

Kandidatengenanalyse zur Identifikation von Suszeptibilitätsvarianten für die Soziale Phobie

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

Nina Alexandra Friedrich

aus Bergisch Gladbach

2021

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Johannes Schumacher
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Heiko Reutter

Tag der Mündlichen Prüfung: 17.12.2020

Aus dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. Markus M. Nöthen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1 Soziale Phobie	10
1.1.1 Kontext	10
1.1.2 Klinik und Komplikationen	11
1.1.3 Epidemiologie	11
1.1.4 Diagnostik und Diagnosekriterien	13
1.1.5 Therapie	14
1.1.5.1 Psychotherapie	14
1.1.5.2 Medikamentöse Therapie	15
1.1.6 Risikofaktoren für die Entwicklung einer sozialen Phobie.....	15
1.1.7 Ätiopathogenese	16
1.2 Methoden zur Identifizierung genetischer Risikovarianten	17
1.2.1 Einzelnukleotid-Polymorphismus.....	17
1.2.2 Assoziationsanalysen	19
1.3 Assoziationsbefunde bei sozialer Phobie.....	20
1.4 Molekulargenetische Befunde psychiatrischer Erkrankungen mit Relevanz für die soziale Phobie.....	21
1.4.1 Assoziationsbefunde bei Panikstörung und anderen Angsterkrankungen..	22
1.4.2 Assoziationsbefunde bei bipolarer Störung	24
1.4.3 Assoziationsbefunde fünf psychiatrischer Erkrankungen	25
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Geräte	27

2.1.2	Chemikalien, Puffer und Lösungen	28
2.1.3	Kommerzielle Kits zur Nukleinsäureisolierung und -aufreinigung.....	28
2.1.4	Ergänzende Materialien zur Analyse von Nukleinsäuren	28
2.1.5	Datenbanken und Softwares	29
2.2	Methoden.....	30
2.2.1	Patientenkollektiv.....	30
2.2.2	Kontrollkollektiv	31
2.2.3	SNP-Auswahl	32
2.2.4	DNA-Isolierung und Aufbereitung.....	34
2.2.5	Analyse der DNA.....	35
2.2.6	Vorbereitung der Proben für die Genotypisierung	36
2.2.7	Genotypisierung der ausgewählten SNPs	36
2.2.7.1	PCR	38
2.2.7.2	SAP-Verdau.....	40
2.2.7.3	Single Base Extension	41
2.2.7.4	Analyse der SBE mittels MALDI-TOF MS.....	44
2.2.8	Qualitätskontrollen.....	47
2.2.9	Statistische Analysen	48
2.2.9.1	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht	48
2.2.9.2	Odds Ratio.....	48
2.2.9.3	Assoziationsanalysen	49
2.2.9.4	Bonferroni-Korrektur	50
3.	Ergebnisse	51
3.1	Assoziationsanalyse der Kandidaten-SNPs im gesamten SAD-Kollektiv.....	51
3.2	Assoziationsanalyse der Kandidaten-SNPs unter SAD-Fällen ohne PD.....	53
3.3	Quantitative Assoziationsanalyse zur Symptomstärke.....	55

3.4	Quantitative Assoziationsanalyse zum Grad an Schadensvermeidung	56
4.	Diskussion	58
5.	Zusammenfassung	67
6.	Abbildungsverzeichnis	69
7.	Tabellenverzeichnis	69
8.	Literaturverzeichnis	70
9.	Danksagung	86

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADHD	attention deficit hyperactivity disorder, Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung
ASD	autism spectrum disorder, Autismus-Spektrum-Störung
ASPD	antisocial personality disorder, dissoziale Persönlichkeitsstörung
bp	Basenpaare
BD	bipolar disorder, bipolare Störung
BDI	Beck-Depressions-Inventar
C	Cytosin
CIDI	Composite International Diagnostic Interview
CR	Call rate, Genotypisierungsrate
Da	Dalton
ddNTPs	Didesoxynukleosidtriphosphate
DIPS	Diagnostisches Interview bei psychischen Störungen
dNDPs	Desoxyribonukleosiddiphosphate
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSM - IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition
G	Guanin
GAD	generalized anxiety disorder, generalisierte Angststörung
GWAS	genome-wide association study, genomweite Assoziationsanalyse
HA	harm avoidance, Schadensvermeidung
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium

ICD-10	International Classification of Diseases, Internationale Klassifikation der Krankheiten, 10. Revision
LD	linkage disequilibrium, Kopplungsungleichgewicht
LSAS	Liebowitz-Soziale-Angst-Skala
MAF	minor allele frequency, Frequenz des selteneren Allels
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Flugzeitanalyse Massenspektrometrie
MDD	major depressive disorder, Depression
MSM I	Magnetic Separation Module I
OCD	obsessive-compulsive disorder, Zwangsstörung
OR	Odds Ratio
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PD	panic disorder, Panikstörung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PTSD	posttraumatic stress disorder, posttraumatische Belastungsstörung
QC	quality control, Qualitätskontrolle
SAD	social anxiety disorder, soziale Phobie
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SBE	Single Base Extension, Einzelbasenverlängerung
SCZ	Schizophrenie
SD	standard deviation, Standardabweichung
SIAS	Soziale-Interaktions-Angst-Skala
SKID-I	Strukturierte Klinische Interview für DSM-IV Achse I Störungen
SNP	single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus

SPIN	Soziale-Phobie-Inventar
SPS	Soziale-Phobie-Skala
SSNRI	selektiver Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
SSRI	selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
T	Thymin
TCI	Temperament- und Charakterinventar
TOF	time-of-flight, Flugzeit
UEP	unextended primer, Extensionsprimer
VNTR	variable number of tandem repeats
VGCC	voltage-gated calcium channel, spannungsabhängiger Kalziumkanal
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
YLD	years lived with disability
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HTT	5-Hydroxytryptamintransporter, Serotonintransporter
5-HTTLPR	serotonin-transporter-linked polymorphic region
5-HT-1A	Serotonin Autorezeptor

1. Einleitung

Die soziale Phobie (social anxiety disorder, SAD) ist eine psychiatrische Erkrankung, welche durch die permanente Angst vor negativer Bewertung der eigenen Person durch andere gekennzeichnet ist und als Konsequenz mit der Vermeidung sozialer Interaktion einhergeht. Krankheitsfolgen sind soziale Isolation, schlechtere schulische und berufliche Leistungen sowie eine allgemein reduzierte Lebensqualität (Brook und Schmidt, 2008; Fehm und Knappe, 2011). Mit einer Prävalenz von ca. 11 - 13 % (Kessler et al., 2012; Stein und Stein, 2008) stellt sie eine der häufigsten psychiatrischen Erkrankungen dar. Aufgrund der Symptomatik und der o.g. Krankheitsfolgen ist die soziale Phobie damit von großer sozioökonomischer Relevanz (GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2017; World Health Organization, 2011). Wie bei den meisten psychiatrischen Erkrankungen liegt auch der sozialen Phobie eine multifaktorielle Genese zugrunde (Bandelow et al., 2004). Dies bedeutet, dass sowohl Umweltfaktoren als auch genetische Faktoren zur Krankheitsentstehung beitragen. Für das bessere Verständnis der Krankheitsätiologie kann die Identifizierung assoziierter Risikogene von entscheidender Bedeutung sein. Von ihnen könnte auf zugrunde liegende Pathomechanismen geschlossen und so ein Fortschritt in der Diagnostik, Therapie und Prävention der sozialen Phobie erzielt werden. Dank modernster Methoden der Humangenetik ist es möglich Risikovarianten im menschlichen Genom zu identifizieren. In Familienstudien konnte eine familiäre Häufung der sozialen Phobie beobachtet und ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bei Verwandten ersten Grades von Sozialphobikern ermittelt werden (Fyer et al., 1993). Zwillingsstudien ergaben eine Heritabilität von ca. 20 % bis 50 % (Kendler et al., 1999, 2001; Skre et al., 2000). Bisher konnten allerdings nur wenige Risikovarianten identifiziert werden (Donner et al. 2008; Jensen et al. 2014; Sipilä et al. 2010; Strug et al. 2010). Ein weiterer interessanter Befund genetischer Analysen ist die genetische Überlappung zwischen zahlreichen psychiatrischen Erkrankungen (Brainstorm Consortium, 2018). So konnten einige Studien starke Belege für ein gemeinsames genetisches Risikoprofil der sozialen Phobie mit Depression (major depressive disorder, MDD), Agoraphobie, generalisierter Angststörung (generalized anxiety disorder, GAD) und Panikstörung (panic disorder, PD) finden (Loken et al., 2014; Nelson et al., 2000). Außerdem zeigte eine groß

angelegte Metaanalyse von Daten aus genomweiten Assoziationsanalysen (genome-wide association study, GWAS) gemeinsame Risikogene zwischen den fünf psychiatrischen Erkrankungen Schizophrenie (SCZ), bipolare Störung (bipolar disorder, BD), Autismus-Spektrum-Störung (autism spectrum disorder, ASD), Depression und Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) auf (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013). Vor diesem Hintergrund ist die systematische Untersuchung genetischer Marker mit bereits bekannter Assoziation zur sozialen Phobie oder anderen psychiatrischen Erkrankungen auf ihren prädisponierenden Effekt bei der Entwicklung einer sozialen Phobie Gegenstand der vorliegenden Dissertation.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden im Artikel „Further evidence for genetic variation at the serotonin transporter gene *SLC6A4* contributing toward anxiety“ in der Zeitschrift „Psychiatric Genetics“ veröffentlicht (Forstner et al., 2017).

1.1 Soziale Phobie

1.1.1 Kontext

Die soziale Phobie gehört nach der Internationalen Klassifikation der Krankheiten (International Classification of Diseases, ICD-10) zu den phobischen Störungen (F40) und damit zur Gruppe der Angststörungen (F40 und F41). Gemeinsam ist diesen Erkrankungen das Auftreten von psychopathologischer Angst, die im Gegensatz zu physiologischer Angst ihre Funktion als Warnsignal vor real bestehender Gefahr verloren hat (Paulitsch, 2009). Aus ihr resultiert keine situationsangemessene Fluchtreaktion und die Symptome lassen nicht nach Beseitigung des Auslösers nach. Pathologische Angst tritt unbegründet auf, hat eine lähmende Wirkung und beeinträchtigt als Krankheitssymptom die Lebensqualität der Betroffenen (Deister, 2013). Bei phobischen Störungen ist sie gerichtet, da sie sich auf bestimmte Objekte oder Situationen bezieht. Tritt sie ungerichtet auf, handelt es sich bei der Erkrankung um eine generalisierte Angststörung oder Panikstörung, je nachdem ob sie freiflottierend ist oder in Attacken auftritt (Kraemer, 2012).

1.1.2 Klinik und Komplikationen

Bei der sozialen Phobie löst eine Bandbreite sozialer Situationen, in denen sich die betroffene Person beobachtet und bewertet fühlt, die Angstsymptome aus. Dies kann zum Beispiel das Essen oder Sprechen in der Öffentlichkeit, das Ausführen von Tätigkeiten in Gegenwart anderer oder die Teilnahme an sozialer Interaktion in kleinen Gruppen sein (Phillips et al., 2013). Die Betroffenen befürchten sich peinlich oder erniedrigend zu verhalten, während sie im Zentrum der Aufmerksamkeit stehen (Dilling et al., 2011). Es kommt zu psychosomatischen Missempfindungen wie Übelkeit oder Schwindel, sowie zu vegetativen Symptomen wie Herzrasen, Schwitzen oder Tremor, die sich bis hin zu einer Panikattacke steigern können. Den Patienten ist bewusst, dass ihre Angst unangemessen ist. Sie sind aber nicht in der Lage ihre Symptome zu kontrollieren. Kommt es in der angstbehafteten Situation zu sichtbaren körperlichen Reaktionen, wird die Angst zudem dadurch verstärkt, dass ein Entdecken der Symptomatik durch andere und die daraus resultierende Erniedrigung befürchtet werden (Phillips et al., 2013). So ist die Erythrophobie, die Angst vor dem Erröten, unter Sozialphobikern weitverbreitet.

Die Erkrankung stellt eine starke emotionale Belastung für die Betroffenen dar. Häufig leiden die Patienten bereits beim Gedanken an die gefürchtete Situation unter Erwartungsangst, was zu einem ausgeprägten Vermeidungsverhalten führt (Deister, 2013). Diese Art der Anspannungslösung birgt die Gefahr der sozialen Isolation, da ohne soziale Interaktion der Aufbau eines Freundeskreises oder einer Partnerschaft unmöglich ist (Fehm und Knappe, 2011). Auch die Auswirkungen auf den schulischen Werdegang und das berufliche Leben sind immens, da den Betroffenen die Teilnahme am Unterricht erschwert ist oder sie den Erwartungen im Beruf nicht nachkommen können. Statistiken zeigen, dass soziale Phobie mit weniger Eheschließungen, früherem Schulabgang, höherer Arbeitslosigkeit und höherer Suizidrate vergesellschaftet ist (Brook und Schmidt, 2008).

1.1.3 Epidemiologie

Die Angaben zur Prävalenz der sozialen Phobie sind sehr heterogen. Eine erschwerte Datenerhebung ist wahrscheinlich der Symptomatik des Krankheitsbildes geschuldet.

Eine Metaanalyse von 23 Studien zur Prävalenz der sozialen Phobie in Europa ergab eine mittlere Lebenszeitprävalenz von 6,7 %, wobei die geringste Angabe aus Belgien mit 3,9 % und die höchste aus Norwegen mit 13,7 % stammt (Fehm et al., 2005). Im National Comorbidity Survey wird die Lebenszeitprävalenz in den USA mit 12,1 % (13,0 % für Frauen und 11,1 % für Männer) angegeben (Kessler et al., 2012; Stein und Stein, 2008). Frauen sind in einem Verhältnis von 2:1 bis 3:2 häufiger betroffen als Männer (Helbig und Petermann, 2008). Das durchschnittliche Erkrankungsalter wird über unterschiedliche Studien hinweg recht konstant zwischen 12 und 16,6 Jahren angegeben (Fehm et al., 2005).

Die soziale Phobie ist mit einer hohen Rate an Komorbidität vergesellschaftet. Bei lediglich 20 % der Patienten einer Studie mit 2300 Individuen in ambulanter psychiatrischer Behandlung wurde ausschließlich eine soziale Phobie diagnostiziert (McGlinchey und Zimmerman, 2007). Die Lebenszeitkomorbidität liegt zwischen 69 % und 92 % (Fehm et al., 2005). Zu den häufigsten Nebendiagnosen gehören andere Angststörungen (57 %), Substanzmissbrauch (41 %) und depressive Störung (41 %) (Deister, 2013). Vor allem die letzten beiden Diagnosen entwickeln sich in vielen Fällen sekundär, da zum einen die symptomreduzierende Wirkung von Alkohol und anderen Drogen zur Selbstmedikation genutzt wird und zum anderen die eingeschränkte Lebensqualität mit einem Relativen Risiko von 1,49 - 1,85 zur Entwicklung einer sekundären depressiven Störung führt (Beesdo et al., 2007). Der Leidensdruck und Beeinträchtigungsgrad schlägt sich in einem hohen Index von Kranken- zu Arbeitstagen nieder, welcher für die soziale Phobie 0,24 beträgt. Zum Vergleich: für Diabetes beträgt der Index 0,12 und für Probanden ohne Erkrankung 0,03 (Fehm et al., 2005).

Des Weiteren leiden Patienten der sozialen Phobie vermehrt unter Cluster C Persönlichkeitsstörungen, wobei vor allem die Assoziation zur ängstlich (vermeidenden) Persönlichkeitsstörung hoch ist (Friborg et al., 2013). Nach dem psychobiologischen Modell von Cloninger (Cloninger et al., 1993) lassen sich individuelle Persönlichkeitsunterschiede auf unterschiedliche Wichtung von vier Temperamentdimensionen (novelty seeking, harm avoidance, reward dependence, persistence) und drei Charakterdimensionen (self-directedness, cooperativeness, self-transcendence) zurückführen. In diesem Zusammenhang ist vor allem die Temperamentdimension der Schadensvermeidung (harm avoidance, HA) von Interesse, da diese gehäuft bei

Patienten mit Angststörungen auftritt und unter Patienten mit sozialer Phobie im Vergleich zu anderen Angsterkrankungen den stärksten Effekt aufweist (Kampman et al., 2014). In Zwillingsstudien konnte zudem gezeigt werden, dass die HA eine hohe, geschätzte Heritabilität aufweist (Keller et al., 2005). Die Relevanz der HA liegt in ihrer Auswirkung auf das Therapieergebnis der Patienten, welches bei einem hohen Grad an HA deutlich schlechter einzustufen ist (Mörtberg et al., 2007).

1.1.4 Diagnostik und Diagnosekriterien

In der Diagnostik psychischer Störungen sind Interviews der Goldstandard. Am häufigsten finden das Composite International Diagnostic Interview (CIDI), das Diagnostische Interview bei psychischen Störungen (DIPS) und das Strukturierte Klinische Interview für DSM-IV Achse I Störungen (SKID-I) Anwendung (Fehm und Knappe, 2011). Um den Schweregrad der sozialen Phobie zu bestimmen, eignet sich besonders gut das Soziale-Phobie-Inventar (SPIN). Es handelt sich hierbei um ein Selbstbeurteilungsinstrument bestehend aus 17 Aussagen, die die Bereiche Vermeidungsverhalten sowie kognitive und physiologische Angstsymptome abdecken (Connor et al., 2000). Der Patient gibt an, ob diese gar nicht bis extrem auf ihn zutreffen. Die zu erreichende Punktzahl liegt bei 0 bis 68, wobei eine soziale Angststörung ab 19 Punkten wahrscheinlich ist. Verschiedene Studien bescheinigen dem SPIN eine hohe Validität und Reliabilität, inklusive hoher Retest-Reliabilität und exzellenter interner Konsistenz. Desweiteren lässt sich eine gute Spezifität und Sensitivität, inklusive Änderungssensitivität feststellen (Antony et al., 2006; Ranta et al., 2007; Sosic et al., 2008). Zwei weitere Selbstbeurteilungsinstrumente, die bei sozialer Angststörung Anwendung finden, sind die Soziale-Phobie-Skala (SPS) und die Soziale-Interaktions-Angst-Skala (SIAS). Sie helfen bei der Identifizierung der angstausslösenden Situationen (Mattick und Clarke, 1998). Ein Fremdbeurteilungsinstrument zur Erfassung des Schweregrades der Angst und des Vermeidungsverhaltens stellt die Liebowitz-Soziale-Angst-Skala (LSAS) dar (Heimberg et al., 1999).

Nach ICD-10 kann die Diagnose gestellt werden, wenn soziale Situationen gefürchtet oder vermieden werden und zusätzlich eine Reihe spezifischer und unspezifischer Symptome durch die soziale Situation oder den Gedanken an diese ausgelöst werden.

Außerdem muss eine organische Ursache der Symptomatik ausgeschlossen werden sowie sichergestellt sein, dass sie keiner anderen psychischen Störung oder der Wirkung von konsumierten Substanzen zuzuordnen sind (Dilling et al., 2011). Die Diagnosekriterien des Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM - IV) der American Psychiatric Association überschneiden sich zum größten Teil mit denen der World Health Organization (ICD-10). Das Auftreten von spezifischen Angstsymptomen ist hier keine diagnostische Voraussetzung, aber eine Dauer der Symptomatik von mindestens 6 Monaten (Phillips et al., 2013).

1.1.5 Therapie

Ohne therapeutische Intervention verläuft die soziale Phobie in der Regel chronisch (Fehm und Knappe, 2011). Sowohl die Pharmakotherapie als auch die Psychotherapie stellen Behandlungsoptionen dar und sollen den Patienten angeboten werden. Führt die vom Patienten nach ausführlicher Aufklärung ausgewählte initiale Therapieform nicht zum erhofften Erfolg, wird mit der jeweils anderen Therapieoption oder einer Kombination fortgefahren (Bandelow et al., 2015).

1.1.5.1 Psychotherapie

Die Wirksamkeit der kognitiven Verhaltenstherapie zur Behandlung der sozialen Phobie wird durch eine Metaanalyse von mindestens drei randomisierten kontrollierten Studien (Evidenzgrad Ib) belegt (Bandelow et al., 2015). Liegt ein Defizit in sozialen Fähigkeiten vor, können diese mithilfe von sozialem Kompetenztraining erworben werden. Hierbei finden Verhaltensübungen in vivo oder im Rollenspiel Anwendung (z. B. Selbstbeobachtung anhand von Videoanalysen, Rückmeldung durch Gruppenmitglieder und Therapeuten, Modelllernen und operante Verstärkermethoden) (Angenendt und Hohagen, 2013). Bestehen soziale Ängste trotz des Vorhandenseins sozialer Kompetenzen, werden nach dem kognitiven Modell der sozialen Phobie pathologische Denkmuster als Ursache angenommen (siehe 1.1.7). Die kognitive Verhaltenstherapie soll eine Umstrukturierung dysfunktionaler Gedanken bewirken, indem diese identifiziert und kritisch überprüft werden (Fehm und Knappe, 2011). Vermeidungsverhalten wird

aufgedeckt und durch alternative angstlösende Handlungen ersetzt (Angenendt und Hohagen, 2013). Neuerlernte Verhaltensweisen und Alternativgedanken werden mithilfe von in vivo Konfrontationsübungen gefestigt und haben zudem den Effekt der Habituation (Fehm und Knappe, 2011).

1.1.5.2 Medikamentöse Therapie

Aufgrund ihrer guten Verträglichkeit und der breiten Evidenzlage für ihre Effektivität, sowohl bei der SAD als auch bei komorbiden Erkrankungen (Blanco et al., 2013), sind die selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRIs) Paroxetin, Sertralin und Escitalopram und der selektive Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SSNRI) Venlafaxin Mittel der ersten Wahl bei der medikamentösen Therapie der SAD (Bandelow et al., 2015). Bei Unverträglichkeit oder ausbleibendem Therapieerfolg ist der reversible Monoaminoxidase-Hemmer Moclobemid Mittel der zweiten Wahl (Bandelow et al., 2015). Zudem kann eine Kombinationstherapie eingesetzt werden (Pollack et al., 2014). Benzodiazepine sind bei sozialer Phobie zwar wirksam, bergen aber ein großes Abhängigkeitspotenzial und sollten daher nur in Ausnahmefällen unter Berücksichtigung des Risiko-Nutzen-Verhältnisses verordnet werden (Bandelow et al., 2015).

1.1.6 Risikofaktoren für die Entwicklung einer sozialen Phobie

Die familiäre Häufung von sozialer Phobie und anderen Angsterkrankungen legt den Verdacht auf eine genetische Ursache nahe. Die Bestätigung dieser Hypothese sowie die Identifizierung konkreter Risikovarianten und -gene ist Gegenstand aktueller Forschung. Familienstudien belegen ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Verwandte ersten Grades von SAD-Patienten. Fyer und Kollegen beziffern dies mit etwa 16 % (Fyer et al., 1993), was das Risiko der Allgemeinbevölkerung (11 % - 13 %) deutlich übersteigt (Kessler et al., 2012; Stein und Stein, 2008). Bestätigt wurde dieser Befund durch eine Metaanalyse von Familienstudien zu Angststörungen (Hettema et al., 2001, 2005). Die Erbllichkeit der sozialen Phobie wird in den Zwillingsstudien von Kendler und Kollegen auf etwa 20 - 50 % und bei Skre und Kollegen auf 47 % geschätzt (Kendler et al., 1999, 2001; Skre et al., 2000). Zudem ist anzunehmen, dass es sich bei der sozialen Phobie

um eine komplex-genetische Erkrankung handelt, bei der Varianten in mehreren Genen mit unterschiedlicher Effektstärke und möglicher Gen-Gen-Interaktion krankheitsverursachend sind. Trotz des begründeten Verdachts einer genetischen Komponente bei der Entwicklung dieses Krankheitsbildes, konnten bisher nur wenige Risikogene identifiziert werden (siehe 1.3).

Es ist in ätiologische Überlegungen außerdem einzubeziehen, dass eine familiäre Häufung auch durch die Exposition mit gleichen Umweltfaktoren, wie Erziehungsstil und prägenden Ereignissen, hervorgerufen werden kann (Knappe et al., 2010). So bestehen Hinweise, dass übertriebene elterliche Kontrolle und Überbehütung, aber auch elterliche Zurückweisung und mangelnde Zuneigung die Entwicklung sozialer Ängste beeinflussen (Brook und Schmidt, 2008). Elterliche Überbehütung hemmt die Entwicklung von Selbstständigkeit und Selbstvertrauen und bestärkt kindliche Ängste mit der Folge Behavioraler Inhibition (Fehm und Knappe, 2011). Diese kann vermehrt bei Betroffenen der sozialen Phobie erhoben werden, zeichnet sich durch zurückhaltendes sowie gehemmtes Verhalten in neuen Situationen aus (Helbig und Petermann, 2008) und setzt sich als ängstlich-vermeidende Grundhaltung in der Adoleszenz fort (Kraemer, 2012). Des Weiteren haben Patienten der sozialen Phobie in ihrer Kindheit signifikant häufiger traumatisierende Erlebnisse durchmachen müssen. Dazu gehört die Trennung von den Eltern, die Scheidung der Eltern, sexueller Missbrauch, familiäre Gewalt und schwere Krankheit (Bandelow et al., 2004).

Wie bei den meisten psychiatrischen Erkrankungen ist ein Zusammenspiel zwischen genetischen und äußeren Risikofaktoren mit gegenseitigen Wechselwirkungen als Teil der Krankheitsentstehung anzunehmen.

1.1.7 Ätiopathogenese

Nach dem Vulnerabilitäts-Stress-Coping-Modell entsteht soziale Phobie durch prädisponierende Bedingungen, auslösende Situationen und aufrechterhaltende Faktoren (Deister, 2013).

Zu den Vulnerabilitätsfaktoren gehören genetische sowie neurobiologische Risikofaktoren, wobei dem limbischen System, Neurotransmittern und hormonellen Substanzen große Bedeutung zukommt (Deister, 2013). Die bereits erwähnten

Umweltfaktoren, wie der elterliche Erziehungsstil und traumatische Kindheitsereignisse, stellen Stressoren dar, die der Theorie nach umso schneller pathologisches Verhalten auslösen, je größer die genetische Vulnerabilität ist (Brook und Schmidt, 2008). Verschiedene kognitive Mechanismen führen dann zur Aufrechterhaltung oder Verstärkung der Symptomatik. Hierzu gehört die Fehlattribution der körperlichen Angstsymptome als vitale Bedrohung mit der Folge der Angstverstärkung und Überspitzung bis hin zur Panikattacke (Deister, 2013). Es wird außerdem angenommen, dass die Betroffenen unter ausgeprägter Selbstbeobachtung stehen und auf negative Signale der sozialen Umwelt sensibilisiert sind (Helbig und Petermann, 2008). Zudem werden soziale Interaktionen nachträglich verzerrt wahrgenommen (Clark und McManus, 2002). Es kommt zur negativen Selbstbewertung des eigenen Verhaltens und Aussehens und Erinnerung an Misserfolge überwiegen denen an Erfolge.

1.2 Methoden zur Identifizierung genetischer Risikovarianten

Mithilfe von Assoziations- und Kopplungsanalysen lässt sich der Einfluss genetischer Varianten auf einen bestimmten Phänotyp untersuchen. Dabei macht man sich die interindividuellen Unterschiede in der Basensequenz des menschlichen Genoms zunutze. Da in der vorliegenden Arbeit Einzelnukleotid-Polymorphismen als genetische Marker gewählt wurden und eine Assoziationsanalyse durchgeführt wurde, werden diese beiden Themen im Folgenden genauer betrachtet.

1.2.1 Einzelnukleotid-Polymorphismus

Der Begriff Einzelnukleotid-Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) bezeichnet die Variation einer einzelnen Base an einer bestimmten Stelle im menschlichen Genom. Die so entstehenden Unterschiede in der Basensequenz machen den Großteil der genetischen Variabilität zwischen Individuen aus (Ziegler und König, 2010).

Das betroffene Allel kann theoretisch in vier verschiedenen Ausprägungen vorkommen. Tatsächlich liegen fast alle SNPs aber lediglich in zwei Allelen vor. Das seltenere Allel stellt den Polymorphismus dar und muss bei $> 1\%$ der Bevölkerung vorkommen, um als

SNP bezeichnet werden zu können (Manolio et al., 2008). Bis heute wurden bereits mehrere Millionen SNPs im menschlichen Genom identifiziert (Wheeler et al., 2007) und in der öffentlichen Datenbank dbSNP des National Center for Biotechnology Information katalogisiert. Je nachdem an welcher Stelle im Genom der Basenaustausch besteht, hat er unterschiedliche zellbiologische Auswirkungen. Liegt der SNP in einer kodierenden Region, kann es entweder zu einem Abbruch der Translation (nonsense), zur Synthese eines Proteins mit veränderter Aminosäuresequenz kommen (missense) oder ohne Auswirkungen auf Ebene der Proteinprimärstruktur bleiben (synonym). Der Großteil aller SNPs liegt allerdings in nicht-kodierenden Regionen und hat regulatorischen Einfluss auf die Proteinsynthese oder keine zellbiologische Auswirkungen (Ziegler und König, 2010). Letztgenannte SNPs haben aber auch Bedeutung für die Wissenschaft. Sie besteht darin, dass sie Hinweise auf krankheitsverursachende Varianten liefern können, wenn sie mit diesen im Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium, LD) stehen. LD beschreibt die Beobachtung, dass SNPs, die sich in räumlicher Nähe zueinander befinden, häufiger miteinander vererbt werden, als dies durch Zufall zu erklären wäre (Wall und Pritchard, 2003). Solche chromosomalen Regionen, auf denen sich gekoppelte SNPs befinden, werden als Haplotyp bezeichnet (Manolio et al., 2008). Allerdings besteht, anders als zunächst vermutet, keine Korrelation zwischen der Distanz zweier SNPs und der Stärke des LD. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass es sowohl eng benachbarte SNPs mit geringer Kopplung als auch weit entfernte SNPs mit hoher Kopplung gibt (Pritchard und Przeworski, 2001). Erklärt wird dies durch sogenannte Rekombinationshotspots, an denen es vermehrt zu Crossing-over kommt (McVean et al., 2004). So herrscht innerhalb von Haplotypen-Blöcken zwischen zwei hotspots ein hohes LD. Wohingegen zwischen zwei direkt benachbarten Blöcken ein niedriges LD bestehen kann, wenn sie von einem hotspot getrennt werden (Gabriel et al., 2002). Die Stärke des LD wird mit dem Koeffizienten r^2 beziffert. Er kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei zwischen zwei Loci mit $r^2 = 0$ keinerlei Kopplungsungleichgewicht besteht und bei $r^2 = 1$ diese in vollständiger Kopplung zueinander stehen, also immer gemeinsam auftreten (Wall und Pritchard, 2003).

1.2.2 Assoziationsanalysen

Assoziationsstudien untersuchen, ob ein bestimmter Genotyp und ein klinischer Phänotyp überdurchschnittlich häufig gemeinsam auftreten, und betrachten, ob im Falle einer bestehenden Assoziation diese statistisch signifikant ist.

Für die Durchführung benötigt man eine Gruppe von Fällen (Patienten der zu untersuchenden Erkrankung) und eine Gruppe von gesunden Kontrollen, deren DNA auf das Vorkommen ausgewählter genetischer Marker hin untersucht wird. SNPs stellen für solche Analysen ideale Marker dar, da sie in hoher Zahl über das gesamte Genom verteilt vorkommen (durchschnittlich alle 300 bp) und einer sehr geringen Rate an Neumutationen unterliegen (Manolio et al., 2008). Zudem ermöglicht die kleine Größe und das geringe Gewicht der zu untersuchenden Sequenzabschnitte die Verwendung von Genotypisierungsmethoden wie MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, siehe 2.2.7.4), die durch ihren hohen Durchsatz die Effizienz der Studie steigern (Strachan und Read, 2005). Bei genomweiten Assoziationsanalysen (GWAS) wird eine sehr große Anzahl von Markern untersucht, die über das gesamte Genom verteilt vorkommen. Sind bereits Pathomechanismen einer Erkrankung bekannt, können assoziierte oder flankierende SNPs der Risikogene in einem engeren Kandidatenansatz analysiert werden.

Im Anschluss an die Bestimmung des Genotyps an den verschiedenen Loci und die Berechnung der jeweiligen Allelfrequenzen im Fall- und Kontrollkollektiv, folgt die statistische Betrachtung (siehe 2.2.9). Lässt sich bei einem SNP eine der beiden Allelausprägungen signifikant häufiger unter den Patienten nachweisen als unter den Kontrollen bedeutet dies zunächst einmal nur, dass eine Assoziation dieses Markers mit dem Phänotyp besteht. Es gibt also einen Hinweis darauf, dass Allelträger ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung der untersuchten Erkrankung haben (Lewis, 2002). Der kausale Zusammenhang kann vielfältig sein. Zum einen kann das Allel direkt krankheitsverursachend sein (direkte Assoziation), indem es in einer proteinkodierenden Region liegt oder sich in einer regulatorischen Region des Krankheitsgens befindet. Zum anderen kann auch ein Kopplungsungleichgewicht zwischen dem Polymorphismus und dem krankheitsverursachenden Gen bzw. der krankheitsdisponierenden Variante bestehen (indirekte Assoziation) (Bickeböller und Fischer, 2007). Das in 1.2.1 beschriebene LD ist somit von immenser Bedeutung für Assoziationsstudien, da es

ermöglicht Risikogene zu detektieren (Wall und Pritchard, 2003) oder die Region einzuschränken, in der sie zu finden sein müssen. Den statistischen Ergebnissen schließt sich dann im nächsten Schritt die genauere Untersuchung der assoziierten Kandidatengenregion an.

1.3 Assoziationsbefunde bei sozialer Phobie

Es existieren bisher nur wenige Studien, die sich mit der Identifizierung von Risikogenen der sozialen Phobie beschäftigt haben. Darunter sind viele, die neben Patienten der sozialen Phobie auch Betroffene anderer Angsterkrankungen in ihr Fallkollektiv eingeschlossen haben. Lediglich zwei Studien konnten bis dato signifikante SNPs in einem reinen SAD-Kollektiv nachweisen.

(1) Donner und Kollegen analysierten in einer Assoziationsstudie zur Angststörung 13 menschliche Kandidatengene, deren homologe chimäre Gene bereits mit ängstlichem Verhalten bei Mäusen korreliert wurden. Unter den 208 ausgewählten SNPs erreichte rs818702 bei *ALAD* und rs7240351 in *CDH2* einen P-Wert $\leq 0,01$ ($p = 0,008$ und $p = 0,006$) unter allen eingeschlossenen SAD-Patienten (Donner et al., 2008). Bei Mäusen mit erhöhtem Angstverhalten konnte die Expression von *Alad* vermehrt im Hippocampus und periaquäduktalem Grau, sowie die Expression von *Cdh2* vermehrt in der Hypophyse nachgewiesen werden (Hovatta et al., 2005).

(2) Sipilä und Kollegen untersuchten, ob Gene der zirkadianen Rhythmik, die als prädisponierend für die bipolare Störung, Depression und Alkoholabhängigkeit beschrieben wurden, ebenfalls zu Angststörungen beitragen. Unter 131 SNPs aus 13 Kandidatengenen konnte für rs2306073 in *ARNTL2* und rs7131056 in *DRD2* eine signifikante Assoziation ($p = 0,0099$ und $p = 0,0084$) unter Patienten der sozialen Phobie nachgewiesen werden (Sipilä et al., 2010). Für das Gen *DRD2* ließen sich auch in der Gruppe der Patienten mit generalisierter Angststörung und der Gruppe aller Angststörungen (GAD, SAD, PD, Agoraphobie und nicht näher spezifizierte Angststörungen) signifikant assoziierte Polymorphismen nachweisen. Zudem belegen frühere Studien die Rolle von *DRD2* bei komorbide auftretender Angststörung und Alkoholabhängigkeit (Joe et al., 2008). Sipilä und Kollegen konnten dies in einer zweiten

Analyse bestätigen, indem sie größere Signifikanz der zuvor beschriebenen SNPs innerhalb *DRD2* unter den Fällen mit komorbidem Alkoholmissbrauch nachwiesen im Vergleich zu der Gruppe der Fälle ohne Alkoholabhängigkeit als Nebendiagnose.

1.4 Molekulargenetische Befunde psychiatrischer Erkrankungen mit Relevanz für die soziale Phobie

Nelson und Kollegen fanden starke Belege für ein gemeinsames genetisches Risikoprofil zwischen SAD und MDD (Nelson et al., 2000). Loken und Kollegen wiesen in einer Zwillingsstudie genetische Überschneidungen zwischen Agoraphobie und SAD nach und Hettema und Kollegen fanden gemeinsame genetische Faktoren bei GAD, PD und Agoraphobie, welche teilweise mit denen der SAD überlappten (Hettema et al., 2005; Loken et al., 2014). Des Weiteren zeigt sich eine erhöhte Prävalenz von SAD unter den Nachkommen von Eltern mit BD (Duffy et al., 2013; Hirshfeld-Becker et al., 2006). Zudem existieren viele Hinweise auf eine gemeinsame genetische Ätiologie von BD und SCZ. Familienstudien zeigten, dass das Erkrankungsrisiko für Verwandte ersten Grades eines BD-Patienten sowohl für BD als auch für SCZ erhöht ist und anders herum (Lichtenstein et al., 2009). Außerdem konnten molekulargenetische Studien gemeinsame Loci mit Prädisposition für beide Erkrankungen nachweisen (Berrettini, 2003). Neben den genetischen Gemeinsamkeiten zwischen SCZ und BD wird auch für andere Paare aus dem psychiatrischen Formenkreis Überlappung beschrieben. Für BD finden sich gemeinsame Risikogene mit MDD, ASD und ADHD und es existieren Studien die ätiologische Schnittstellen zwischen ASD und ADHD, ASD und SCZ sowie ADHD und MDD nachgewiesen haben (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013). Gerade diese genetischen Überschneidungen sind von großem Interesse bei der Analyse anderer psychiatrischer Erkrankungen, wie beispielsweise der sozialen Phobie. Auch Knappe und Kollegen vermuten, dass eine familiäre Häufung der sozialen Phobie zum Teil durch sogenannte "cross-disorder" Risikofaktoren verursacht wird (Knappe et al., 2010). Deshalb werden im Folgenden die, im Hinblick auf die vorliegende Arbeit wichtigsten, Assoziationsbefunde aus Studien zu Angsterkrankungen und bipolarer Störung sowie die Ergebnisse einer großen

GWAS-Metaanalyse zu fünf bedeutenden psychiatrischen Störungen (ADHD, ASD, BD, MDD, SCZ) dargestellt.

1.4.1 Assoziationsbefunde bei Panikstörung und anderen Angsterkrankungen

(1) Durch ihre Auswirkungen auf Verhalten und Kognition stellen Gene der Mannosidase interessante Kandidaten bei Analysen zur Identifikation von Risikovarianten von Angststörungen dar. Für rs1133503 innerhalb des Alpha-Endomannosidase Gens *MANEA* konnten zwei Studien signifikante Assoziation zu Substanzabhängigkeit und kokaininduzierter Paranoia nachweisen (Farrer et al., 2009; Yu et al., 2008). Unter der Hypothese, dass ein Polymorphismus in *MANEA* zudem Auswirkungen auf psychiatrische Erkrankungen hat, untersuchten Jensen und Kollegen die Assoziation zwischen rs1133503 und den vier psychischen Störungen PD, MDD, posttraumatische Belastungsstörung (posttraumatic stress disorder, PTSD) und dissoziale Persönlichkeitsstörung (antisocial personality disorder, ASPD) und bestätigten diese bei PD-Patienten europäisch-amerikanischer Herkunft ($p = 0,002$). Zur weiteren Analyse des Befundes wurde die Studie um ein Kollektiv mit 131 Patienten der SAD sowie 202 Kontrollen erweitert. Auch hier bestätigte sich, dass das Risiko für die Entwicklung einer sozialen Phobie durch das Vorhandensein des C-Allels bei rs1133503 steigt (Jensen et al., 2014).

(2) Das Rat Genome Sequencing Consortium berichtet über vermehrtes Angstverhalten bei Ratten mit Polymorphismen im Catenin- $\delta 2$ Gen (*CTNND2*). Nivard und Kollegen gelang es die Rolle von *CTNND2* in der Pathogenese von Angststörungen ebenfalls beim Menschen zu bestätigen (Nivard et al., 2014). Unter 1714 Fällen, zusammengesetzt aus Patienten der PD, SAD, GAD und Agoraphobie ließ sich der SNP rs1012176 in *CTNND2* überzufällig häufiger nachweisen als unter den 1349 Kontrollen.

(3) Der Polymorphismus rs769407 im Gen der Glutamatdecarboxylase 1 (*GAD1*) stellt einen weiteren Teil der genetischen Überlappung zwischen verschiedenen Formen von Angststörung dar. *GAD1* war bei Donner und Kollegen das einzige Gen mit signifikanter Assoziation zum untersuchten Phänotyp. Die Fall-Kontroll-Studie analysierte 93 SNPs in 16 Genen mit bereits beschriebenem Einfluss auf die Entwicklung von Angststörung

oder ängstlicher Persönlichkeit in einem Kollektiv aus 282 Patienten mit PD, GAD, SAD, Agoraphobie und nicht näher spezifizierter Phobie, sowie 575 Kontrollen. Drei SNPs erreichten das Signifikanzniveau von $< 0,01$. Alle befanden sich innerhalb *GAD1* und rs769407 stellte mit $p = 0,0005$ den Topbefund dar (Donner et al., 2012). In der anschließenden Haplotypenanalyse konnte in der Subgruppe der drei Phobien ebenfalls eine Assoziation für *GAD1* nachgewiesen werden.

(4) Erhardt und Kollegen konnten 2011 für die beiden SNPs rs7309727 und rs11060369 im Gen *TMEM132D* eine Assoziation zu PD in drei unabhängigen deutschen Fall-Kontroll-Kollektiven aus insgesamt 909 Fällen und 915 Kontrollen nachweisen, jedoch ohne ausreichende Signifikanz nach der Korrektur für multiples Testen (Erhardt et al., 2011). Eine Metaanalyse mit fünf zusätzlichen und unabhängigen Kollektiven aus Europa, USA, Canada und Japan, insgesamt 2678 Fälle und 3262 Kontrollen umfassend, bestätigte die Assoziation zwischen PD und den beiden SNPs der Originalstudie. Durch Ausschluss des japanischen Kollektivs erreichte rs7309727 einen p-Wert von $3,98 \times 10^{-6}$ und rs11060369 einen p-Wert von $7,64 \times 10^{-5}$. Den besten Befund ($p = 1,05 \times 10^{-8}$) erreicht rs7309727 innerhalb des Subkollektivs aus europäisch-amerikanischen Patienten mit PD ohne MDD, BD, SCZ oder Substanzenmissbrauch (Erhardt et al., 2012)

(5) Obwohl die genaue Wirkweise von SSRIs bisher nicht eindeutig geklärt ist, bestätigen diverse klinische Studien ihnen eine positive Modulation von Angstsymptomen bei Patienten mit PD, SAD, GAD, PTSD und Zwangsstörung (obsessive-compulsive disorder, OCD). Dies legt die Vermutung eines gemeinsamen Pathomechanismus im serotonergen System zwischen den oben genannten Erkrankungen nahe. Vor diesem Hintergrund untersuchten Strug und Kollegen in einer Fall-Kontroll-Studie mit PD-Fällen, SAD-Fällen und PD+SAD-Fällen Gene mit Einfluss auf die neurobiologische Wirkung von Serotonin (*SLC6A4* und *HTR1A*) sowie drei weitere Gene, denen eine Bedeutung bei der Pathogenese von PD (*COMT*) oder beim Angstverhalten im Mausmodell (*RGS2* und *GRPR*) nachgewiesen wurde. Es ließen sich ausschließlich im Gen des Serotonin Transporters *SLC6A4* signifikante SNPs finden, wobei rs140701 mit $p = 0,001$ für die Gruppe der PD-Fälle den stärkst assoziierten Marker darstellt (Strug et al., 2010).

1.4.2 Assoziationsbefunde bei bipolarer Störung

(1) In einer groß angelegten GWAS der Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group konnten in einem Kollektiv aus 7481 BD-Fällen und 9250 Kontrollen 34 SNPs mit $p < 5 \times 10^{-5}$ nachgewiesen werden. Diese wurden in einem unabhängigen Kollektiv aus 4496 BD-Fällen und 42422 Kontrollen nachverfolgt. In einer kombinierten Analyse aller Probanden (primäre GWAS und Replikationskohorte) wurde eine genomweite Assoziation für rs4765913 in *CACNA1C* ($p = 1,52 \times 10^{-8}$) sowie für rs12576775 im ersten Intron des Gens *ODZ4* ($p = 4,40 \times 10^{-8}$) nachgewiesen (Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011). *ODZ4* kodiert für ein Oberflächenprotein mit Beteiligung an intrazellulärer Signaltransduktion und zielgerichteter Aussprossung von Nervenzellaxonen. Ein prädisponierender Effekt des Gens *CACNA1C* auf psychiatrische Erkrankungen wurde bereits in mehreren Studien nachgewiesen, wie unter anderem 2008 von Ferreira und Kollegen in einem Kollektiv aus Patienten mit bipolarer Störung und 2010 von Green und Kollegen für Schizophrenie und Depression (Ferreira et al., 2008; Green et al., 2010).

(2) Durch den Zusammenschluss der Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group mit dem Kollektiv des Schizophrenia Psychiatric GWAS Consortium (16374 Fälle und 14044 Kontrollen) konnten drei weitere genomweit signifikante Loci identifiziert werden. Zum einen ein weiterer Polymorphismus in *CACNA1C* (rs4765905) mit $p = 7 \times 10^{-9}$, zum anderen rs10994359 in *ANK3* mit $p = 2,5 \times 10^{-8}$ und als drittes rs2239547 zwischen *ITIH3* und *ITIH4* mit $p = 7,8 \times 10^{-9}$ (Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011).

(3) In der primären Analyse der GWAS der PGC Bipolar Disorder Working Group konnte bereits für rs9371601 innerhalb *SYNE1* eine Assoziation zur bipolaren Störung mit $p < 5 \times 10^{-8}$ aufgezeigt werden. Green und Kollegen bestätigten diese Assoziation in einem neuen unabhängigen Kollektiv (1527 BD-Fälle, 1579 Kontrollen; $p = 0,0095$). Für den Polymorphismen ergibt sich in einem weiteren Kollektiv zudem eine Assoziation zur Depression (1159 MDD-Fälle, 2592 Kontrollen; $p = 0,032$) (Green et al., 2013a).

(4) Cichon und Kollegen fanden bei 2411 BD-Patienten und 3613 Kontrollen einen genomweit signifikanten Polymorphismus (rs1064395; $p = 3 \times 10^{-8}$) im Gen des

Glykoproteins Neurocan (*NCAM*) und lokalisierten dessen Expression in kortikalen und hippocampalen Gehirnarealen (Cichon et al., 2011), womit ihm eine wichtige Beteiligung an Kognition und Emotion zukommt.

(5) Mühleisen und Kollegen konnten in einer großangelegten GWAS zur BD mit 24025 Patienten und Kontrollen für die bereits bekannten Gene *ANK3* und *ODZ4* genomweite Signifikanz bestätigen. Für den Polymorphismus rs6550435, in der Nähe des Gens *TRANK1*, für den Green und Kollegen zuvor kein ausreichendes Signifikanzniveau aufzeigen konnten (Green et al., 2013b), wiesen sie genomweite Signifikanz nach ($p = 2,1 \times 10^{-8}$) (Mühleisen et al., 2014). Zudem handelte es sich bei ihrem dritt- und vierbesten Befund um zwei bisher unbeschriebene Risikoloci für BD: *ADCY2* und eine Region zwischen *MIR2113* und *POU3F2* (Mühleisen et al., 2014). Für *ADCY2* auf Chromosom 5p15 konnten in der Studie zwei genomweit signifikante SNPs gefunden werden, mit rs1782616 als Topbefund ($p = 9,9 \times 10^{-9}$). *ADCY2* kodiert für ein membrangebundenes Enzym zur cAMP-Synthese und wird im Gehirn exprimiert. Vier weitere genomweit signifikante SNPs befanden sich in der Region zwischen *MIR2113* und *POU3F2* auf Chromosom 6q16, wobei rs12202969 die stärkste Assoziation zeigte ($p = 1,1 \times 10^{-8}$).

(6) Der von O'Donovan und Kollegen 2008 beschriebene Locus rs1344706 im Gen *ZNF804A* konnte 2010 von Williams und Kollegen bestätigt werden. Schon die erste GWAS mit 479 SCZ-Patienten und 2937 Kontrollen, sowie ein follow-up der 12 am stärksten assoziierten Loci mit 16726 Individuen ergab für rs1344706 einen p-Wert von $1,61 \times 10^{-7}$. Durch den Einschluss von BD-Patienten zeigte sich eine noch stärkere Assoziation ($p = 9,96 \times 10^{-9}$) (O'Donovan et al., 2008). Im größeren Kollektiv von Williams und Kollegen (21274 Patienten mit BD und Schizophrenie sowie 38675 Kontrollen) konnte für rs1344706 ein Signifikanzniveau von $p = 4,1 \times 10^{-13}$ erreicht werden (Williams et al., 2011).

1.4.3 Assoziationsbefunde fünf psychiatrischer Erkrankungen

Vor dem Hintergrund der beobachteten genetischen Überlappung unter psychiatrischen Erkrankungen untersuchte die Cross-Disorder Group des Psychiatric Genomics

Consortium in einer Metaanalyse von GWAS Daten aus über 19 Ländern die Assoziation von genetischen Marker zu den fünf psychiatrischen Erkrankungen BD, SCZ, MDD, ASD und ADHD. Für vier der untersuchten Loci konnte ein genomweit signifikantes Ergebnis mit $p < 5 \times 10^{-8}$ erzielt werden (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013). Die stärkste Assoziation zeigte rs2535629 auf Chromosom 3p21, welcher sich im Intron von *ITIH3* befindet. Für den intronischen SNP rs11191454 innerhalb von *AS3MT* auf Chromosom 10q24 bestand die zweitstärkste Assoziation. Weitere genomweit signifikante SNPs waren rs1024582 und rs2799573, welche in intronischen Sequenzen der Gene *CACNA1C* und *CACNB2* liegen. Diese kodieren für Untereinheiten spannungsabhängiger Kalziumkanäle (Voltage-gated calcium channel, VGCC), welche unter anderem im Gehirn exprimiert werden. Für rs1024582 ergab sich in der Metaanalyse eine signifikante Heterogenität und weitere Analysen zur Spezifizierung der Krankheitsdisposition zeigten für den Polymorphismus in *CACNA1C* ausschließlich einen Effekt für BD und SCZ auf.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage welche genetischen Varianten mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für die soziale Phobie einhergehen. Ziel war die Validierung bereits beschriebener Risikovarianten für die soziale Phobie sowie der Nachweis neuer Suszeptibilitätsvarianten durch die systematische Untersuchung von SNPs mit bekannter Assoziation zu anderen psychiatrischen Erkrankungen. Es sollte festgestellt werden, ob es sich hierbei um cross-disorder Risikofaktoren handelt, die ebenfalls für die soziale Phobie prädisponieren. Dazu wurden durch Literaturrecherche gezielt ausgewählte SNPs in einem bisher nicht genotypisierten Kollektiv aus SAD-Patienten und Kontrollen zentraleuropäischer Ethnizität analysiert. Von der Identifikation genetischer Risikovarianten erhofft man sich ein besseres Verständnis der Krankheitsätiologie und der zugrunde liegenden Pathomechanismen. Ein Wissenszuwachs in diesem Bereich kann bei der Entwicklung gezielterer Medikamente für die soziale Phobie von Bedeutung sein sowie einen Fortschritt in der Diagnostik und Prävention der weitverbreiteten Erkrankung bewirken.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav

- Systec D-150, Systec GmbH
- Varioklav[®] 135 S Dampfsterilisator, H + P Labortechnik GmbH

Eismaschine

- AF 100, Scotsman

Schüttel- und Mischgeräte

- Vortex Genie 2[®], Scientific Industries Inc.
- DMS-2500 High Speed Microplate Shaker, VWR International GmbH
- REAX2 Überkopfschüttler, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG

Zentrifugen

- Megafuge 1.0 R, Heraeus GmbH
- Biofuge fresco, Heraeus GmbH
- Mikrozentrifuge MiniStar silverline, VWR International GmbH

Pipettierhilfen

- Biomek[®] NX MC Laboratory Automation Workstation, Beckman Coulter GmbH
- Biomek[®] NX S8 Laboratory Automation Workstation, Beckman Coulter GmbH
- Transferpette[®]-8, BRAND GmbH & Co. KG
- Eppendorf Research, Eppendorf AG Deutschland
- Eppendorf Research pro, Eppendorf AG Deutschland
- Eppendorf Varispenser plus, Eppendorf AG Deutschland

Nukleinsäure-Isolierung und -Aufreinigung

- chemagic Magnetic Separation Module I, PerkinElmer chemagen Technologie GmbH
- Roti[®]-Prep Plasmid MINI Säulen, Carl Roth GmbH & Co. KG

Nukleinsäure-Messgeräte

- NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab Biotechnology GmbH
- NanoDrop[®] 8000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc.

PCR-Cycler

- Mastercycler[®] pro, Eppendorf AG Deutschland

Nanodispenser

- MassARRAY[™] Nanodispenser, SAMSUNG Techwin Co. Ltd. für Sequenom[®] GmbH

Chip

- SpectroCHIP[®] II - G384, Sequenom[®] GmbH

MALDI-TOF Mass Spectrometer / Genotypisierungssystem

- MassARRAY[™] Compact Analyzer, Bruker Daltonics Inc. für Sequenom[®] GmbH

2.1.2 Chemikalien, Puffer und Lösungen

- Natriumhypochloridlösung (12 % Cl) (NaClO in H₂O), Carl Roth GmbH & Co.KG
- Ethanol (C₂H₅OH) (EtOH) (95 %), AppliChem GmbH
- Clean Resin, Sequenom[®] GmbH
- Tris-EDTA (TE⁻⁴): 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl pH 8,0
- H₂O Millipore

2.1.3 Kommerzielle Kits zur Nukleinsäureisolierung und -aufreinigung chemagic DNA Blood Kit special:

- Protease, PerkinElmer chemagen Technologie GmbH
- Lysis Buffer 1, PerkinElmer chemagen Technologie GmbH
- Binding Buffer 2, PerkinElmer chemagen Technologie GmbH
- Magnetic Beads, PerkinElmer chemagen Technologie GmbH
- Wash Buffer 3-6, PerkinElmer chemagen Technologie GmbH

2.1.4 Ergänzende Materialien zur Analyse von Nukleinsäuren

- PCR Buffer (10x) mit MgCl₂ [15 mM], Qiagen GmbH
- MgCl₂ [25 mM], Qiagen GmbH
- Desoxyribonukleosidtriphosphate (d-NTPs) [10 mM], Labomedic GmbH
- Oligonukleotid-Primer, Metabion GmbH

- MALDI-TOF HotStar Taq[®] DNA Polymerase [5 U/μl], Qiagen GmbH
- SAP-Buffer, Sequenom[®] GmbH
- Shrimp Alkaline Phosphatase Enzym, Sequenom[®] GmbH
- iPlex[®] Buffer Plus (10x), Sequenom[®] GmbH
- iPlex[®] Termination Mix, Sequenom[®] GmbH
- iPlex[®] Enzym, Sequenom[®] GmbH
- 3-Pt. Calibrant, Liquid, Sequenom[®] GmbH

2.1.5 Datenbanken und Softwares

DNA-Verwaltung

- 2D Cypher™ 1,2 ml Cluster Tubes und Racks, ABgene, Thermo Scientific
- 2D Cypher™ SmartScan Solo, ABgene, Thermo Fisher Scientific Inc.
- 2D Cypher™ SmartScan 96, ABgene, Thermo Fisher Scientific Inc.
- FluidX Tubes und Racks, Brooks Automation Inc.
- XTR-96 Whole Rack 2D Code Reader, FluidX Ltd.

Software

- Magnetic Separator, PerkinElmer chemagen Technologie GmbH
- NanoDrop[®] ND-100 v3.3.0, Peqlab Biotechnology GmbH
- NanoDrop[®] ND-8000 v2.1.0, Thermo Fisher Scientific Inc.
- 2D CYPHER™ Pilot Databases, ABgene, Thermo Fisher Scientific Inc.
- FluidX Scanner Software, Brooks Automation Inc.
- Biomek[®] Software, Beckman Coulter
- Nanodispenser Software, Sequenom[®]
- MassARRAY Typer 4.0, Sequenom[®]
- MassARRAY Assay Design Software, Sequenom[®]
- Mass Spectrometer Software (Software package: Typer, QGE, EpiTYPER, OligoCheck), Bruker Daltonics Inc. für Sequenom[®] GmbH
- PLINK Version v1.07, Whole-genome association analysis toolset, Autor: Shaun Purcell (Purcell et al., 2007), URL: <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenkollektiv

Die Patienten der vorliegenden Studie wurden durch die Klinik und Poliklinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie des Universitätsklinikums Bonn rekrutiert. Haupteinschlusskriterium war die Diagnose einer sozialen Phobie, welche durch geschulte Untersucher anhand des Strukturierten Klinischen Interviews für DSM-IV Achse I Störungen (SKID-I) gestellt bzw. bestätigt wurde. Zudem mussten die Patienten zentral-europäischer Herkunft (d.h. alle vier Großeltern wurden in Zentraleuropa geboren) und 18 Jahre oder älter sein. Unzureichende Kenntnisse der deutschen Sprache sowie körperliches und/oder geistiges Unvermögen bei der Beantwortung der Fragebögen führten zum Ausschluss aus der Studie. Das Fallkollektiv umfasste 321 Patienten von denen 144 (44,9 %) männlich und 177 (55,1 %) weiblich waren. Das mittlere Alter des Fallkollektivs war 44,6 Jahre.

Des Weiteren wurden personenbezogene Daten wie Geschlecht, Alter, Partnerschaft und Ausbildungsniveau sowie relevante Achse-I Nebendiagnosen erfasst. Patienten mit der Diagnose Schizophrenie oder bipolare Störung (n=14) wurden aus dem Patientenkollektiv ausgeschlossen. Der Schweregrad der Angstsymptome wurde anhand des Soziale-Phobie-Inventars (SPIN) bestimmt (siehe 1.1.4). Die Ausprägung einer möglichen, komorbiden Depression wurde mithilfe des Beck-Depressions-Inventar (BDI) klassifiziert. Dieser Selbstbeurteilungsfragebogen besteht aus 21 Fragen mit je vier Antwortmöglichkeiten, aus denen der Proband die für ihn zutreffendste Antwort auswählt. Mithilfe des Temperament- und Charakterinventar (TCI), bestehend aus 240 Ja-/Nein-Fragen zu persönlichen Zielen und Werten, zum eigenen Selbstkonzept sowie zu Gefühlen und emotionalem Verhalten, wurde der Grad an Schadensvermeidung (HA) ermittelt (siehe 1.1.3). Die Zusammenstellung der phänotypischen Daten wurde von Frau Dipl.-Psych. Stefanie Rambau durchgeführt (siehe Tabelle 1). Alle Probanden gaben ihr mündliches und schriftliches Einverständnis zur Dokumentation und Auswertung der erhobenen Daten sowie zur Entnahme von Blutproben und deren Verwendung für molekulargenetische Analysen. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Bonn genehmigt.

Tab. 1: Demographische und medizinische Daten des Fallkollektivs (nach QC).
Modifiziert nach Forstner et al. (2017).

	Info vorhanden	Mittelwert (SD)	n	%
Demographische Daten				
männlich			132	43,6
weiblich			171	56,4
Alter		44,25 (13,58)		
In Partnerschaft	255		139	54,5
Ausbildungsstand	267			
keine Ausbildung			1	0,4
Weiterführende Schule			106	39,7
Abitur/ Hochschule			160	59,9
Nebendiagnosen (Achse-I)				
Panikstörung	278		90	32,4
Generalisierte Angststörung	264		45	17,0
Spezifische Angststörung	261		85	32,6
Depression	292		221	75,7
Alkoholabusus	287		66	23,0
Drogenabusus	263		21	8,0
Medikamentenabusus	257		21	8,2
Symptom- und Persönlichkeitsgraduierung				
Schweregrad der Angstsymptome	284	40,77 (11,50)		
Schweregrad depressiver Symptomatik	286	19,52 (10,80)		
Grad an Schadensvermeidung	281	26,64 (5,58)		

2.2.2 Kontrollkollektiv

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn wurden die DNA-Proben des Kontrollkollektivs aus den Buffy-Coats ausgewählter Blutspender gewonnen und für die vorliegende Dissertation zur Verfügung gestellt. Einschlusskriterium war die zentraleuropäische Herkunft (d.h. alle vier Großeltern wurden in Zentraleuropa geboren). Es erfolgte kein Screening auf soziale Phobie oder andere psychiatrische Erkrankungen. Bei einer Prävalenz der sozialen Phobie von ca. 11 - 13 % (Kessler et al., 2012; Stein

und Stein, 2008) sollte es zu keiner wesentlichen Reduktion der Teststärke gekommen sein (Moskvina et al., 2005). Das Kontrollkollektiv umfasste 804 Personen, davon 366 (45,5 %) Männer und 438 (54,5 %) Frauen. Das mittlere Alter des Kontrollkollektivs war 33,4 Jahre. Alle Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung ihrer Blutproben für Forschungszwecke.

2.2.3 SNP-Auswahl

In der vorliegenden Dissertation wurden insgesamt 24 genetische Varianten analysiert. Ausgewählt wurden SNPs, für die bereits eine signifikante Assoziation zur sozialen Phobie nachgewiesen werden konnte. Zusätzliches Einschlusskriterium waren signifikante Ergebnisse aus Assoziationsstudien/GWAS zu Angsterkrankungen und bipolarer Störung sowie aus einer cross-disorder GWAS zu den fünf psychiatrischen Erkrankungen bipolare Störung, Schizophrenie, Depression, Autismus-Spektrum-Störung und Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung.

Tab. 2: SNPs mit Assoziation zur sozialen Phobie.

Abkürzungen Tab. 2 - 5: SNP: Einzelnukleotid-Polymorphismus; SAD: soziale Phobie; PD: Panikstörung; GAD: generalisierte Angststörung, BD: bipolare Störung; SCZ: Schizophrenie; MDD: Depression; ASD: Autismus-Spektrum-Störung; ADHD: Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung. Tab. 2 - 5 modifiziert nach Forstner et al. (2017).

SNP	Gen	Publikation	assozierte Erkrankung
rs818702	<i>ALAD</i>	Donner et al. 2008	SAD
rs7240351	<i>CDH2</i>	Donner et al. 2008	SAD
rs2306073	<i>ARNTL2</i>	Sipilä et al. 2010	SAD
rs7131056	<i>DRD2</i>	Sipilä et al. 2010	SAD

Tab. 3: SNPs mit Assoziation zu Angsterkrankungen.

SNP	Gen	Publikation	assozierte Erkrankungen
rs1133503	<i>MANEA</i>	Jensen et al. 2014	PD, SAD
rs1012176	<i>CTNND2</i>	Nivard et al. 2014	PD, SAD, GAD, Agoraphobie
rs769407	<i>GAD1</i>	Donner et al. 2012	PD, SAD, GAD, Agoraphobie, nicht spezifizierte Phobien
rs7309727	<i>TMEM132D</i>	Erhardt et al. 2012	PD
rs140701	<i>SLC6A4</i>	Strug et al. 2010	PD, SAD

Tab. 4: SNPs mit Assoziation zur bipolaren Störung

SNP	Gen	Publikation	assozierte Erkrankungen
rs4765913	<i>CACNA1C</i>	Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011	BD
rs12576775	<i>ODZ4</i>	Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011	BD
rs4765905	<i>CACNA1C</i>	Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011	BD, SCZ
rs10994359	<i>ANK3</i>	Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011	BD, SCZ
rs2239547	<i>ITIH3-ITIH4</i>	Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011	BD, SCZ
rs9371601	<i>SYNE1</i>	Green et al. 2013	BD, MDD
rs1064395	<i>NCAN</i>	Cichon et al. 2011	BD
rs6550435	<i>TRANK1</i>	Mühleisen et al. 2014	BD
rs17826816	<i>ADCY2</i>	Mühleisen et al. 2014	BD
rs12202969	<i>MIR2113;</i> <i>POU3F2</i>	Mühleisen et al. 2014	BD
rs1344706	<i>ZNF804A</i>	Williams et al. 2011	BD, SCZ

Tab. 5: SNPs mit Assoziation in der cross-disorder GWAS

SNP	Gen	Publikation	assozierte Erkrankungen
rs1024582	<i>CACNA1C</i>	Cross-Disorder Group PGC 2013	SCZ, BD
rs2799573	<i>CACNB2</i>	Cross-Disorder Group PGC 2013	SCZ, BD, MDD, ASD, ADHD
rs2535629	<i>ITIH3</i>	Cross-Disorder Group PGC 2013	SCZ, BD, MDD, ASD, ADHD
rs11191454	<i>AS3MT</i>	Cross-Disorder Group PGC 2013	SCZ, BD, MDD, ASD, ADHD

2.2.4 DNA-Isolierung und Aufbereitung

Die Isolierung der DNA erfolgte automatisiert mithilfe des chemagic Magnetic Separation Module I (MSM I) aus 10 ml Vollblut (PerkinElmer chemagen Technologie GmbH). Das Funktionsprinzip des Moduls beruht dabei auf kleinen magnetischen Partikeln (magnetic beads), an deren Oberfläche verschiedene funktionelle Gruppen angehängt werden können, die eine Bindung zwischen den magnetic beads und der Zielsubstanz, hier humane DNA, ermöglichen (Berensmeier, 2006). Über eine Änderung des pH-Wertes und damit der Polarität der DNA, kann gesteuert werden, ob die DNA frei in Lösung oder gebunden vorliegt.

Im ersten Reaktionsschritt werden die Zellkerne lysiert, um die DNA freizusetzen. Dazu wird 10 ml Vollblut aus dem EDTA Röhrchen in ein 50 ml Tube überführt und 50 μ l Protease sowie 8 ml Lysepuffer hinzugegeben. Der Ansatz wird im MSM I durch eintauchende, rotierende Metallstäbe 20 Minuten lang gemischt, um eine effiziente Lyse zu gewährleisten. Anschließend werden 28 ml Bindungspuffer (pH: 5,4 - 5,9) und 1,2 ml magnetic beads hinzugegeben und erneut mithilfe des MSM I vermischt. Das saure Milieu führte zu einem Ladungswechsel der DNA von negativ zu positiv, wodurch eine Bindung der DNA an die negativ geladenen funktionellen Gruppen der magnetic beads erreicht wird. Bei Magnetisierung der Metallstäbe sammeln sich die beads mit der gebundenen DNA an deren Spitzen und können in die nachfolgenden Tubes überführt werden. Die darin enthaltenen Waschpuffer lösen Salze und Proteine von der DNA. Die Waschvorgänge werden bei ausgeschaltetem Magneten durch Rotation der Metallstäbe beschleunigt. Nach fünf Waschvorgängen folgt die Elution der DNA in TE⁻⁴, welches mit einem pH-Wert von 8 einen erneuten Polaritätswechsel der DNA bewirkt. Da so keine Bindung zwischen der DNA und den magnetic beads mehr vorliegt, können die beads mithilfe der magnetisierten Metallstäbe entfernt werden und die gereinigte DNA verbleibt im Elutionsansatz.

Tab. 6: Protokoll zur DNA-Isolierung aus 10 ml Vollblut

Reaktionsschritt	Volumen	Reagenz	pH-Wert
Lyse	10 ml	Blut	
	50 μ l	Protease	
	8 ml	Lysis Buffer 1	6,8 - 7,4
Bindung	28 ml	Binding Buffer 2	5,4 - 5,9
	1,2 ml	Magnetic Beads	
Waschvorgänge	15 ml	Wash Buffer 3	5,1 - 5,6
	15 ml	Wash Buffer 4	5,1 - 5,6
	15 ml	Wash Buffer 5	5,1 - 5,6
	2 ml	Wash Buffer 6	6,0 - 6,7
	15 ml	Wash Buffer 6	6,0 - 6,7
Elution	1 ml	TE ⁻⁴	8

2.2.5 Analyse der DNA

Um sicherzustellen, dass die DNA nach der Extraktion aus dem Vollblut in ausreichender Menge und Qualität vorhanden ist, wurden alle Proben mit NanoDrop ND-1000 (PepqLab Biotechnology GmbH) analysiert. Dieses Photometer berechnet anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm die Konzentration der DNA nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz (Atkins und de Paula, 2013).

Für die Messung werden 1,5 μ l der Probe zwischen den unteren und oberen optischen Sensor des NanoDrops gegeben. Diese geringe Menge reicht bereits aus, um eine Flüssigkeitssäule zwischen den beiden Sensoren zu bilden, die als Lichtweg fungiert. Da ein Referenzspektrum zur Berechnung benötigt wird, wird vor der Messung der Probe die Extinktion des Suspensionsmediums, hier TE⁻⁴ oder H₂O, gemessen. Bei einer Konzentration von 2 - 100 ng/ μ l beträgt die Messabweichung ± 2 ng/ μ l und bei Konzentrationen > 100 ng/ μ l ± 2 % (aus NanoDrop 1000 Spectrophotometer User's Manual).

Da das Gerät die Extinktion über Wellenlängen von 220 nm bis 350 nm misst, können zur Überprüfung der Reinheit der DNA die Quotienten 260/280 und 260/230 gebildet werden. DNA wird bei einer Wellenlängen von 260 nm detektiert, Proteine bei einer

Wellenlänge von 280 nm und Salze bei einer Wellenlänge von 230 nm. Der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und 280 nm gibt also an, ob die DNA-Lösung Proteine enthält. Werte über 1,8 gelten als rein. Der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und 230 nm liegt häufig zwischen 1,8 und 2,2. Wesentlich kleinere Werte deuten auf eine Kontamination mit Salzen hin (aus NanoDrop 1000 Spectrophotometer User's Manual).

Alle Proben wiesen einen deutlichen DNA-Peak sowie überwiegend optimale Extinktionsquotienten auf und waren somit von sehr guter Qualität. Die zweimalige Messung der Konzentration ergab sehr konstante und ausreichende Werte.

2.2.6 Vorbereitung der Proben für die Genotypisierung

Nach Überprüfung der Reinheit der isolierten DNA und ihrer Konzentrationsbestimmung wurden alle Proben des Fall-Kontroll-Kollektivs auf eine Konzentration von 4 ng/ μ l eingestellt. Die 321 Fälle und 804 Kontrollen wurden mit 12 Positivkontrollen und 12 Negativkontrollen auf drei 384er Platten in etwa im Verhältnis 1:3 zusammengestellt. Dazu wurden je 4 μ l der Proben in die Wells der 384er Platten überführt und anschließend bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Die enthaltene DNA wurde in folgenden Schritten amplifiziert und die Kandidaten-SNPs genotypisiert.

2.2.7 Genotypisierung der ausgewählten SNPs

Die Genotypisierung der 24 SNPs wurde mithilfe des iPLEX Gold Sequenom MassARRAY Systems durchgeführt. Hierbei werden die Kandidatengenregionen zunächst durch die Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und anschließend ungebundene Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) inaktiviert (SAP-Verdau). Es folgt die eigentliche iPlex-Reaktion, bei der die Extensionsprimer um eine einzelne, zum SNP komplementäre Base, verlängert werden (Single Base Extension), welche sich dann per MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) detektieren lassen.

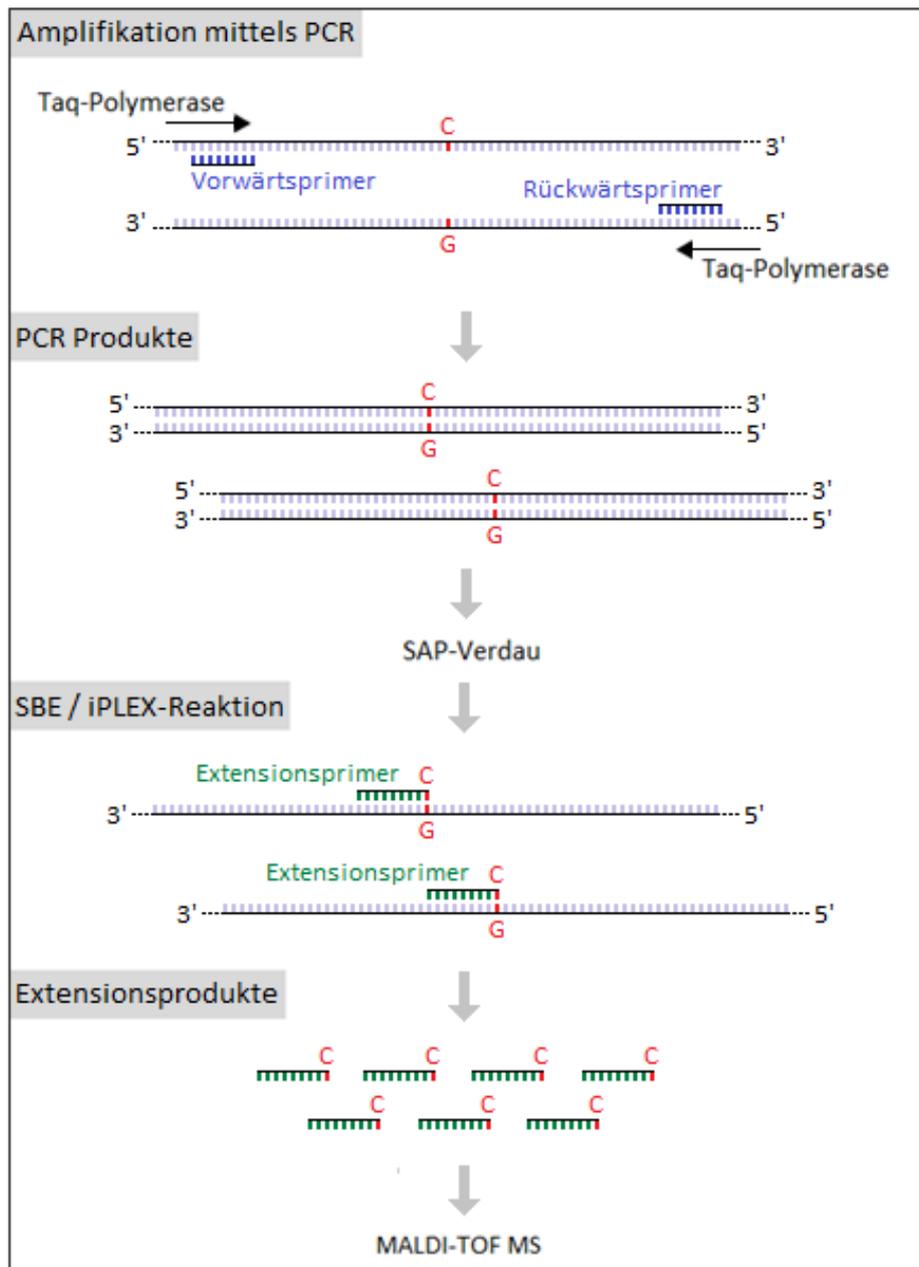


Abb. 1: Ablauf des iPLEX-Verfahrens.

Abkürzungen: PCR: Polymerase-Kettenreaktion; SAP: Shrimp Alkaline Phosphatase; SBE: Einzelbasenverlängerung; MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; C: Cytosin; G: Guanin. Modifiziert nach Oeth et al. (2005).

2.2.7.1 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dient der exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Sie besteht aus den Schritten Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Elongation (Berg et al., 2013). Durchgeführt wird sie in Thermocyclern, deren temperierbarer Reaktionsraum auf zyklische Temperaturänderungen programmiert werden kann.

Im ersten Schritt werden durch Erhitzen der DNA auf 95 °C die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen aufgebrochen, sodass die DNA anschließend einzelsträngig vorliegt und sich die Oligonukleotidprimer anlagern können. Das Temperaturoptimum für diesen Schritt beträgt 56 °C. Für die folgende Amplifikation bei 72 °C wird die hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq*) verwendet. Da sie auch bei 95 °C nicht denaturiert, können mehrere Zyklen ohne erneute Zugabe des Enzyms durchgeführt werden. Die DNA-Polymerase bindet an die Primer und verlängert diese, komplementär zum Matrizenstrang durch Verknüpfung der dNTPs unter Abspaltung von Diphosphat. Da die Verlängerung nur in 5'-3'-Richtung erfolgen kann, werden ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer benötigt um beide Stränge zu replizieren. Das Primerdesign erfolgte mit der MassARRAY Assay Design Software von Sequenom. Eine Übersicht der verwendeten Vorwärts- und Rückwärtsprimer zeigt Tabelle 7.

In Tabelle 8 sind die Reagenzien des PCR-Ansatzes aufgeführt. Der Primermix enthält die Vorwärts- und Rückwärtsprimer in einer 1:800 Verdünnung mit H₂O Millipore. Die Herstellung des Ansatzes findet auf Eis gelagert statt. Mithilfe des Pipettierroboters Biomek NX MC (Beckman Coulter GmbH) wurden je 5 µl des PCR-Ansatzes in die Wells der 384er Platten pipettiert.

Tab. 7: Übersicht der Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer

SNP_ID	2nd-PCR	1st-PCR
rs12202969	ACGTTGGATGTTACACAAAAAGACTCTGGC	ACGTTGGATGTCTGCTCTAGAATGGTAGAC
rs7309727	ACGTTGGATGCAAAGGCCTGAAAATGACCC	ACGTTGGATGCACAAGCTTCAAGCTTCCCTC
rs4765905	ACGTTGGATGCCTCAGTAAAGGTGCAGATG	ACGTTGGATGAGTAGAGAGGTTAAAAAGGG
rs140701	ACGTTGGATGGAGGAAAACTCAGCCACAAC	ACGTTGGATGCACCTTGGTGTGTGTCAAAC
rs10994359	ACGTTGGATGGCATGCTTTTACACTCAGGG	ACGTTGGATGCTTACAGGATAGTCTCTGTG
rs12576775	ACGTTGGATGTTTACAGCATCAGAGCTGG	ACGTTGGATGGCAAACAGGCACTCTGTGG
rs2239547	ACGTTGGATGATCTGCCTGGCACTTCTGAG	ACGTTGGATGAAAGGAAATGCAGTCCCCAC
rs7131056	ACGTTGGATGGTTAATCAAGGCCACACAGG	ACGTTGGATGTGTATCAGACAGATCTAGGC
rs9371601	ACGTTGGATGTGGGTGCTCAGTAGCTAAAC	ACGTTGGATGATGAAGTGCAGATACCAGCC
rs11191454	ACGTTGGATGGAAGTACGATAACGAAATGC	ACGTTGGATGATCTGGGACTCACTTTTCTCTG
rs2306073	ACGTTGGATGAGAGGTATCACCATGTCCCC	ACGTTGGATGAGAACTGTCTACTGGAAGC
rs1133503	ACGTTGGATGTTAACTGTGTGTAAGTGC	ACGTTGGATGTGCATTTCTGACTGAAATC
rs2535629	ACGTTGGATGCTGGATCTAGTGCCATCACC	ACGTTGGATGCTCTAGGCCATCAGCTGTC
rs1012176	ACGTTGGATGTCAGCTGATTGGGTGTTGG	ACGTTGGATGTCCTCAGACAAACCAGCTAC
rs7240351	ACGTTGGATGCATGTCTGGAAGATGGATTC	ACGTTGGATGGCAAGCTCAAGAAAACATAG
rs769407	ACGTTGGATGTAAGGACCAATGTGCTTGGG	ACGTTGGATGGACCCATTTCTGTTAATGGTG
rs2799573	ACGTTGGATGTTCTTAGTGCATGCTAGGCG	ACGTTGGATGCTGTGCTAATAATAGCACTG
rs1344706	ACGTTGGATGGGTGGAAATGGAAGAGTAGG	ACGTTGGATGCCAGATAGATATCCAAGAAG
rs6550435	ACGTTGGATGAGCCTGGGCAACGTAGTTGA	ACGTTGGATGCCAGCACACATAGCTAGTTT
rs17826816	ACGTTGGATGCTGCACCACGTATTACAACC	ACGTTGGATGTACAGCTGATCAGACACCAC
rs1024582	ACGTTGGATGTGAAGTGCACCCACTAAGGC	ACGTTGGATGCTTGATATATGCCAGGCAC
rs818702	ACGTTGGATGGGTGTGAGAATGGATTAAC	ACGTTGGATGATGCCTTGCTTCTTTTGTCTC
rs1064395	ACGTTGGATGAACACTGAGCATCTCTCTAC	ACGTTGGATGTTGCCTGGTGGTCTAGAAAC
rs4765913	ACGTTGGATGCTTTCGACTCACAGGGTTCT	ACGTTGGATGGCATGAGCTCTCCAAAACAC

Tab. 8: PCR-Ansatz

Reagenz	Volumen [μ l] im Mastermix	Volumen [μ l] je Well (384er Platte)
Millipore H ₂ O	1272	2,65
PCR-Puffer (10x) [15 mM MgCl ₂]	300	0,625
MgCl ₂ [25 mM]	156	0,325
dNTPs [10 mM]	120	0,25
PrimerMix	480	1
Taq-Polymerase [5 U/ μ l]	72	0,15
Volumen total	2400	5

Im Thermocycler Mastercycler pro (Eppendorf AG) wurde folgendes Programm durchlaufen:

Tab. 9: Thermocycler-Programm für die PCR

Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	95 °C	15 Min	
Denaturierung	95 °C	20 Sek	44 Zyklen
Primer-Hybridisierung	56 °C	30 Sek	
Elongation	72 °C	1 Min	
Finale Elongation	72 °C	3 Min	

2.2.7.2 SAP-Verdau

Nach Ablauf der PCR Zyklen sind noch ungebundene dNTPs in den Reaktionsansätzen enthalten. Damit diese während der folgenden Einzelbasenverlängerung (Single Base Extension, SBE) nicht zu ungewünschten Elongationsprodukten führen, müssen sie inaktiviert werden. Dies geschieht über Dephosphorylierung mithilfe des Enzyms Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) wodurch Desoxyribonukleosiddiphosphate (dNDPs) entstehen.

Aus den Reagenzien in Tabelle 10 wurde der SAP-Ansatz hergestellt und per Pipettierroboter Biomek NX MC (Beckman Coulter, GmbH) je 2 µl des Mixes in jedes Well der 384er Platten überführt.

Tab. 10: SAP-Ansatz

Reagenz	Volumen [µl] im Mastermix	Volumen [µl] je Well
Millipore H ₂ O	734,4	1,53
SAP-Puffer (10x)	81,6	0,17
SAP Enzym [1 U/ µl]	144	0,3
Volumen total	960	2

Anschließend wurde die Platte im Thermocycler bei folgendem Programm inkubiert:

Tab. 11: Thermocycler-Programm für die SAP-Verdau

Schritt	Temperatur	Dauer
SAP-Verdau	37 °C	40 Min
SAP-Inaktivierung	85 °C	5 Min

2.2.7.3 Single Base Extension

Dieser Schritt entspricht der Methodik der PCR mit dem Unterschied, dass die verwendeten Extensionsprimer (unextended primers, UEPs) nur um eine Base verlängert werden. Für jeden SNP wird ein spezifischer UEP hergestellt. Dieser bindet so an den amplifzierten Sequenzabschnitt, dass er genau eine Base vor dem zu untersuchenden SNP endet (Denomme, 2009). Dem PCR-Ansatz werden anstelle von dNTPs Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugefügt. Auf Grund einer fehlenden Hydroxygruppe am 3'-Kohlenstoffatom, kann an ihnen kein weiteres Nukleotid binden. So kommt es bei der SBE zu einer Verlängerung der UEPs um genau eine, zum SNP komplementäre Base, wodurch später auf die Allelausprägung des SNPs der jeweiligen Person geschlossen werden kann. Um sicherzustellen, dass bei der später folgenden Untersuchung mit MALDI-TOF MS keine Fehldetektionen unterlaufen, wurden die UEPs unter Berücksichtigung eines Massenunterschiedes von mindestens 16 Da ausgewählt (Oeth et al., 2005). Weiterhin ist zu beachten, dass die Masse der Primer Einfluss auf das Signal bei der Massenspektrometrie hat. Bei Primern mit kleiner Masse ist das eigentliche Signal deutlich größer als das ebenfalls entstehende Hintergrundrauschen. Das signal-to-noise Verhältnis ist also gut. Je größer die Primer werden, desto kleiner wird dieses Verhältnis. Das führt dazu, dass die Unterscheidung zwischen Signal und Störgeräusch erschwert wird und es leichter zu Fehldetektionen kommen kann. Um dies zu vermeiden und den Erfolg der Massenspektrometrie zu optimieren, müssen die UEPs in Abhängigkeit von ihrer Masse in ihrer Konzentration angepasst werden (Oeth et al., 2005). Mit der Software MassARRAY Assay Design Software von Sequenom wurden die Primer entsprechend ihrer Masse in 4 Gruppen unterteilt (siehe Tabelle 12). Die

UEPs in Gruppe 1 haben die kleinsten Massen und sind im Extensionsprimer-Mix in einer Konzentration von 7 μM vorhanden. Die nachfolgenden Gruppen 2 und 3 kommen in den Konzentrationen 9,3 μM und 11,6 μM vor. Gruppe 4 wurden die größten UEPs zugeteilt und ihre Konzentration beträgt 14 μM .

Tab. 12: Übersicht der verwendeten Extensionsprimer.

Abkürzungen: UEP [Da]: Masse des UEP in Dalton; EXT1 / EXT2: Base der SBE; EXT1 [Da] / EXT2 [Da]: Masse des um genannte Base verlängerten Primer.

SNP	UEP	UEP [Da]	EXT1	EXT1 [Da]	EXT2	EXT2 [Da]	μM
rs12202969	GCTTGGCCCCTTCAG	4519,9	G	4767,1	A	4847	7
rs7309727	ACAGCACCTTTGTCC	4792,1	C	5039,3	T	5119,2	7
rs4765905	CACATCACAGACCCCAA	5077,3	G	5324,5	C	5364,5	7
rs140701	AGCCACAACAACAGTTA	5156,4	G	5403,6	A	5483,5	7
rs10994359	AGAAAAGTGGGGTTACT	5258,4	T	5529,7	C	5545,7	7
rs12576775	AAACAGTTGTGGGGAGG	5339,5	G	5586,7	A	5666,6	9,3
rs2239547	TTCTGAGCTCTCCATGA	5440,5	G	5687,7	A	5767,6	9,3
rs7131056	TGGTGAGAACTGAAGCTG	5603,7	C	5890,9	A	5930,8	9,3
rs9371601	TCAACCATGACCAAACACA	5718,8	G	6006	T	6045,9	9,3
rs11191454	CGGAAATGCTAAAACGACT	5829,8	G	6077	A	6156,9	9,3
rs2306073	GCCCTGTCCCCCTCAAATT	5972,9	G	6220,1	A	6300	9,3
rs1133503	GATGCTAAGTGCTTTAGGTA	6187	T	6458,2	C	6474,2	11,6
rs2535629	GCATCCCAAGGCTGTTTTCT	6348,1	T	6619,3	C	6635,3	11,6
rs1012176	TTGGGTGTTGGTATGCTGTA	6529,2	C	6776,4	A	6800,4	11,6
rs7240351	CTCAACTGAGAATCTGTTTACA	6678,4	G	6925,6	A	7005,5	11,6
rs769407	TGGAAAAAGGTAAAACCAAGAT	6833,5	G	7080,7	C	7120,7	11,6
rs2799573	CTGTTCAAATTTATTACAACCAT	6956,6	A	7227,8	G	7243,8	11,6
rs1344706	CACTGAAACAAAGAATCAAAAAC	7035,6	G	7322,9	T	7362,7	14
rs6550435	CAACCCCCAAAACCAAAAAAAC	7190,7	G	7437,9	T	7461,9	14
rs17826816	CTCATTACAACCTGAAAAGAACCA	7282,8	G	7530	A	7609,9	14
rs1024582	AGGAGGCCTCAGATTTTACAAGAT	7400,8	C	7648	T	7727,9	14
rs818702	TTTTATACAACCTACATAGCAACA	7577	G	7824,2	A	7904,1	14
rs1064395	TACTTAGCATCTCTCTACAATATGAC	7864,1	G	8111,3	A	8191,2	14
rs4765913	TCACAGGGTCTTTCATTCTGTGGGC	7959,2	A	8230,4	T	8286,3	14

Der Extensions-Ansatz setzt sich aus folgenden Reagenzien zusammen:

Tab. 13: Extensions-Ansatz

Reagenz	Volumen [μ l] im Mastermix	Volumen [μ l] je Well
Millipore H ₂ O	303,31	0,619
iPlex-Puffer (10x)	98	0,2
Terminations Mix	98	0,2
Extensions Primer Mix	460,6	0,94
iPlex Enzym	20,09	0,041
Volumen total	980	2

Um eine möglichst hohe Extensionsrate zu erzielen, wurde bei kurzer Dauer der einzelnen PCR-Phasen eine hohe Anzahl von Zyklen durchgeführt. Hybridisierung und Elongation erfolgten in fünf Zyklen zu je 5 Sekunden. Diese kurzen Zyklen wiederum wurden, einschließlich der Denaturierung, vierzigfach wiederholt, wodurch eine Gesamtzahl von 200 Zyklen erreicht wurde.

Tab. 14: Thermocycler-Programm für die Single Base Extension

Schritt	Temperatur	Dauer		
Initiale Denaturierung	94 °C	30 Sek		
Denaturierung	94 °C	5 Sek	1 Zyklus	40 Zyklen
Primer-Hybridisierung	52 °C	5 Sek	5 Zyklen	
Elongation	80 °C	5 Sek		
Finale Elongation	72 °C	3 Min		

2.2.7.4 Analyse der SBE mittels MALDI-TOF MS

Zur Optimierung der Massenspektrometrie wurde, im Anschluss an die SBE, allen Proben je 16 µl H₂O sowie 6 mg Clean Resin zugegeben. Hierbei handelt es sich um ein sehr feines Harz, welches der Salzbindung dient. Mithilfe des Überkopfschüttlers wird dieses für mindestens 30 Minuten in den Wells dispergiert und anschließend bei 4000 rpm abzentrifugiert, sodass sich das Harz mit den gebundenen Salzen am Boden des Wells befindet. So kann verhindert werden, dass Natrium (22 Da) und Kalium (38 Da) die Differenzierung zwischen den heterozygoten Allelen A/C (24 Da) und C/G (40 Da) bei der Massenspektrometrie behindern (Oeth et al., 2005).

Es folgt die Übertragung der Proben sowie eines Kalibranten, bestehend aus drei Oligonukleotiden bekannter Masse, per Nanodispenser auf den SpectroCHIP (Sequenom GmbH). Dort werden sie in eine Matrix aus 3-Hydroxypicolinsäure gebettet, was man als co-kristallisiert bezeichnet. Im MassARRAY Analyzer (Sequenom GmbH) kann der Chip nun mittels MALDI-TOF MS ausgelesen werden. Hierbei werden die co-kristallisierten Moleküle mit einem Laser beschossen, wodurch die Matrix verdampft und das Probenmaterial ionisiert in das Vakuum der Massenspektrometerröhre übertritt. Dort ist ein elektrisches Feld angelegt, welches die nun positiv geladenen Extensionsprodukte beschleunigt. Diese fliegen zum Minuspol am Ende des Flugrohres wo ein Detektor den Zeitpunkt ihres Eintreffens registriert (Storm et al., 2003). Da eine direkte Proportionalität zwischen Flugzeit (time-of-flight, TOF) und Molekulargewicht besteht, kann mithilfe der Kalibranten von der detektierten TOF auf die genaue Masse der Moleküle geschlossen werden. Mithilfe der Software MassARRAY Typer 4.0 kann dann, bei bekannter Masse der ddNTPs und UEPs, auf den vorliegenden Genotyp geschlossen werden.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie werden graphisch dargestellt. Abbildung 2 zeigt beispielhaft das Spektrum eines einzelnen SNPs bei einer heterozygoten (a) und einer homozygoten (b) Person. Die Verteilung der drei möglichen Genotypen eines SNPs im gesamten Fall-Kontroll-Kollektiv wird durch einen Clusterplot veranschaulicht (siehe Abbildung 3).

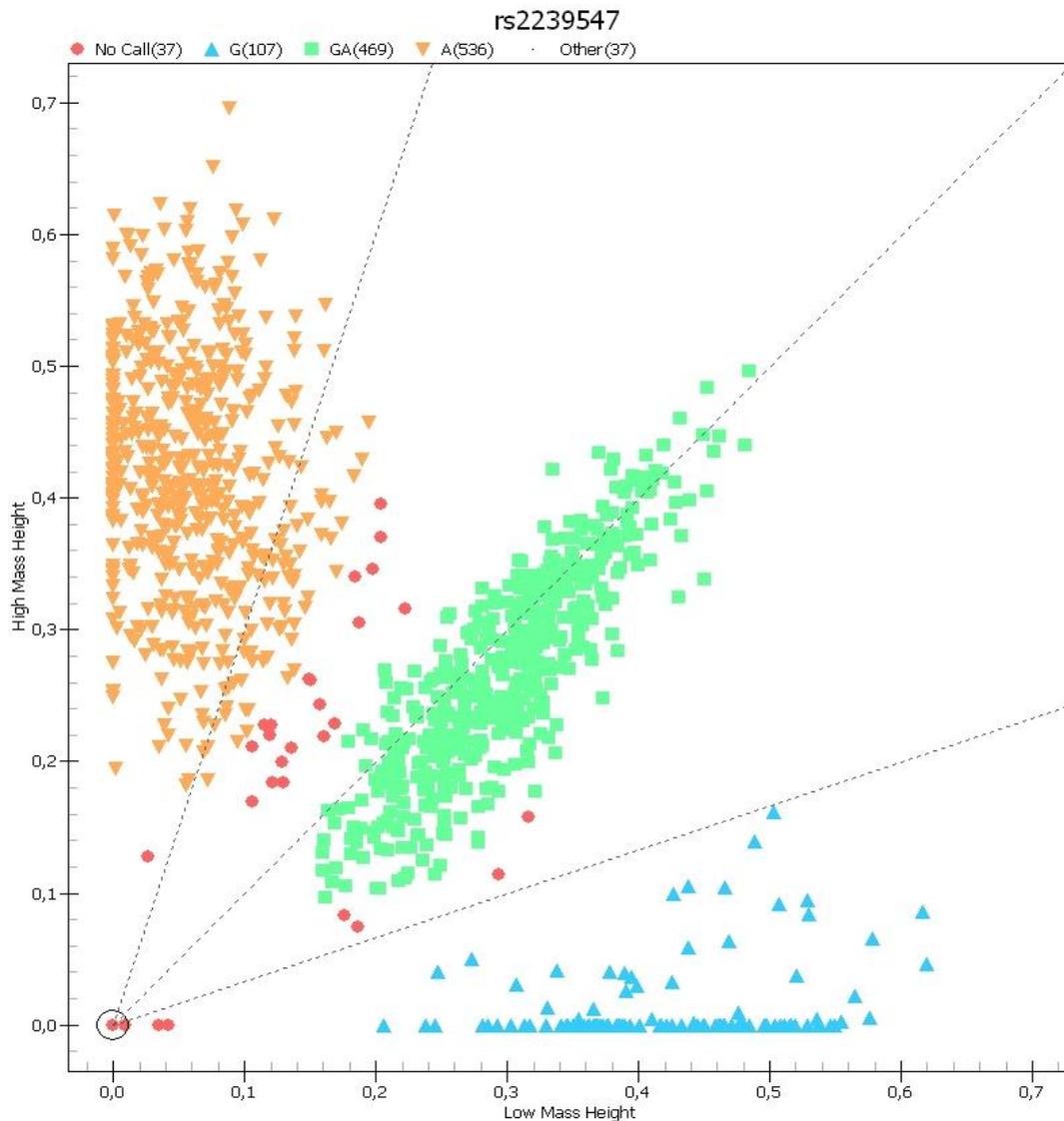


Abb. 3: Clusterplot des SNPs rs2239547. Auf der x-Achse ist die relative Peakhöhe an der Position des Allels mit niedriger Masse (hier Allel G) gegen die relative Peakhöhe an der Position des Allels mit hoher Masse (hier Allel A) auf der y-Achse aufgetragen. Jedes Symbol repräsentiert eine Probe. Homozygote für das Allel A werden durch ein oranges Dreieck, Heterozygote (G/A) durch ein grünes Viereck und Homozygote für das Allel G durch ein blaues Dreieck gekennzeichnet. Konnte einer Probe kein Genotyp zugeordnet werden, ist diese mit einem roten Kreis gekennzeichnet.

2.2.8 Qualitätskontrollen

Um sicherzustellen, dass es während der Probenvorbereitung nicht zu Kontaminationen gekommen ist und keine groben Fehler bei der Genotypisierung abgelaufen sind, wurde jede 96er Platte um eine Positiv- und eine Negativkontrolle ergänzt. Da jeweils vier 96er Platten auf einer 384er Platte zusammengestellt wurden, ergibt sich eine Gesamtzahl von 12 Positiv- und 12 Negativkontrollen pro Chip. Eine laborinterne DNA-Probe wurde für die Positivkontrollen verwendet. Durch die so vorhandenen Dubletten konnte eine stichprobenartige Kontrolle der Genotypisierung erfolgen. H₂O diente als Negativkontrolle. Bei der Auswertung der Clusterplots wurde überprüft, ob diese mit "no call" gekennzeichnet wurden. Zudem erfolgte eine visuelle Kontrolle der Streuung im Clusterplot, durch Auswertung der Spektren der Proben in den Grenzbereichen zwischen Homozygoten und Heterozygoten sowie von Ausreißern aus den Genotypenwolken. Zeigte das Spektrum kein eindeutiges Ergebnis, wurde die Probe manuell korrigiert und als "no call" gekennzeichnet. Lag bei visueller Kontrolle ein eindeutiges Spektrum vor, wurde den Proben manuell der richtige Genotyp zugeordnet. In die statistische Auswertung wurden ausschließlich SNPs mit einer Genotypisierungsrate (Call rate, CR) > 95 % eingeschlossen. Das bedeutet, dass für einen SNP bei > 95 % der DNA-Proben ein eindeutiger Genotyp vorliegen musste. Weiteres Qualitätskriterium war eine Minor allele frequency (Frequenz des selteneren Allels, MAF) > 5%. Außerdem durften die Allelfrequenzen an den einzelnen Loci unter den Kontrollen nicht signifikant ($p > 0,001$) vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht abweichen (siehe 2.2.9.1). Alle 24 SNPs erfüllten diese Qualitätskriterien und konnten in die Assoziationsanalyse eingeschlossen werden. Um falsch positive Ergebnisse im Rahmen von Populationsstratifikation zu verhindern, wurde bei der Rekrutierung der Fälle sowie der Kontrollen auf eine zentraleuropäische Herkunft geachtet. Vier Fälle und sieben Kontrollen konnten nicht in die Analyse einbezogen werden, da ihre CR unter 90 % lag. Das Kollektiv umfasste somit nach der Qualitätskontrolle 303 Fälle, davon 132 (43,6 %) Männer und 171 (56,4 %) Frauen sowie 797 Kontrollen, davon 359 (45,0 %) Männer und 438 (55,0 %) Frauen.

2.2.9 Statistische Analysen

2.2.9.1 Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Theoretisch betrachtet stellt sich in einer unendlich großen Population, ohne Zu- oder Abwanderung, ohne Auftreten von Neumutationen, in der Zufallspaarung herrscht und keine Selektion zugunsten eines Genotyps besteht, bereits von einer Generation zur nächsten ein Gleichgewicht der Genotypenhäufigkeiten ein, welches als Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy-Weinberg-Equilibrium, HWE) bezeichnet wird. Für einen Locus mit den Allelen A und a sowie den Allelhäufigkeiten p und q gilt dann $P(AA) = p^2$, $P(Aa) = 2pq$, $P(aa) = q^2$ und $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ (Bickeböller und Fischer, 2007). Weichen die Genotypfrequenzen an den Kandidatenloci unter den Kontrollen stark vom HWE ab, kann dies Hinweis auf Fehler bei der Genotypisierung oder auf ein heterogenes Kontrollkollektiv sein (Lewis, 2002). Aus diesem Grund wird ein χ^2 -Test auf Abweichung vom HWE zur Qualitätskontrolle herangezogen.

2.2.9.2 Odds Ratio

Das Odds Ratio (OR) gibt die Stärke des Zusammenhangs zwischen den beiden Merkmalen Exposition und Erkrankung an. In humangenetischen Studien entspricht die Exposition dem Vorliegen eines bestimmten Genotyps oder Allels, welcher/welches auf Assoziation zu einer Erkrankung untersucht werden soll. Die Stärke des Zusammenhangs zwischen Exposition und Erkrankung lässt sich mit dem OR abschätzen, indem die Quote des Expositionsfaktors in der Gruppe der Erkrankten ins Verhältnis mit derselben Quote in der Gruppe der Gesunden gesetzt wird. Ist das $OR > 1$ erhöht das Vorhandensein des untersuchten Genotyps oder Allels die Erkrankungswahrscheinlichkeit. Ist das $OR < 1$ besteht ein protektiver Effekt (Bickeböller und Fischer, 2007).

Betrachtet man einen biallelischen genetischen Marker, ergibt sich folgende Kontingenztafel:

Tab. 15: Genotypenverteilung unter Patienten und Kontrollen

Genotyp	A1/A1	A1/A2	A2/A2
Patienten	a	c	e
Kontrollen	b	d	f

Soll der Zusammenhang zwischen dem vorliegenden Genotyp und der Erkrankung untersucht werden, ergeben sich zwei OR:

$$\text{OR}_{A1/A1} = a \times f / e \times b$$

$$\text{OR}_{A1/A2} = c \times f / e \times d$$

Geht man, wie bei der vorliegenden Arbeit, von einem Modell aus, bei dem sich mit jedem Allel das Risiko zur Ausprägung der Erkrankung vervielfältigt, ist es sinnvoll den Zusammenhang zwischen der Erkrankung und dem Allel, losgelöst vom Genotyp, zu untersuchen. Es ergibt sich folgende Kontingenztafel:

Tab. 16: Allelverteilung unter Patienten und Kontrollen

Allel	A1	A2
Patienten	2a + c	2e + c
Kontrollen	2b + d	2f + d

Das OR für das minore Allel A1 berechnet sich dann wie folgt:

$$\text{OR}_{A1} = ((2a + c) \times (2f + d)) / ((2e + c) \times (2b + d))$$

2.2.9.3 Assoziationsanalysen

Gibt das OR Hinweis auf eine Assoziation des betrachteten genetischen Markers mit der Erkrankung, muss diese Hypothese durch statistisches Testen auf Signifikanz geprüft werden. Da bei den meisten komplexen Erkrankungen der zugrunde liegende genetische Mechanismus unbekannt ist, wird bei Assoziationsstudien von einem additiven Modell ausgegangen, bei dem sich das Erkrankungsrisiko für Träger eines

Risikoallels um den Faktor r und für Träger zweier Risikoallele um den Faktor $2r$ erhöht (Clarke et al., 2011; Ghodsi et al., 2016). Für die statistische Analyse auf Assoziation der ausgewählten genetischen Marker zur untersuchten Erkrankung in einem additiven Modell eignet sich der Cochran-Armitage Trend Test (Armitage, 1955), welcher in der vorliegenden Arbeit mithilfe der Software PLINK (Purcell et al., 2007) durchgeführt wurde. In einem ersten Schritt wurden alle 24 SNPs auf Assoziation zur SAD im gesamten Fall-Kontroll-Kollektiv untersucht. In einem zweiten Schritt erfolgte die Assoziationsanalyse in einem Subkollektiv, bestehend aus allen SAD-Fällen ohne die Nebendiagnose PD sowie den Kontrollen.

Des Weiteren erfolgten quantitative Assoziationsanalysen zur Symptomstärke (erhoben durch den SPIN-Score) und zum Grad an Schadensvermeidung (erhoben durch den TCI-Score). Diese Analysen wurden ebenfalls mithilfe der Software PLINK, unter Anwendung des Wald Testes (Wald, 1947), durchgeführt.

Die statistischen Analysen der genetischen Daten (Einzelmarkeruntersuchungen und quantitative Assoziationsanalysen) erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Jessica Becker und Herrn Dr. Andreas Forstner.

2.2.9.4 Bonferroni-Korrektur

Das Signifikanzniveau wird für die Überprüfung einer Alternativhypothese an einer Stichprobe festgelegt. Werden in einer Studie mehrere Hypothesen an einer Stichprobe untersucht (multiples Testen), steigt mit jedem Test die Wahrscheinlichkeit, dass ein Ergebnis fälschlicherweise als signifikant angenommen wurde, obwohl die Nullhypothese nicht zu verwerfen war (Bickeböller und Fischer, 2007). Dieses Problem der Akkumulation der Irrtumswahrscheinlichkeit kann mithilfe der Bonferroni-Korrektur ausgeglichen werden. Dazu wird das Signifikanzniveau um die Anzahl (n) der durchgeführten Test angepasst: $\alpha = 0,05 / n$. In der vorliegenden Arbeit wurden die berechneten p -Werte entsprechend der Anzahl der untersuchten SNPs und der durchgeführten Assoziationsanalysen um $n = 24 \times 4 = 96$ korrigiert.

3. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Assoziationsanalysen zwischen ausgewählten genetischen Polymorphismen (SNPs) und der sozialen Phobie durchgeführt. Dazu wurden 24 SNPs mit Relevanz für psychiatrische Erkrankungen in einem Kollektiv aus bisher nicht genotypisierten SAD-Fällen und ausgewählten Kontrollen betrachtet. Nach Bonferroni-Korrektur konnte für keinen Marker eine signifikante Assoziation mit der untersuchten Erkrankung festgestellt werden. Zwei SNPs erreichten jedoch ein nominal signifikantes Ergebnis. In einem zweiten Schritt wurden die 24 Marker in einem reduzierten Fall-Kontroll-Kollektiv, bestehend aus SAD-Patienten ohne PD und den Kontrollen, auf Assoziation überprüft. Außerdem erfolgte eine quantitative Assoziationsanalyse unter Betrachtung der Symptomstärke und dem Grad an Schadensvermeidung. Auch die weiteren Analyseschritte lieferten kein signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Korrektur. Im Kollektiv der SAD-Patienten ohne PD erreichten zwei Marker nominal signifikante Werte. Eine nominale Assoziation konnte für vier Marker zur Symptomstärke und für zwei Marker zum Grad an Schadensvermeidung nachgewiesen werden.

3.1 Assoziationsanalyse der Kandidaten-SNPs im gesamten SAD-Kollektiv

Das gesamte Fallkollektiv bestand nach der Qualitätskontrolle aus 303 Patienten mit sozialer Phobie. Alle 24 SNPs wurden bei den Fällen und den 797 Kontrollen genotypisiert und auf Assoziation zur SAD analysiert. Hierbei konnte für keinen der untersuchten Polymorphismen nach Korrektur für multiples Testen ein signifikantes Ergebnis erzielt werden. Nominale Signifikanz lag für rs818702 mit $p = 0,032$ und für rs140701 mit $p = 0,048$ vor. SNP rs140701 befindet sich auf Chromosom 17 im Gen *SLC6A4*, welches für den Serotonin-Transporter (5-HTT) kodiert und in einer vorangegangenen Studie eine Assoziation zur SAD und PD zeigte (Strug et al., 2010). Die Genotypisierung ergab die beiden Allelausprägungen A und G, wobei A das seltenere Allel ist und mit einer MAF von 0,467 unter den Fällen und 0,419 unter den Kontrollen auftritt. Mit einem OR von 1,215 stellt es zudem die Risikovariante dar, was der Effektrichtung in der Studie von Strug und Kollegen entspricht. Für den anderen

SNP rs818702 auf Chromosom 9 in der Nähe des Gens *ALAD* stellte das minore Allel G (MAF Fälle: 0,259; MAF Kontrollen: 0,216) mit einem OR von 1,269 in unserer Studie die Risikovariante dar. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorangegangenen Studie, in der das minore Allel G häufiger unter den Kontrollen gefunden wurde (Donner et al., 2008). Die Ergebnisse der Assoziationsanalyse können Tabelle 17 entnommen werden.

Tab. 17: Ergebnisse der Assoziationsanalyse im gesamten Fall-Kontroll-Kollektiv. Abkürzungen: Chr: Chromosom; Position: chromosomale Position nach hg19; A1: selteneres Allel im untersuchten Gesamtkollektiv; A2: häufigeres Allel im untersuchten Gesamtkollektiv; MAF_F: Frequenz des selteneren Allels unter den Fällen; MAF_K: Frequenz des selteneren Allels unter den Kontrollen; p-Wert: p-Wert der Assoziationsanalyse; OR: Odds Ratio bezogen auf A1; AD: allelic direction; +/- : gleiche/unterschiedliche AD als zuvor berichtet; n.a. : not available. Modifiziert nach Forstner et al. (2017).

SNP	Chr	Position	A1	A2	MAF_F	MAF_K	p-Wert	OR	AD
rs818702	9	116144973	G	A	0,259	0,216	0,032	1,269	-
rs140701	17	28538532	A	G	0,467	0,419	0,048	1,215	+
rs12576775	11	79077193	G	A	0,145	0,171	0,140	0,822	-
rs17826816	5	7519298	G	A	0,276	0,247	0,176	1,159	+
rs2306073	12	27555837	A	G	0,290	0,319	0,195	0,873	+
rs7131056	11	113329774	A	C	0,457	0,431	0,261	1,112	+
rs2239547	3	52855229	G	A	0,287	0,311	0,298	0,895	+
rs10994359	10	62222107	C	T	0,089	0,077	0,339	1,177	+
rs7309727	12	129955359	T	C	0,269	0,250	0,355	1,106	+
rs1064395	19	19361735	A	G	0,124	0,139	0,377	0,880	-
rs11191454	10	104660004	G	A	0,101	0,088	0,395	1,153	-
rs7240351	18	25554456	A	G	0,432	0,453	0,407	0,921	+
rs4765913	12	2419896	A	T	0,237	0,222	0,440	1,092	+
rs9371601	6	152790573	T	G	0,340	0,357	0,446	0,926	-
rs769407	2	171693708	C	G	0,254	0,270	0,450	0,922	-
rs2799573	10	18601928	G	A	0,303	0,286	0,452	1,084	-
rs2535629	3	52833219	T	C	0,354	0,370	0,509	0,935	+
rs1133503	6	96054588	C	T	0,430	0,444	0,520	0,941	-
rs1344706	2	185778428	G	T	0,434	0,424	0,687	1,041	-
rs1024582	12	2402246	T	C	0,323	0,333	0,687	0,960	-
rs6550435	3	36864489	G	T	0,391	0,382	0,706	1,037	+
rs1012176	5	11320538	A	C	0,264	0,271	0,738	0,965	n.a.
rs12202969	6	98576223	A	G	0,477	0,482	0,816	0,978	-
rs4765905	12	2349584	C	G	0,318	0,322	0,848	0,980	-

3.2 Assoziationsanalyse der Kandidaten-SNPs unter SAD-Fällen ohne PD

Für eine zweite Analyse wurden alle SAD Patienten mit Panikstörung oder ohne ausreichende Angaben zu Nebenerkrankungen aus dem Fallkollektiv ausgeschlossen. In dem so ausgewählten Fall-Kontroll-Kollektiv, bestehend aus 188 Fällen und 797 Kontrollen, wurden alle 24 SNPs erneut auf Assoziation zur sozialen Phobie analysiert. Für keinen der untersuchten Marker konnte eine signifikante Assoziation nach Bonferroni-Korrektur nachgewiesen werden. Zwei SNPs (rs140701 und rs12576775) erreichten ein nominal signifikantes Ergebnis. Interessanterweise fiel die Assoziation für rs140701 im Gen des Serotonintransporters aus der ersten Analyse durch Ausschluss der Patienten mit komorbider PD, trotz deutlich kleinerer Fallzahl (188 statt 303), stärker aus ($p = 0,021$). Für rs12576775 auf Chromosom 11 im Gen *ODZ4* beträgt der p-Wert 0,028. Die vorangegangene Studie wies für diesen Locus eine Assoziation zur bipolaren Störung nach, mit erhöhtem Erkrankungsrisiko unter den Träger des minoren Allels G (Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group, 2011). In unserer Studie zeigt dieses dagegen einen protektiven Effekt. Eine Übersicht der Ergebnisse liefert Tabelle 18.

Tab. 18: Ergebnisse der Assoziationsanalysen und der quantitativen Analysen. Abkürzungen: p-Wert 1 (entspricht p-Wert aus Tab. 17): Ergebnis der Assoziationsanalyse aller SAD-Patienten gegen alle Kontrollen; p-Wert 2: Ergebnis der Assoziationsanalyse aller SAD-Patienten ohne PD gegen alle Kontrollen; p SPIN: quantitative Analysen im Hinblick auf die Symptomstärke; p HA: quantitative Analyse zum Grad an Schadesvermeidung. Modifiziert nach Forstner et al. (2017).

SNP	A1	A2	p-Wert 1	p-Wert 2	p SPIN	p HA	Phänotyp
rs818702	G	A	0,032	0,126	0,011	0,596	SAD
rs140701	A	G	0,048	0,021	0,430	0,226	SAD, PD
rs12576775	G	A	0,140	0,028	0,534	0,224	BD
rs17826816	G	A	0,176	0,112	0,988	0,490	BD
rs2306073	A	G	0,195	0,162	0,036	0,093	SAD
rs7131056	A	C	0,261	0,070	0,539	0,426	SAD
rs2239547	G	A	0,298	0,506	0,745	0,882	BD, SCZ
rs10994359	C	T	0,339	0,119	0,001	0,001	BD, SCZ
rs7309727	T	C	0,355	0,591	0,509	0,131	PD
rs1064395	A	G	0,377	0,671	0,090	0,009	BD
rs11191454	G	A	0,395	0,301	0,882	0,395	Cross disorder
rs7240351	A	G	0,407	0,406	0,107	0,299	SAD
rs4765913	A	T	0,440	0,086	0,988	0,993	BD
rs9371601	T	G	0,446	0,272	0,352	0,289	BD, MDD
rs769407	C	G	0,450	0,868	0,463	0,480	SAD, PD, GAD, Phobien
rs2799573	G	A	0,452	0,474	0,334	0,895	Cross disorder
rs2535629	T	C	0,509	0,374	0,259	0,262	Cross disorder
rs1133503	C	T	0,520	0,638	0,025	0,565	SAD, PD
rs1344706	G	T	0,687	0,390	0,494	0,227	BD, SCZ
rs1024582	T	C	0,687	0,846	0,337	0,828	Cross disorder
rs6550435	G	T	0,706	0,557	0,414	0,340	BD
rs1012176	A	C	0,738	0,261	0,528	0,908	SAD, PD, GAD, Phobien
rs12202969	A	G	0,816	0,433	0,873	0,182	BD
rs4765905	C	G	0,848	0,855	0,146	0,825	BD, SCZ

3.3 Quantitative Assoziationsanalyse zur Symptomstärke

Bei 284 Personen des SAD-Kollektivs konnte die Stärke ihrer Angstsymptome mithilfe des SPIN erhoben werden. In der quantitativen Assoziationsanalyse der Allelausprägungen der 24 Marker ergaben sich vier SNPs (rs10994359, rs818702, rs1133503, rs2306073) mit nominal signifikanter Assoziation. Die stärkste Assoziation zur Symptomstärke bestand im untersuchten Kollektiv für den Polymorphismus rs10994359 ($p = 0,001$). Abbildung 4 zeigt die Verteilung der SPIN-Werte in Abhängigkeit vom Genotyp des SNPs. SAD-Patienten mit dem Genotyp TT hatten im Median den niedrigsten SPIN-Wert (40), während die Gruppen der SAD-Patienten mit dem Genotyp TC und CC im Median jeweils höhere SPIN-Werte (45) erreichten. Der Polymorphismus befindet sich auf Chromosom 10 im Gen *ANK3* und zeigte in einer vorangegangenen Studie eine genomweit signifikante Assoziation mit bipolarer Störung und Schizophrenie (Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011). Zudem zeigte rs10994359 bei der quantitativen Analyse zum Grad an Schadensvermeidung ebenfalls die stärkste Assoziation (siehe 3.4).

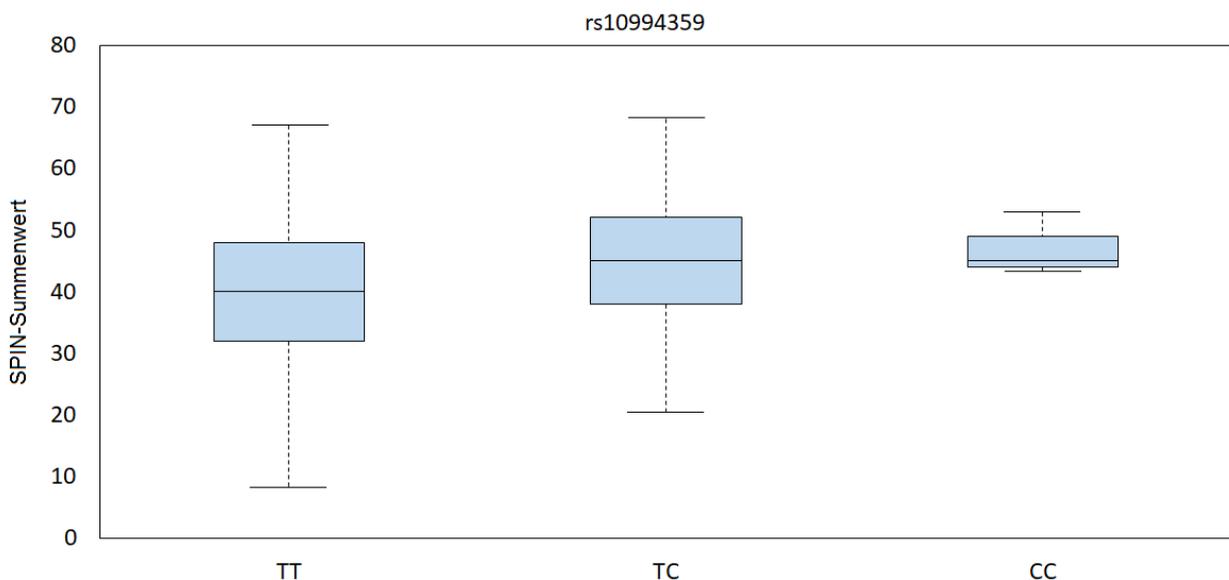


Abb. 4: Boxplot zur Darstellung der Abhängigkeit des SPIN-Summenwertes vom vorliegenden Genotyp des SNPs rs10994359. Unter den SAD-Patienten mit dem Genotyp TT betrug der kleinste SPIN-Wert 8, der höchste 67 und der Median 40; für den Genotyp TC betrug der kleinste SPIN-Wert 20, der höchste 68 und der Median 45; für den Genotyp CC betrug der kleinste SPIN-Wert 43, der höchste 53 und der Median 45.

Das zweit- und drittstärkstes Ergebnis lieferten rs818702 mit $p = 0,011$ und rs1133503 mit $p = 0,025$. SNP rs818702 befindet sich, wie oben bereits dargestellt, auf Chromosom 9 in der Nähe des Gens *ALAD*. Der SNP konnte von Donner und Kollegen (Donner et al., 2008) als Risikovariante für SAD identifiziert werden und lieferte in der vorliegenden Analyse bei Betrachtung des gesamten SAD-Kollektives ein nominal signifikantes Ergebnis. Für den SNP rs1133503 konnten Jensen und Kollegen eine Assoziation zur sozialen Phobie und zur Panikstörung nachweisen (Jensen et al., 2014). Er befindet sich auf Chromosom 6 im Gen *MANEA*. Der vierte SNP mit Assoziation zur Symptomstärke ist rs2306073. Er befindet sich auf Chromosom 12 im Gen *ARNTL2* und erreichte in der vorliegenden quantitativen Analyse einen p-Wert von 0,036. In der vorangegangenen Studie von Sipilä und Kollegen wurde für ihn bereits eine Assoziation zur sozialen Phobie beschrieben (Sipilä et al., 2010). Die Ergebnisse können Tabelle 18 (S.54) entnommen werden.

3.4 Quantitative Assoziationsanalyse zum Grad an Schadensvermeidung

Mithilfe des Persönlichkeitsfragebogens TCI konnte bei 281 der 303 Fälle ein Score für HA erhoben werden. Die quantitative Assoziationsanalyse der 24 SNPs ergab eine nominale Signifikanz für rs10994359 ($p = 0,001$) und rs1064395 ($p = 0,009$). SNP rs1064395 befindet sich im Gen *NCAN* auf Chromosom 19 und zeigte in der vorangegangenen Studie von Cichon und Kollegen eine Assoziation mit bipolarer Störung (Cichon et al., 2011). SNP rs10994359 befindet sich auf Chromosom 10 im Gen *ANK3* und zeigte sich in der GWAS des Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortiums signifikant assoziiert bei Patienten mit Schizophrenie und bipolarer Störung (Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011). In Abbildung 5 ist der Grad an HA in Abhängigkeit vom Genotyp des SNP rs10994359 dargestellt. SAD-Patienten mit dem Genotyp TT hatten im Median den niedrigsten HA-Wert (27), während die Gruppen der SAD-Patienten mit dem Genotyp TC und CC im Median jeweils höhere HA-Werte (31 und 29) erreichten. In der vorliegenden Arbeit konnte für den Polymorphismus zudem die stärkste Assoziation zur Symptomstärke nachgewiesen werden (siehe 3.3). Eine Übersicht aller Ergebnisse liefert Tabelle 18 (S.54).

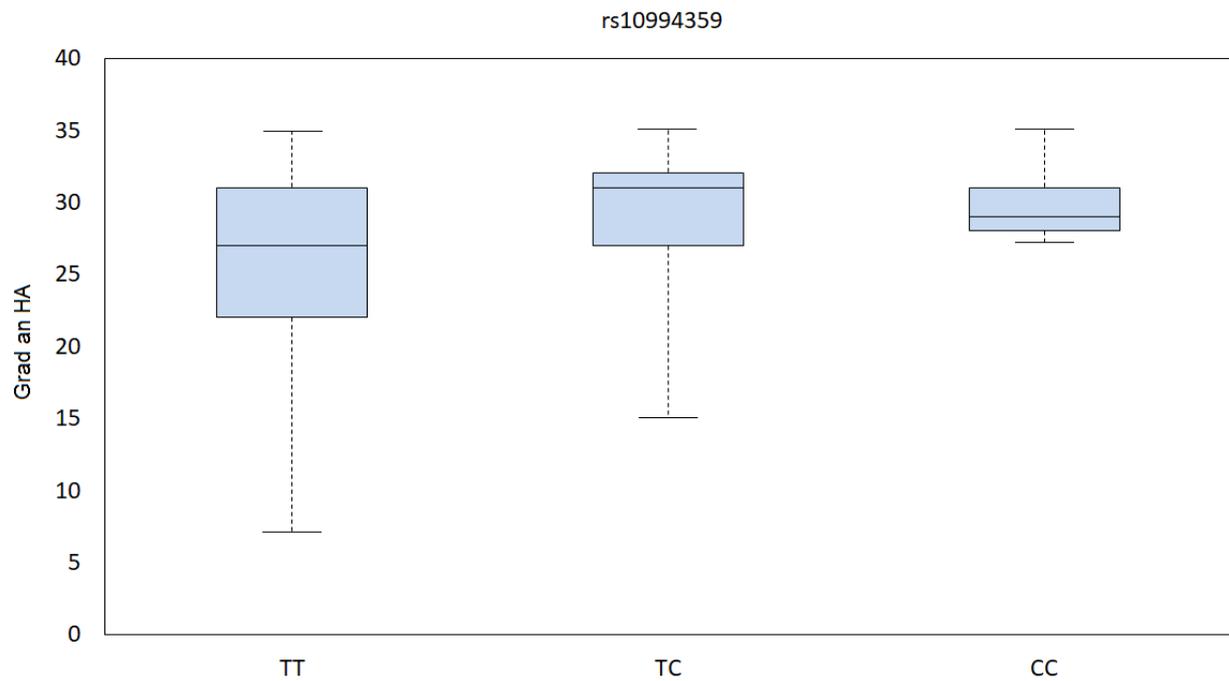


Abb. 5: Boxplot zur Darstellung der Abhängigkeit des Grades an HA vom vorliegenden Genotyp an Position des SNPs rs10994359. Unter den SAD-Patienten mit dem Genotyp TT betrug der kleinste HA-Wert 7, der höchste 35 und der Median 27; für den Genotyp TC betrug der kleinste HA-Wert 15, der höchste 35 und der Median 31; für den Genotyp CC betrug der kleinste HA-Wert 27, der höchste 35 und der Median 29.

4. Diskussion

Die Auswirkungen psychiatrischer Erkrankungen auf die Betroffenen sowie ihre ökonomische Bedeutung für unsere Gesellschaft werden in den Erhebungen der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization, WHO) deutlich. In der Global Burden of Disease Study 2016 zeigt sich der große Einfluss psychiatrischer Erkrankungen auf die Lebensqualität, welcher sich in hohen Werten der years lived with disability (YLD) niederschlägt (GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2017). Der Wert berechnet sich aus der Inzidenz, der durchschnittlichen Erkrankungsdauer sowie einem Faktor für die Schwere der Erkrankung (World Health Organization, 2008). Die Studie untersuchte 328 Erkrankungen in 195 Ländern. 2016 nahmen Angsterkrankungen in Westeuropa den sechsten Platz unter allen untersuchten Erkrankungen bei der Bewertung der YLD ein. Global gesehen werden die YLD pro 1000 Einwohner für Angsterkrankungen mit 26.417 beziffert. Zum Vergleich: Diabetes erreicht einen Wert von 28.584 und kardiovaskuläre Erkrankungen einen Wert von 33.482 (GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2017). Die ökonomische Relevanz wird im Mental Health Atlas der WHO bestätigt. Hiernach werden in Europa 5 % des Gesundheitsbudgets für psychiatrische Erkrankungen ausgegeben (World Health Organization, 2011). Mit einer Prävalenz von ca. 11 - 13 % (Kessler et al., 2012; Stein und Stein, 2008) nimmt die soziale Phobie unter allen psychiatrischen Erkrankungen eine bedeutende Stellung ein. Ein Zuwachs wissenschaftlicher Kenntnisse über Ätiologie und Pathophysiologie der Erkrankung sind somit von großem Interesse. Ziel der Humangenetik ist es krankheitsverursachende Gene zu identifizieren, um so Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Pathomechanismus zu ziehen. Wie beispielsweise bei der Phenylketonurie (Zurflüh et al., 2008), M. Wilson (Ala et al., 2007) und M. Fabry (Mehta et al., 2010) konnte so eine medikamentöse Therapie entwickelt werden. Bei der sozialen Phobie wurde eine familiäre Häufung beobachtet (Fyer et al., 1993) und es wird von einer Heritabilität von 20 - 50 % ausgegangen (Kendler et al., 1999, 2001; Skre et al., 2000). Bislang gelang es aber nur wenige genetische Risikovarianten zu identifizieren (Donner et al., 2008; Sipilä et al., 2010).

Bei multifaktoriellen Erkrankungen wie der sozialen Phobie konnte gezeigt werden, dass in der Regel viele häufige genetische Varianten mit kleinem Effekt zur Krankheitsentstehung beitragen (Sullivan et al., 2018). Assoziationsanalysen stellen bei Varianten mit niedrigem bis moderatem Effekt auf das Erkrankungsrisiko eine adäquate Methode dar, um genetische Suszeptibilitätsfaktoren aufzudecken (Risch, 2000). Dabei macht man sich die interindividuellen Unterschiede in der Basensequenz des menschlichen Genoms zunutze und untersucht, ob eine genetische Variante in einem Fall-Kontroll-Kollektiv signifikant häufiger unter den Patienten als unter den Kontrollen auftritt. Die assoziierte Variante kann selbst krankheitsverursachend sein oder im LD zur krankheitsverursachenden Variante stehen und so als Marker dienen (Daly und Day, 2001). Vor dem Hintergrund beobachteter genetischer Überlappung unter psychiatrischen Erkrankungen (siehe 1.4) wurden in der vorliegenden Arbeit 24 ausgewählte SNPs mit bekannter Assoziation zur sozialen Phobie und anderen psychiatrischen Erkrankungen auf ihren Einfluss bei der Entwicklung einer sozialen Phobie hin untersucht. Es wurden Assoziationsanalysen in einem Kollektiv bestehend aus 303 SAD-Patienten und 797 Kontrollen sowie in einem reduzierten Kollektiv bestehend aus 188 SAD-Patienten ohne PD und den 797 Kontrollen durchgeführt. Außerdem erfolgten quantitative Assoziationsanalysen zur Symptomstärke und zum Grad an Schadensvermeidung. Kein Befund der Assoziationsanalysen überstand die Korrektur für multiples Testen. Dennoch ergaben sich interessante, nominal signifikante Befunde, die im Folgenden näher betrachtet werden. Insbesondere rs140701 im Gen des Serotonintransporters (SLC6A4) und rs10994359 in ANK3 sind hervorzuheben.

Für rs140701 konnte bei der Analyse aller Patienten mit SAD im Vergleich zur Kontrollgruppe ein nominal signifikantes Ergebnis erzielt werden. Bei Ausschluss aller SAD-Patienten mit PD aus der Fallgruppe zeigte rs140701 sogar eine noch stärkere Assoziation. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem Polymorphismus um eine Risikovariante der sozialen Phobie unabhängig vom Vorliegen einer Panikstörung handeln könnte. Dieser Befund steht allerdings im Widerspruch zum Ergebnis der Originalstudie von Strug und Kollegen, die für rs140701 eine geringfügig stärkere Assoziation in der Gruppe der Patienten mit Panikstörung ($p = 0,001$) im Vergleich zur Gruppe der Patienten mit Panikstörung und sozialer Phobie ($p = 0,003$) ermittelten

(Strug et al., 2010). Zukünftige Studien umfangreicherer Kollektivgröße sind notwendig, um die hier beschriebene Assoziation zu bestätigen.

Der Polymorphismus befindet sich auf Chromosom 17q11 in Intron 9 des Gens *SLC6A4*. Dieses kodiert für den Serotonintransporter (5-Hydroxytryptamintransporter, 5-HTT), welcher membranständig an Synapsen vorkommt und für den Rücktransport von Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) aus dem synaptischen Spalt in die präsynaptische Endigung zuständig ist (Stein und Andrews, 2015). Seine Beteiligung am serotonergen System macht diesen Marker besonders interessant, da Dysfunktionen innerhalb dieses Systems wiederholt mit Angsterkrankungen und ängstlichem Verhalten in Verbindung gebracht wurden: Frick und Kollegen konnten in einer Positronen-Emissions-Tomographie- (PET-) Studie zeigen, dass bei Patienten mit sozialer Phobie eine erhöhte Serotoninsyntheserate im Vergleich zum Kontrollkollektiv vorlag (Frick et al., 2015). Die Syntheserate in den zentralen Nuclei der rechten Amygdala, welche eine bedeutende Stellung bei der Modulation von Angstepfinden einnimmt, korrelierte zudem positiv mit der Symptomstärke (Frick et al., 2015). Des Weiteren wirken sich Veränderungen in der Serotonintransporterdichte auf Verhalten und Emotion aus. So konnte im Tiermodell beobachtet werden, dass 5-HTT knockout Mäuse ein erhöhtes Angstverhalten und Rückzugstendenzen zeigen (Holmes et al., 2003; Kalueff et al., 2010). Altieri und Kollegen fanden bei Mäusen mit verminderter Expression des Serotonintransporters neben dem erhöhten Angstverhalten zudem einen erhöhten extrazellulären Serotoninspiegel (Altieri et al., 2015). Neben Serotonintransportern befinden sich an serotonergen Neuronen Autorezeptoren mit inhibitorischer Wirkung auf Synthese und Freisetzung von Serotonin sowie exzitatorischer Wirkung auf die Serotoninwiederaufnahme (Nautiyal und Hen, 2017). Autorezeptor (5-HT-1A) knockout Mäuse zeigen im Vergleich zu ihren entsprechenden Wildtyp-Mäusen einen ängstlichen Phänotyp (Olivier et al., 2001). Auch unter Patienten der sozialen Phobie konnte ein vermindertes Vorkommen von 5-HT-1A-Autorezeptoren nachgewiesen werden (Lanzenberger et al., 2007). Insgesamt deuten diese Befunde auf eine Überaktivität des serotonergen Systems als Krankheitsursache hin.

Der Polymorphismus rs140701 im Gen des Serotonintransporters ist außerdem von Interesse, da der Serotonintransporter die Zielstruktur von selektiven Serotoninwiederaufnahmehemmern (SSRIs) darstellt. Diese sind Medikamente der

ersten Wahl zur Therapie der SAD und ihr genauer Wirkmechanismus ist noch Gegenstand aktueller Diskussion: SSRIs verhindern durch Bindung an 5-HTT die Wiederaufnahme von Serotonin in die präsynaptische Endigung (Zhong et al., 2012) und sorgen somit für eine Erhöhung der Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt (David et al., 2003). Ihre anxiolytische und antidepressive Wirkung (van der Linden et al., 2000) legt die Vermutung nahe, dass ein extrazellulärer Serotoninmangel eine mögliche Krankheitsursache ist. Dies steht in direktem Widerspruch zur o.g. Annahme der serotonergen Überfunktion bei Angsterkrankungen. Möglicherweise ist vielmehr eine Störung des Gleichgewichts der intra- und extrazellulären Serotoninkonzentration mitverantwortlich für die Entstehung von Angst und die anxiolytische Wirkung von SSRIs lässt sich durch Umbauvorgänge der serotonergen Synapsen (Beeinflussung der Transporterdichte und -empfindlichkeit) erklären (Stein und Andrews, 2015). Dafür würde auch die Latenzzeit von 1 - 6 Wochen (Tylee und Walters, 2007) bis zum Beginn der therapeutischen Wirkung von SSRIs sprechen. Eine Desensibilisierung von Autorezeptoren bei erhöhter extrazellulärer Serotoninkonzentration konnte bereits nachgewiesen werden (Altieri et al., 2015). In einem komplexen System mit einer Vielzahl verschiedener Stellschrauben und Interaktionen ist es zudem denkbar, dass bei Patienten mit einem ähnlichen Symptomkomplex unterschiedliche Pathologien ursächlich zugrunde liegen. So ließe sich auch erklären, dass bei nur ca. 40 % der SAD-Patienten ein zufriedenstellendes therapeutisches Ansprechen auf SSRIs erzielt werden kann (Pollack et al., 2014). Diesbezüglich lieferten verschiedene Studien Hinweise für den Einfluss von 5-HTT-Varianten auf das therapeutische Ansprechen auf SSRIs. Stein und Kollegen konnten eine lineare Beziehung zwischen dem Genotyp der 5-HTTLPR (s.u.) und der Reduktion von Angstsymptomen unter SSRI-Therapie aufzeigen (Stein et al., 2006).

Für *SLC6A4* wurde bereits wiederholt eine Assoziation zu ängstlich vermeidender Persönlichkeit nachgewiesen. Zudem konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der Expressionrate von *SLC6A4* Auswirkungen auf Persönlichkeitszüge und die Entwicklung von Angsterkrankungen haben. Der bekannteste genetische Polymorphismus (5-HTTLPR, serotonin-transporter-linked polymorphic region) mit Auswirkungen auf die Expression von *SLC6A4* befindet sich in dessen Promotorregion strangaufwärts der kodierenden Sequenz. Es handelt sich dabei um einen VNTR

(variable number of tandem repeats), der in einer kurzen und einer langen Variante vorkommt. Beim Vorliegen einer oder zwei Kopien der kurzen Variante reduziert sich die Transkription des Gens signifikant (Lesch et al., 1996). Lesch und Kollegen konnten signifikante Assoziation zwischen 5-HTTLPR und Neurotizismus (klassifiziert nach NEO personality inventory), Anspannung (klassifiziert nach Cattell's 16PF personality inventory) sowie HA (klassifiziert nach Cloninger's Tridimensional Personality Questionnaire) nachweisen, wobei Probanden mit einer oder mehreren Kopien der kurzen Variante in allen Bereichen einen höheren Score erreichten (Lesch et al., 1996). Neben dem o.g. Polymorphismus ließen sich auch SNPs, die nicht in LD mit 5-HTTLPR stehen, mit Auswirkungen auf die Expression von *SLC6A4* und/oder auf die Entwicklung von Angsterkrankungen nachweisen. Zu ihnen gehört rs3813034, an dessen Position das Allel G unter Patienten der PD signifikant häufiger auftritt und mit einer niedrigeren Expressionsrate von *SLC6A4* einhergeht (Schumacher und Deckert, 2010). Auch rs140701 in *SLC6A4* steht nicht in LD mit 5-HTTLPR (Strug et al., 2010). In der Follow-up Studie von Strug und Kollegen stellt er den Polymorphismus mit der stärksten Assoziation zu PD und SAD dar. Zum jetzigen Zeitpunkt sind die funktionellen Auswirkungen des Polymorphismus rs140701 in *SLC6A4* unklar und weitere molekulargenetische und funktionelle Studien sind nötig um die Bedeutung des SNPs aufzuklären. Da in der vorliegenden Arbeit die Assoziation von rs140701 durch Ausschluss der PD-Patienten aus dem SAD-Kollektiv verstärkt wird, ergibt sich der Hinweis auf die Beteiligung des Polymorphismus, insbesondere an der Entstehung der SAD. Da die Befunde der Korrektur für multiples Testen nicht standhielten, gilt es diese Beobachtung in größeren Studien zu bestätigen.

Für rs818702 im Gen *ALAD* konnte bei der Assoziationsanalyse des Gesamtkollektivs ebenfalls ein nominal signifikantes Ergebnis erzielt werden. Das Gen ist 15 kb groß und befindet sich auf Chromosom 9q33. Es kodiert für das Enzym δ -Aminolävulinatsynthase, welches Aminolävulinsäure zu Porphobilinogen, einer Vorstufe des Häm, umwandelt. In der vorliegenden Arbeit stellte das Allel G die Risikovariante dar. Dies steht im Widerspruch zur Originalstudie von Donner und Kollegen, welche das Allel A unter den Fällen häufiger nachwies als unter den Kontrollen (Donner et al., 2008). Zudem reduziert sich die Stärke der Assoziation in der vorliegenden Arbeit bei Ausschluss der Patienten mit PD. Weitere Studien mit größerer

Fallzahl sind nötig, um die Relevanz des Polymorphismus bei der Entstehung der sozialen Phobie zu bestätigen und die Risikovariante zu identifizieren.

Die quantitative Assoziationsanalyse der 24 SNPs unter Betrachtung der Symptomstärke anhand des SPIN-Summenwertes ergab vier nominal signifikante Befunde. Der Polymorphismus mit der stärksten Assoziation (rs10994359) befindet sich auf Chromosom 10 im Gen *ANK3*, welches für viele unterschiedliche Isoformen des Proteins Ankyrin G kodiert. Das Protein ist unter anderem an der Ausbildung und Aufrechterhaltung des axonalen Initialsegments beteiligt. Des Weiteren wird es für die Bildung und Weitergabe des Aktionspotentials benötigt (Leussis et al., 2013). In einer großen GWAS-Metaanalyse konnte für den SNP rs10994359 eine Assoziation zur BD nachgewiesen sowie aufgezeigt werden, dass er Teil des gemeinsamen genetischen Risikoprofils zwischen BD und Schizophrenie ist (Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium, 2011). Leussis und Kollegen untersuchten, über welchen Pathomechanismus das Risikogen zur Krankheitsentstehung der bipolaren Störung beiträgt und fanden heraus, dass Mäuse mit reduzierter Expression von *Ank3* zum einen ein vermindertes Angstverhalten und gesteigerte Aktivität zeigten und zum anderen stärker in ihrem Verhalten durch chronische Stressexposition beeinflusst wurden. Diese führt bei den *Ank3* knockdown Mäusen vermehrt zu depressivem Verhalten sowie zu einer höheren Kortisolkonzentration im Blut (Leussis et al., 2013). Es ist somit zu vermuten, dass der Polymorphismus in *ANK3* über die Modulation von Angstverhalten und Stressreaktion Einfluss auf die Symptomstärke nimmt.

Für den Polymorphismus rs10994359 konnte in der vorliegenden Arbeit bei der quantitativen Analyse der 24 SNPs unter Betrachtung des Grades an der Temperamentdimension HA ebenfalls die stärkste Assoziation aufgezeigt werden. Viele Studien beschäftigen sich mit der Bedeutung von Persönlichkeitszügen bei der Entwicklung von psychiatrischen Erkrankungen. Es konnte beobachtet werden, dass sich Patienten unterschiedlicher affektiver Störungen in ihrem Temperament und Charakter von gesunden Probanden unterscheiden (Engstrom et al., 2004; Mörtberg et al., 2007). Es bleibt allerdings unklar, ob es sich bei diesem Unterschied um die Folge der Erkrankung oder einen ätiologischen Risikofaktor handelt, der die Disposition erhöht

oder die klinische Ausprägung modifiziert (Jylha et al., 2011). Ein erhöhter Grad an HA konnte bereits wiederholt bei Patienten der bipolaren Störung festgestellt werden (Engstrom et al., 2004; Jylha et al., 2011; Loftus et al., 2008). Da rs10994359 in der Originalstudie des Psychiatric GWAS Consortiums unter anderem eine Assoziation zur bipolaren Störung zeigte, könnte der Polymorphismus durch seinen Einfluss auf Persönlichkeitszüge wie der HA zur Krankheitsentwicklung beitragen. Auch für die soziale Phobie gibt es viele Belege für eine Assoziation der Erkrankung zu einem erhöhten HA-Score (Kampman et al., 2014; Mörtberg et al., 2007). Schon die erhöhte Prävalenz von SAD in BD-Familien sowie die hohe Komorbiditätsrate zwischen den beiden Erkrankungen (Duffy et al., 2013; Hirshfeld-Becker et al., 2006; Merikangas et al., 2011) lässt den Verdacht auf ein gemeinsames genetisches Risikoprofil aufkommen. Angesichts der Assoziation zwischen dem BD-SNP rs10994359 und einem höheren Grad an HA bei Patienten der sozialen Phobie könnten diese Abweichungen in der Persönlichkeitsstruktur einen gemeinsamen Risikofaktor darstellen, der zur erhöhten Vulnerabilität für beide Erkrankungen führt. Ein möglicher zugrunde liegender Pathomechanismus stellt die o.g. Angst- und Stressmodulation durch den Polymorphismus in ANK3 dar.

HA ist nicht nur ein möglicher Faktor der Krankheitsentwicklung, er ist auch von großer Bedeutung für das Therapieergebnis. Mörtberg und Kollegen untersuchten den Einfluss der Temperament und Charakterdimensionen auf das Ergebnis unterschiedlicher Therapieformen und fanden heraus, dass eine hoher HA-Eingangsscore mit einem geringeren Therapieerfolg einhergeht (Mörtberg et al., 2007). Außerdem konnte gezeigt werden, dass es mit Reduktion der Angstsymptome auch zur Abnahme des Grades an HA kommt. So könnte der Polymorphismus rs10994359 in ANK3 über Veränderungen in der Persönlichkeitsdimension HA Einfluss auf die Symptomstärke bei der sozialen Phobie nehmen. Sicherlich ist die Kausalität komplex und es gilt die zugrunde liegenden Pathomechanismen weiter zu untersuchen. Zudem haben die Ergebnisse der quantitativen Analyse zum Grad an HA und zur Symptomstärke der Korrektur für multiples Testen nicht standgehalten. Daher sind weitere, größere genetische Studien notwendig, um die nominal signifikanten Befunde zu überprüfen.

Von den untersuchten 24 SNPs konnte für keinen Polymorphismus eine signifikante Assoziation zur sozialen Phobie, zur Symptomstärke oder zum Grad an Schadensvermeidung nach Korrektur für multiples Testen nachgewiesen werden. Dies kann durch verschiedene Einflussfaktoren bedingt sein, die bei Assoziationsanalysen multifaktorieller Erkrankungen, wie der sozialen Phobie, eine Rolle spielen.

Bisherige GWAS bei psychiatrischen Erkrankungen haben gezeigt, dass in der Regel ein Zusammenspiel vieler verschiedener, häufiger genetischer Varianten zur Krankheitsdisposition beiträgt. Dabei weisen die einzelnen assoziierten Varianten jedoch nur jeweils kleine Effekte (Odds Ratios $<1,2$) auf (Sullivan et al., 2018), sodass zum Nachweis dieser Effekte große Fall-Kontroll-Stichproben nötig sind (Visscher et al., 2012). Die Beobachtung, dass keiner der 24 untersuchten SNPs in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Assoziation zur sozialen Phobie, zur Symptomstärke oder zum Grad an Schadensvermeidung nach Korrektur für multiples Testen zeigte, könnte daher darauf hinweisen, dass die Größe des untersuchten Kollektivs limitierend war, um eine Assoziation häufiger Varianten mit kleinen Effektstärken nachzuweisen. Die statistische Teststärke kann bei polygenetischen Erkrankungen zudem durch weitere Faktoren eingeschränkt sein. Sind viele verschiedene genetische Veränderungen an der Krankheitsentwicklung beteiligt, kann bei Anlageträgern einzelner genetischer Risikofaktoren ein gesunder Phänotyp vorliegen. Dies kann zur Reduktion der Teststärke führen (Ohashi und Tokunaga, 2001; Risch, 2000). Da bei psychiatrischen Erkrankungen keine laborchemischen, histologischen oder radiologischen Parameter als Diagnosekriterien zur Verfügung stehen und die Diagnose durch klinische Beobachtung und Zuordnung von Symptomen zu einem Krankheitsbild gestellt wird, ist von einer phänotypischen Heterogenität innerhalb der Fallgruppe auszugehen (Manchia et al., 2013). Des Weiteren ist bei komplexen Erkrankungen eine genetische Heterogenität, bei der verschiedene unabhängige Suszeptibilitätsvarianten für ähnliche Symptomkomplexe prädisponieren, nicht auszuschließen (Risch, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass phänotypische und genetische Heterogenität sowohl zu einer Reduktion der Teststärke von Assoziationsanalysen, als auch zu einer reduzierten Effektstärke (OR) der beobachteten Suszeptibilitätsvarianten führen. Dies gilt insbesondere für Risikovarianten mit kleinem Effekt (OR $<1,2$) und für häufige Varianten (MAF $> 5\%$) (Manchia et al., 2013). Durch ein homogenes Fallkollektiv kann die Detektionswahrscheinlichkeit einer

bestehenden Assoziation erhöht werden. So konnte auch in der vorliegenden Studie eine stärkere Assoziation für rs140701 bei Ausschluss von SAD-Patienten mit der Nebendiagnose PD beobachtet werden. Ein weiterer limitierender Faktor der vorliegenden Studie stellt die Auswahl der Probanden des Kontrollkollektivs dar. Sie wurden zufällig unter freiwilligen Blutspendern der Universität Bonn ausgewählt. Es fand kein Screening für das Vorliegen einer sozialen Phobie statt. Es besteht also die Möglichkeit, dass Probanden mit sozialer Phobie in das Kontrollkollektiv eingeschlossen wurden, was die Teststärke der Assoziationsanalyse reduziert. Moskvina und Kollegen zeigten auf, dass die Reduktion der Teststärke durch eine willkürliche Auswahl der Kontrollen aus der Allgemeinbevölkerung von der Prävalenz der Erkrankung abhängt (Moskvina et al., 2005). Eine niedrige Prävalenz führt hierbei zu einer weniger starken Reduktion der Teststärke. Bei einer Prävalenz der sozialen Phobie von ca. 11 - 13 % (Kessler et al., 2012; Stein und Stein, 2008) ist anzunehmen, dass es zu keiner wesentlichen Reduktion der Teststärke gekommen ist (Moskvina et al., 2005).

Es ist nicht auszuschließen, dass die genannten limitierenden Faktoren dazu geführt haben, dass keine signifikante Assoziation nach Korrektur für multiples Testen nachzuweisen war. Es wäre daher wünschenswert, die vorliegenden Ergebnisse an einem größeren und homogeneren Kollektiv zu replizieren. Gelingt es in zukünftigen genetischen Studien zur sozialen Phobie krankheitsverursachende Varianten zu identifizieren und so die zugrunde liegenden Pathomechanismen zu erschließen, könnten die Erkenntnisse für einen Fortschritt in Diagnostik und Prävention sowie eine zielgerichtete Pharmakotherapie genutzt werden.

5. Zusammenfassung

Die soziale Phobie gehört mit einer Prävalenz von ca. 11 - 13 % zu einer der häufigsten psychiatrischen Erkrankungen. Aufgrund ihrer Krankheitsfolgen, wie soziale Isolation, schlechtere schulische und berufliche Leistungen, ist sie von großer sozioökonomischer Relevanz. Wie bei den meisten psychiatrischen Erkrankungen liegt auch der sozialen Phobie eine multifaktorielle Genese zugrunde. Für die Beteiligung von genetischen Faktoren an der Krankheitsentstehung spricht die familiäre Häufung, welche in Familienstudien aufgezeigt werden konnte. Des Weiteren ergaben Zwillingsstudien eine Heritabilität von ca. 20 - 50 %. Bisher konnten allerdings nur wenige genetische Risikovarianten für die soziale Phobie gefunden werden. Durch deren Identifizierung erhofft man sich ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Pathomechanismen, um so Fortschritte in der Diagnostik, Therapie und Prävention der sozialen Phobie erzielen zu können. Da Hinweise auf ein gemeinsames genetisches Risikoprofil unter psychiatrischen Erkrankungen existieren, erfolgte die systematische Untersuchung genetischer Varianten mit bereits beschriebener Assoziation zur sozialen Phobie und anderen psychiatrischen Erkrankungen auf ihren prädisponierenden Effekt bei der Entwicklung einer sozialen Phobie. Dies erfolgte in einem Fall-Kontroll-Kollektiv aus bisher nicht genotypisierten SAD-Patienten sowie zentraleuropäischen Kontrollen. Dazu wurden 24 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in einem Kollektiv aus 321 SAD-Fällen und 804 Kontrollen mithilfe des iPLEX Gold Sequenom MassARRAY Systems, basierend auf Single Base Extension und MALDI-TOF Massenspektroskopie, genotypisiert. Anschließend wurden die erhobenen Genotypen der 24 SNPs auf Assoziation zur SAD untersucht und quantitative Assoziationsanalysen zur Symptomstärke (erhoben durch den SPIN-Score) und zum Grad an Schadensvermeidung (Temperamentdimension nach Cloninger, erhoben durch den TCI-Score) durchgeführt.

Keine der untersuchten Varianten zeigte eine signifikante Assoziation zur SAD nach Bonferroni Korrektur. Der SNP rs140701 im Gen des Serotonintransporters (*SLC6A4*) erreichte nominale Signifikanz. Das Ergebnis für rs140701 konnte durch Ausschluss der Patienten mit komorbider PD, trotz deutlich kleinerer Fallzahl (188 statt 303),

bestärkt werden. Die stärkste Assoziation zur Symptomstärke und zum Grad an Schadesvermeidung bestand für den Polymorphismus rs10994359 im Gen *ANK3*.

Die vorliegende Studie deutet auf die Beteiligung von *SLC6A4* in der Ätiologie der SAD hin. Zudem scheint ein Einfluss von *ANK3* bei der Entwicklung von ängstlich vermeidender Persönlichkeit mit Auswirkungen auf die Symptomstärke der SAD möglich. Da die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Assoziationen einer Korrektur für multiples Testen nicht standhielten, gilt es die vorliegenden Ergebnisse in zukünftigen Studien mit Kollektiven größerer Fallzahl zu bestätigen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ablauf des iPLEX-Verfahrens	S. 37
Abb. 2a: Spektrum des SNPs rs9371601 bei einer heterozygoten (G/T) Person	S. 45
Abb. 2b: Spektrum des SNPs rs9371601 bei einer homozygoten (T/T) Person	S. 45
Abb. 3: Clusterplot des SNPs rs2239547	S. 46
Abb. 4: Boxplot zur Darstellung der Abhängigkeit des SPIN-Summenwertes vom vorliegenden Genotyp an Position des SNPs rs10994359	S. 55
Abb. 5: Boxplot zur Darstellung der Abhängigkeit des Grades an HA vom vorliegenden Genotyp an Position des SNPs rs10994359	S. 57

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Demographische und medizinische Daten des Fallkollektivs (nach QC)	S. 31
Tab. 2: SNPs mit Assoziation zur sozialen Phobie	S. 32
Tab. 3: SNPs mit Assoziation zu Angsterkrankungen	S. 32
Tab. 4: SNPs mit Assoziation zur bipolaren Störung	S. 33
Tab. 5: SNPs mit Assoziation zu fünf psychiatrischen Erkrankungen	S. 33
Tab. 6: Protokoll zur DNA-Isolierung aus 10ml Vollblut	S. 35
Tab. 7: Übersicht der Sequenzen der Vorwärts- und Rückwärtsprimer	S. 39
Tab. 8: PCR-Ansatz	S. 39
Tab. 9: Thermocycler-Programm für die PCR	S. 40
Tab. 10: SAP-Ansatz	S. 40
Tab. 11: Thermocycler-Programm für die SAP-Verdau	S. 41
Tab. 12: Übersicht der verwendeten Extensionsprimer	S. 42
Tab. 13: Extensions-Ansatz	S. 43
Tab. 14: Thermocycler-Programm für die Single Base Extension	S. 43
Tab. 15: Genotypenverteilung unter Patienten und Kontrollen	S. 49
Tab. 16: Allelverteilung unter Patienten und Kontrollen	S. 49
Tab. 17: Ergebnisse der Assoziationsanalyse im gesamten Fall-Kontroll-Kollektiv	S. 52
Tab. 18: Ergebnisse der Assoziationsanalysen und der quantitativen Analysen	S. 54

8. Literaturverzeichnis

Ala A, Walker AP, Ashkan K, Dooley JS, Schilsky ML. Wilson's Disease. *Lancet* 2007; 369: 397-408.

Altieri SC, Yang H, O'Brien HJ, Redwine HM, Senturk D, Hensler JG, Andrews AM. Perinatal vs genetic programming of serotonin states associated with anxiety. *Neuropsychopharmacology* 2015; 40: 1456–1470

Angenendt J, Hohagen F. Phobien und Panikstörungen. In: Batra A, Wassmann R, Buchkremer G, Hrsg. *Verhaltenstherapie*. Stuttgart: Thieme, 2013: 156–166

Antony MM, Coons MJ, McCabe RE, Ashbaugh A, Swinson RP. Psychometric properties of the social phobia inventory: further evaluation. *Behav Res Ther* 2006; 44: 1177–1185

Armitage P. Tests for Linear Trends in Proportions and Frequencies. *Biometrics* 1955; 11: 375–386

Atkins PW, de Paula J. *Physikalische Chemie*. Weinheim: Wiley-VCH, 2013

Bandelow B, Charimo Torrente A, Wedekind D, Broocks A, Hajak G, Ruther E. Early traumatic life events, parental rearing styles, family history of mental disorders, and birth risk factors in patients with social anxiety disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2004; 254: 397–405

Bandelow B, Lichte T, Rudolf S, Wiltink J, Beutel M. *S3-Leitlinie Angststörungen*. Berlin: Springer, 2015

Beesdo K, Bittner A, Pine DS, Stein MB, Höfler M, Lieb R, Wittchen HU. Incidence of social anxiety disorder and the consistent risk for secondary depression in the first three decades of life. *Arch Gen Psychiatry* 2007; 64: 903–912

Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006; 73: 495-504

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Stryer Biochemie*. Berlin Heidelberg: Springer, 2013

Berrettini W. Evidence for shared susceptibility in bipolar disorder and schizophrenia. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2003; 123: 59–64

Bickeböller H, Fischer C. *Einführung in die Genetische Epidemiologie*. Berlin Heidelberg: Springer, 2007

Blanco C, Bragdon LB, Schneier FR, Liebowitz MR. The evidence-based pharmacotherapy of social anxiety disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 2013; 16: 235–249

Brainstorm Consortium. Analysis of shared heritability in common disorders of the brain. *Science* 2018; 360: e8757

Brook CA, Schmidt LA. Social anxiety disorder: a review of environmental risk factors. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2008; 4: 123–143

Cichon S, Mühleisen TW, Degenhardt FA, Mattheisen M, Miró X, Strohmaier J, Steffens M, Meesters C, Herms S, Weingarten M, Priebe L, Haenisch B, Alexander M, Vollmer J, Breuer R, Schmääl C, Tessmann P, Moebus S, Wichmann H-E, Schreiber S, Müller-Myhsok B, Lucae S, Jamain S, Leboyer M, Bellivier F, Etain B, Henry C, Kahn J-P, Heath S, Hamshere M, O'Donovan MC, Owen MJ, Craddock N, Schwarz M, Vedder H, Kammerer-Ciernioch J, Reif A, Sasse J, Bauer M, Hautzinger M, Wright A, Mitchell PB, Schofield PR, Montgomery GW, Medland SE, Gordon SD, Martin NG, Gustafsson O, Andreassen O, Djurovic S, Sigurdsson E, Steinberg S, Stefansson H, Stefansson K, Kapur-Pojkic L, Oruc L, Rivas F, Mayoral F, Chuchalin A, Babadjanova G, Tiganov AS, Pantelejeva G, Abramova LI, Grigoriou-Serbanescu M, Diaconu CC, Czerski PM, Hauser J, Zimmer A, Lathrop M, Schulze TG, Wienker TF, Schumacher J, Maier W, Propping P, Rietschel M, Nöthen MM. Genome-wide association study identifies genetic

variation in neurocan as a susceptibility factor for bipolar disorder. *Am J Hum Genet* 2011; 88: 372–381

Clark DM, McManus F. Information processing in social phobia. *Biol Psychiatry* 2002; 51: 92–100

Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc* 2011; 6: 121–133

Cloninger CR, Svrakic DM, Przybeck TR. A psychobiological model of temperament and character. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50: 975–990

Connor KM, Davidson JR, Churchill LE, Sherwood A, Foa E, Weisler RH. Psychometric properties of the Social Phobia Inventory (SPIN). New self-rating scale. *Br J Psychiatry* 2000; 176: 379–386

Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *Lancet* 2013; 381: 1371–1379

Daly AK, Day CP. Candidate Gene Case-Control Association Studies: Advantages and Potential Pitfalls. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 52: 489-99

David DJP, Bourin M, Jegu G, Przybylski C, Jolliet P, Gardier AM. Effects of acute treatment with paroxetine, citalopram and venlafaxine in vivo on noradrenaline and serotonin outflow. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 1128–1136

Deister A. Angst- und Panikstörungen. In: Möller H-J, Laux G, Deister A, Hrsg. *Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie*. Stuttgart: Thieme, 2013: 127–144

Denomme GA. Single base extension in multiplex blood group genotyping. *Methods Mol Biol* 2009; 496: 15-24

Dilling H, Mombour W, Schmidt MH, Schulte-Markwort E. Internationale Klassifikation psychischer Störungen. Bern: Huber, 2011

Donner J, Pirkola S, Silander K, Kananen L, Terwilliger JD, Lönqvist J, Peltonen L, Hovatta I. An association analysis of murine anxiety genes in humans implicates novel candidate genes for anxiety disorders. *Biol Psychiatry* 2008; 64: 672–680

Donner J, Sipilä T, Ripatti S, Kananen L, Chen X, Kendler KS, Lönqvist J, Pirkola S, Hetttema JM, Hovatta I. Support for involvement of glutamate decarboxylase 1 and neuropeptide Y in anxiety susceptibility. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012; 159: 316–327

Duffy A, Horrocks J, Doucette S, Keown-Stoneman C, McCloskey S, Grof P. Childhood anxiety: An Early Predictor of Mood Disorders in Offspring of Bipolar Parents. *J Affect Disord* 2013; 150: 363–369

Engstrom C, Brandstrom S, Sigvardsson S, Cloninger R, Nylander PO. Bipolar disorder: I. Temperament and Character. *J Affect Disord* 2004; 82: 131–134

Erhardt A, Akula N, Schumacher J, Czamara D, Karbalai N, Müller-Myhsok B, Mors O, Borglum A, Kristensen AS, Woldbye DPD, Koefoed P, Eriksson E, Maron E, Metspalu A, Nurnberger J, Philibert RA, Kennedy J, Domschke K, Reif A, Deckert J, Otowa T, Kawamura Y, Kaiya H, Okazaki Y, Tani H, Tokunaga K, Sasaki T, Ioannidis, JPA, McMahon FJ, Binder EB. Replication and meta-analysis of TMEM132D gene variants in panic disorder. *Transl Psychiatry* 2012; 2: e156

Erhardt A, Czubere L, Roeske D, Lucae S, Unschuld PG, Ripke S, Specht M, Kohli MA, Kloiber S, Ising M, Heck A, Pfister H, Zimmermann P, Lieb R, Pütz B, Uhr M, Weber P, Deussing JM, Gonik M, Bunck M, Keßler MS, Frank E, Hohoff C, Domschke K, Krakowitzky P, Maier W, Bandelow B, Jacob C, Deckert J, Schreiber S, Strohmaier J, Nöthen M, Cichon S, Rietschel M, Bettecken T, Keck ME, Landgraf R, Müller-Myhsok B,

Holsboer F, Binder EB. TMEM132D, a new candidate for anxiety phenotypes: evidence from human and mouse studies. *Mol Psychiatry* 2011; 16: 647–663

Farrer LA, Kranzler HR, Yu Y, Weiss RD, Brady KT, Anton R, Cubells JF, Gelernter J. Association of Variants in MANEA With Cocaine-Related Behaviors. *Arch Gen Psychiatry* 2009; 66: 267–274

Fehm L, Knappe S. Soziale Phobie. In: Wittchen HU, Hoyer J, Hrsg. *Klinische Psychologie & Psychotherapie*. Heidelberg: Springer-Medizin, 2011: 954–969

Fehm L, Pelissolo A, Furmark T, Wittchen HU. Size and burden of social phobia in Europe. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005; 15: 453–462

Ferreira MAR, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR, Ruderfer DM, Jones L, Fan J, Kirov G, Perlis RH, Green EK, Smoller JW, Grozeva D, Stone J, Nikolov I, Chambert K, Hamshere ML, Nimgaonkar VL, Moskvina V, Thase ME, Caesar S, Sachs GS, Franklin J, Gordon-Smith K, Ardlie KG, Gabriel SB, Fraser C, Blumenstiel B, DeFelice M, Breen G, Gill M, Morris DW, Elkin A, Muir WJ, McGhee KA, Williamson R, MacIntyre DJ, MacLean AW, Clair DS, Robinson M, van Beck M, Pereira ACP, Kandaswamy R, McQuillin A, Collier DA, Bass NJ, Young AH, Lawrence J, Ferrier IN, Anjorin A, Farmer A, Curtis D, Scolnick EM, McGuffin P, Daly MJ, Corvin AP, Holmans PA, Blackwood DH, Gurling HM, Owen MJ, Purcell SM, Sklar P, Craddock N, Wellcome Trust Case Control Consortium. Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet* 2008; 40: 1056–1058

Forstner AJ, Rambau S, Friedrich N, Ludwig KU, Böhmer AC, Mangold E, Maaser A, Hess T, Kleiman A, Bittner A, Nöthen MM, Becker J, Geiser F, Schumacher J, Conrad R. Further evidence for genetic variation at the serotonin transporter gene SLC6A4 contributing toward anxiety. *Psychiatr Genet* 2017; 27: 96–102

Friborg O, Martinussen M, Kaiser S, Øvergård KT, Rosenvinge JH. Comorbidity of personality disorders in anxiety disorders: A meta-analysis of 30 years of research. *J Affect Disord* 2013; 145: 143–155

Frick A, Ahs F, Engman J, Jonasson M, Alaie I, Bjorkstrand J, Frans O, Faria V, Linnman C, Appel L, Wahlstedt K, Lubberink M, Fredrikson M, Furmark T. Serotonin Synthesis and Reuptake in Social Anxiety Disorder: A Positron Emission Tomography Study. *JAMA Psychiatry* 2015; 72: 794–802

Fyer AJ, Mannuzza S, Chapman TF, Liebowitz MR, Klein DF. A direct interview family study of social phobia. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50: 286–293

Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 2002; 296: 2225–2229

GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *Lancet* 2017; 390: 1211–1259

Ghods M, Amiri S, Hassani H, Ghods Z. An enhanced version of Cochran-Armitage trend test for genome-wide association studies. *Meta Gene* 2016; 9: 225–229

Green EK, Grozeva D, Forty L, Gordon-Smith K, Russell E, Farmer A, Hamshere M, Jones IR, Jones L, McGuffin P, Moran JL, Purcell S, Sklar P, Owen MJ, O'Donovan MC, Craddock N. Association at SYNE1 in both bipolar disorder and recurrent major depression. *Mol Psychiatry* 2013a; 18: 614–617

Green EK, Grozeva D, Jones I, Jones L, Kirov G, Caesar S, Gordon-Smith K, Fraser C, Forty L, Russell E, Hamshere ML, Moskvina V, Nikolov I, Farmer A, McGuffin P,

Holmans PA, Owen MJ, O'Donovan MC, Craddock N. The bipolar disorder risk allele at CACNA1C also confers risk of recurrent major depression and of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2010; 15: 1016–1022

Green EK, Hamshere M, Forty L, Gordon-Smith K, Fraser C, Russell E, Grozeva D, Kirov G, Holmans P, Moran JL, Purcell S, Sklar P, Owen MJ, O'Donovan MC, Jones L, Jones IR, Craddock N. Replication of bipolar disorder susceptibility alleles and identification of two novel genome-wide significant associations in a new bipolar disorder case-control sample. *Mol Psychiatry* 2013b; 18: 1302–1307

Heimberg RG, Horner KJ, Juster HR, Safren SA, Brown EJ, Schneier FR, Liebowitz MR. Psychometric properties of the Liebowitz Social Anxiety Scale. *Psychol Med* 1999; 29: 199–212

Helbig S, Petermann F. Entwicklungspsychopathologie Sozialer Angststörungen. *Zeitschrift für Psychiatrie, Psychologie und Psychotherapie* 2008; 3: 211–227

Hettema JM, Neale MC, Kendler KS. A review and meta-analysis of the genetic epidemiology of anxiety disorders. *Am J Psychiatry* 2001; 158: 1568–1578

Hettema JM, Prescott CA, Myers JM, Neale MC, Kendler KS. The Structure of Genetic and Environmental Risk Factors for Anxiety Disorders in Men and Women. *Arch Gen Psychiatry* 2005; 62: 182–189

Hirshfeld-Becker DR, Biederman J, Henin A, Faraone SV, Dowd ST, de Petrillo LA, Markowitz SM, Rosenbaum JF. Psychopathology in the young offspring of parents with bipolar disorder. *Psychiatry Res* 2006; 145: 155–167

Holmes A, Murphy DL, Crawley JN. Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression. *Biol Psychiatry* 2003; 54: 953–959

Hovatta I, Tennant RS, Helton R, Marr RA, Singer O, Redwine JM, Ellison JA, Schadt EE, Verma IM, Lockhart DJ, Barlow C. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 2005; 438: 662–666

Jensen KP, Stein MB, Kranzler HR, Yang BZ, Farrer LA, Gelernter J. The α -endomannosidase gene (MANEA) is associated with panic disorder and social anxiety disorder. *Transl Psychiatry* 2014; 28: e353

Joe KH, Kim DJ, Park BL, Yoon S, Lee HK, Kim TS, Cheon YH, Gwon DH, Cho SN, Lee HW, Namgung S, Shin HD. Genetic association of DRD2 polymorphisms with anxiety scores among alcohol-dependent patients. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 371: 591–595

Jylha P, Mantere O, Melartin T, Suominen K, Vuorilehto M, Arvilommi P, Holma I, Holma M, Leppamaki S, Valtonen H, Rytala H, Isometsa E. Differences in temperament and character dimensions in patients with bipolar I or II or major depressive disorder and general population subjects. *Psychol Med* 2011; 41: 1579–1591

Kalueff AV, Olivier JDA, Nonkes LJP, Homberg JR. Conserved role for the serotonin transporter gene in rat and mouse neurobehavioral endophenotypes. *Neurosci Biobehav Rev* 2010; 34: 373–386

Kampman O, Viikki M, Jarventausta K, Leinonen E. Meta-analysis of anxiety disorders and temperament. *Neuropsychobiology* 2014; 69: 175–186

Keller MC, Coventry WL, Heath AC, Martin NG. Widespread evidence for non-additive genetic variation in Cloninger's and Eysenck's personality dimensions using a twin plus sibling design. *Behav Genet* 2005; 35: 707–721

Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA. Fears and phobias: reliability and heritability. *Psychol Med* 1999; 29: 539–553

Kendler KS, Myers J, Prescott CA, Neale MC. The Genetic Epidemiology of Irrational Fears and Phobias in Men. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 257–265

Kessler RC, Petukhova M, Sampson NA, Zaslavsky AM, Wittchen HU. Twelve-month and lifetime prevalence and lifetime morbid risk of anxiety and mood disorders in the United States. *Int J Methods Psychiatr Res* 2012; 21: 169–184

Knappe S, Beesdo-Baum K, Wittchen HU. Familial risk factors in social anxiety disorder: calling for a family-oriented approach for targeted prevention and early intervention. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2010; 19: 857–871

Kraemer S. Angststörungen (F40 und F41). In: Leucht S, Förstl H, Hrsg. *Kurzlehrbuch Psychiatrie und Psychotherapie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2012: 123–134

Lanzenberger RR, Mitterhauser M, Spindelegger C, Wadsak W, Klein N, Mien LK, Holik A, Attarbaschi T, Mossaheb N, Sacher J, Geiss-Granadia T, Kletter K, Kasper S, Tauscher J. Reduced serotonin-1A receptor binding in social anxiety disorder. *Biol Psychiatry* 2007; 61: 1081–1089

Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996; 274: 1527–1531

Leussis MP, Berry-Scott EM, Saito M, Jhuang H, Haan G de, Alkan O, Luce CJ, Madison JM, Sklar P, Serre T, Root DE, Petryshen TL. The ANK3 bipolar disorder gene regulates psychiatric-related behaviors that are modulated by lithium and stress. *Biol Psychiatry* 2013; 73: 683–690

Lewis CM. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Brief Bioinform* 2002; 3: 146–153

Lichtenstein P, Yip BH, Björk C, Pawitan Y, Cannon TD, Sullivan PF, Hultman CM. Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. *Lancet* 2009; 373: 234–239

Loftus ST, Garino JL, Jaeger J, Malhotra AK. Temperament and character dimensions in bipolar I disorder: a comparison to healthy controls. *J Psychiatr Res* 2008; 42: 1131–1136

Loken EK, Hetttema JM, Aggen SH, Kendler KS. The structure of genetic and environmental risk factors for fears and phobias. *Psychol Med* 2014; 44: 2375–2384

Manchia M, Cullis J, Turecki G, Rouleau GA, Uher R, Alda M. The Impact of Phenotypic and Genetic Heterogeneity on Results of Genome Wide Association Studies of Complex Diseases. *PLoS One* 2013; 8: e76295

Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest* 2008; 118: 1590–1605

Mattick RP, Clarke JC. Development and validation of measures of social phobia scrutiny fear and social interaction anxiety. *Behav Res Ther* 1998; 36: 455–470

McGlinchey JB, Zimmerman M. Examining a dimensional representation of depression and anxiety disorders' comorbidity in psychiatric outpatients with item response modeling. *J Abnorm Psychol* 2007; 116: 464–474

McVean GAT, Myers SR, Hunt S, Deloukas P, Bentley DR, Donnelly P. The fine-scale structure of recombination rate variation in the human genome. *Science* 2004; 304: 581–584

Mehta A, Beck M, Eyskens F, Feliciani C, Kantola I, Ramaswami U, Rolfs A, Rivera A, Waldek S, Germain DP. Fabry Disease: A Review of Current Management Strategies. *QJM* 2010; 103: 641-659

Merikangas KR, Jin R, He J-P, Kessler RC, Lee S, Sampson NA, Viana MC, Andrade LH, Hu C, Karam EG, Ladea M, Medina-Mora ME, Ono Y, Posada-Villa J, Sagar R, Wells JE, Zarkov Z. Prevalence and correlates of bipolar spectrum disorder in the world mental health survey initiative. *Arch Gen Psychiatry* 2011; 68: 241–251

Mörtberg E, Bejerot S, Åberg Wistedt A. Temperament and character dimensions in patients with social phobia: Patterns of change following treatments?. *Psychiatry Res* 2007; 152: 81–90

Moskvina V, Holmans P, Schmidt KM, Craddock N. Design of case-controls studies with unscreened controls. *Ann Hum Genet* 2005; 69: 566–576

Mühleisen TW, Leber M, Schulze TG, Strohmaier J, Degenhardt F, Treutlein J, Mattheisen M, Forstner AJ, Schumacher J, Breuer R, Meier S, Herms S, Hoffmann P, Lacour A, Witt SH, Reif A, Müller-Myhsok B, Lucae S, Maier W, Schwarz M, Vedder H, Kammerer-Ciernioch J, Pfennig A, Bauer M, Hautzinger M, Moebus S, Priebe L, Czerski PM, Hauser J, Lissowska J, Szeszenia-Dabrowska N, Brennan P, McKay JD, Wright A, Mitchell PB, Fullerton JM, Schofield PR, Montgomery GW, Medland SE, Gordon SD, Martin NG, Krasnow V, Chuchalin A, Babadjanova G, Pantelejeva G, Abramova LI, Tiganov AS, Polonikov A, Khusnutdinova E, Alda M, Grof P, Rouleau GA, Turecki G, Laprise C, Rivas F, Mayoral F, Kogevinas M, Grigoriu-Serbanescu M, Propping P, Becker T, Rietschel M, Nöthen MM, Cichon S. Genome-wide association study reveals two new risk loci for bipolar disorder. *Nat Commun* 2014; 5: 3339

Nautiyal KM, Hen R. Serotonin receptors in depression: from A to B. *F1000Res* 2017; 6: 123

Nelson EC, Grant JD, Bucholz KK, Glowinski A, Madden PA, Reich W, Heath AC. Social phobia in a population-based female adolescent twin sample: co-morbidity and associated suicide-related symptoms. *Psychol Med* 2000; 30: 797–804

Nivard MG, Mbarek H, Hottenga JJ, Smit JH, Jansen R, Penninx BW, Middeldorp CM, Boomsma DI. Further confirmation of the association between anxiety and CTNND2: replication in humans. *Genes Brain Behav* 2014; 13: 195–201

O'Donovan MC, Craddock N, Norton N, Williams H, Peirce T, Moskvina V, Nikolov I, Hamshere M, Carroll L, Georgieva L, Dwyer S, Holmans P, Marchini JL, Spencer CCA, Howie B, Leung HT, Hartmann AM, Möller HJ, Morris DW, Shi Y, Feng G, Hoffmann P, Propping P, Vasilescu C, Maier W, Rietschel M, Zammit S, Schumacher J, Quinn EM, Schulze TG, Williams NM, Giegling I, Iwata N, Ikeda M, Darvasi A, Shifman S, He L, Duan J, Sanders AR, Levinson DF, Gejman PV, Cichon S, Nöthen MM, Gill M, Corvin A, Rujescu D, Kirov G, Owen MJ, Buccola NG, Mowry BJ, Freedman R, Amin F, Black DW, Silverman JM, Byerley WF, Cloninger CR, Molecular Genetics of Schizophrenia Collaboration. Identification of loci associated with schizophrenia by genome-wide association and follow-up. *Nat Genet* 2008; 40: 1053–1055

Oeth P, Beaulieu M, Park C, Kosman D, del Mistro G, van den Boom D, Jurinke C, 2005: IPLEX™ Assay: Increased plexing efficiency and flexibility for MassARRAY system through single base primer extension with mass-modified terminators. <https://www.garvan.org.au/research/capabilities/molecular-genetics/documents/sequenom-plex-assay.pdf> (Zugriffsdatum: 29.02.2020)

Ohashi J, Tokunaga K. The Power of Genome-Wide Association Studies of Complex Disease Genes: Statistical Limitations of Indirect Approaches Using SNP Markers. *J Hum Genet* 2001; 46: 478-82

Olivier B, Pattij T, Wood SJ, Oosting R, Sarnyai Z, Toth M. The 5-HT(1A) receptor knockout mouse and anxiety. *Behav Pharmacol* 2001; 12: 439–450

Paulitsch K. Grundlagen der ICD-10-Diagnostik. Stuttgart: UTB, 2009

Phillips KA, Craske MG, Andrews JG, Bögels SM, Friedmann MJ, Hollander E, Lewis-Fernández R, Pynoos RS, Rauch SL, Simpson HB, Spiegel D, Stein DJ, Stein MB,

Ursano RJ, Wittchen HU. Anxiety, Obsessive-Compulsive Spectrum, Posttraumatic, and Dissociative Disorders. In: American Psychiatric Association, Hrsg. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition (DSM-5[®]). Washington, D.C: American Psychiatric Publishing, 2013: 189–233

Pollack MH, van Ameringen M, Simon NM, Worthington JW, Hoge EA, Keshaviah A, Stein MB. A double-blind randomized controlled trial of augmentation and switch strategies for refractory social anxiety disorder. *Am J Psychiatry* 2014; 171: 44–53

Pritchard JK, Przeworski M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. *Am J Hum Genet* 2001; 69: 1–14

Psychiatric GWAS Consortium Bipolar Disorder Working Group. Large-scale genome-wide association analysis of bipolar disorder identifies a new susceptibility locus near ODZ4. *Nat Genet* 2011; 43: 977–983

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, Bakker PIW de, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 559–575

Ranta K, Kaltiala-Heino R, Rantanen P, Tuomisto MT, Marttunen M. Screening social phobia in adolescents from general population: the validity of the Social Phobia Inventory (SPIN) against a clinical interview. *Eur Psychiatry* 2007; 22: 244–251

Risch NJ. Searching for Genetic Determinants in the New Millennium. *Nature* 2000; 405: 847-56

Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet* 2011; 43: 969–976

Schumacher J, Deckert J. Serotonin transporter polymorphisms and panic disorder. *Genome Med* 2010; 2: 40

Sipilä T, Kananen L, Greco D, Donner J, Silander K, Terwilliger JD, Auvinen P, Peltonen L, Lönnqvist J, Pirkola S, Partonen T, Hovatta I. An association analysis of circadian genes in anxiety disorders. *Biol Psychiatry* 2010; 67: 1163–1170

Skre I, Onstad S, Torgersen S, Philos DR, Lygren S, Kringlen E. The heritability of common phobic fear: a twin study of a clinical sample. *J Anxiety Disorders* 2000; 14: 549–562

Sosic Z, Gieler U, Stangier U. Screening for social phobia in medical in- and outpatients with the German version of the Social Phobia Inventory (SPIN). *J Anxiety Disord* 2008; 22: 849–859

Stein MB, Andrews AM. Serotonin States and Social Anxiety. *JAMA Psychiatry* 2015; 72: 845–847

Stein MB, Seedat S, Gelernter J. Serotonin transporter gene promoter polymorphism predicts SSRI response in generalized social anxiety disorder. *Psychopharmacology* 2006; 187: 68–72

Stein MB, Stein DJ. Social anxiety disorder. *Lancet* 2008; 371: 1115–1125

Storm N, Darnhofer-Patel B, van den Boom D, Rodi CP. MALDI-TOF Mass Spectrometry-Based SNP Genotyping. *Methods Mol Biol* 2003; 212: 241-262

Strachan T, Read AP. *Molekulare Humangenetik*. München, Heidelberg: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag 2005

Strug LJ, Suresh R, Fyer AJ, Talati A, Adams PB, Li W, Hodge SE, Gilliam TC, Weissman MM. Panic disorder is associated with the serotonin transporter gene (SLC6A4) but not the promoter region (5-HTTLPR). *Mol Psychiatry* 2010; 15: 166–176

Sullivan PF, Agrawal A, Bulik CM, Andreassen OA, Børglum AD, Breen G, Cichon S, Edenberg HJ, Faraone SV, Gelernter J, Mathews CA, Nievergelt CM, Smoller JW, O'Donovan MC, Psychiatric Genomics Consortium. Psychiatric Genomics: An Update and an Agenda. *Am J Psychiatry* 2018; 175: 15-27

Tylee A, Walters P. Onset of action of antidepressants. *BMJ* 2007; 334: 911–912

van der Linden GJ, Stein DJ, van Balkom AJ. The efficacy of the selective serotonin reuptake inhibitors for social anxiety disorder (social phobia): a meta-analysis of randomized controlled trials. *Int Clin Psychopharmacol* 2000; 15: 15-23

Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet* 2012; 90: 7–24

Wald A. *Sequential analysis*. New York: Wiley, 1947

Wall JD, Pritchard JK. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 587–597

Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, Geer LY, Kapustin Y, Khovayko O, Landsman D, Lipman DJ, Madden TL, Maglott DR, Ostell J, Miller V, Pruitt KD, Schuler GD, Sequeira E, Sherry ST, Sirotkin K, Souvorov A, Starchenko G, Tatusov RL, Tatusova TA, Wagner L, Yaschenko E. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: 5-12

Williams HJ, Norton N, Dwyer S, Moskvina V, Nikolov I, Carroll L, Georgieva L, Williams NM, Morris DW, Quinn EM, Giegling I, Ikeda M, Wood J, Lencz T, Hultman C,

Lichtenstein P, Thiselton D, Maher BS, Malhotra AK, Riley B, Kendler KS, Gill M, Sullivan P, Sklar P, Purcell S, Nimgaonkar VL, Kirov G, Holmans P, Corvin A, Rujescu D, Craddock N, Owen MJ, O'Donovan MC. Fine mapping of ZNF804A and genome-wide significant evidence for its involvement in schizophrenia and bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 2011; 16: 429–441

World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. Geneva: World Health Organization, 2008

World Health Organization. Mental health atlas 2011. Geneva: World Health Organization, 2011

Yu Y, Kranzler HR, Panhuysen C, Weiss RD, Poling J, Farrer LA, Gelernter J. Substance Dependence Low Density Whole Genome Association Study In Two Distinct American Populations. *Hum Genet* 2008; 123: 495–506

Zhong H, Haddjeri N, Sanchez C. Escitalopram, an antidepressant with an allosteric effect at the serotonin transporter--a review of current understanding of its mechanism of action. *Psychopharmacology* 2012; 219: 1–13

Ziegler A, König IR. A statistical approach to genetic epidemiology. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010

Zurflüh MR, Zschocke J, Lindner M, Feillet F, Chery C, Burlina A, Stevens RC, Thöny B, Blau N. Molecular Genetics of Tetrahydrobiopterin-Responsive Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. *Hum Mutat* 2008; 29: 167-175

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Johannes Schumacher für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas, die freundliche Zusammenarbeit und die konstruktiven Anregungen bedanken.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Markus M. Nöthen für die Möglichkeit diese Arbeit unter Bereitstellung aller erforderlichen Mittel am Institut für Humangenetik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Andreas J. Forstner für die hervorragende Betreuung und Unterstützung in den letzten Jahren, für die sorgfältige Durchsicht dieser Arbeit sowie die hilfreichen Anmerkungen und Ratschläge, die mir sehr bei der Fertigstellung geholfen haben.

Für die exzellente Einarbeitung in die labortechnischen Arbeitsweisen, die zahlreichen fachlichen Hilfestellungen und ihre permanente Hilfsbereitschaft möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Jessica Becker bedanken. Ihre Unterstützung hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Einen großen Dank möchte ich allen ehemaligen Kollegen am Institut aussprechen. Die freundliche Atmosphäre im Labor hat sehr zu meiner Freude an dem Projekt beigetragen. Insbesondere Frau Sandra Barth und Frau Bärbel Lippke möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft danken.

Der gesamten Arbeitsgruppe und den Kolleginnen und Kollegen der Klinik und Poliklinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie des Uniklinikums Bonn danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Mein aufrichtiger Dank gilt außerdem den Patientinnen und Patienten, ohne deren Studienteilnahme dieses Projekt nicht hätte realisiert werden können.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie, meinen Freundinnen und meinem Freund für die moralische Unterstützung, Geduld und Nachsicht bedanken. Insbesondere danke ich meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben.