wie die VIC-markierte Sonde (für den Wildtyp). Wie aus Abb. 6 (S. 46) ersichtlich ist, ergaben positive Proben für die FAM-Sonde Fluoreszenzwerte (dRn) zwischen 0,7 und 0,8 und positive Proben für die VIC-Sonde solche zwischen 0,7 und 0,9. Bei negativen Proben lagen die Werte unter den gesetzten Schwellenwerten. Der TaqMan-Assay mit den gewählten Sonden konnte somit klar und eindeutig die beiden Rezeptor-Allele erfassen und differenzieren.

Wie die Tabellen 11 und 12 zeigen, wurden bei den DNA-Proben sowohl der Kontrollgruppe als auch der Patientengruppe nur für den Wildtyp 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor Fluoreszenzsignale detektiert. In keiner Probe wurde ein Hinweis auf das Vorkommen der R219L-Rezeptorvariante gefunden.

**Tab.11:** Mittelwerte (und Standardabweichungen) der Stärke des Fluoreszenzsignals (dRn Last) bei der qPCR der DNA-Proben der Patienten und Kontrollen

dRn Last	Patientengruppe		Kontrollgruppe	
	R219L Variante Polymorphismus 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor (n=0)	Wildtyp 5-HT <sub>1A</sub> - Rezeptor (n=50)	R219L Variante Polymorphismus 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptor (n=0)	Wildtyp 5-HT <sub>1A</sub> - Rezeptor (n=74)
dRn Last	0,0	0,623	0,0	0,643
VIC		(0,041)		(0,042)
dRn Last	0,0	0,013	0,0	0,011
FAM		(0,013)		(0,014)

Die Auswertung konnte auch anhand der ermittelten Ct-Werte erfolgen. Eine Probe war positiv, wenn sie Ct-Werte für das Fluoreszenzsignal zwischen 23 und 29 aufwies, wie dies bei den DNA-Proben für den Wildtyp der Fall war. War bis zum PCR-Zyklus 40 hingegen kein über dem Hintergrund liegendes Fluoreszenzsignal messbar, so war die Probe negativ, d.h. das Allel war nicht nachweisbar, wie hier für die DNA der Variante (siehe Tab: 12).

**Tab. 12:** Mittelwerte (und Standardabweichungen) der Ct-Werte für die Fluoreszenzsignale bei der qPCR der DNA-Proben der Patienten und Kontrollen

Ct-Wert	Patientengruppe		Kontrollgruppe	
	R219L- Variante des 5-HT <sub>1A</sub> - Rezeptors	5-HT <sub>1A</sub> - Re- zeptor Wildtyp (n=50)	R219L- Variante des 5-HT <sub>1A</sub> - Rezeptors	5-HT <sub>1A</sub> - Re- zeptor Wildtyp (n=74)
Ct-Wert	> 40	25,611	> 40	25,434
VIC		(1,054)		(0,595)
Ct-Wert	> 40	> 40	> 40	> 40
FAM				

## 5. Diskussion

In einer vorausgehenden Arbeit von Lam et al. (1996) wurde die R219L-Variante des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors bei einem Patienten, der an dem Gilles de la Tourette-Syndrom litt, gefunden. Die Position der veränderten Aminosäure befindet sich in der dritten intrazellulären Schleife des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors zwischen der Transmembrandomäne 5 und 6, einer Region, die in die G-Protein-Kopplung involviert ist. Es erfolgten daher funktionelle Untersuchungen der Variante. Die funktionelle Analyse der R219L-Variante bei Lam et al. (1996) und Del Tredici et al. (2004) wurde mittels R-SAT (*Receptor Selection and Amplification Technology*) Assay durchgeführt, einem Hochdurchsatz Assay basierend auf Proliferation/Transformation von transfizierten Zellen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen Variante und Wildtyp in diesem Assay. Allerdings induzieren G<sub>q</sub>-gekoppelte G-Protein-gekoppelte Rezeptoren originär die Transformation der Fibroblasten im R-SAT Assay (Smit et al. 2002). Der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor vermittelt seine Effekte in vivo jedoch über G<sub>i</sub>-Kopplung. In einer Studie von Brüss et al. (2005) erfolgte daher eine differenzierte pharmakologische Charakterisierung der R219L-Variante im Vergleich zum Wildtyp. Dabei wurde die Rezeptorligandbindung, die G-Protein-Kopplung sowie die Agonist-induzierte Inhibition der cAMP-Bildung untersucht (Brüss et al. 2005). Für die Studie wurden stabil oder transient mit der Variante oder dem Wildtyp des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors transfizierte HEK293-Zellen (humane, embryonale Nierenstammzellen) eingesetzt. Sättigungsexperimente zur Radio-ligandbindung von [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Variante. Die pIC<sub>50</sub> Werte der Inhibition der spezifischen [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT-Bindung durch die 5-HT-Agonisten 5-HT, Roxindol, 8-OH-DPAT, Buspiron, Uradipil und die 5-HT-Antagonisten Methiothepin, Spiperon und WAY100135 waren bei Variante und Wildtyp nahezu identisch (Brüss et al. 2005). Der pIC<sub>50</sub>-Wert ist der negative Logarithmus der Agonistenkonzentration, der eine 50 %ige Hemmung eines Kompetitors hervorruft.

Untersuchungen zur G-Protein-Kopplung mittels [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung ergaben keine messbare Stimulation der [<sup>35</sup>S]GTPγS Bindung durch 5-HT bei der R219L-Variante (Brüss et al. 2005). Die maximale Inhibition der Forskolin-stimulierten cAMP Akkumulation durch 5-HT, Buspiron und Uradipil betrug beim Wildtyp 72 - 85 % während die Inhibition bei der R219L-Variante mit 17 - 39 % signifikant geringer war (Brüss et al. 2005).

Die R219L-Variante des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors weist somit im Vergleich zum Wildtyp keine veränderten Ligandbindungseigenschaften auf, zeigt aber eine starke Beeinträchtigung der Signaltransduktion über G<sub>i</sub>-Kopplung.

Mögliche funktionelle und klinisch relevante Konsequenzen beim Vorliegen der R219L-Variante wären beispielsweise ein vermindertes oder fehlendes Ansprechen auf Medikamente, die über den 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor wirken, z. B. das Antihypertensivum Urapidil (5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptoragonist und  $\alpha_2$ -Adrenozeptorantagonist) oder das Anxiolytikum Buspiron (5-HT<sub>1A</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptoragonist). Buspiron wurde bereits zur Behandlung der Tic-Symptomatik bei Tourette-Syndrom-Patienten eingesetzt (Dursun et al. 1995; Termine et al. 2013).

In der Studie von Lam et al. (1996) trat die R219L-Variante in einem Kollektiv von 56 Tourette-Syndrom-Patienten, 27 Alkoholkranken, zwei Depressiven und 20 gesunden Kontrollpersonen einmal bei einem Tourette-Syndrom-Patienten auf. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu prüfen, ob bei 75 DNA-Proben von Tourette-Patienten die R219L-Variante häufiger auftaucht als bei 75 DNA-Proben von gesunden Kontrollpersonen. Die untersuchten Proben stammen alle aus der Kinder- und Jugendpsychiatrie der Uniklinik Marburg. Alle Probanden haben die DSM IV Diagnose 307.23 *Tourette`s Disorder*. Nach Qualitätskontrolle wurden insgesamt 50 Patientenproben und 74 Proben von gesunden Kontrollpersonen analysiert.

Zunächst versuchten wir mittels Amplifizierung des entsprechenden Genabschnitts mit PCR und anschließendem Restriktionsverdau mit dem Enzym Bfal die R219L-Variante und den Wildtyp in den Proben nachzuweisen. Trotz Aufreinigung der PCR-Proben blieb die Restriktionsreaktion unvollständig; es konnte keine klare Trennung der Fragmente erzielt werden. Daher wurde die Methode verlassen. Die weiteren Untersuchungen erfolgten mittels TaqMan-Sonden und qPCR (TaqMan-Assay). Hierbei verwendet man zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Sonden, wobei sich eine spezifisch an den Wildtyp, die andere spezifisch an die Variante anlagert. Weder in den DNA-Proben der Tourette-Patienten noch in denen der Kontrollen konnte die 5-HT<sub>1A</sub>-Variante (CGA<sub>657</sub>→CTA; Arg219Leu, R219L) gefunden werden. Dies ist auf keinen Fall auf ein Versagen der Methode zurückzuführen, da die gewählten TaqMan-Sonden mit vergleichbarer Sensitivität sowohl den Wildtyp als auch die Variante detektierten (siehe

Abb. 6). Der fehlende Nachweis der Variante beruht offensichtlich auf deren Seltenheit. Bereits in der Studie von Lam et al. (1996) zeigte sich, dass die R219L-Variante offensichtlich relativ selten ist, da sie nur in einer von 105 DNA-Proben von 56 Tourette-Patienten, 27 Alkoholiker, 2 Patienten mit einer Depression und 20 Kontrollen gefunden wurde. In der vorliegenden Untersuchung standen uns 75 DNA-Proben von Tourette-Patienten und 75 von Kontrollen zur Verfügung. Das waren deutlich mehr DNA-Proben als bei Lam et al (1996). Unser DNA-Probenumfang war zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit (im Februar 2004) die größte Sammlung an DNA-Proben von Tourette-Patienten, die in Deutschland verfügbar war. Ein DNA-Probenumfang in dieser Größenordnung wurde damals sehr häufig für Untersuchungen über das Vorkommen von Gen-Varianten und zur Klärung, ob diese häufiger bei einer bestimmten Erkrankung vorkommt als in Kontrollen, eingesetzt. Nachfolgend sollen nur einige Beispiele genannt werden. Bei einem systematischen Screening der kodierenden Region des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorgens auf Mutationen wurden DNA-Proben von 43 Tourette-Patienten, 25 gesunden Kontrollen, 45 Schizophrenie-Patienten und 46 Patienten mit bipolaren Störungen untersucht (Erdmann et al., 1995), wobei nur eine I28V-Variante aber nicht die R219L-Variante des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors gefunden wurde. Zur Überprüfung, ob bei Tourette-Patienten Mutationen im Noradrenalintransporter-Gen häufiger vorkommen als bei Kontrollen wurden DNA-Proben von 43 Patienten und 46 Kontrollen eingesetzt (Stöber et al., 1999). In einer Studie über eine Assoziation von Mutationen im CB<sub>1</sub>-Cannabinoidrezeptorgen mit dem Tourette-Syndrom wurden von Gadzicki et al. (2004) DNA-Proben von nur 40 Tourette-Patienten und nur 81 gesunden Kontrollen untersucht. Heutzutage würden für derartige Untersuchungen sehr viel mehr DNA-Proben eingesetzt werden, auch weil heute viel größere Sammlungen von entsprechenden DNA-Proben verfügbar sind.

Über die Häufigkeit der R219L-Variante des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors lagen bis zur Beendigung der experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation (2007) keine Kenntnisse vor. In einem Review über 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptor-Genvarianten und psychiatrische Erkrankungen berichten Drago et al. (2008), dass von der R219L-Variante keine Allelfrequenz-Daten in der Allgemeinbevölkerung bekannt sind. Eine Überprüfung (am 15.10.2016) der Häufigkeit der Allelfrequenz der 5-HT<sub>1A</sub>-R219L-Variante in der dbSNP-Datenbank ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1800044](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1800044)) zeigte, dass die

„minor allele frequency“ (MAF) für den zugrundeliegenden SNP (rs 1800044) mit einem Wert von 0,00361 extrem niedrig ist; einen ähnlich niedrigen MAF-Wert (0,00382) findet man in der gnomad-Datenbank (<https://gnomad.broadinstitute.org/variant/5-63256888-C-A>). Von einer solch niedrigen Allel-Frequenz konnte man bei Beginn der vorliegenden Arbeit nicht ausgehen. Mit dem heutigen Wissen über diese sehr niedrige MAF würde man eine solche Studie mit insgesamt nur 150 DNA-Proben nicht mehr durchführen. Die extrem niedrige Allelfrequenz des 5-HT<sub>1A</sub>-SNPs erklärt die Negativbefunde von Erdmann et al. (1995; siehe oben) und auch unseren Negativbefund. Unsere Ergebnisse sind vereinbar mit der Vorstellung, dass die Rezeptorvariante bei Tourette-Patienten nicht häufiger vorkommt als bei gesunden Kontrollen. Unsere Befunde, zusammen mit den zuvor genannten Befunden aus der Literatur und aus Datenbanken sprechen auch gegen die von Lam et al. (1996) angedeutete Assoziation von Tourette-Erkrankung mit der Expression der 5-HT<sub>1A</sub>-R219L-Rezeptorvariante. Auch eine Studie von Brett et al. (1995) spricht dafür, dass Variationen/Mutationen im 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorgen keine Rolle bei der Ätiologie des Tourette-Syndroms spielen. In einer Linkage-Analyse an 116 Mitgliedern aus einem Stammbaum, darunter 29 Mitglieder mit einem diagnostizierten Tourette-Syndrom, 20 mit multiplen Tics und 5 mit Zwangsstörungen, konnten Brett et al. (1995) keinen Beleg für die Hypothese finden, dass eine genetische Variation im 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorgen eine erhöhte Suszeptibilität für das Tourette-Syndrom und chronisch multiple Tics verursacht.

Vermutlich dürfte jedoch das 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorgen und seine Variante eine eher untergeordnete Rolle bei der Pathogenese des Tourette-Syndroms spielen. In der Literatur finden sich bei einer Pubmed-Suche mit den Stichworten „Tourette“ und „5-HT<sub>1A</sub>“ keine weiteren Originalarbeiten (außer den oben erwähnten 3 Publikationen von Lam et al. (1996), Erdmann et al. (1995) und Brett et al. (1995)), die sich mit einer potentiellen Assoziation der Erkrankung mit der Expression der 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptorvariante beschäftigen. Es besteht offensichtlich eine genetische Heterogenität für das Tourette-Syndrom. Die meisten Studien zur Genese des Tourette-Syndroms bezogen sich auf Gene, die mit Neurotransmittern im Zusammenhang stehen. Diese Kandidatengen-Studien basierten auf Befunden von Hirnuntersuchungen (post mortem), dem Wirkmechanismus der therapeutisch verwendeten Psychopharmaka, pathophysiologischen Studien oder genetischen Linkage-Studien. Als Kandidatengene wurden die Gene im Neurotransmitter-

Pathway von Dopamin, Serotonin, Glutamat und Histamin untersucht, insbesondere die an der Synthese oder dem Abbau beteiligten Enzyme (z.B. Tryptophanhydroxylase-2 oder COMT), Rezeptoren (z.B. Dopamin-D<sub>2</sub>, -D<sub>3</sub>, -D<sub>4</sub> oder 5-HT<sub>2C</sub>) oder Transporter (z.B. Dopamintransporter DAT1). Hierzu und zu genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) gibt es einige neuere Übersichtsartikel, z.B. von Diaz-Anzaldúa et al (2004), Paschou (2013) oder Felling und Singer (2011). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird in jüngster Zeit auch einer gestörten Funktion des H<sub>3</sub>-Histaminrezeptors eine pathophysiologische Rolle zugeschrieben (Rapanelli, 2017; Rapanelli und Pittenger, 2016). Die meist zu geringe Anzahl untersuchter DNA-Proben und die häufige Nichtreproduzierbarkeit früherer Resultate gab den Anlass für eine kürzlich publizierte internationale Gemeinschaftsstudie 14 wissenschaftlicher Institute, in welcher oben genannte genetische Varianten bei einer Kohorte von 465 Probanden mit einer chronischen Tic-Erkrankung (93% davon mit Tourette-Syndrom) untersucht wurden (Abdulkadir et al. 2018). In dieser Studie wurde kein überzeugender Beleg für die bisher postulierten genetischen Polymorphismen gefunden. Dies spricht dafür, dass die Ätiologie des Tourette-Syndroms sehr komplex polygenetisch ist und hierbei auch seltene vererbte oder de-novo Mutationen und auch nicht-genetische Faktoren (z.B. immunologische) eine Rolle spielen dürften (Robertson et al., 2017). Diese Ansicht wird auch durch eine kürzlich von 82 Autoren publizierte, sehr große genomweite Assoziationsstudie (GWAS) zu Tourette bestärkt (Yu et al., 2019). Diese Studie wurde an 4819 Tourette-Patienten und 9488 Kontrollen durchgeführt. Obwohl dies die größte Tourette-Syndrom GWAS ist, die bisher weltweit durchgeführt wurde, ist nach Meinung der Autoren die Anzahl von weniger als 5000 Patienten immer noch nicht ausreichend um definitiv Tourette-Suszeptibilitäts-Varianten zu identifizieren; die 5-HT<sub>1A</sub>-R219L-Rezeptorvariante wird in dieser Arbeit nicht erwähnt.



## 6. Zusammenfassung

Nach einleitender Beschreibung des komplexen Serotoninsystems und der Beschreibung allgemein klinischer Aspekte des Tourette-Syndroms wird in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob in DNA-Proben von Tourette-Syndrom-Patienten (Diagnose DSM IV/No. Code 30723 *Tourette's Disorder*) der Uniklinik Marburg eine Serotoninrezeptor-Variante häufiger vorkommt als in Proben einer gesunden Kontrollgruppe. Hierbei wurde auf das Vorliegen des Basenaustauschs (SNP) CGA<sub>657</sub>→CTA in der DNA-Probe getestet, der zum Austausch der Aminosäure Arginin gegen Leucin in Position 219 und damit zur R219L-Variante des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors führt. In einer Studie von Lam et al. (1996) war diese Variante des Rezeptorgens in einem Kollektiv von 56 Tourette-Syndrom-Patienten bei einem Patienten gefunden worden. Der Aminosäureaustausch in der R219L-Variante des 5-HT<sub>1A</sub>-Rezeptors befindet sich in einer Region des Rezeptors, die unmittelbar in die G-Protein-Kopplung involviert ist.

Das Vorkommen der Variante könnte also zu veränderten Eigenschaften des Rezeptors führen, die funktionelle und klinische Relevanz nach sich ziehen könnten. Tatsächlich konnte in einer Studie von Brüss et al. (2005) eine starke Beeinträchtigung der Signaltransduktion über G<sub>i</sub>-Protein-Kopplung durch die R219L-Variante nachgewiesen werden. Für die Untersuchung standen DNA-Proben aus einem Kollektiv von 75 Tourette-Syndrom-Patienten und 75 gesunden Kontrollpersonen zur Verfügung.

Die Genotypisierung erfolgte mittels der quantitativen PCR-Methode (qPCR). Für Wildtyp und Variante wurden hierbei TaqMan-Sonden (Oligonukleotide) eingesetzt, die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren und welche sehr Sequenzspezifisch entweder mit der DNA des Wildtyps oder der Variante hybridisieren. Die Funktionstüchtigkeit dieses TaqMan-Assays konnte mit cDNA-Proben von Wildtyp und Variante einwandfrei nachgewiesen werden.

Weder in den DNA-Proben der Tourette-Patienten noch in denen der Kontrollgruppe konnte der gesuchte Polymorphismus nachgewiesen werden. Dieser Negativbefund spricht, zusammen mit Befunden aus der Literatur, für einen sehr seltenen Polymorphismus. Die „minor allele frequency“ (MAF) der 5-HT<sub>1A</sub>-Variante, die bis zum Abschluss

des experimentellen Teils dieser Arbeit nicht bekannt war, belegt mit einem MAF-Wert  $<0,004$  eindeutig das extrem seltene Vorkommen dieser Variante.

## 7. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Biosynthese von 5- Hydroxytryptamin (Serotonin) .....	12
Abb. 2: Abbau von 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) .....	13
Abb. 3: Schematische Darstellung des humanen 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptors.....	19
Abb. 4: Dynamik des Dopamins und des Serotonins bei Patienten mit TS und OCD sowie bei Patienten mit TS ohne OCD .....	30
Abb. 5: Schematische Darstellung der Zunahme des Fluoreszenzsignals mit ansteigender Zyklenzahl bei einer qPCR .....	45
Abb. 6: Ein typisches Beispiel für die Vermessung einer DNA-Probe mittels qPCR (TaqMan-Assay) unter Verwendung der spezifischen TaqMan-Sonden für Wildtyp und Variante des 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptorgens .....	46
Abb. 7: Ergebnis der Gelelektrophorese nach dem Restriktionsverdau .....	49

## 8. Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1: Einfache und komplexe Tics, die bei Tourette-Patienten vorkommen.....	25
Tab. 2: Komorbiditäten und deren Häufigkeit bei TS.....	27
Tab. 3: Die verwendeten Arbeitsgeräte .....	34
Tab. 4: Die Chemikalien und die verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	35
Tab. 5: Alter und Geschlecht des Patienten- und Kontrollkollektivs .....	37
Tab. 6: Die Sequenzen und Schmelztemperaturen der Primer zur Durchführung der PCR des 5-HT <sub>1A</sub> -Rezeptorgens.....	39
Tab. 7: Das Temperaturprogramm der PCR .....	39
Tab. 8: Die Anregungs- und Emissionswellenlängen der gewählten Filterkombinationen (Gerät: Mx 3000 P, Stratagene) zur Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe .....	44
Tab. 9: Das Temperaturprogramm des TaqMan Assays (qPCR) .....	47
Tab. 10: Die Sequenzen der Primer und der TaqMan-Sonden für die qPCR.....	47
Tab. 11: Mittelwerte (und Standardabweichungen) der Stärke des Fluoreszenzsignals (dRn Last) bei der qPCR der DNA-Proben der Patienten und Kontrollen .....	51
Tab. 12: Mittelwerte (und Standardabweichungen) der Ct-Werte für die Fluoreszenzsignale bei der qPCR der DNA-Proben der Patienten und Kontrollen .....	51

## 9. Literaturverzeichnis

Abdulkadir M, Londono D, Gordon D, Fernandez TV, Brown LW, Cheon K-A, Coffey BJ, Elzerman L, Fremer C, Fründt O, Garcia-Delgar B, Gilbert DL, Grice DE, Hedderly T, Heyman I, Hong HJ, Huyser C, Ibanez-Gomez L, Jakubovski E, Kim YK, Kim YS, Koh Y-J, Kook S, Kuperman S, Leventhal B, Ludolph AG, Madruga-Garrido M, Maras A, Mir P, Astrid Morer A, Müller-Vahl K, Münchau A, Murphy TL, Plessen KJ, Roessner V, Shin E-Y, Song D-H, Song J, Tübing J, van den Ban E, Visscher F, Wanderer S, Woods M, Zinner SH, King RA, Tischfield JA, Heiman GA, Hoekstra PJ, Dietrich A. Investigation of previously implicated genetic variants in chronic tic disorders: a transmission disequilibrium test approach. *Eur Arch Psychiatry* 2018; 268: 301-316

Awaad Y, Michon AM, Minarik S. Use of levetiracetam to treat tics in children and adolescents with Tourette's syndrome. *Mov Disord* 2005; 20: 714-718

Banaschewski T, Woerner W, Rothenberger A. Premonitory sensory phenomena and suppressibility of tics in Tourette syndrome: developmental aspects in children and adolescents. *Dev Med Child Neurol* 2003; 45: 700-703

Barnes MN, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999; 38: 1083-1152

Baou M, Boumba VA, Petrikis P, Rallis G, Vougiouklakis T, Mavreas V. A review of genetic alterations in the serotonin pathway and their correlation with psychotic diseases and response to atypical antipsychotics. *Schizophr Res* 2015; 170: 18-29

Baumgarten HG, Göthert M. Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. *Handbook of experimental Pharmacology*. Berlin – Heidelberg – New York: Springer, 1997; 129: 1-750

Bockaert J, Claeysen S, Compan V, Dumuis A. 5-HT<sub>4</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2004; 3: 39–51

Bockaert J, Claeysen S, Becamel C, Dumuis A, Marin P. Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. *Cell Tissue Res* 2006; 326: 553-572

Boddeke HWGM, Fargin A, Raymond JP, Schoeffer P, Hoyer D. Agonist/Antagonist interactions with cloned human 5-HT<sub>1A</sub> receptors: variations in intrinsic activity studied in transfected HeLa cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1992; 345: 257-263

Bortolato M, Pivac N, Muck Seler D, Nicolac Perkovic M, Pessia M, Di Giovanni G. The role of the serotonergic system at the interface of aggression and suicide. *Neuroscience* 2013; 236: 160-185

Brett PM, Curtis D, Robertson MM, . Gurling HMD. Exclusion of the 5-HT<sub>1A</sub> serotonin neuroreceptor and tryptophan oxygenase genes in a large British kindred multiply affected with Tourette's Syndrome, chronic motor Tics, and obsessive-compulsive behavior. *Am J Psychiatry* 1995; 152: 437-440

Brüss M, Kostanian A, Bönisch H, Göthert M. The naturally occurring Arg219Leu variant of the human 5-HT<sub>1A</sub> receptor: Impairment of signal transduction. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 257-264

Bruun RD, Budmann CL. Risperidone as a treatment for Tourette's syndrome. *J Clin Psych* 1996; 57: 29-31

Brunner D, Hen R. Insights into the neurology of impulsive behavior from serotonin receptor knockout mice. *Ann NY Acad Sci* 1997; 836: 81-105

Burnet PWJ, Eastwood SL, Lacy K, Harrison PJ. The distribution of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA in human brain. *Brain Res* 1995; 676: 157-168

Buzard JA, Nytch PD. Some characteristics if rat kidney 5-hydroxytryptophan decarboxylase. *J Biol Chem* 1957; 210: 139

Chanda PK, Minchin MCW, Davis AR, Greenberg L, Reilly Y, McGregor WH, Bhat R, Lubeck MD, Mizutani S, Hung PP. Identification of residues important for ligand binding to the human 5- hydroxytryptamine <sub>1A</sub> serotonin receptor. *Mol Pharmacol* 1993; 43: 516-520

Chen NH, Reith ME, Monoamine interactions measured by microdialysis in the ventral tegmental area of rats treated systemically with (+/-)-8hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *J Neurochem* 1995; 64:1585-1597

Clark CT, Weissbach H, Udenfried S. 5-hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties. *J Biol Chem* 1954; 210: 139

Civelli O, Bunzo JR, Grandy DK. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 32: 281 – 307

Cooper JR, Melcer I. The enzymic oxidation of tryptophan to 5-hydroxytryptophan in the biosynthesis of serotonin. *J Pharm Eptl Therap* 1961; 132: 265-268

Cross C, Zhuang XX, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, Santarelli L, Beck S, Hen R. Serotonin<sub>1A</sub> receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 2002; 416: 396-400

Davies L, Stern JS, Agrawal N, Robertson MM. A case series of patients with Tourette's syndrome in the United Kingdom treated with aripiprazole. *Hum Psychopharmacol* 2006; 21: 447-453

Del Tredici A:L, Schiffer HH, Burstein ES, Lameh J, Mohell N, Hacksell U, Brann MR, Weiner DM. Pharmacology of polymorphic variants of the human 5-HT<sub>1A</sub>-receptor. *Biochem Pharmacol* 2004; 67: 479-490

Diaz-Anzaldúa A, Joober R, Riviere JB, Dion Y, Lesperance P, Richer F, Chouinard S, GA. Rouleau GA, Montreal Tourette Syndrome Study Group. Tourette syndrome and dopaminergic genes: a family-based association study in the French Canadian founder population. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 272-277

Done CJ, Sharp T. Biochemical evidence for the regulation of central noradrenergic activity by 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors: microdialysis studies in the awake and anaesthetized rat. *Neuropharmacology* 1994; 33: 411-421

Doupnik CA, Dawidson N, Lester HA, Kofuji P. RGS proteins reconstitute the raping gating kinetics of betagamma-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 10461-10466

Drago A, De Ronchi D, Serretti A. 5-HT<sub>1A</sub> gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies. *International J Neuropsychopharmacology* 2008; 11: 701-721

Dursun SM, Burke JG, Reveley MA. Buspirone treatment of Tourette's syndrome. *Lancet* 1995; 345: 1366-1367.

Eiden LE, Schäfer MK, Weihe E, Schütz B. The vesicular amine transporter family (SLC 18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch* 2004; 447: 636-640

Ensink FBM, Soyka D. Migräne: Aktuelle Aspekte eines altbekannten Leidens. Berlin – Heidelberg – New York: Springer Verlag, 1994: 1-510

Erdmann J, Shimron-Abarbanell D, Cichon S, Albus M, Maier W, Lichtermann D, Mingos J, Reuner U, Franzek E, Ertl MA, Hebebrand J, Remschmidt H, Lehmkuhl G, Poustka F, Schmidt M, Fimmers R, Korner J, Rietschel M, Propping P, Nothen MM. Systematic screening for mutations in the promoter and the coding region of the 5-HT<sub>1A</sub> gene. *Am J Med Genet* 1995; 60: 393-399

Erspamer V, Vialli M. Ricerche sul secreto delle cellule enterochromaffini. *Boll Soc Med-chir Pavia* 1937; 51: 357-363

Fargin A, Raymond JR, Regan JW, Cotecchia, S, Lefkowitz RJ, Caron MG. Effector coupling mechanism of the cloned 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *J Biol Chem* 1989; 264: 14848-14852

Felling RJ, Singer HS. Neurobiology of Tourette Syndrome: current status and need for further investigation. *J Neurosci* 2011; 31: 12387-12395

- Filip M, Bader M. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 761-777
- Flaherty AW, Williams ZM, Amirnovin R, Kasper E, Rauch SL, Cosgrove GR, Eskandar EN. Deep brain stimulation of the internal capsule for the treatment of Tourette syndrome: technical case report. *Neurosurgery* 2005; 57: 403
- Fletcher A, Bill DJ, Bill SJ. WAY 100 135: A novel, selective antagonist at presynaptic and postsynaptic 5HT<sub>1A</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 1993; 237: 283-91
- Frazer A, Hensler JG. Serotonin. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Molinoff PB. editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 5th edition. New York: Raven Press; 1994; 283-319
- Freeman RD, Fast DK, Burd L, Kerbeshian J, Robertson MM, Sandor P. An international perspective on Tourette syndrome: selected findings from 3500 individuals in 22 countries. *Dev Med Child Neurol* 2000; 42: 436- 447
- Gadzicki D, Müller-Vahl KR, Heller D, Ossege S, Nöthen MM, Hebebrand J, Stuhmann M. Tourette syndrome is not caused by mutations in the central cannabinoid receptor (CNR1) gene. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2004; 127B:97-103
- Galter D, Unsicker K. Brain-derived neurotrophic factor and trkB are essential for cAMP-mediated induction of the serotonergic neuronal phenotype. *J Brain Res* 1990; 528:155-158
- Gilbert D. Treatment of children and adolescents with tics and Tourette syndrome. *J Child Neurol* 2006; 21: 690-700
- Gilbert F, Brazell C, Tricklebank MD. Activation of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor subtype increases plasma ACTH concentration *Eur J Pharmacol* 1988; 147: 431-439
- Gilles de la Tourette G. Etude sur une affection nerveuse caracterisee par de l'incoordination motorice, acompagnee d`echolalie et de coprolalie (jumping, latah, myriachit). *Arch Neurol* 1885; 9: 158-200
- Goetz CG, Klawans HL. Guilles de la Tourette on Tourette syndrome. *Adv Neurol* 1982; 35: 1-16
- Göthert M. In Kalsner S, Westfall TC. Presynaptic Receptors and the Question of Auto-regulation of Neurotransmitter Release. *Ann NY Acad Sci* 1994; 604: 102-111
- Göthert M. Serotonin discovery and stepwise disclosure of 5-HT receptor complexity over four decades. Part I. General background and discovery of serotonin as a basis for 5-HT receptor identification. *Pharmacol Rep* 2013; 65: 771-768



Göthert M, Propping P, Bönisch H, Brüss M, Nöthen MM. Genetic variation in human 5-HT receptors: potential pathogenetic and pharmacological role. *Ann NY Acad Sci* 1998; 861: 26-30

Grace AA. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 1991; 41: 1- 24

Grace AA. The tonic/phasic model of dopamine system regulation: its relevance for understanding how stimulant abuse can alter basal ganglia function. *Drug Alcohol Depend* 1995; 37: 111-129

Green AR, Grahame-Smith DG. (-)-Propranolol inhibits the behavioural responses of rats to increased 5-hydroxytryptamine in the central nervous system. *Nature* 1976; 262: 594-596

Guan XM, Peroutka SJ, Kobilka BK. Identification of a single amino acid residue responsible for the bindings of a class of beta-adrenergic receptor antagonists to 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors. *Mol Pharmacol* 1992; 41: 695- 698

Haj-Dahmane S, Hamon M, Lanfumey L. K<sup>+</sup> channel and 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> autoreceptor interactions in the rat dorsal nucleus: an in vitro electrophysical study. *Neuroscience* 1991; 41: 495-505

Hall DA, Strange PG. Evidence that antipsychotic drugs are inverse agonist at D<sub>2</sub> dopamine receptors. *Br J Pharmacol* 1997; 1214: 731-736

Hamon M, Gozlan H, El Mestikawy S, Emerit MB, Bola-os F, Schechter L. The central 5-HT<sub>1A</sub> receptors: pharmacological, biochemical, functional and regulatory properties. *Ann NY Acad Sci* 1990; 600: 114-131

Handley SL. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol Ther* 1995; 112: 13-20

Hannon J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* 2008; 195: 198-213

Hebebrand J, Klug B, Remschmidt H. Genetik des Tourette-Syndroms. *Medgen* 1998; 10: 406- 408

Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor mutant mice. *Neurobiology* 1998; 95: 15049-15054

- Hjorth S, Carlsson A, Lindberg P, Sanchez D, Wirksterm H, Arvidsson LE, Hacksell U, Nilsson JLG. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin, 8-OH-DPAT, a potent and selective simplified ergot congener with central 5-HT-receptor stimulating activity. *J Neural Transm* 1982; 55: 169-188
- Ho BY, Karschin A, Rancheck T, Davidson N, Lester HA. The role of conserved aspartate and serine residues in ligand binding and function of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor: a site directed mutation study. *FEBS Lett* 1992; 312: 259-262
- Holzapfel B, Wickert L Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biol Unserer Zeit* 2007; 37:120-126.
- Houeto JL, Karachi C, Mallet L, Pillon B, Yelnik J, Mesnage V, Welter ML, Navarro S, Pelissolo A, Damier P, Pidoux B, Dormont D, Cornu P, Agid Y. Tourette's syndrome and deep brain stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76: 992- 995
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International union of pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). *Pharmacol Rev* 1994; 46: 157-203
- Hoyer D, Martin GR. Classification and nomenclature of 5-HT receptors: a comment on current issues. *Behav Brain Res* 1996; 73: 263-268
- Humphrey PP, Goadsby PJ. The mode of action of sumatriptan is vascular? A debate. *Cephalalgia* 1994; 14: 401-410
- Ichiyama A, Nakamura S, Nishizuka Y, Hayashi O. Enzymic studies on the biosynthesis of serotonin in mammalian brain. *J Biol Chem* 1970; 245:1699-1709
- Jancovic J. Tourette syndrome. Phenomenology and classification of Tics. *Neurol Clin* 1997; 15: 267-275
- Jequier E, Robinson DS, Lovenberg W, Sjoerdsma A. Further studies on tryptophanhydroxylase in rat brainstem. *Biochem Pharmacol* 1969; 18: 1071-1081
- Khalifa N, von Knorring AL. Psychopathology in a Swedish population of school children with tic disorders. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2006; 45:1346-53
- Kaneoake Y, Vitek L. The role of the basal ganglia in movement control. *Clin Neurol* 1995; 35: 1518-1521
- Kaumann AJ, Levy FO. 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. *Pharmacol Ther* 2006; 111: 674-706
- Kia HK, Brisorgueil MJ, Hamon M, Calas A, Vergé D. Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine <sub>1A</sub> receptors in the rat brain *J Neurosci* 1996; 46: 697-708

- Kitts A, Sherry S. The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) of Nucleotide Sequence Variation. In: McEntyre J, Ostell J, HRSB. The NCBI Handbook. Bethesda, MD: US National Center for Biotechnology Information. 2011; 1-21
- Klug B, Hebebrand J, Remschmidt H. Therapie des Gilles-de-la-Tourette-Syndroms. *Kinderärztliche Praxis* 1999; 7:466-482
- Knight T, Steeves T, Day L, Lowerison M, Jette N, Pringsheim T. Prevalence of tic disorder: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Neurol* 2012; 47: 77-90
- Kobilka BK, Frielle T, Collins S, Yang-Feng T, Kobilka TS, Francke U, Lefkowitz RJ, Caron MG. An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature* 1987; 329: 75-79
- Lam S, Shen Y, Nguyen T, Messier TL, Brann N, Comings George S, O'Dowd B. A serotonin receptor gene (5HT<sub>1A</sub>) variant was found in a Tourette's syndrome patient. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219: 853-858
- Lanfumeey S, Hamon M. Central 5-HT<sub>1A</sub> receptors: regional distribution and functional characteristics. *Nucl Med Biol* 2000; 27: 429-435
- Lees AJ, Robertson M, Trimble MR, Murray NMF. A clinical study of Gilles de la Tourette syndrome in the United Kingdom. *J Neurol Neurosurg and Psych* 1984; 47: 1-8
- Lucki I. 5-HT<sub>1</sub> receptors and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 1992; 16: 83-93
- Ludolph AG, Roessner V Münchau A, Müller-Vahl K. Tourette syndrome and other tic disorders in childhood, adolescence and adulthood. *Dtsch Arztl Int* 2012; 109: 821-828
- Malhotra AK, Lencz T, Correll CU, Kane JM. Genomics and the future of pharmacotherapy in psychiatry. *Int Rev Psychiatry* 2007; 19: 523-530
- May A, Goadsby PJ. The trigeminovascular system in humans: pathophysiologic implications for primary headache syndromes of the neural influences on the cerebral circulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 115-127
- Marcinkiewicz M, Vergé D, Gozlan H, Pichat L, Hamon M. Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT<sub>1</sub> sites in the rat brain. *Brain Res* 1984; 291: 159-163
- Meents JE, Neeb L, Reuter U. TRPV1 in migraine pathophysiology. *Trends Mol Med* 2010; 16: 153-159
- Millan MJ, Bertvoets K, Colpaert FC. 5-hydroxytryptamine (5-HT)<sub>1A</sub> receptors and the tail-flick response. 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin Hbr-induced spontaneous tail-flicks in the rat as in vivo model of 5-HT<sub>1A</sub> receptor-mediated activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256: 973-982

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350

Nichols DE, Nichols CD. Serotonin receptors. *Chem Rev* 2008; 108(5): 1614-1641

O'Donnell P, Grace AA. Tonic D2-mediated attenuation of cortical excitation in nucleus accumbens neurons recorded in vitro. *Brain Res* 1994; 634: 105-112

Oleskevich S. G alpha o1 decapeptide modulates the hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> potassium current. *J Neurophysiol* 1995; 74: 2189-2193

Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M. Increased anxiety of mice lacking the serotonin<sub>1A</sub> receptor. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 10734-10739

Paschou P. The genetic basis of Gilles de la Tourette Syndrome. *Neurosci Biobehav Rev* 2013; 37: 1026-1039

Pazos A, Palacios M. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 1985; 346: 205-230

Pithadia P, Jain SM. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes and their modulators with therapeutics potentials. *J Clin Med Res* 2009; 1: 72-80

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 1992; 12: 440-453

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution of the 5-HT<sub>2</sub> receptor family mRNAs: comparison between 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 23:163-178

Racké K, Reimann A, Schwörer H, Kilbinger H. Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. *Behav Brain Res* 1996; 73: 83-87

Radja F, Daval G, Hamon M, Vergé D. Pharmacological and physicochemical properties of pre-versus postsynaptic 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor binding sites in the rat brain: a quantitative autoradiographic study. *J Neurochem* 1992; 58: 1338-1346

Rapanelli M. The Magnificent Two: Histamine and the H3 receptor as key modulators of striatal circuitry. *Progress Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat* 2017; 73:36-40

Rapanelli M, Pittenger C. Histamine and histamine receptors in Tourette syndrome and other neuropsychiatric conditions. *Neuropharmacology* 2016; 106:85-90

Rapport MM. The discovery of serotonin. *Perspect Biol Med* 1997; 40: 260-273

Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R. Serotonin receptor<sub>1A</sub> knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 14476-14481

Raymond JR, Alberts FJ, Middleton JP. Functional expression of human 5-HT<sub>1A</sub> receptors and differential coupling to second messengers in CHO cells. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1992; 346: 127-137

Raymond JR, Olsen CL, Gettys TW. Cell specific physical and functional coupling of human 5-HT<sub>1A</sub> receptors to inhibitory G protein alpha-subunits and lack of coupling to G<sub>s</sub> alpha. *Biochemistry* 1993; 32: 11064-11073

Raymond JR, Mukhin YV, Gettys TW, Garnovskaya MN. The recombinant 5-HT<sub>1A</sub> receptor: G Protein coupling and signaling pathways. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1751-1764

Renson J, Weissbach H, Udenfriend S. Hydroxylation of tryptophan by phenylalanin hydroxylase. *J Biol Chem* 1962; 237: 2261-2264

Rex A, Bert B, Fink H. History and new developments. The pharmacology of 5-HT<sub>3</sub> antagonists. *Neurosci Res* 2007; 61: 295-301

Reynolds GP, McGowan OO, Dalton CF. Pharmacogenomics in psychiatry: the relevance of receptor and transporter polymorphism. *Br J Clin Pharmacol* 2014; 77(4): 654-672

Riederer F, Stamenkovic M, Schindler SD, Kasper S. Das Tourette Syndrom. *Nervenarzt* 2002; 73: 805-819

Robertson MM. Tourette syndrome, associated conditions and the complexities of treatment. *Brain* 2000; 123: 425-462

Robertson MM. The prevalence and epidemiology of Gilles de la Tourette syndrome. *J Psychosom Res* 2008; 6: 461-72

Robertson MM, Eapen V, Singer HS, Martino D, Scharf JM, Paschou P, Roessner V, Woods DW, Hariz M, Mathews CA, Crncec R, Leckman JF. Gilles de la Tourette syndrome. *Nat Rev Dis Prim* 2017; 3:16097

Rondot P, Bathien N. Movement disorders in patients with striatal and/or pallidal lesions. In: Percheron G, Mc Kenzie JS, Féger, HRSG. *The basal ganglia*. New York: Plenum Press, 1994: 519-523

Sacco S, Bendtsen L, Ashina M, Reuter U, Terwindt G, Mitsikostas DD, Martelletti P. European headache federation guideline on the use of monoclonal antibodies acting on the calcitonin gene related peptide or its receptor for migraine prevention. *J Headache and Pain* 2019; 20(6):1-33

- Sallee FR, Kurlan R, Goetz CG, Singer H, Scahill L, Law G, Dittman VM, Chappell PB. Ziprasidone treatment of children and adolescents with Tourette's syndrome: a pilot study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2000; 39: 292-299
- Sanders KH, Beller KD, Bischler P, Kolassa N. Interaction of urapidil with brain serotonin-1A receptors increases the blood pressure reduction due to peripheral alpha-adrenoceptor inhibition. *J Hypertens* 1988; 6: 65-8
- Sarafides PA, Nilsson PM. The metabolic syndrome: a glance at its history. *J Hypertens* 2006; 24: 621-626
- Scahill L, Leckman JF, Schultz RT, Katsovich L, Peterson BSA. Placebo-controlled trial of risperidone in Tourette syndrome. *Neurology* 2003; 60: 1130-1135
- Seo WS, Sung HM, Sea HS, Bai DS. Aripiprazole treatment of children and adolescents with Tourette's syndrome or chronic tic disorder. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2008; 18:197-205
- Servello D, Porta M, Sassi M, Brambilla A, Robertsom MM. Deep brain stimulation in 18 patients with severe Gilles de la Tourette syndrome refractory to treatment: the surgery and stimulation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79: 136-142.
- Singer HS, Hahn IH, Moran TH. Abnormal dopamine uptakes sites in postmortem striatum from patients with Tourette syndrome. *Ann Neurol* 1991; 30: 558-562
- Singer HS. Neurobiological issues in Tourette syndrome. *Brain Dev* 1994; 16: 353-364
- Singer HS. Current issues in Tourette Syndrome. *Mov Disord* 2000; 15: 1051-1063
- Smit MJ, Bakker RA, Burstein ES. G protein-coupled receptors and proliferative signaling. *Methods Enzymol* 2002; 343: 430-447
- Staley D, Wand R, Shady G. Tourette disorder: a cross – cultural review. *Compr Psychiatry* 1997; 38: 6-16
- Stöber G, Hebebrand J, Cichon S, Brüss M, Bönisch H, Lehmkuhl G, Poustka F, Schmidt M, Remschmidt H, Propping P, Nöthen MM. Tourette syndrome and the norepinephrine transporter gene: results of a systematic mutation screening. *Am J Med Genet* 1999; 88:158-63
- Suzuki M, Matsuda T, Asano S, Somboonthum P, Takuma K, Baba A. Increase of norepinephrine release in the hypothalamus of freely moving rat by postsynaptic 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor activation. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 703-711
- Taylor DP, Moon SL. Buspirone and related compounds as alternative anxiolytics. *Neuropeptides* 1991; 19 Suppl: 15-9

Termine C, Selvini C, Rossi G, Balottin U. Emerging treatment strategies in Tourette syndrome: what's in the pipeline? In: Martino D, Cavanna AE, HRSG. *Advances in the Neurochemistry and Neuropharmacology of Tourette Syndrome*. London: Elsevier, 2013: 445-480

Thomas DR, Hagan JJ. 5-HT<sub>7</sub> receptors. *Curr Drug Targets. CNS Neurol Disord* 2004; 3: 81-90

Udenfriend S, Titus E, Weissbach H, Peterson RE. Biogenesis and metabolism of 5-hydroxyindole compounds. *J Biol Chem* 1956; 219: 335

Van Vliet IM, Westenberg HG, den Boer JA. Effects of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist flesinoxan in panic disorder. *Psychopharmacology* 1996; 127: 174-180

Vergé D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, el Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT<sub>1</sub> receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci* 1986; 6: 3474-3482

Wang C, Jiang Y, Ma J, Wu H, Wacker D, Katritch V, Han GW, Liu W, Huang X-P, Vardy E, McCorvy JD, Gao X, Zhou XE, Melcher K, Zhang C, Bai F, Yang H, Yang L, Jiang H, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC, Xu HE. Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science* 2013; 340: 610-614

Weizmann A, Mandel A, Barber Y, Weiz R, Cohen A, Master R, Rehavi M. Decreased platelet imipramine binding in Tourette syndrome children with obsessive compulsive disorder. *Biol Psychiatry* 1992; 31: 705-711

Wightman RM, Robinson DR. Transient changes in mesolimbic dopamine and their association with « reward » *J Neurochem* 2002; 82: 721-735

Whitaker-Azmitia P, Murphy R, Azmitia E. Stimulation of astroglial 5HT<sub>1A</sub> receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res* 1990; 528:155-158

Woolley ML, Marsden CA, Fone KC. 5-HT<sub>6</sub> receptors. *Curr Drug Targets. CNS Neurol Disord* 2004; 3:59-79

Wong DF, Brasic JR, Singer HS, Schretlen DJ, Kuwabara H, Zhou Y, Nandi A, Maris MA, Alexander M, Ye W, Rousset O, Kumar A, Szabo Z, Gjedde A, Grace AA. Mechanisms of dopaminergic and serotonergic neurotransmission in Tourette syndrome: clues from an in vivo neurochemistry study with PET. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33: 1239-1251

Xu L, Zhou S, Yu K, Gao B, Jiang H, Zhen X, Fu W. Molecular modeling of the 3D structure of 5-HT(1A)R: discovery of novel 5-HT(1A)R agonists via dynamic pharmacophore-based virtual screening. *J Chem Inf Model* 2013; 53:3202-3211

Yevtushenko OO, Reynolds GP. 14 – Functional Pharmacogenetics of Serotonin Receptors in Psychiatric Drug Action. *Handbook of Behavioral Neuroscience* 2010; 21: 791-806

Yu D, Sul JH, Tsetsos F, Nawaz MS, Huang AY, Zelaya I, Illmann C, Osiecki L, Darrow SM, Hirschtritt ME, Greenberg E, Muller-Vahl KR, Stuhmann M, Dion Y, Rouleau G, Aschauer H, Stamenkovic M, Schlögelhofer M, Sandor P, Barr CL, Grados M, Singer HS, Nöthen MM, Hebebrand J, Hinney A, King RA, Fernandez TV, Barta C, Tarnok Z, Nagy P, Depienne C, Worbe Y, Hartmann A, Budman CL, Rizzo R, Lyon GJ, McMahon WM, Batterson JR, Cath DC, Malaty IA, Okun MS, Berlin C, Woods DW, Lee PC, Jankovic J, Robertson MM, Gilbert DL, Brown LW, Coffey BJ, Dietrich A, Hoekstra PJ, Kuperman S, Zinner SH, Luđvigsson P, Sæmundsen E, Thorarensen Ó, Atzmon G, Barzilai N, Wagner M, Moessner R, Ophoff R, Pato CN, Pato MT, Knowles JA, Roffman JL, Smoller JW, Buckner RL, Willsey AJ, Tischfield JA, Heiman GA, Stefansson H, Stefansson K, Posthuma D, Cox NJ, Pauls DL, Freimer NB, Neale BM, Davis LK, Paschou P, Coppola G, Mathews CA, Scharf JM; Tourette Association of America International Consortium for Genetics, the Gilles de la Tourette GWAS Replication Initiative, the Tourette International Collaborative Genetics Study, and the Psychiatric Genomics Consortium Tourette Syndrome Working Group. Interrogating the genetic determinants of Tourette's syndrome and other Tic disorders through genome-wide association studies. *Am J Psychiatry* 2019; 176:217-227

Zheng G, Dwoskin LP, Crooks PA. Vesicular Monoamine Transporter 2: Role as a Novel Target for Drug Development. *AAPS J* 2006; 8: E682-E692



## 10. Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. M. Göthert für die Überlassung des interessanten Themas und die stets zuverlässige Unterstützung. Mir wurde viel Geduld entgegengebracht und die wertvollen Anregungen und Ratschläge führten schließlich zum Gelingen der Arbeit. Ich danke auch Prof. Dr. H. Bönisch, in dessen Arbeitsgruppe und Labors ich die Untersuchungen durchführen durfte.

In Erinnerung gilt auch mein Dank Herrn Dr. Michael Brüss, der leider viel zu früh von uns ging. Er unterstützte das Team und meine Person mit fundiertem Wissen und vermochte immer eine positive und lockere Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

Ich danke insbesondere auch Frau PD Dr. Britta Hänisch, die mich über die Zeit immer wieder mit ihrem profunden Fachwissen und ihren sehr wertvollen Tipps geduldig unterstützte. Sie gab mir sehr viele Anregungen, Kritik und moralische Unterstützung.

Ich danke auch Frau Prof. Dr. Jeanette Erdmann für ihre freundliche Hilfe bei Fragen zur Humangenetik, insbesondere zur Allelfrequenz.

Meiner lieben langjährigen Freundin Claudia Andreosso danke ich für ihre stetige liebevolle und zuverlässige Unterstützung. Sie stand mir immer, insbesondere in schwierigen Zeiten, zur Seite. Sie ertrug meine wechselnden Stimmungen, baute mich auf, meine Arbeit fortzusetzen und manche Träne verwandelte sie in ein Lachen. Danke dafür.

Auch danke ich Frau Susann Lietz für ihre spontane nette Art und liebevoll motivierende Unterstützung zur Frage der Formatierung und Gestaltung der Arbeit.