Institut für Naturheilkunde und Klinische Pharmakologie der Universität Ulm

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Simmet

Pharmakogenetik von Antidepressiva: Methoden für pharmakologisch basierte Response Biomarker

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. biol. hum.) der medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Kristina Probst-Schendzielorz
aus Berlin

2018

Amtierender Dekan: Prof. Thomas Simmet

1. Berichterstatter: Prof. Julia Stingl

2. Berichterstatter: Prof. Tatiana Syrovets

Tag der Promotion: 18. Januar 2019

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert in: K. Probst-Schendzielorz, C. Scholl, O. Efimkina, E. Ersfeld, R. Viviani, A. Serretti, C. Fabbri, D. Gurwitz, S. Lucae, M. Ising, A. M. Paul, M.-L. Lehmann, M. Steffens, C. Crisafulli, M. Calabrò, F. Holsboer, and J. Stingl, "CHL1, ITGB3 and SLC6A4 gene expression and antidepressant drug response: results from the Munich Antidepressant Response Signature (MARS) study.," *Pharmacogenomics*, pp. 1–13, May 2015. Copyright 2015 Pharmacogenomics [163]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis VI
1 Einleitung 1
1.1 Pharmakogenetik ... 1
1.2 Pharmakogenetik von Antidepressiva ... 2
1.2.1 Einfluss genetischer Variabilitäten im Bereich der Pharmakokinetik ... 2
1.2.2 Genetische Variabilität auf Seiten der Pharmakodynamik ... 4
1.3 Biomarker für das Ansprechen der antidepressiven Therapie ... 4
1.4 LCLs als Modell zur Untersuchung von Arzneimitteleffekten ... 7
1.5 Zelltoxizität als *in vitro* Marker für Arzneimitteleffekte ... 7
1.6 Klinische Studien: Das PADRE Projekt ... 8
1.6.1 CHL1 und ITGB3 als potentielle Response Biomarker ... 9
1.7 Serotonintransporter als Angriffspunkt von SSRIs und TCAs ... 11
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit ... 12
2 Materialien und Methoden 14
2.1 Chemikalien, Lösungen und Kulturmedien ... 14
2.1.1 Kits ... 16
2.1.2 Geräte ... 16
2.1.3 Verbrauchsmaterialien ... 17
2.2 Methoden ... 17
2.2.1 Klinische Daten der MARS-Patienten ... 17
2.2.2 Studienpopulation - LCL Kohorte ... 19
2.2.3 Bestimmung der *in vitro* Sensitivitäten mittels XTT Assay ... 21
2.2.4 RNA Extraktion und Reverse Transkription ... 22
2.2.5 Real Time Quantitative PCR ... 23
2.2.6 DNA Extraktion ... 24
2.2.7 CHL1 Genotypisierung ... 24
2.2.8 ITGB3 Genotypisierung ... 26
2.2.9 Serotonintransporter Genotypisierung ... 28
2.3 Statistik ... 31
3 Ergebnisse 32
3.1 Ergebnisse der Patienten der MARS-Studie ... 32
3.2 Bestimmung der *in vitro* Sensitivitäten ... 33

3.3 *In vitro* Sensitivitäten und Therapieergebnisse 37
3.4 Genexpressionen von *CHL1*, *ITGB3* und *SLC6A4* 37
3.5 Genexpressionen und *in vitro* Sensitivitäten 40
3.6 Genexpressionen und Therapieergebnisse 40
3.7 Genetische Varianten in *CHL1* 42
3.8 Genetische Varianten im *ITGB3* 42
3.9 Genetische Varianten im *SLC6A4* 43
3.10 Genetische Varianten in *CHL1* und *in vitro* Sensitivitäten 44
3.11 Genetische Varianten in *ITGB3* und *in vitro* Sensitivitäten 45
3.12 Genetische Varianten in *SLC6A4* und *in vitro* Sensitivitäten 45
3.13 Genetische Varianten in *CHL1*, *ITGB3*, *SLC6A4* und Genexpressionen 47
3.13.1 *CHL1* Genotypen und Genexpressionen 47
3.13.2 *ITGB3* Genotypen und Genexpressionen 47
3.13.3 *SLC6A4* Genotypen und Genexpressionen 47
3.14 Therapieansprechen und Polymorphismen in *CHL1*, *ITGB3* und *SLC6A4* 47
3.14.1 Polymorphismen im *CHL1* und Therapieansprechen der MARS-Patienten 47
3.14.2 Polymorphismen in *ITGB3* und Therapieansprechen der MARS-Patienten 49
3.14.3 Polymorphismen im *SLC6A4* und Therapieansprechen der MARS-Patienten 50
4 Diskussion 51
4.1 LCLs als Modell zur Response Biomarkerfindung 54
4.2 *In vitro* Sensitivitäten der LCLs der Patienten der MARS-Studie 55
4.3 Genetische Varianten von *SLC6A4* und *in vitro* Sensitivitäten 57
4.4 Genexpressionen von *CHL1*, *ITGB3* und Serotonintransporter 58
4.5 Genexpressionen und *in vitro* Sensitivitäten 59
4.6 *CHL1* und *ITGB3* als mögliche Response Biomarker für den Therapieausgang 60
4.7 Ausblick 62
5 Zusammenfassung 65
6 Literaturverzeichnis 67
Anhang

Abkürzungsverzeichnis

µM	Mikromolar
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
bp	Basenpaar
BPD	Bipolar Disorder
BSA	Bovines Serum Albumin
CHL1	Cell adhesion molecule with homology to L1CAM
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
CYP	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dGTPs	Desoxyguanosintriphosphat
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
GWAS	Genomweite Assoziationsstudien
HDRS	Hamilton rating scale for depression
HHN-System	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (Nebenniere, engl. ‚adrenal gland')
5-HTTLPR	5-HTT gene linked polymorphic region
IC_{50}	Mittlere Inhibitorische Konzentration
ICD 10	International Classifications of Diseases; Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten
ITGB3	Integrin beta3
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
MAO-Hemmer	Monoaminooxidase-Hemmer
MARS	Munich Antidepressant Response Signature
MDD	Major Depression Disorder

Met	Methionin
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
MilliQ	Deionisiertes und aufgereinigtes Wasser
mM	Millimolar
NARI/NRI	Selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
NASSA	Noradrenerge und spezifisch serotonerge Antidepressiva
NDRI	Selektive Dopamin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
PADRE	Pharmacogenomics of Antidepressant Drug Response
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMS	N-Methyl-Dibenzopyrazinmethylsulfat
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ‚-acid')
RPMI 1640	Zellkulturmedium mit Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen
STAR*D	Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SLC6A4	Humaner Serotonintransporter (Genbezeichnung)
SNP	Single nucleotide polymorphism
SNRI	Selektive Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
TCA	Trizyklische Antidepressiva
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq Polymerase	Thermostabile *DNA* Polymerase des Bakteriums Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box binding protein
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBST	Tris-gepufferte Saline mit 0,05% Polysorbat20
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/µl	Enzyme (units) pro Mikroliter
Val	Valin

WHO	Weltgesundheitsorganisation
XTT	2,3-Bis-(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Salz

1 Einleitung

Psychische Störungen, und davon Depressionen, gehören zu den häufigsten Erkrankungen weltweit [220]. Die 12-Monatsprävalenz in Europa beträgt etwa 7 %, davon werden 15-25 % chronisch depressiv [16]. Die Weltgesundheitsbehörde WHO schätzt, dass 2020 Depressionen die zweithäufigste Ursache für verlorene potentielle Lebensjahre (Disability Adjusted Life Years, DALY) darstellen [166]. Ein weiteres Problem ist die hohe Suizidrate. 15 % der an Depression erkrankten Personen unternehmen einen Selbstmordversuch, etwa 60 % der Selbstmorde werden von Depressiven verübt [11]. Auch volkswirtschaftlich und gesundheitsökonomisch kommt der Volkskrankheit Depression große Bedeutung zu. Häufig sind Depressionen die Ursache für Frühberentung und Berufsunfähigkeit. Die Krankheitskosten in Deutschland beliefen sich laut Statistischem Bundesamt im Jahr 2008 auf über 5 Milliarden Euro [194]. Bei der Therapie von Depressionen sind Antidepressiva die erste Wahl. Diese Medikamente wirken jedoch sehr unterschiedlich bei verschiedenen Patienten, trotz vergleichbarer Dosierungen. Ob ein Behandlungserfolg zufriedenstellend erreicht wird, oder ob es zu Therapieversagen bzw. Nebenwirkungen kommt, lässt sich bei Verordnung eines Antidepressivums nicht ausreichend vorhersagen. So spricht nur etwa ein Drittel der Behandelten adäquat auf eine Therapie mit Antidepressiva an [16] [101] [114]. Zum anderen tritt eine antidepressive Wirkung in der Regel erst nach mehreren Wochen Behandlung ein [16]. Somit gehören Dosisänderungen, Medikamentenwechsel und Medikamentenkombinationen zum klinischen Alltag. Biomarker wären ein Instrument, um anhand genetischer Merkmale eine prognostische Aussage zu treffen, ob oder welches Antidepressivum und welche Dosierung bei einer bestimmten Person wirken wird.

1.1 Pharmakogenetik

Die Pharmakogenetik beschäftigt sich mit dem Einfluss genetisch bedingter Variabilitäten auf die Reaktion auf Arzneimittel. Solche genetische Varianten betreffen einerseits wichtige Enzyme des Fremdstoffmetabolismus oder Arzneistofftransporter und beeinflussen damit die Pharmakokinetik, also die Verstoffwechselung und Verteilung im Körper [98]. So kommt es zu unterschiedlichen Konzentrationen des Arzneimittels und dessen Metaboliten im Zielgewebe und Blut [103]. Anhand pharmakokinetischer Parameter (z. B. Plasmakonzentrationen, Konzentrations-Zeit-Kurven, Clearance oder Eliminationshalbwertszeiten) können solche

Einflüsse beschrieben werden [101]. Viele Arzneistoffe werden durch Enzyme des Cytochrom P450 Systems (CYP) metabolisiert [99] [103] [162]. Genetische Variabilitäten (Polymorphismen) in diesen Stoffwechselenzymen sind eine Ursache für große individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik. So entspricht die eingenommene Dosis nicht unbedingt parallel dem gemessenen Blutspiegel. Genetische Unterschiede treten andererseits auch in Zielstrukturen wie Arzneistofftransportern, -Rezeptoren, Ionenkanälen oder intrazellulären Signalwegen (Signaltransduktionsmolekülen) auf und beeinflussen dadurch die Wirkung von Arzneistoffen (Pharmakodynamik) [99] [112] [137] [172]. Somit können genetische Variabilitäten die Wirkung von Arzneistoffen von der Absorption bis zur Elimination beeinflussen. Ein wesentliches Ziel der Pharmakogenetik ist die optimale Auswahl und Dosierung eines Medikaments, angepasst an den individuellen Bedarf eines Patienten auf Grundlage seines genetischen Profils, um so Über- oder Unterdosierungen zu vermeiden.

1.2 Pharmakogenetik von Antidepressiva

1.2.1 Einfluss genetischer Variabilitäten im Bereich der Pharmakokinetik

Aufgrund genetischer Varianten (Genduplikationen, -insertionen, Basenpaardeletionen, Gendeletionen oder Einzelnukleotid-Polymorphismen), insbesondere in CYP2D6, CYP2C9 und CYP2C19 kommt es zu unterschiedlichen Phänotypen. Man unterscheidet je nach Aktivität in langsame Metabolisierer (poor metabolizer), intermediäre Metabolisierer (intermediate metabolizer), schnelle Metabolisierer (extensive metabolizer) und ultraschneller Metabolisierer (ultrarapid metabolizer) [136]. Bei intermediären Metabolisierern ist die Aktivität vermindert, bei langsamen Metabolisierern hingegen fehlt sie vollkommen [136]. Der schnelle Metabolisierer stellt den „Wildtyp“ dar, also die Normvariante. Ultraschnelle Metabolisierer verfügen über erhöhte Aktivität. Bei ihnen liegt das Gen für das entsprechende Enzym in mehreren Kopien vor [136]. Beispielsweise wurden bis zu 12 Kopien von CYP2D6*2 beschrieben [9]. Als Konsequenz kann es bei ultraschnellen Metabolisierern zu Therapieresistenz oder Ineffizienz aufgrund unzureichender Arzneistoffplasmaspiegel kommen [101]. Langsame Metabolisierer hingegen können durch erhöhte Plasmaspiegel unter mehr Nebenwirkungen leiden [101]. Folglich lässt es sich schwer von der Dosis auf die Plasmaspiegel schließen.

Die Häufigkeiten, mit der Polymorphismen in CYP Enzymen auftreten, variieren mitunter stark in verschiedenen Bevölkerungsgruppen und sollten bei der Therapie mit CYP-Substraten wie

Antidepressiva beachtet werden [100] [174]. So tritt beispielsweise ein genetisch bedingtes Defizit an CYP2D6 Enzymaktivität bei ca. 10 % der weißen Bevölkerung auf, der Phänotyp des ultraschnellen Metabolisierers hingegen unter 5 % in Kaukasiern und Afrikanern, jedoch bis zu 30 % in Saudi-Arabern und Äthiopiern [164]. CYP2D6 ist für den Metabolismus von einigen Trizyklischen Antidepressiva (TCAs; u. a. Amitriptylin, Imipramin, Nortriptylin, Desipramin, Doxepin), Selektiven Serotonin Wiederaufnahmehemmern (SSRIs; z. B. Paroxetin, Fluoxetin und Fluvoxamin) und anderen Antidepressiva (Duloxetin, Mianserin, Maprotilin und Mirtazapin) hauptverantwortlich [195]. Für CYP2D6 Langsam-Metabolisierer werden Dosisreduktionen von etwa 70 % für z. B. Fluvoxamin oder Amitriptylin und 50 % für Paroxetin, Nortriptylin oder Clomipramin empfohlen [98].

Über CYP2C19 werden hauptsächlich Citalopram, Escitalopram (SSRIs) und Moclobemid (MAO-Hemmer) verstoffwechselt. Es trägt aber auch zum Metabolismus von Amitriptylin, Clomipramin, Imipramin, Trimipramin (TCAs) und Venlafaxin (SNRI, selektiver Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer) bei [65] [195]. Drei Allelvarianten sind hauptsächlich für Unterschiede in der Enzymaktivität verantwortlich: während *CYP2C19*1* den Wildtyp darstellt (normale Funktion), haben **17* Träger eine erhöhte Aktivität. Das häufigste vorkommende Allel ohne Enzymaktivität ist **2*, gefolgt von **3* [185]. Für CYP2C19 Langsam-Metabolisierer, die beispielsweise Trimipramin, Sertralin oder Escitalopram einnehmen, werden Dosisreduktionen um ca. 50 % empfohlen. Für Citalopram existiert sogar eine Höchstdosierungsempfehlung von 20 mg/Tag für CYP2C19 Langsam-Metabolisierer oder Patienten, die andere CYP2C19 Substrate einnehmen [45].

CYP1A2 trägt zur Metabolisierung von Agomlatin, Duloxetin, Imipramin, Fluvoxamin und Paroxetin bei [65] [195]. Polymorphismen in diesem Enzym scheinen die Pharmakokinetik der Antidepressiva nicht zu beeinflussen [101].

CYP2C9 ist gering am Metabolismus von Fluoxetin und Sertralin beteiligt. Wichtige genetische Polymorphismen von CYP2C9, die zu reduzierter Aktivität führen, sind **2* und **3*. Etwa 35 % der Kaukasier tragen diese Allele, in Asiaten und Afrikanern sind sie relativ selten [174].

CYP3A4 trägt zu einem geringen Teil an der Verstoffwechselung von Sertralin, Citalopram Escitalopram (SSRIs) und Reboxetin (NARI, selektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer) bei [65] [195]. Genetische Polymorphismen in diesem Enzym spielen jedoch für die Pharmakokinetik von Antidepressiva praktisch keine Rolle [101].

CYP2B6 biotransformiert Bupropion (NDRI, selektiver Dopamin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer) [65] [195]. Polymorphismen in diesem Enzym tragen jedoch nur zum geringen Teil für Unterschiede in der Pharmakokinetik bei [102].

Zu beachten ist, dass Metaboliten, die zur pharmakologischen Wirkung beitragen (z. B. bei Fluoxetin und dessen aktivem Metaboliten Norfluoxetin) bei der Dosisberechnung unbedingt berücksichtigt werden müssen (active moiety) [177]. Neben Polymorphismen in den CYPs haben auch andere Faktoren einen Einfluss auf die Metabolisierungsgeschwindigkeit der Antidepressiva. So sind durch überlappende Substratspezifitäten einige Antidepressiva Substrate und gleichzeitig Inhibitoren mancher CYPs. Dies gilt zum Beispiel für die SSRIs Paroxetin, Fluvoxamin, Fluoxetin und CYP2D6. Dadurch hemmen sie ihren eigenen Metabolismus, und es kann zur Änderung des Metabolisierungsstatus (Phenoconversion) [108] [229] kommen, insbesondere bei Langzeitanwendung und höheren Dosierungen. Diese Arzneistoffe weisen nichtlineare Kinetiken auf und Unterschiede in pharmakokinetischen Parametern, bedingt durch Polymorphismen, können sich verringern. Hinzu kommen die Eigenschaften einiger Antidepressiva, selbst potente Hemmer einiger CYPs zu sein. Paroxetin, Fluoxetin und dessen aktiver Metabolit Norfluoxetin sind beispielsweise starke Inhibitoren von CYP2D6. Fluoxetin ist ebenfalls ein starker Hemmer von CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4. Daraus folgen können potentielle Wechselwirkungen mit anderen CYP-Substraten [65] [189]. Die Effekte von CYP Genotypen auf Plasmaspiegel sind durch zahlreiche Studien belegt, jedoch ist die Datenlage über deren Effekte auf klinische Parameter wie Ansprechen oder Nebenwirkungen von Antidepressiva unzureichend bzw. widersprüchlich [164].

1.2.2 Genetische Variabilität auf Seiten der Pharmakodynamik

Die Wirkung von Antidepressiva im Körper wird ebenfalls durch genetische Varianten in Zielstrukturen wie Rezeptoren und Molekülen der Signaltransduktion beeinflusst. Hierzu zählen beispielsweise der Serotonintransporter, Serotonin- und Dopaminrezeptoren, der Glukokortikoid-Rezeptor, Gene des intrazellulären Signalwegs (z. B. Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) und auch Gene, die an der Regulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) beteiligt sind [101] [180].

1.3 Biomarker für das Ansprechen der antidepressiven Therapie

Je früher ein Patient in Remission gelangt, desto besser ist die Prognose [169]. Es gibt jedoch bisher kein verlässliches Vorgehen für die Auswahl eines geeigneten Antidepressivums für einen bestimmten Patienten. Biomarker könnten anzeigen, ob ein Antidepressivum anschlagen würde. Mit Hilfe solcher Prädiktoren ließe sich eine Therapie individuell auf einen einzelnen Patienten zuschneiden, basierend auf dem genetischen Profil mit dem Ziel der effektivsten

Therapie mit möglichst wenigen Nebenwirkungen. Hierbei ist die Etablierung von prognostischen Biomarkern von großem Vorteil, denn je mehr Behandlungsschritte ein Patient benötigt, desto wahrscheinlicher ist die Rückfallrate [170].

Auf der Suche nach Biomarkern betreffen die meisten Untersuchungen Kandidatengene, die am Arzneistoffmetabolismus oder Transport, des intrazellulären Signalwegs (z. B. BDNF) beteiligt oder die direkter Angriffspunkt von Antidepressiva sind [95]. Der brain-derived neurotrophic factor (BDNF) beispielsweise ist das am besten untersuchte Neutrophin. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass BDNF-Level im Serum, Plasma und Gehirn von depressiven Patienten erniedrigt sind, und diese bei erfolgreicher Therapie auf ähnlich hohe Werte wie in Gesunden ansteigen [23] [60] [109]. Träger des Val66Met Polymorphismus sprachen besser auf einige Antidepressiva an [95]. Methylierungen in der Promoterregion des *BDNF* sind bei den meisten Depressiven stärker ausgeprägt als bei Gesunden und scheinen einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Antidepressiva zu haben [202]. Ebenso werden funktionelle Polymorphismen unter anderem in den Genen von Serotonin- und Dopamin-rezeptoren, denen des Serotonintransporters und des Glukokortikoid-Rezeptors sowie auch in Genen wie IL-1β, IL-11 und TNF-α mit Ansprechen/Nichtansprechen auf Antidepressiva in Verbindung gebracht. Die Studienergebnisse sind jedoch nicht einheitlich [25] [101] [180]. Die Wirksamkeit von Antidepressiva hängt auch wesentlich von der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ab. Polymorphismen im Transporter P-Glykoprotein (P-gp, *ABCB1*, *MDR1*) scheinen einen Einfluss auf die Effektivität von manchen Antidepressiva zu haben, indem diese wieder ausgeschleust werden, bevor sie wirken [13] [210]. Einige Antidepressiva (z. B. Mirtazapin) überwinden nicht P-gp abhängig die Blut-Hirn-Schranke und könnten somit eine Alternative bei P-gp-abhängiger Therapieresistenz bieten [210].

Neben Forschungen in diesen Kandidatengenen gibt es mehrere biologische Anomalitäten, die bei depressiven Patienten immer wieder gefunden werden: Entzündungsprozesse, Missverhältnisse in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal, HPA)-Achse und Veränderungen in der Neuroplastizität. In Patienten, die an einer depressiven Episode leiden, finden sich meist erhöhte Kortisolspiegel , verbunden mit einer reduzierten Glukokortikoid-Rezeptorfunktion [70] [71] [85] [152]. Diese verminderte Rezeptorfunktion findet sich vor allem in behandlungsresistenten Patienten [7] [90]. Störungen im HPA-System können mit der kombinierten Dexamethason-Suppression/CRH-Stimulation (Dex-CRH-Test) gemessen werden [84] [107]. Es gibt Hinweise, dass eine Normalisierung des HPA-Systems mit einer erfolgreichen antidepressiven Behandlung einher geht [10] [84]. Polymorphismen im Glukokortikoid-Rezeptorgen scheinen die Glukokortikoid-Rezeptor-

funktion zu beeinflussen und ein Ansprechen auf eine antidepressive Behandlung zu prognostizieren [10] [207] [222].

Auch Entzündungsprozesse sind bei Depressionen beteiligt [7]. Proinflammatorische Zytokine, insbesondere Interleukin IL-1β, IL-6 und der Tumornekrosefaktor (TNF-α) sind in depressiven Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöht [7] [56] [88]. Erhöhte Level dieser Zytokine sinken während einer erfolgreichen antidepressiven Behandlung [88]. Polymorphismen in Genen wie IL-1β, IL-11 und TNF-α sind assoziiert mit vermindertem Ansprechen auf Antidepressiva [208] [222]. Die Hyperaktivität der HPA-Achse und die erhöhten Entzündungswerte hemmen möglicherweise neurotrophische Faktoren (z. B. BDNF) und beeinträchtigen dadurch die Neuroplastizität [109].

Die meisten genetischen Variabilitäten stellten sich jedoch nicht als prognostische Marker heraus. Viele publizierte Assoziationen zwischen Genotypen und Therapieeffekten wurden entweder in weiteren Studien nicht untersucht oder nicht bestätigt. Weiterhin analysierten viele Studien Kurzzeit-Effekte, wie Änderungen im Serotonin- oder Norepinephrin-System, weil man früher Defizite von Neurotransmittern als Ursache von Depressionen verantwortlich machte [196]. Auch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) mit mehr als 2000 Patienten fanden in 3 großen Studien bezüglich Antidepressiva-Response keinen einheitlichen Genlokus [50] [86] [208].

Durch empirisch erfasste Daten zu Unterschieden in der Pharmakokinetik von Antidepressiva aufgrund genetischer Variationen lassen sich nach dem Bioäquivalenzprinzip Dosierungen berechnen [101]. Unterschiede in Plasmaspiegeln oder oraler Clearance lassen sich so theoretisch kompensieren. Kirchheiner, Brosen u. a. entwickelten auf Grundlage von CYP2D6 und CYP2C19 Genotypen eine erste Dosierungsempfehlung für Antidepressiva [100]. Weitere systematische Reviews empfehlen Dosierungsanpassungen, Therapeutisches Drug Monitoring (TDM, Kontrolle der Plasmaspiegel) oder Gabe eines alternativen Medikaments für viele Antidepressiva [64] [164] [195]. Auf der PharmGKB Webseite sind spezifische Richtlinien (CPIP Dosis-Richtlinien) über Dosisanpassungen für bestimmte Antidepressiva verfügbar [167] [219].

Zusammengefasst kommen Unterschiede in der Pharmakogenetik von Antidepressiva einerseits durch polymorphe CYP Enzyme (Beeinflussung der Pharmakokinetik) zustande [65] [101], sie stellen Biomarker auf Metabolisierungsebene dar. Da die Wirkung von Antidepressiva aber auch von Zielstrukturen, wie Transportermolekülen, Rezeptoren und Molekülen der Signaltransduktion abhängt, gestaltet sich andererseits eine Therapieempfehlung bezüglich genetischer Variabilitäten in diesen Strukturen weitaus schwieriger.

1.4 LCLs als Modell zur Untersuchung von Arzneimitteleffekten

LCLs sind humane B-Zelllinien, die durch Transfektion mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) immortalisiert wurden [2]. Ursprünglich als erneuerbare Quelle für DNA verwendet, gewinnen sie zunehmend auf dem Gebiet der personalisierten Medizin zur Untersuchung von Arzneimitteleffekten auf funktioneller und molekularer Ebene an Bedeutung (z. B. Expressionsstudien). Sie sind als *in vitro* bzw. *ex vivo* Modelle gut geeignet, denn sie sind einfach durch Blutentnahme und anschließender Immortalisierung zu gewinnen und leicht kultivierbar. LCLs sind im Phänotyp ähnlich den B-Lymphozyten und werden auch zur Biomarkerfindung genutzt [227]. Biobanken (HapMap, CEPH, Human Variation Panel) verfügen über LCLs von vielfältigen repräsentativen ethnischen Gruppen sowie deren genomische Daten und teilweise auch Expressionsdaten [33]. LCLs wurden bereits in vielen Studien zur Untersuchung individueller Unterschiede von Arzneimitteleffekten erfolgreich verwendet. An zahlreichen Zytostatika wurden Assoziationen zwischen genetischen Variationen und Therapieresponse oder Nebenwirkungen aufgedeckt [49] [59] [78] [79] [92] [116] [117] [158] [198] [217]. Wie bei Zytostatika variiert auch das Ansprechen auf Bestrahlungen in Krebspatienten stark. Hier dienten LCLs zur Bestimmung von Genen bzw. Signalwegen, die möglicherweise für deren Wirkung wichtig sind [154] [224]. Aber auch zur Aufklärung der Effekte von β-Blockern oder Immunsuppressiva wurden LCLs genutzt [121]. So wurden mehrere Gene gefunden, die mit Zytotoxizität von Mycophenolat-Mofetil assoziiert sind [223]. Für Acetaminophen (Paracetamol) fand man mit diesem Modell verantwortliche SNPs (single nucleotide polymorphisms; Einzelnukleotid-Polymorphismen) für Lebertoxizität [146] und für Statine Ursachen für geringere Simvastatin-induzierte Lipidreduktion [128]. Die mit Hilfe von LCLs gefundenen Ergebnisse konnten auch durch Effekte in Patienten bestätigt werden [80] [115] [141] [228].

1.5 Zelltoxizität als *in vitro* Marker für Arzneimitteleffekte

Zellbasierte Modelle werden in der präklinischen Arzneistoffentwicklung verwendet, um arzneistoffinduzierte Zellwachstumshemmungen oder Apoptose zu erforschen. Weiterhin bieten Zelllinien die Möglichkeit, Interaktionen von Arzneistoffen mit Stoffwechselenzymen oder Transporterproteinen aufzudecken. Änderungen in der Genexpression oder Zellwachstum als Antwort auf Arzneistoffexpositionen sind ebenfalls messbar [218]. An zahlreichen Antidepressiva wurde die apoptotische Wirkung auf verschiedenste Krebszelllinien gezeigt [3] [28]

[44] [77][110] [118] [119] [149][159] [165] [178]. Antidepressiva zeigten apoptotische Effekte ebenfalls auf Blutzellen. Trizyklika wie Imipramin und Clomipramin und das SSRI Citalopram induzierten Apoptose in kultivierten menschlichen peripheren Lymphozyten [58] [225] und in LCLs [93]. Auf menschliche T-Lymphozyten wirkten Paroxetin und Sertralin wachstumshemmend [203]. Zelltoxische Effekte unterschiedlicher Arzneistoffklassen, unter anderem Antidepressiva, Antipsychotika, Glukokortikoide und Zytostatika wurden mittels Zellwachstumhemmungs-Assays (XTT) an LCLs gesunder Spender untersucht. Dabei zeigten die LCLs ähnliche Wachstumshemmungen gegenüber einer Medikamentengruppe [143]. Diese Korrelationen lassen auf gleiche Signalwege und Wirkungsorte einer Wirkstoffklasse schließen. Interindividuelle Unterschiede von Arzneistoffwirkungen können ebenfalls gezeigt werden. Genexpressionsunterschiede bei auf Paroxetin sensitive und wenig sensitive LCLs führten zu einer Reihe interessanter Kandidatengene für Antidepressiva-Response Biomarker, u. a. *CHL1* [144]. Morag et al. zeigten, dass LCLs von nicht verwandten gesunden Individuen sehr unterschiedliche Empfindlichkeiten bezüglich Wachstumshemmung (*in vitro* Sensitivität) durch ein gegebenes Arzneimittel aufweisen und diese individuellen Empfindlichkeiten für Arzneistoffe mit ähnlichen Signalwegen gelten [143]. Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit Antidepressiva aus verschiedenen Antidepressiva-Klassen mit verschiedenen molekularen Signalwegen gewählt: Imipramin als Trizyklisches Antidepressivum, Paroxetin als Vertreter für einen SSRI und als noradrenerges und spezifisch serotonerges Antidepressivum Mirtazapin. LCLs, die empfindlich auf Imipramin reagieren, sollten ebenfalls empfindlich auf Paroxetin reagieren. Beide wirken hemmend auf die Serotoninwiederaufnahme und stimmen somit teilweise in ihren Signalwegen überein. Mirtazapin bewirkt die vermehrte Freisetzung von Noradrenalin und Dopamin und hat keine Wirkung auf den Serotonintransporter, beeinflusst somit den Serotoninspiegel nur unwesentlich [139].

1.6 Klinische Studien: Das PADRE Projekt

Das PADRE Projekt (**P**harmacogenomics of **A**ntidepressant **D**rug **R**espons**E**: tentative drug response biomarkers from human lymphoblastoid cells) hatte sich zum Ziel gesetzt, potentiell prädiktive Biomarker für das Ansprechen auf Antidepressiva zu finden. Für komplexe klinische Phänotypen wie im Fall von Depressionen scheinen genomweite Untersuchungen (MARS, STAR*D, GENDEP) zur Identifikation von beteiligten Genen nicht geeignet zu sein [50] [51] [86] [208]. So werden zum Beispiel bestimmte genetische Varianten, wie Deletionen oder Genkopieanzahl auf diesem Weg nicht berücksichtigt. Ein Ansatz wäre die Einbeziehung genom-

weiter Variabilität im Transkriptom. Die Bedeutung der (basalen) Genexpression würde erfasst werden sowie Arzneimitteleffekte, die zu einer Änderung der Genexpression führen. Eine weitere Möglichkeit bietet sich anhand eines *in vitro* bzw. *ex vivo* Modells von Blutzellen. Individuelles Proliferations- und Toxizitätsverhalten von LCLs auf Exposition mit Antidepressiva könnte als Biomarker dienen, das Therapieansprechen vorherzusagen.
Das PADRE Projekt war eine internationale Kooperation mit Partnern aus Israel, Italien und Polen mit unabhängigen Teilprojekten, die Gesamtkoordination lag in Deutschland. Diese Doktorarbeit ist Teil dieses Projekts.

1.6.1 CHL1 und ITGB3 als potentielle Response Biomarker

Im Rahmen des PADRE Projekts wurden genomweite Analysen von Expressionsprofilen von LCLs gesunder Spender des Repository of the Israelian Populations durchgeführt. Dabei fielen zwei vielversprechende Gene auf. *CHL1* als potentieller Biomarker für das Ansprechen auf SSRIs [144] und *Integrin beta3* (ITGB3) als mit dem Wirkmechanismus von SSRIs assoziiert [155].

1.6.1.1 CHL1

CHL1 gehört zu den Zelladhäsionsproteinen (CAMs) und hierbei zur Immunglobulin-Superfamilie. Diese sind integrale Membranproteine, die aus der Zelle herausragen. Sie treten auf der Zelloberfläche mit anderen Proteinen in Wechselwirkung und vermitteln so Kontakte zwischen den Zellen [175]. CHL1 ist nahe verwandt mit L1 [29] [81]. Jedes Mitglied der L1-Unterfamilie besteht aus sechs Ig- (Immunglobulin) ähnlichen Domänen, die mit fünf Fibronectin TYP III (FNIII)-Domänen auf der Zelloberfläche verbunden sind [96]. Studien zeigen, dass L1 und neurales Zelladhäsionsprotein (NCAM) für die Induktion der Langzeit-Potenzierung (LTP) im Hippocampus erforderlich sind [148]. Sie spielen für die Aufrechterhaltung der morphologischen und funktionellen Integrität von Organen eine Rolle. Durch Adhäsion können intrazelluläre Prozesse wie Signaltransduktionen aus bzw. in die Zelle hinein sowie Umstrukturierungen des Zytoskeletts in Gang gesetzt werden [46] [184]. CHL1 ist im gesamten Nervensystem exprimiert, hauptsächlich in Bereichen mit hoher Plastizität [67] [120]. In Mäusen kann CHL1 frühestens am 13. Tag während der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden, etwa zur gleichen Zeit, wenn die ersten Axone auszuwachsen beginnen [142]. CHL1 reguliert die Proliferation und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen, ist beteiligt an Zellinteraktionen während der Entwicklung des Nervensystems und bei Regeneration und synaptischer Plastizität in Erwachsenen. Es spielt weiterhin eine Rolle bei

Synaptogenese, Myelinisierung und neuronaler Zellmigration [29] [81] [175]. CHL1 ist u. a. für Wachstum und Wegfindung von thalamokortikalen Axonen von Bedeutung [39]. *CHL1-/-* Mäuse zeigten weitestgehend normale kognitive, motorische und olfaktorische Fähigkeiten, jedoch reduzierte Reaktionsfreudigkeit auf neuartige Umweltreize, verringerte Aufmerksamkeit, verzögerte Verhaltensreaktionen auf ökologische und soziale Reize und geringeres Interesse an fremdartigen Artgenossen [145]. Diese Symptome sind vergleichbar mit den typischen Symptomen, die bei psychiatrischen Störungen wie Schizophrenie auftreten. Dieses Verhalten wird vermutlich durch Störungen im Gyrus dentatus im Hippocampus verursacht. Damit einher geht die verminderte Fähigkeit, relevante Informationen aus der Umgebung zu extrahieren [145]. In Studien fand man Polymorphismen im *CHL1*, die mit Schizophrenie assoziiert waren [27] [173] [181]. Erhöhte Genexpressionslevel von *L1* wurden in peripheren Blutzellen bei Patienten mit bipolarer Störung beobachtet [211]. In der STAR*D Studie, der größten Therapieresponse- und Pharmakogenetik-Studie bezüglich Depressionen, wurden SNPs im *CHL1* in Zusammenhang mit Nebenwirkungen gefunden [32].
Diese Studienergebnisse lassen einen Zusammenhang von CHL1 (bzw. L1) und psychiatrischen Störungen vermuten.

1.6.1.2 ITGB3

Integrine sind heterodimere Transmembranproteine und stellen die Verbindung von Zellen zur extrazellulären Matrix her [31]. Sie bestehen aus zwei unterschiedlichen Glykoproteinketten, die als Alpha (α)- und Beta (β)-Untereinheit bezeichnet werden [204]. Synapsen enthalten eine große Menge an solchen Zelladhäsionsmolekülen, so ist auch die Untereinheit β3 in Synapsen mengenmäßig hoch vertreten [31] [106]. *ITGB3* kodiert für die Integrin β3-Untereinheit und bildet in Thrombozyten Integrin αIIβIII (Glykoprotein-IIb/IIIa, CD61) und im Gehirn Integrin αVβIII [221]. Integrine sind in allen Geweben mit Ausnahme der roten Blutkörperchen exprimiert und übermitteln Signale zwischen Zellen und deren Umgebung. Sie sind an der Regulation der synaptischen Plastizität im zentralen Nervensystem, an Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zelladhäsion und Migration, an Apoptose und Blutgerinnung und auch an der Langzeitpotenzierung beteiligt, die eine wichtige Rolle beim Lernen und Erinnerungen spielt [26] [38] [61] [135]. Integrine binden an andere membranständige Adhäsionsmoleküle auf benachbarten Zellen, so auch an die extrazelluläre Domäne von Mitgliedern der L1-Familie [96]. Eine Studie identifizierte durch genomweites Screening einen Polymorphismus (Leu33Pro) im *ITGB3* als quantitativen Trait Locus (QTL, Region eines Chromosoms mit Einfluss auf die Ausprägung eines phänotypischen Merkmals), der einen Einfluss auf die Blut-

serotoninkonzentration hatte [215]. In einem Mausmodell wurde eine direkte Interaktion von ITGB3 und dem Serotonintransporter beobachtet, die einen Einfluss auf die Serotoninaufnahme an Synapsen zeigte [221]. Außerdem fand man verringerte Serotonintransporterexpressionen in Synapsen des Mittelhirns nach Bindung des SSRI Citalopram [221]. *ITGB3* knockout-Mäuse zeigten ein ängstlicheres Verhalten als Wildtyp-Mäuse; die Expression von *ITGB3* im ventralen Hippocampus erlöste die erwachsene Mäuse von ihrer Ängstlichkeit [134]. Integrine interagieren mit den Ig-ähnlichen Domänen der Zelladhäsionsmoleküle L1 und CHL1 [46] [17]. In weiteren Studien fand man einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen in *ITGB3* mit psychischen Störungen wie Schizophrenie [212] oder Autismus [176] [186] [214]. In einer Studie mit depressiven Patienten der MARS-Studie fanden sich erhöhte ITGB3 Proteingehalte bei Respondern einer Therapie mit Antidepressiva [132]. Bei Vorarbeiten im Rahmen des PADRE Projekts waren *ITGB3* Genexpressionen in LCLs, die mit dem SSRI Paroxetin inkubiert wurden, etwa 2-fach erhöht [155]. Da Paroxetin an den Serotonintransporter bindet, deutet dies auf eine Verbindung von ITGB3 und dem Wirkmechanismus von SSRIs hin.

1.7 Serotonintransporter als Angriffspunkt von SSRIs und TCAs

SSRIs entfalten ihre Wirkung am Serotonintransporter (SERT, *SLC6A4*), indem sie an ihn binden und somit die Wiederaufnahme des Neurotransmitters Serotonin in die Präsynapse hemmen [21] [73]. Dadurch erhöhen sie initial die Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt. Nachfolgend kommt es durch Feedbackhemmung zur Absenkung der Empfindlichkeit und später zur Reduktion der Anzahl und Dichte von Serotoninrezeptoren. Dieser Effekt tritt erst nach einigen Wochen ein und könnte die teilweise erst nach Wochen bis Monate einsetzende verzögerte antidepressive Wirkung von Antidepressiva erklären. Auch einige trizyklische Antidepressiva und SNRIs (Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer) hemmen den neuronalen Reuptake von Serotonin [5]. Studien mit Tieren weisen auf eine Beteiligung des Serotonintransporters bei der Entstehung von Depressionen hin. Es wurden bei *SERT* knockout-Mäusen Verhaltensauffälligkeiten beobachtet, die depressiven Symptome ähneln, wie gesteigerter Ängstlichkeit und übertriebene Reaktionen auf Stress, verringertes aggressives Verhalten oder verlangsamte Bewegungen [68] [69]. Funktionelle Polymorphismen im Serotonintransportergen (*SLC6A4*) wurden bereits in zahlreichen Studien als möglicher Grund für die Prävalenz, an psychischen Störungen in Verbindung mit Stressepisoden und belastenden Lebensumständen zu erkranken, untersucht [21] [89] [206] [226]. Dabei scheint der 44-bp Ins/Del (5-HTTLPR, (5-HTT gene linked polymorphic region)) Polymorphismus in

der Promoterregion einen Einfluss auf die Transkription und damit die Expression des Serotonintransporters zu haben. Durch eine Deletion (s-Allel) wird der Transporter weniger exprimiert [62] [74] [111]. Es wird vermutet, dass sich dadurch die Prävalenz für psychiatrische Erkrankungen, wie u. a. Depressionen erhöht [37]. In vielen Studien wurden hinsichtlich genetischer Varianten des Serotonintransporters und dem Ansprechen auf Antidepressiva keine einheitlichen Ergebnisse gefunden. So fanden bezüglich des 5-HTTLPR viele (Meta-) Studien eine Assoziation des L-Allels mit besserer Response für einige Antidepressiva [40] [72] [160] [161] [179] [187], andere (Meta-) Studien konnten dies jedoch nicht bestätigen [105] [205] bzw. fanden gegenteilige Effekte in Asiaten, die besseres Ansprechen in Verbindung mit dem s-Allel zeigten [97] [151]. Widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Therapieansprechens wurden ebenfalls für den 17-bp VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) Polymorphismus im Intron 2 des Serotonintransportergens (STin2 VNTR) gefunden. Mehrere Veröffentlichungen berichten über bessere Response bezüglich SSRIs [12] [140] [147]. Andere Autoren fanden eine Assoziation des STin2 10/12 Genotyps mit schlechterem Ansprechen auf SSRIs bei asiatischen Patienten [188]. Dieses Ergebnis konnte aber in anderen Untersuchungen nicht bestätigt werden [72] [87] [153]. Interessant im Rahmen dieser Arbeit ist der Zusammenhang des Serotonin-transporters mit den beiden untersuchten Kandidatengenen *CHL1* und *ITGB3*. Integrine stehen mit dem serotonergen System in Verbindung. Untersuchungen mit Mäusen fanden, dass *ITGB3* knockout-Mäuse eine verringerte Serotoninaufnahme in Thrombozyten und Gehirn zeigten und dass die Aktivierung von ITGB3 durch Fibrinogen die Aktivität des Serotonintransporters verstärkte [20]. So scheint es direkte Interaktionen zwischen dem Serotonintransporter und ITGB3 zu geben [20] [123] [221]. Untersuchungen im Kontext mit Autismus zufolge hatten genetische Varianten im ITGB3 Einfluss auf Serotoninspiegel [35]. Da die in dieser Arbeit verwendeten Antidepressiva Paroxetin und Imipramin an den Serotonintransporter binden, war dieser neben CHL1 und ITGB3 Gegenstand unserer Untersuchungen.

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Pharmakotherapie depressiver Störungen zeigt sich aufgrund schlechter Ansprechraten und starker Nebenwirkungen als nicht befriedigend, obwohl es mehrere Klassen von Antidepressiva gibt, die eigentlich eine große Variabilität in der Therapie bieten. Trotz bekannter genetischer Einflüsse seitens der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik fehlt es an zuverlässigen Methoden, um das am besten wirkende Antidepressivum für einen bestimmten Patienten auszuwählen. Als Teil des PADRE Projekts sollen in dieser Arbeit LCLs als *ex vivo* Modell

anhand von Kandidatengenen und verschiedenen Antidepressiva auf die Eignung für die Entwicklung und Validierung eines funktionellen Antidepressiva-Response-Assays geprüft werden. Für diese Arbeit werden LCLs von depressiven Patienten des MARS-Projekts [63] verwendet, von denen klinische Daten wie Medikation, Alter, Geschlecht, Diagnose und Therapieverlauf bekannt sind. In Vorarbeiten im Rahmen des PADRE Projekts wurde *CHL1* als potentieller Response Biomarker für die Therapie mit SSRIs vorgeschlagen [144] und *ITGB3* mit dem Wirkmechanismus von CHL1 und dem Serotonintransporter in Verbindung gebracht [155]. Diese beiden Gene wurden durch Wachstumshemmungs-Assays (*in vitro* Sensitivitäten) und genomweiten Genexpressionen von LCLs von gesunden Spendern (Repository of the Israelian Populations) gefunden.

In der vorliegenden Arbeit werden von LCLs von depressiven Patienten, Studienteilnehmern des MARS-Projekts, 1) die individuellen *in vitro* Sensitivitäten (Bestimmung der IC_{50}) durch Inkubation mit drei verschiedenen Antidepressiva (Paroxetin, Mirtazapin und Imipramin) bestimmt, 2) die basalen Genexpressionen von *CHL1* und *ITGB3* ermittelt und 3) Polymorphismen (SNPs) im *CHL1* und *ITGB3* genotypisiert. Da Studiendaten auf einen möglichen Zusammenhang von *CHL1*, *ITGB3* und dem Serotonintransporter (*SLC6A4)* hinzuweisen scheinen und der Serotonintransporter primäres Ziel von SSRIs sowie an der Wirkung durch Trizyklische Antidepressiva beteiligt ist, werden die basalen Genexpressionen sowie genetische Varianten des *SLC6A4* ebenfalls bestimmt. Die ermittelten Daten über Genexpressionen, IC_{50}-Werte und Genotypen werden zur Aufdeckung möglicher Assoziationen miteinander und dem klinischen Verlauf der MARS-Patienten korreliert, um einen möglichen Zusammenhang zum Therapieverlauf aufzudecken. So soll auch geprüft werden, ob sich die Kandidatengene, gewonnen anhand genomweiter Expressionsprofile oder individueller Wachstumshemmungen von LCLs gesunder Spender, auf LCLs von depressiven Patienten übertragen lassen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien, Lösungen und Kulturmedien

	Hersteller, Zusammensetzung
dNTPs 100 mM	Invitrogen, Deutschland
$MgCl_2$ Lösung 50 mM	Invitrogen, Deutschland
Deaza-GTPs	7-Deaza-2′-deoxy-guanosine-5′-triphosphate
10 x Puffer (-MgCl)	Invitrogen, Deutschland
Ampli Taq Polymerase 5 U/µl	Invitrogen, Deutschland
DMSO	Sigma, Deutschland
GeneRuler 50 bp und 100 bp Ladder (0,5 µg/µl) (DNA-Marker)	MBI Fermentas, Litauen
Agarose	SIGMA, Deutschland
Ethidiumbromid 100 mg/ml	Fluka Bio Chemika, Schweiz
6 x DNA Loading Dye	10 mM Tris-HCl, 0,003 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylene Cyanol FF, 60 % Glycerol, 60 mM EDTA
5 x TBE	5 x Stammlösung 54 g Tris, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8)
50 x TAE	242 g Tris, 57,1 ml Eisessig 96 %, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8), 1 l MilliQ Wasser
Quantiscript Reverse Transkriptase	QIAGEN®, Deutschland
5 x Reverse Transkriptase Puffer/Primer Mix	QIAGEN®, Deutschland
7 x gDNA Wipeout Puffer	QIAGEN®, Deutschland
2 x QuantiFast® SYBR Green PCR Master Mix	QIAGEN®, Deutschland
10 x QuantiTect® Primer Assay	QIAGEN®, Deutschland
TBP (TATA binding protein)	Applied Biosystem, USA
GAPDH	Applied Biosystem, USA

	Hersteller, Zusammensetzung
10 x Puffer Tango	Fermentas, Deutschland
Albumin bovine serum (BSA)	SIGMA, Deuschland
Trypanblau	Invitrogen, Deutschland
Cyclosporin A	SIGMA ALDRICH, C3662-5MG, Deutschland
B95-8 Zelllinie	ATCC, Deutschland
Imipramine hydrochloride ≥98%	SIGMA ALDRICH
Paroxetine-hydrochloride-hemihydrate ≥98%	SIGMA ALDRICH
Mirtazapine ≥98%	SIGMA ALDRICH
PBS	PAA, Österreich; Phosphatgepufferte Salzlösung mit 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Gesamt-Phosphat
FCS	PAA, Österreich; Fetales Kälberserum
FCS superior	Biochrom, Berlin, Deutschland; Fetales Kälberserum
Electron-coupling reagent	SIGMA, Deutschland; PMS (N-Methyl-Dibenzopyrazine-Methyl-Sulfat) in PBS (0,383 mg/ml)
XTT labeling reagent	AppliChem, Deutschland; XTT in RPMI 1640 ohne Phenolrot (1mg/ml)
Lymphoprep	Stemcell, Köln, Deutschland
RPMI-1640	PAA, Österreich
RPMI-1640 mit Phenolrot	PAA, Österreich; Phenolrot als Indikator für den pH-Wert
Medium für LCLs	RPMI-1640 mit Phenolrot, 10% FCS, 1% Penicillin/ Streptomycin

2.1.1 Kits

Kits	**Hersteller**
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN®, Hilden, Deutschland
QIAamp® DNA Mini Kit	QIAGEN®, Hilden, Deutschland
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche, Deutschland
QuantiTect Reverse Transkriptions Kit	QIAGEN®, Hilden, Deutschland
QuantiTect Primer Assays	QIAGEN®, Hilden, Deutschland
QuantiFast SYBR® Green PCR Kit	QIAGEN®, Hilden, Deutschland

2.1.2 Geräte

Geräte	**Hersteller**
Gelelektrophorese-Kammer	Scientific Support, USA
Elektrophorese Power PAC 300	Scientific Support, USA
Zentrifuge 4K15C	SIGMA
Zentrifuge Megafuge	Heraeus Sepatech
Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius, Deutschland
Thermocycler	MJ-Research, Biozym, Deutschland
Thermomixer compact ThermoStat plus	Eppendorf, Deutschland
UV-Transluminator	Herolab GmbH, Deutschland
Brutschrank 37 °C, 5% CO_2	Queue®
Absauger	KNF Aero MAT
Mikroskop	Olympus CH-2, Japan
ELISA-Plate-Reader	DYNATECH MR7000
Spektralphotometer NanoDrop® ND 1000	Thermo Scientific, USA
Sterilbank	clean air CA/REV6, Hilden, Deutschland
Pipetten 2 µl-200 µl	Gilson, Deutschland
Pipette 100 µl-1000 µl	Abimed HT, Deutschland

Geräte	Hersteller
Pipetboy	Inegra Biosciences
Suspenser-Pipette 50-1000 µl und 100-5000µl	Eppendorf
Zählkammer	Neubauer Optik Labor 0,1 mm Tiefe und 0,0025 mm^2 IBS

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf
Zell-Kulturflaschen; T25 (40 ml), T75 (125 ml)	Greiner
Sepmate-Röhrchen	Stemcell, Köln, Deutschland
Falcons; 15, 50 ml	BD, Belgien
Pipetten für Pipetboy; 5 ml, 10 ml, 25 ml	Costar Stripette, USA
Pipettenspitzen 10-5000 µl	Sarstedt
96-Well Platte	BD Falcon™, Frankreich
PCR Gefäße	Sarstedt AG & Co KG
PCR Deckel	Sarstedt AG & Co KG

2.2 Methoden

2.2.1 Klinische Daten der MARS-Patienten

Die klinischen Daten der Patienten MARS-Studie wurden in einer Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München zur Verfügung gestellt. Aus dem Blut dieser Patienten wurden die in dieser Arbeit verwendeten LCLs hergestellt. Insgesamt lagen von 60 Patienten Informationen zu Alter, Geschlecht (Tab. 1) und Diagnose (Tab. 2) vor. Da ein Patient nach 2 Wochen vorzeitig die Studie verließ (Drop-out) und von einem anderen Patienten unvollständige klinischen Daten vorlagen, waren somit für 58 Patienten auch die Daten über Therapie und Therapieverlauf bekannt. Diagnosen waren entweder depressive Episode (F32, n=11), rezidivierende depressive Episode (F33, n=41) oder bipolare Störung (F31, n=8). Der Therapieerfolg wurde jede Woche bis zu 8 Wochen anhand der $HDRS_{21}$-Skala (klinische

Fremdbeurteilungsskala, 21 Fragen) bewertet. Response auf die Behandlung mit Antidepressiva bedeutete eine Reduktion des HDRS-Wertes um mehr als 50 % im Vergleich zum Wert nach Aufnahme in die Studie. Remission wurde mit einem HDRS-Wert kleiner als 8 erreicht.

Tabelle 1: Allgemeine Angaben zur LCL MARS-Kohorte

Anzahl der Patienten	60
Alter	50,7 (19-75) Jahre
Geschlecht	m=28; w=32

Tabelle 2: Diagnosen der Patienten der MARS-Kohorte (n=60)
ICD-10: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision

Diagnose	ICD-10	Anzahl der Patienten
Bipolare Störung	**F31**	**8**
Bipolar Störung, aktuelle leichte oder mittelschwere Episode	F31.3	2
Bipolar Störung, aktuelle schwere depressive Episode ohne psychotische Symptome	F31.4	5
Bipolar Störung, aktuelle schwere depressive Episode mit psychotischen Symptomen	F31.5	1
Depressive Episode	**F32**	**11**
schwere depressive Episode ohne psychotische Symptome	F32.2	10
schwere depressive Episode mit psychotischen Symptomen	F32.3	1
Rezidivierende depressive Störung	**F33**	**41**
Rezidivierende depressive Störung, aktuelle mittelschwere Episode	F33.1	3
Rezidivierende depressive Störung, aktuelle mittelschwere Episode, ohne somatischem Syndrom	F33.10	1
Rezidivierende depressive Störung, aktuelle mittelschwere Episode, mit somatischem Syndrom	F33.11	1
Rezidivierende depressive Störung, aktuelle schwere Episode, ohne somatischem Syndrom	F33.2	30
Rezidivierende depressive Störung, aktuelle schwere Episode, mit somatischem Syndrom	F33.3	6

Die Behandlung der Patienten (n=58) erfolgte sehr inhomogen mit Antidepressiva aus verschiedenen Klassen. In der Studie wurde mit folgenden Antidepressiva behandelt: SSRI (Paroxetin), SNRIs (Venlafaxin, Duloxetin), TCA (Imipramin), NASSA (Mirtazapin, Maprotilin), NARI/NRI (Reboxetin) und MAO-Hemmern. 18 Patienten erhielten eine Monotherapie mit nur einem Antidepressivum, 13 von ihnen mit einem Antidepressivum, welches die Serotoninwiederaufnahme hemmt (SSRI, SNRI, TCA). Der Großteil (n=40) erhielt eine Kombitherapie mit zwei (n=25) oder drei Antidepressiva (n=15). Die meisten Patienten (n=47) bekamen zumindest zeitweilig Co-Medikation mit Benzodiazepinen (Lorazepam ≥ 0.5 mg, n=24), Neuroleptika (n=20) und Sedativa (Lorazepam < 0,5 mg, Mirtazapin ≤ 15 mg, Trimipramin ≤ 50 mg, n=17) zusätzlich zur antidepressiven Therapie. Teilweise erhielten die Patienten bis zu sechs verschiedene Medikamente. Während der Studie wechselte die Medikation öfter. Nur fünf Patienten behielten ihre Medikation während der Studiendauer bei. Am Ende der Studie (oder frühzeitigem Verlassen) wurden 25 Patienten mit mindestens zwei Antidepressiva und 34 mit einem Antidepressivum entlassen; 32 von 58 bekamen zusätzliche Medikamente. Eine detaillierte Übersicht über die klinischen Daten einschließlich der Therapie aller Patienten findet sich im Anhang.

2.2.2 Studienpopulation - LCL Kohorte

Für diese Doktorarbeit wurden im Rahmen des PADRE Projekts von Teilnehmern des Munich Antidepressant Response Signature (MARS) Projekts [63], stationär aufgenommene Patienten, die an einer depressiven Episode, einer rezidivierenden depressiven Störung bzw. einer bipolaren Störung litten, prospektiv LCLs hergestellt. Hierfür konnten Zelllinien von 60 Patienten gewonnen werden. Die Patienten gaben eine mündliche und schriftliche Einverständniserklärung für die Teilnahme an der Antidepressiva-Biomarker Studie ab, einschließlich der Transformation von Blutzellen (B-Lymphozyten) in Zelllinien (LCLs). Die offizielle Bezeichnung der MARS-Studie lautet: „Genetische Varianten als Marker für Erkrankungsverlauf und Therapieresponse bei psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen“. Das positive Votum wurde unter der Projektnummer 318/00 von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München am 26.3.2001 erteilt. Die Begutachtung und Generierung von Zelllinien erfolgten über ein Amendment, für das am 29.3.2007 ein positives Votum erteilt wurde.

2.2.2.1 Herstellung von EBV-Überständen

Humane B-Zellen können durch Transfektion mit EBV immortalisiert werden, wodurch unbegrenzt proliferierende B-LCLs entstehen. Zur Gewinnung des Epstein-Barr-Virus (EBV) für die Transfektion diente die B95-8 Zelllinie. Als Kulturmedium für diese Zelllinie wurde RPMI1640 + 10 % FCS + Pen/Strep (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) und Glutamin verwendet. Die Zellen wurden in Flaschen liegend bei +37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank kultiviert und alle 7 Tage auf 0,5 Mio Zellen/ml gesplittet. Zur Gewinnung des EBV wurden die Zellen 20 min bei 2500g zentrifugiert, der Überstand sterilfiltriert (Porengröße 0,45 µm, Sartorius AG) und portioniert bei -70 °C eingefroren.

2.2.2.2 B-Zellisolierung und EBV-Transformation

Zur Gewinnung der PBMC mittels Dichtegradienten wurden 9 ml EDTA-Blut mit 9 ml PBS + 2 % FCS superior verdünnt. Dafür wurde die Zellsuspension vorsichtig auf ein mit Lymphoprep gefülltes Sepmate-Röhrchen pipettiert und 10 min bei 1200xg mit Bremse zentrifugiert. Proben die älter als 24 Stunden waren, wurden 20 min bei 1200xg zentrifugiert. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit dem gleichen Volumen PBS + 2 % FCS verdünnt und bei 1800g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 20 ml PBS + 2 % FCS resuspendiert, 10 min bei 1800xg zentrifugiert, der Überstand erneut abgesaugt und das Pellet in 800 µl EBV-Überstand aufgenommen. In 8 Vertiefungen einer 48-Well Platte wurden je 200 µl RPMI 1640-Medium (20 % FCS, 1 % Pen/Strep, Glutamin) vorgelegt, anschließend 100 µl der Zellsuspension zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2. Mediumwechsel erfolgte nach 5 Tagen: 200 µl pro Well wurden abpipettiert und die Zellsuspension in das unterliegende Well überführt. 200 µl frisches RPMI (20 % FCS) kamen in das Ausgangswell und 100 µl Medium in das überführte Well. Anschließend wurden in alle Wells 6 µl Cyclosporin A pipettiert. Am Tag 23-26 nach Isolation wurden die Zellen pro Patient in einer T25 Zellkulturflasche gepoolt und mit 8 ml frischem RPMI- Medium (20 % FCS) versehen. Die Zellen wurden unter zweitägigem Mediumwechsel kultiviert, das FCS anschließend auf 15 % reduziert. Bei einer Zellzahl von mindestens 10 Mio. wurden die Zellen in FCS + 10 % DMSO eingefroren.

2.2.2.3 LCLs Zellkultur

Die LCLs wurden in 10 %igem FCS Medium bei 37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchte in Kultur gehalten. Als Medium diente RPMI 1640, versetzt mit 10 % FCS (Fetales Kälber Serum)

und jeweils 1 % der Antibiotika Penicillin und Streptomycin. Nach Auftauen einer Zelllinie wurde 15 %iges FCS Medium verwendet, bis ausreichend Zellen in der Kulturflasche vorhanden waren. Die Zellkonzentration wurde zwischen 0,5 und 2 Mio. Zellen/ml gehalten. Die Zellen wurden maximal 12 Wochen in Kultur gehalten und einmal pro Woche passagiert. Während dieser Zeit wurden alle Untersuchungen, wie Wachstumshemmungs-Assays, RNA- und DNA-Isolationen und Genexpressionsbestimmungen durchgeführt. Zum besseren Vergleich der phänotypischen Eigenschaften der Zelllinien wurde auf gleiche Passagenzahl bei den Experimenten geachtet. Dabei zeigten sich innerhalb dieser Zeitspanne die IC_{50}-Werte als auch die Ct-Werte (Genexpressionswerte) als unverändert. Auch nach Auftauen neuer Aliquots blieben die individuellen IC_{50}- und Genexpressions-Werte unverändert.

2.2.3 Bestimmung der *in vitro* Sensitivitäten mittels XTT Assay

Die Wachstumshemmung - und damit die *in vitro* Sensitivitäten der LCLs - wurden durch Inkubation mit den drei Antidepressiva Imipramin, Paroxetin und Mirtazapin mittels des kolorimetrischen XTT Assays in 96 Well-Mikrotiterplatten bestimmt. Die verwendeten Konzentrationen sind in der Tabelle 3 aufgeführt. Ziel war es, die individuellen Empfindlichkeiten der Patienten-LCLs und damit die individuellen IC_{50}-Konzentrationen zu bestimmen. Die IC_{50}-Konzentration ist die Konzentration eines (Arznei-)Stoffes, bei dem eine Hemmung des Zellwachstums um 50 % erreicht wird (mittlere inhibitorische Konzentration).

Zu Beginn jedes XTT Assays wurden 50 µl Zellsuspension (20.000 Zellen/ml) in die Wells einer 96-Well Mikrotiterplatte gegeben. Verschiedene Konzentrationen der 3 Antidepressiva wurden zugegeben und die Zellen für 3 Tage bei 37 °C inkubiert, für jede Konzentration in Triplikaten. Nach 72 Stunden wurde, entsprechend der XTT-Kit Anleitung, das Electron-coupling reagent PMS (N-Methyldibenzopyrazinmethylsulfat) mit dem XTT labeling reagent (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Salz) gemischt und zu den Wells gegeben. Metabolisch aktive Zellen reduzieren durch mitochondriale Dehydrogenasen das gelbliche Tetrazoliumsalz XTT in orangefarbenes Formazan. Dieses Stoffwechselprodukt ist wasserlöslich und wird von den Zellen ins Kulturmedium abgegeben. Je größer die Anzahl der lebenden, also stoffwechselaktiven Zellen ist, desto größer ist die Absorption des Kulturmediums. Nach weiteren sechs Stunden Inkubation bei 37 °C wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) mittels ELISA-Plate Spektrometer gemessen. Für jede Zelllinie wurden die Versuche dreimal an verschiedenen Tagen unter identischen Bedingungen durchgeführt, immer 3 Tage nach einer Passage. Die

Konzentrationen wurden in Vorversuchen so gewählt, dass die IC_{50} bestimmt werden konnte. Die jeweils höchsten Konzentrationen führten zum Absterben aller LCLs.

Tabelle 3: Konzentrationen der 3 verwendeten Antidepressiva in den Wells (96-Well Mikrotiterplatte), mit denen die LCLs (Lymphoblastoide Zelllinien) der MARS-Patienten inkubiert wurden. Für Imipramin wurden 7 Konzentrationen von 30 bis 110 µM verwendet, für Paroxetin 6 verschiedene Konzentrationen von 5 bis 30 µM und von Mirtazapin 5 Konzentrationen von 80 bis 600 µM. Die mittleren Konzentrationen entsprachen etwa der Konzentration, bei denen die IC_{50} lag. Die jeweils niedrigsten Konzentrationen zeigten keine Wachstumshemmung auf die Zelllinien und bei den höchsten Konzentrationen waren keine lebenden Zellen mehr vorhanden. IC_{50} ist die Konzentration, bei der eine Wachstumshemmung um 50 % erreicht wird.

Imipramin-Konzentrationen [µM]	Paroxetin-Konzentrationen [µM]	Mirtazapin-Konzentrationen [µM]
30	5	80
50	10	200
60	15	300
70	20	400
80	25	600
90	30	
110		

2.2.4 RNA Extraktion und Reverse Transkription

5 Millionen Zellen wurden aus der jeweiligen Zellsuspension entnommen. Mittels RNeasy® Mini Kit wurde gemäß der Anleitung des Herstellers die Gesamt-RNA isoliert und bei -80 °C aufbewahrt. Mittels 1%igem Agarosegel wurde die Integrität der RNA untersucht (Vorhandensein von zwei deutlich getrennten Banden [28S- und 18S-Bande] mit 2:1 Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten). Die Konzentration wurde mittels eines NanoDrop® ND 1000 Spektralphotometer (FA Thermo Scientific) bestimmt. Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des QuantiTect Reverse Transkriptions-Kit (Qiagen), bestehend aus der Quantiscript® Reversen Transkriptase, RT Primer Mix und Quantiscript RT Puffer, gemäß der Anleitung des Herstellers, mit einem Thermocycler MJ-Research (Biozym, Germany) in cDNA umgeschrieben und bis zur Verwendung bei -70 °C aufbewahrt. RNA Extraktion und Transkription wurde von jeder Zelllinie doppelt durchgeführt.

2.2.5 Real Time Quantitative PCR

Die quantitative PCR wurde mit einem Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) in Kombination mit dem QuantiFast SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) durchgeführt. Die verwendeten Primer stammten ebenfalls von der Firma Qiagen (Tab. 4).

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer (Qiagen)

	Gen	**Bezeichnung**	**Katalognummer**
Untersuchte (Ziel-)Gene	*CHL1*	close homolog of L1	QT00024801
	ITGB3	integrin β-3	QT00044590
	SLC6A4	serotonin transporter	QT00058380
Referenz-Gene	*TBP*	TATA box-binding protein	QT00000721
	GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	QT00079247

1 µl cDNA (50 ng/µl) wurden mit 1,25 µl Primern, 6,25 µl Mastermix und 4 µl Wasser, verhältnismäßig entsprechend dem Protokoll der Firma Qiagen gemischt, so dass letztendlich 12,5 µl/Well vorlagen. Im Mastermix ist SYBR®-Green enthalten; dieser Fluoreszenzfarbstoff lagert sich unspezifisch in den Doppelstrang der DNA ein. Mit fortschreitender PCR-Reaktion kommt es zu einem proportionalen Fluoreszenzanstieg, der vom Gerät gemessen wird und der der entstandenen Produktmenge entspricht. Die PCR Bedingungen sind in der Tabelle 5 aufgeführt. Parallel dazu wurden in jedem PCR-Lauf bekannte Template-Mengen amplifiziert. Diese sogenannten Haushaltsgene (*TBP* und *GAPDH*) werden stabil exprimiert und wurden zur Quantifizierung der Expression der Zielgene (*CHL1*, *ITGB3* und *SLC6A4*) herangezogen. Alle Genexpressionsanalysen wurden doppelt bestimmt und der Mittelwert für weitere Berechnungen verwendet. Quantifiziert wurde anhand des Ct-Wertes, dem so genannten Threshold Cycle, das ist jener PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Die Expressionen der untersuchten Gene wurden als ΔCt-Werte berechnet (Differenz der Ct-Werte zwischen Zielgen und Referenzgen). Anschließend an die PCR wurden Schmelzkurvenanalysen durchgeführt, um damit die Spezifitäten der PCR Produkte zu überprüfen.

Tabelle 5: Protokoll für die PCR Quantifizierung

	Dauer	**Temperatur**
Initiation	5 min	95 °C
40 Zyklen		
Denaturierung	10 sec	95 °C
Annealing/Amplifikation	30 sec	60 °C

2.2.6 DNA Extraktion

Für die Genotypisierungen von *ITGB3*, *CHL1* und *SLC6A4* wurde aus den LCLs der Patienten DNA isoliert. Hierfür wurden 5 Millionen Zellen der jeweiligen Zellkultur entnommen, bei 400 g zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die DNA Extraktion aus den LCLs erfolgte gemäß dem Protokoll des QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) mittels QIAamp-Mini-Spinsäulen. Im Prinzip wird die Eigenschaft der DNA ausgenutzt, spezifisch an die QIAamp Silikagel-Membran zu binden, während mit mehreren Waschschritten alle anderen Substanzen und Verunreinigungen abgetrennt werden.

2.2.7 CHL1 Genotypisierung

Die Auswahl der Polymorphismen erfolgte nach folgenden Kriterien: Allelhäufigkeit des SNP beträgt mindestens 5 % in Kaukasiern ($R^2 = 0{,}08$ und MAF = 0,05), ‚tagging' von SNPs (bei SNPs, die hoch korreliert sind, entscheidet man zugunsten eines SNPs, der stellvertretend für das ganze Set steht) und zur Verfügung stehende validierte Assays im Labor. Der SNP rs2272522 wurde in einer Studie als assoziiert mit Schizophrenie gefunden und deshalb für unsere Studie ausgewählt. 6 Polymorphismen im *CHL1* wurden genotypisiert: Die SNPs rs2133402 und rs1516340 mit der RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen) PCR und die SNPS rs1516338, rs2272522, rs4003413 und rs9841789 mit der ASO Methode (Allel-spezifische Oligonukleotid PCR). Bei der RFLP-Methode erkennen und schneiden Restriktionsenzyme bestimmte DNA-Sequenzen (Schnittstellen). Dazu wurde der entsprechende DNA-Bereich mit dem Polymorphismus zuerst amplifiziert und anschließend mit den Restriktionsenzymen *BsrDI* für rs2133402 und mit *BcgI* für rs1516340 verdaut. Dadurch entstehen spezifische Fragmente mit unterschiedlichen Längen. Diese DNA-Fragmente wurden durch Gelelektrophorese (Agarosegel 2,5 %) aufgetrennt und das charakteristische Bandenmuster durch Färbung der DNA sichtbar gemacht.

Tabelle 6: Primersequenzen für *CHL1* Genotypisierung

RFLP Primer		
Polymorphismus	**Primer**	**Primersequenz**
rs1516340	RFLP-Chl-151.4 F	5'-ACT GGC CAT GCC TAT TGA G-3'
	RFLP-Chl-151.4 R	5'-TGT GGG CAC AGT TCT TAC C-3'
rs2133402	RFLP-Chl-213 F	5'-GAA ATT AGC TGA TCC CAG CA-3'
	RFLP-Chl-213 R	5'-AGG GCT ATC AGA AGT AAG GA-3'
ASO-PCR Primer		
Polymorphismus	**Primer**	**Primersequenz**
rs1516338	WT-L-Chl-151.3	5'-AAC ATT CTT CTA AGC TTC TGG-3'
	Var-L-Chl-151.3	5'-AAC ATT CTT CTA AGC TTC TGA-3'
	C-R-Chl-151.3	5'-AAG CGA CAG CTA TGA GGT GT-3'
rs2272522	WT-L-Chl-227	5'-CTA ATC GTA TAT CTA ATG TTC C-3'
	Var-L-Chl-227	5'-CTA ATC GTA TAT CTA ATG TTC T-3'
	C-R-Chl-227	5'-ATG TTC TAA GTT TGC ATA AGG A-3'
rs4003413	WT-L-Chl-400	5'-TGT CTC ATT GGT AAA TAA GGG-3'
	Var-L-Chl-400	5'-TGT CTC ATT GGT AAA TAA GGT-3'
	C-R-Chl-400	5'-AAC CCG GAG ACT GAT CTC AA-3'
rs9841789	WT-L-Chl-984	5'-TCT GTC ATC AAA TAT CCC AG-3'
	Var-L-Chl-984	5'-TCT GTC ATC AAA TAT CCC AA-3'
	C-R-Chl-984	5'-ACT AGG TAG GAG GCC ATC T-3'

Zur Aufdeckung von einzelnen Basenaustauschen in einem Allel diente die Allelspezifische Oligonukleotid PCR. Nur exakt zur fraglichen Sequenz passende (komplementäre) Oligonukleotide (Primer) binden an die Gensequenz. Liegt ein Basenaustausch vor, bindet der Primer nicht mehr. Pro SNP wurden 3 Primer designed (WT-F, Var-F and C-R). Am 3' Ende der Primer befindet sich die zu untersuchende allelspezifische Base. WT-F bindet komplementär an die Wildtypform, Var-F an die Variantform, C-R ist er Rückwärtsprimer. Die Primer wurden so entworfen, dass die PCR-Fragmente unterschiedliche Basenpaarlängen aufweisen. Somit konnten nach Auftrennung mittels Gelelektrophorese und Färbung die Genotypen durch die charakteristischen Bandenmuster zugeordnet werden. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 6 aufgeführt.

2.2.8 ITGB3 Genotypisierung

Fünf SNPs im *ITGB3* Gen wurden analysiert. Die SNPs rs15908 und rs3809865 stehen in Verbindung zu Autismus und wurden deshalb für unsere Untersuchungen ausgewählt. Die Genotypisierung erfolgte mittels der bidirektionalen Allelspezifischen Oligonukleotid PCR. Hierfür wurden 2 Primersätze verwendet. Beim inneren allelspezifischen Primersatz ist Primer IL (Internal left) komplementär zum kodierenden Strang des Wildtyps und Primer IR komplementär zu der Punktmutation am nichtkodierenden Strang. Der äußere Satz von Primern, EL und ER, flankiert die Mutationsstellen auf den kodierenden und nichtkodierenden Strängen. Sie binden vor der Punktmutation und dienen als Positivkontrolle. Somit erzeugen alle Proben unabhängig davon, ob ein Basenaustausch vorliegt, EL-ER Amplikons. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 7 aufgeführt. Die Primer EL und ER wurden so gewählt, dass die Amplicons EL-IL und IR-ER charakteristische Längen aufweisen, über die die Zygosität anhand der Schmelztemperaturen bestimmt werden konnte. Ein homozygoter und heterozygoter Wildtyp erzeugte somit das Amplifikationsprodukt EL-IL und eine homozygote Mutante generierte IR-ER. Heterozygote Varianten erzeugten beide Amplikons. Mittels des Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) wurde über das Muster der Schmelzkurven der Genotyp zugeordnet. Homozygote Wildtypen zeigten eine Schmelzkurve bei 77 °C, die Amplikons der homozygoten Mutanten schmolzen bei 81 °C und Heterozygote wiesen zwei Schmelzkurven bei 77 °C und 81 °C auf.

Tabelle 7: Übersicht über die Primer zur Genotypisierung der Polymorphismen im *ITGB3*. Verwendet wurden 2 Primersätze. Beim inneren allelspezifischen Primersatz ist Primer IL (Internal left) komplementär zum kodierenden Strang des Wildtyps und Primer IR komplementär zu der Punktmutation am nichtkodierenden Strang. Der äußere Satz von Primern (EL und ER) flankiert die Mutationsstellen auf den kodierenden und nichtkodierenden Strängen.

Polymorphismus	Primer	Primersequenz
rs15908	EL	5'-AAT CTT GAG TCC CAT ACA AGA C-3'
	IR	5'-TCA GAA AAT CCG TTC TAAA GTC-3'
	IL	5'-CAC GCA CTT CCA GCT CT-3'
	ER	5'-GTT TCC TTT CAG TTC AAT TTC T-3'
rs3851807	EL	5'-TGG CTG TGA ATA TCA CTA GAA TGA C-3'
	IR	5'-AGG CTG AGC CAT GGA CC-3'
	IL	5'-CAT CAG TTA CGA TCT GAG ACT TGC-3'
	ER	5'-AAT ACA GGT TAT TGG TTA GGA AGA A-3'
rs3809865	EL	5'-GGG AGA GAG TGC TAT TGT AGA G-3'
	IR	5'-ATA CAG CAC ACC AAG GCA-3'
	IL	5'-CAC ATA CCT GGC CCT GA-3'
	ER	5'-TGA TAC AAC TGA CCC ATC ATT-3'
rs8074094	EL	5'-CAT TAT AGA CAT TGC ATG GCT CAG-3'
	IR	5'-ATG TAA GCG TGA GGC CCA-3'
	IL	5'-CCA ATG TCA TCA TTC CCA CTC AC-3'
	ER	5'-CTC AGA GCC TTG AGT CCA TCT AAC T-3'
rs2056131	EL	5'-GGA TGG CAG ATA TAA ATA TAG TAG A-3'
	IR	5'-GCG ATT CCA GAA GTG GTA-3'
	IL	5'-GCT CAG CAC AAC CCA TC-3'
	ER	5'-GCA ACA TAG TGA GAC CTA ATC TCT A-3'

2.2.9 Serotonintransporter Genotypisierung

Es wurden der 5-HTTLPR Polymorphismus (44-bp Insertion/Deletion), der SNP rs25531 innerhalb des 5-HTTLPR im L-Allel und STin2 VNTR des Serotonintransporters (*SLC6A4*) bestimmt. Der 5-HTTLPR Polymorphismus (Insertion (L-Allel) oder Deletion (S-Allel)) von einer 44 Basenpaar langen Sequenz) und der STin2 VNTR wurden mittels PCR und nachfolgender Gelelektrophorese bestimmt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Übersicht über die Primer zur Genotypisierung der Polymorphismen im *SLC6A4*

Polymorphismus	Primer	Primersequenz
5-HTTLPR	44bp-F	5'-GGC GTT GCC GCT CTG AAT GC-3'
(44-bp Ins/Del)	44bp-R	5'-GAG GGA CTG AGC TGG ACA ACAC-3'
STin2 VNTR	SERT17-3	5'-GGT CAG TAT CAC AGG CTG CGA GTA G-3'
(17-bp VNTR)	SERT17-4	5'-TGT TCC TAG TCT TAC GCC AGT GAA G-3'

Je nach Vorhandensein einer Insertion oder Deletion bzw. abhängig von der Anzahl der Wiederholungen der 17 bp-Sequenz entstehen unterschiedlich lange PCR-Produkte. Anhand der charakteristischen Bandenmuster kann der Genotyp bestimmt werden. Der SNP (rs25531) innerhalb des 5-HTTLPR im L-Allel (bei Vorliegen einer Insertion) wurde mit Hilfe des Restriktionsenzyms *MspI* ermittelt. Eine Übersicht über mögliche Allele des 5-HTTLPR in *SLC6A4* ist in der Tabelle 9 zu finden, mögliche Allele des STin2 VNTR Polymorphismus zeigt Tabelle 10 und in Tabelle 11 wird eine Übersicht über die SNP rs25331 Genotypen gezeigt.

Tabelle 9: Übersicht über mögliche Allele des 5-HTTLPR im *SLC6A4*

	l/l	**l/s**	**s/s**
Fragment-Größe [bp]	528	528 484	484

Tabelle 10: Übersicht über mögliche Allele des STin2 VNTR Polymorphismus im *SLC6A4*

	12/12	**12/10**	**10/10**	**12/9**	**10/9**
Fragment-Größe [bp]	301	301 267	267	301 250	 267 250

Tabelle 11: Übersicht über Genotyp SNP rs25531

	L_A	L_G
Fragment-Größe [bp]	339 127 62	 172 167 127 62

Reaktionsbedingungen für 5-HTTLPR

Reaktionsansatz (24 µl):	10*Puffer (Invitrogen)	2,5 µl
	MgCl (50 mM)	0,75 µl
	DMSO (3 %)	0,75 µl
	dNTP-GTPs (2 mM)	2,5 µl
	dGTPs (1 mM)	1,25 µl
	deaza GTPs (1 mM)	1,25 µl
	Primer 44bp-F (10 µM)	0,5 µl
	Primer 44bp-R (10 µM)	0,5 µl
	Taq Polymerase (Invitrogen)	0,15 µl
	H_20 (bidest, steril)	13,85 µl
	+ genomische DNA	1-2 µl (100 ng DNA)
Cycler Programm:	2 min 94 °C - 35x (30 s 94 °C - 30 s 67 °C - 60 s 72 °C) - 7 min 72 °C (Thermocycler)	
Elektrophorese:	10 µl PCR-Produkt + 2 µl ‚blue sucrose‘, 120 min bei 110 V Agarosegel 2 %, 20 min Färben in EtBr - Lsg. (50 ml 1 x TBE + 5 µl EtBr)	
DNA-Marker (Ladder):	3 µl 100 bp	

Reaktionsbedingungen für SNP rs25531 (L_A/L_G)

Reaktionsansatz:	Restriktionsenzym *MspI*	1,5 µl
	Buffer Tango gelb	1,8 µl
	PCR-Produkt	ca. 15 µl
	(von SERT 44 bp Ins/Del)	
Cycler Programm (Verdau):	3 h bei 37 °C	
Elektrophorese:	18 µL Produkt (alles) + 2 µL ‚blue sucrose'	
	135 min bei 90 V, Agarosegel 3 %	
	40 min Färben in EtBr-Lsg. (50 mL 1 x TBE + 5 µL EtBr)	
DNA-Marker (Ladder):	3 µl 100 bp	

Reaktionsbedingungen für STin2 VNTR

Reaktionsansatz (23 µL):	10*Puffer (Invitrogen)	2,5 µl
	MgCl (50 mM)	1,25 µl
	dNTPs (2 mM)	4,5 µl
	dGTPs (1 mM)	1,25 µl
	Primer SERT17-3 (10 µM)	0,5 µl
	Primer SERT17-4 (10 µM)	0,5 µl
	AmpliTaq Polymerase (Invitrogen)	0,25 µl
	H_20 (bidest, steril)	13,5 µl
	+ genomische DNA	2 µl
Cycler Programm:	2 min 94 °C - 35x (30 s 94 °C - 45 s 58 °C - 60 s 72 °C) - 7 min	
	72 °C (Thermocycler)	
Elektrophorese:	10 µl PCR-Produkt + 1,5 µl Bromphenolblau,	
	120 min bei 100 V, Agarosegel 2,5 %,	
	20 min Färben in EtBr - Lsg. (50 ml 1 x TAE + 5 µl EtBr)	
DNA-Marker (Ladder):	3 µl 50 bp	

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Softwares SPSS V.12, Sigmaplot V.7, R v3.01 und den Bibliothekssoftwares drc v2.3-96 (Analysis of dose-response curve data) und coin v1.0-23 (Conditional Inference Procedures in a Permutation Test Framework). Für Genotypen wurden die Allelhäufigkeiten statistisch auf Ungleichverteilung mittels Hardy-Weinberg-Gesetz getestet. Die IC_{50}-Werte (engl.: 'inhibitory concentration') wurden durch nichtlineare Regression mit Hilfe der 4-Parameter-Logistik-Funktion ermittelt. Die Genexpressionswerte (ΔCT) wurden als Mean ± Standardabweichung angegeben. Intra- und interindividuelle Varianzen wurden mittels F-Test berechnet. Um die IC_{50}-Werte und die Genexpressionswerte aller LCLs vergleichbar zu machen, wurden vor dem Korrelieren alle Werte normalisiert, um Unterschiede, bedingt durch Experimente (Probenvorbereitung, Prozess der Messung), auszugleichen. Nach Testung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test ($p>0,05$) erfolgte die statistische Auswertung der Daten anhand parametrischer Tests. Ein Signifikanzniveau von $p<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Abhängig von der Anzahl der experimentell bestimmten Faktoren (Genotyp, Response bzw. Remission) wurden univariate bzw. multivariate Tests angewendet. Korrelationen der IC_{50}- und Genexpressions-werte zwischen Gruppen (Response, Remission, Alter, Geschlecht) wurden mit dem Zweistichproben-t-Test (Welch-Test) überprüft. Auf einen Trend von Raten in Gruppen (z.B. Genotypen) wurde mit dem Cochran-Armitage-Test (linearer Trend Test) getestet. Auf einen statistischen Zusammenhang wurden die IC_{50}-Werte untereinander und die IC_{50}-Werte mit den Genexpressionswerten mittels Pearson-Korrelation (Produkt-Moment-Korrelation) überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Patienten der MARS-Studie

Zur Beurteilung der Ansprechraten wurde der Response- und Remissionsstatus von 58 Patienten nach 5 bzw. 8 Wochen herangezogen. Response bedeutete eine Reduktion des HDRS-Wertes um mehr als 50 % im Vergleich zum Wert nach Aufnahme in die Studie. Remission wurde mit einem HDRS-Wert kleiner als 8 erreicht. 27 Studienteilnehmer (46,6 %) zeigten Response nach 5 Wochen und 30 Teilnehmer (51,7 %) nach 8 Wochen. Von den 27 Patienten mit Response nach 5 Wochen zeigten 13 (22,4 %) Patienten auch Remission nach 5 Wochen (early remitters). Nach 8 Wochen waren von den 58 Patienten 18 (31,0 %) in Remission (late remitters). 22 Patienten zeigten weder ein Ansprechen noch Remission nach 5 bzw. 8 Wochen (Tab. 12).

Tabelle 12: Übersicht über Response und Remission der Patienten der MARS-Studie nach 5 und 8 Wochen (n=58). Response bedeutete eine Reduktion des HDRS-Wertes um mehr als 50 % im Vergleich zum Wert nach Aufnahme in die Studie. Remission entsprach einem HDRS-Wert < 8.

Anzahl Patienten	Response 5 Wochen	Response 8 Wochen	Remission 5 Wochen	Remission 8 Wochen
22	nein	nein	nein	nein
11	ja	ja	ja	ja
4	ja	nein	nein	nein
4	ja	ja	nein	nein
6	ja	ja	nein	ja
1	nein	ja	nein	ja
8	nein	ja	nein	nein
2	ja	nein	ja	nein

3.2 Bestimmung der *in vitro* Sensitivitäten

Zur Bestimmung der *in vitro* Sensitivitäten, also der Hemmung des Zellwachstums durch die Antidepressiva, wurde das Enzymaktivitäts-Assay, bzw. Wachstumshemmungs-Assay XTT angewendet. Hierfür wurden die LCLs von den Patienten des MARS-Projekts mit verschiedenen Konzentrationen der drei Antidepressiva (Paroxetin, Imipramin und Mirtazapin) inkubiert und mittels XTT die lebenden, metabolisch aktiven Zellen (%) bestimmt (Abb. 1).

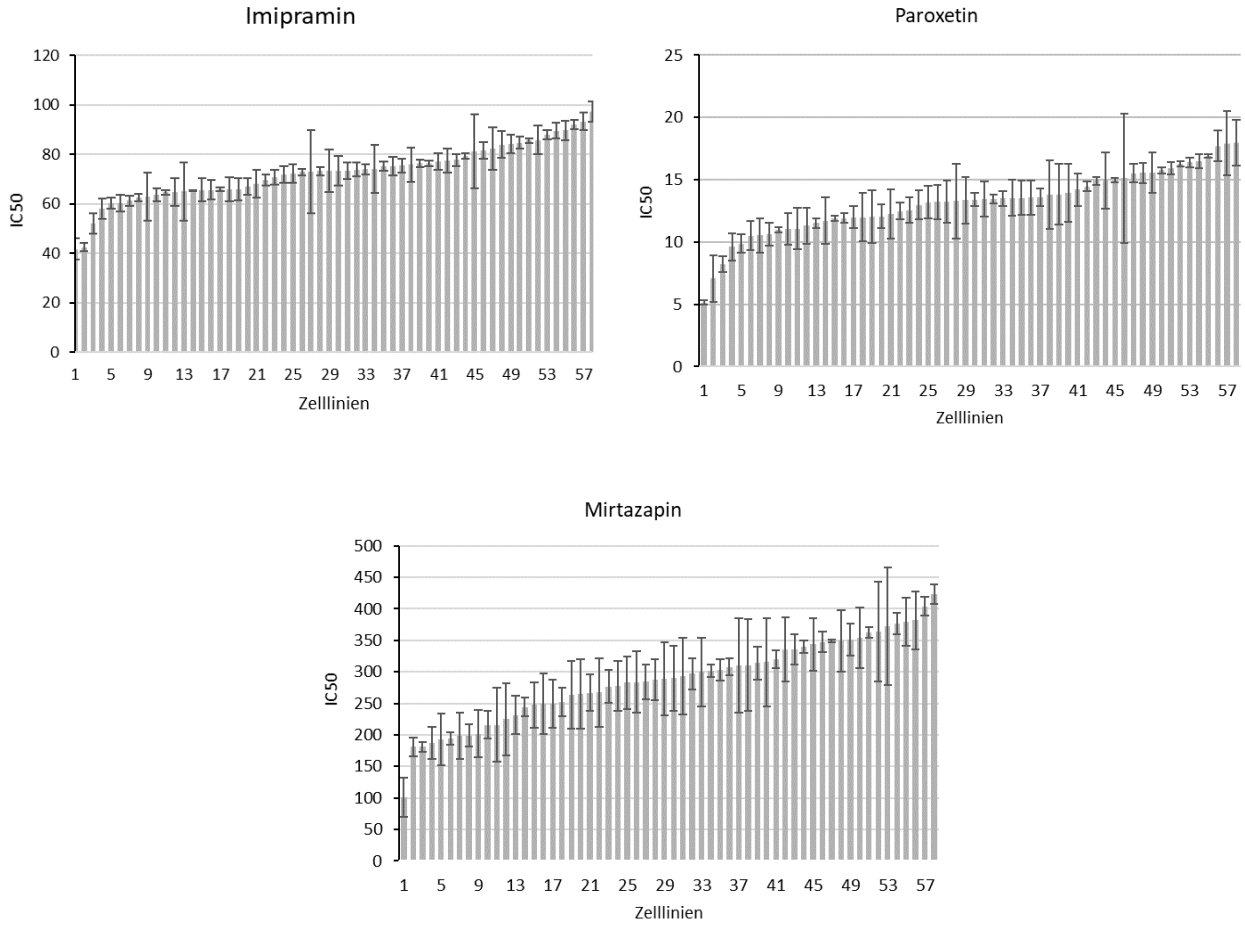


Abbildung 1: Die Hemmung des Zellwachstums durch die Antidepressiva Imipramin, Mirtazapin und Paroxetin wurde mittels XTT (Wachstumshemmungs-Assay) bestimmt. Jeder Datenpunkt repräsentiert die durchschnittliche Wachstumshemmung (IC_{50}-Wert) einer Zelllinie mit Standardabweichungen durch das jeweilige Antidepressivum in Dreifachbestimmung (n=58).
IC_{50}: Konzentration, bei der eine Hemmung des Zellwachstums um 50% erreicht wird.

Von den 60 Zelllinien konnten 2 Zelllinien nicht zum Wachsen gebracht werden, somit wurden Wachstumshemmungs-Assays für 58 Zelllinien durchgeführt. Alle Versuche wurden dreimal an verschiedenen Tagen durchgeführt, immer unter identischen Bedingungen. Die individuellen IC_{50}-Werte (engl.: ‚inhibitory concentration'), diese entsprechen derjenigen Wirkstoffkonzentration, bei der eine Hemmung des Zellwachstums um 50 % hervorgerufen wird, wurden mittels kompletter Dosis-Wirkungskurven berechnet. Für jede Zelllinie wurden hierfür die Konzentrationen der Medikamente (x-Achse) gegen die lebenden Zellen [%], (y-Achse) aufgetragen und die Kurven mit dem 4-Parameter Kurvenfitting angepasst. Für Imipramin lag die durchschnittliche IC_{50} Konzentration bei etwa 72,5 µM, für Paroxetin bei 13,1 µM und für Mirtazapin bei 287 µM (Tab. 14). Die absolute Hemmung des Zellwachstums wurde bei 30 µM für Paroxetin, 110 µM für Imipramin und 600 µM für Mirtazapin beobachtet. Die LCLs zeigten große individuelle Unterschiede in der Wachstumshemmung durch alle drei Antidepressiva und damit große interindividuelle Varianz. Die Abbildung 2 zeigt am Beispiel von Paroxetin den unterschiedlichen Kurvenverlauf für die Wachstumshemmung durch diesen Arzneistoff in zwei unterschiedlichen Zelllinien. Zelllinie AA02EMM reagiert viel sensitiver auf Paroxetin (IC_{50}=10,6 µM) im Vergleich zu Zelllinie KO872 (IC_{50} =17,7 µM).

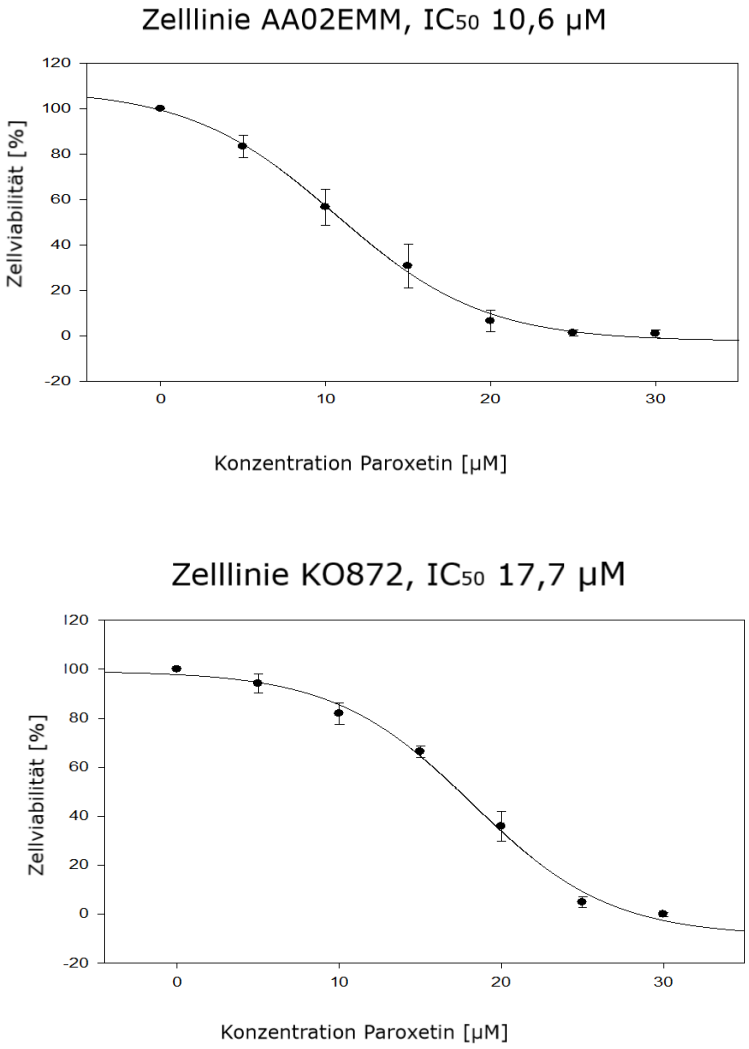


Abbildung 2: Vergleich von Dosis-Wirkungs-Kurven (4-Parameter Kurvenfitting) von zwei verschiedenen Patienten-LCLs am Beispiel Paroxetin, bestimmt mittels Wachstumshemmungs-Assay XTT, (n = 3, Mittelwert ± SD). Zelllinie AA02EMM zeigt eine höhere Empfindlichkeit, die IC_{50} liegt bei 10,6 µM, wogegen Zelllinie KO872 weniger sensitiv auf Paroxetin reagiert, die IC_{50} ist höher und liegt bei 17,7 µM. IC_{50}: Konzentration, bei der eine Hemmung des Zellwachstums um 50% erreicht wird.

Um zu zeigen, dass Unterschiede der IC_{50} durch individuelle Empfindlichkeiten auf die Exposition mit einem bestimmten Arzneistoff bedingt sind, wurden die intra- und inter-individuellen Variationskoeffizienten (VK) bestimmt. Die interindividuellen VK betrugen 15,4 für Imipramin, 19,2 für Paroxetin und 22,9 für Mirtazapin. Die intraindividuelle Varianz war 2 bis 3-fach kleiner mit VK von 5,8 für Imipramin, 9,6 für Paroxetin und 13,1 für Mirtazapin (Tab. 13).

Tabelle 13: Inter- und intraindividuelle Varianzen. Die IC_{50}-Werte der LCLs der MARS-Patienten bei Inkubation mit Imipramin, Paroxetin und Mirtazapin wurden mittels kompletter Dosis-Wirkungskurven bestimmt (Dreifachbestimmung). Variationskoeffizienten (VK) wurden als prozentualer Anteil der Standardabweichung (SD) vom IC_{50} Mittelwert errechnet. Die interindividuelle Varianz ist 2 bis 3-fach größer als die intraindividuelle Varianz.
IC_{50} ist die Konzentration, bei der eine Hemmung des Zellwachstums um 50 % erreicht wird.

	Imipramin	**Paroxetin**	**Mirtazapin**
IC_{50} Minimum	41,752	5,133	101,095
IC_{50} Maximum	97,133	17,980	423,701
IC_{50} Mittelwert	72,723	13,163	287,015
Standardabweichung (SD)	11,19	2,52	65,71
VK [%] intraindividuell	5,8	9,6	13,1
VK [%] interindividuell	15,4	19,2	22,9

Um die IC_{50}-Werte aller LCLs vergleichbar zu machen, wurden vor dem Korrelieren alle Werte normalisiert mit dem Ergebnis einer starken Korrelation der IC_{50} für Paroxetin und Imipramin ($R^2 = 0{,}62$, $p = 2{,}5 \times 10^{-7}$), hingegen keinerlei Korrelationen zwischen Paroxetin und Mirtazapin bzw. Imipramin und Mirtazapin (Abb. 3 und Tab. 14). Einen Zusammenhang zwischen den IC_{50} und Alter und Geschlecht gab es nicht (Zweistichproben-t-Test (Welch-Test), $p>0{,}05$).

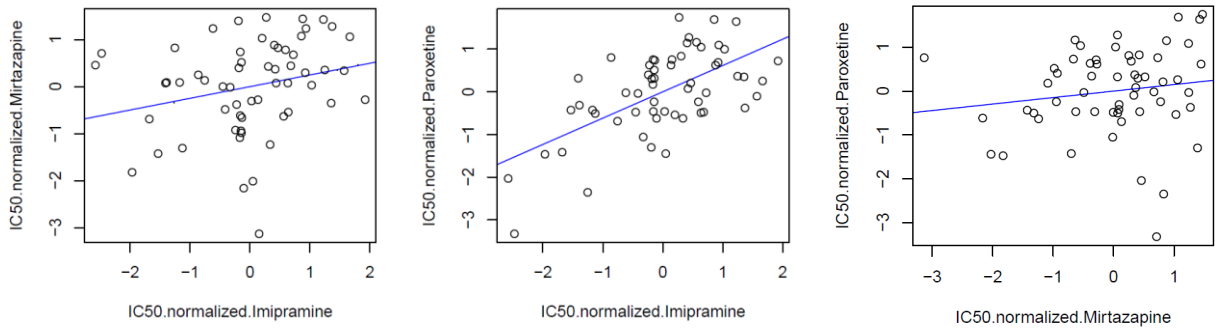


Abbildung 3: Die Diagramme zeigen die Korrelationen der normalisierten IC_{50}-Werte der drei Antidepressiva. Eine starke Korrelation zeigen Imipramin und Paroxetin (mittleres Diagramm, $R^2 = 0{,}62$, $p = 2{,}5 \times 10^{-7}$), beide binden an den Serotonintransporter. Keine Korrelationen zeigen Mirtazapin und Imipramin (linkes Diagramm) bzw. Mirtazapin und Paroxetin (rechtes Diagramm). (*Abb. entnommen [163, S. 6]*)

Tabelle 14: Korrelation zwischen den normalisierten IC_{50}-Werten der Antidepressiva: Pearson-Korrelation [Korrelationskoeffizient, p-Wert]. Eine starke Korrelation der IC_{50}-Werte findet sich für Imipramin und Paroxetin ($R^2 = 0,62$, $p = 2,5 \times 10^{-7}$).

1. Arzneistoff	2. Arzneistoff	R^2	p-Wert
Imipramin	Paroxetin	**0,62**	**$2,5 \times 10^{-07}$***
Imipramin	Mirtazapin	0,25	0,06
Mirtazapin	Paroxetin	0,15	0,27

3.3 *In vitro* Sensitivitäten und Therapieergebnisse

Zur Bestimmung der *in vitro* Sensitivität wurden die LCLs mit verschiedenen Konzentrationen der Antidepressiva Imipramin, Paroxetin und Mirtazapin für 72 Stunden inkubiert und die jeweiligen IC_{50}-Werte anhand kompletter Dosis-Wirkungskurven bestimmt. Um einen Zusammenhang der individuellen IC_{50}-Werte mit dem Therapieansprechen aufzudecken, wurden diese mit Response und Remission nach 5 und nach 8 Wochen korreliert. Response entsprach einer Reduktion des HDRS-Wertes > 50% im Vergleich zum Ausgangswert nach Aufnahme in die Studie, Remission bedeutete ein HDRS-Wert kleiner 8. Es wurden keine Assoziationen gefunden: Zweistichproben-t-Test (Welch-Test), $p>0,05$, (Tab. 15).

Tabelle 15: Korrelationen von Response und Remission mit den normalisierten IC_{50}-Werten: Zweistichproben-t-Test (Welch-Test) [p-Wert]. Es ergaben sich keine Zusammenhänge der IC_{50}-Werte mit den Therapieergebnissen.

	Response nach 5 Wochen	Response nach 8 Wochen	Remission nach 5 Wochen	Remission nach 8 Wochen
Imipramin	0,466	0,879	0,473	0,185
Paroxetin	0,640	0,980	0,586	0,714
Mirtazapin	0,253	0,498	0,872	0,357

3.4 Genexpressionen von *CHL1*, *ITGB3* und *SLC6A4*

Für die Bestimmung der Genexpressionen wurde aus den LCLs RNA isoliert und die basalen Genexpressionen von *CHL1*, *SLC6A4* und *ITGB3* mittels Real-time PCR bestimmt. Von jeder Zelllinie wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Genexpressionswerte der

Kandidatengene wurden gegen die Referenzgene *TBP* und *GAPDH* normalisiert (Differenz der Ct-Werte zwischen Zielgen und Referenzgen). Die Mittelwerte der jeweiligen Genexpressionswerte sind in Abbildung 4 aufgeführt. Für diese relative Bestimmung wurde die vergleichende ΔCt - Methode benutzt. Ct ist der schon oben beschriebene Threshold Cycle, also die Zyklusnummer, bei der ein Signal den so genannten Threshold-Level erreicht.

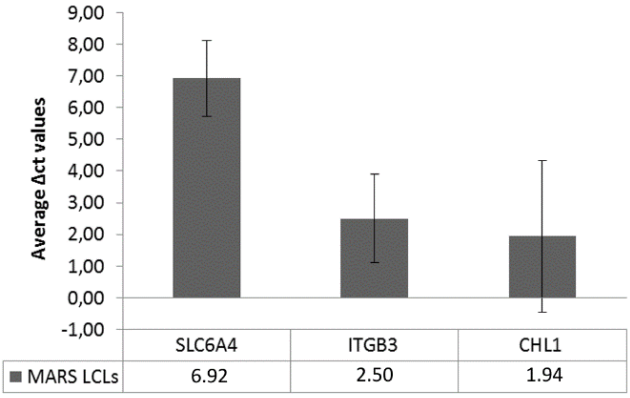


Abbildung 4: Basale Genexpressionen von *CHL1, ITGB3 und SLC6A4* in den LCLs der Patienten des MARS-Projekts, bestimmt durch Real-time PCR (Doppelbestimmmungen). Die Genexpressionswerte der Kandidatengene wurden gegen die Referenzgene *TBP* und *GAPDH* normalisiert mittels der ΔCt Methode, n = 58 Zelllinien, Mittelwert ± SD. ΔCt Differenz der Ct-Werte zwischen Zielgen und Referenzgen. *(Abb. entnommen aus [163, S. 7])*

Die Diagramme in Abbildung 5 zeigen die Expressionswerte mit Standardabweichungen der drei untersuchten Gene für alle Zelllinien (n=58). Eine signifikante Korrelation ($R^2 = 0{,}65$, $p = 2{,}5 \times 10^{-08}$) wurde für die Genexpressionswerte von *CHL1* und *ITGB3* gefunden. Es bestanden keine Korrelationen der Genexpressionen von *SLC6A4* (Serotonintransporter) und denen von *ITGB3* bzw. *CHL1* (Tab. 16).

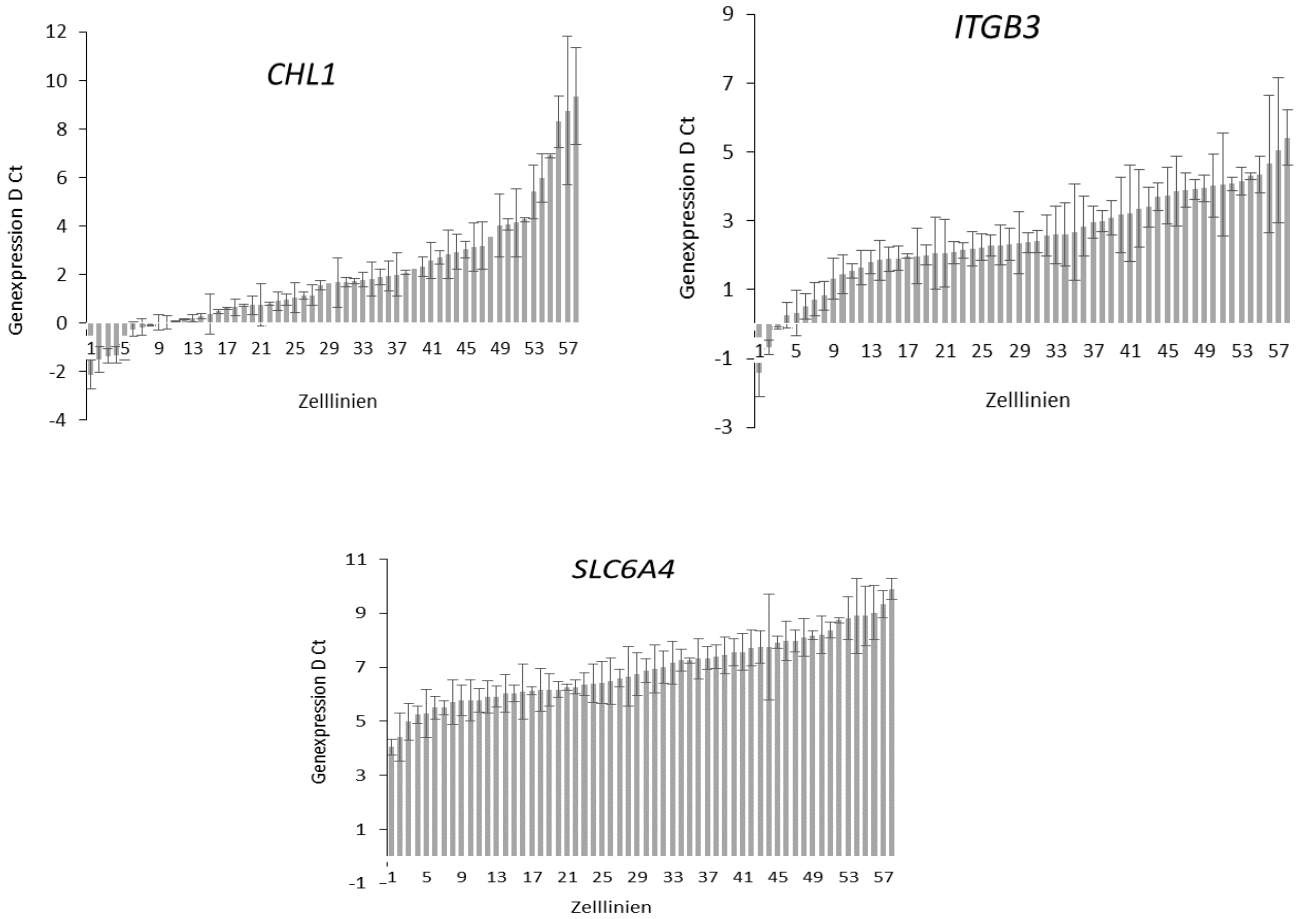


Abbildung 5: Genexpressionen von *CHL1*, *ITGB3 und SLC6A4* in den LCLs der MARS-Patienten (n=58) bestimmt durch Real-time PCR. Die Genexpressionswerte der Kandidatengene wurden gegen die Referenzgene TBP und GAPDH normalisiert mittels der ΔCt Methode. Jeder Wert ist ein Mittelwert ± SD aus 2 unabhängigen Bestimmungen.
ΔCt: Differenz der Ct-Werte zwischen Zielgen und Referenzgen

Tabelle 16: Korrelationen der normalisierten basalen Genexpressionen von *SLC6A4*, *ITGB3* und *CHL1* (ΔCt): Pearson-Korrelation [Korrelationskoeffizient, p-Wert]. Die Genexpressionen von *SLC6A4* und *ITGB3* zeigen eine starke Assoziation (R^2 = 0,65, p = 2,5 x 10^{-08}).

1. Gen	2. Gen	R^2	p-Wert
SLC6A4	*ITGB3*	0,07	0,59
SLC6A4	*CHL1*	-0,07	0,6
CHL1	*ITGB3*	**0,65**	**2,5 x 10^{-08}***

3.5 Genexpressionen und *in vitro* Sensitivitäten

Weiterhin wurde der Zusammenhang zwischen den *in vitro* Sensitivitäten (IC_{50}) und den basalen Genexpressionen von *CHL1*, *ITGB3* und *SLC6A4* in den LCLs der MARS-Patienten untersucht. Es fanden sich keine Korrelationen zwischen den IC_{50}-Werten von Imipramin, Paroxetin und Mirtazapin und den Genexpressionen von *CHL1*, *ITGB3* und *SLC6A*4 (Pearson-Korrelation, p>0,05).

3.6 Genexpressionen und Therapieergebnisse

Das Therapieansprechen (Response und Remission) der Patienten der MARS-Studie wurden mit den Genexpressionen korreliert. Ein signifikanter Zusammenhang der Genexpressionen und einer Remission nach 5 Wochen wurde für *CHL1* (p = 0,006) und *ITGB3* (p = 0,00045) gefunden. Hier zeigte sich, dass die LCLs von Remittern nach 5 Wochen signifikant höhere *CHL1* und *ITGB3* Genexpressionen aufwiesen. Für Response nach 5 und 8 Wochen und Remission nach 8 Wochen gab es keinen Zusammenhang mit den Genexpressionen der drei Kandidatengene (Tab. 17 und Abb. 6).

Tabelle 17: Korrelation von Response und Remission mit den basalen Genexpressionen von *SLC6A4*, *CHL1*, *ITGB3* (ΔCt): Zweistichproben-t-Test (Welch-Test) [p-Wert]. Ein signifikanter Zusammenhang der Genexpressionen und einer Remission nach 5 Wochen zeigt sich für *CHL1* (p = 0,006) und *ITGB3* (p = 0,00045).

		ΔCt *CHL1*	ΔCt *SLC6A4*	ΔCt *ITGB3*
Remission	5 Wochen (n=13)	**0,006***	0,874	**0,00045***
	8 Wochen (n=18)	0,107	0,783	0,054
Response	5 Wochen (n=27)	0,178	0,348	0,174
	8 Wochen (n=30)	0,108	0,712	0,507

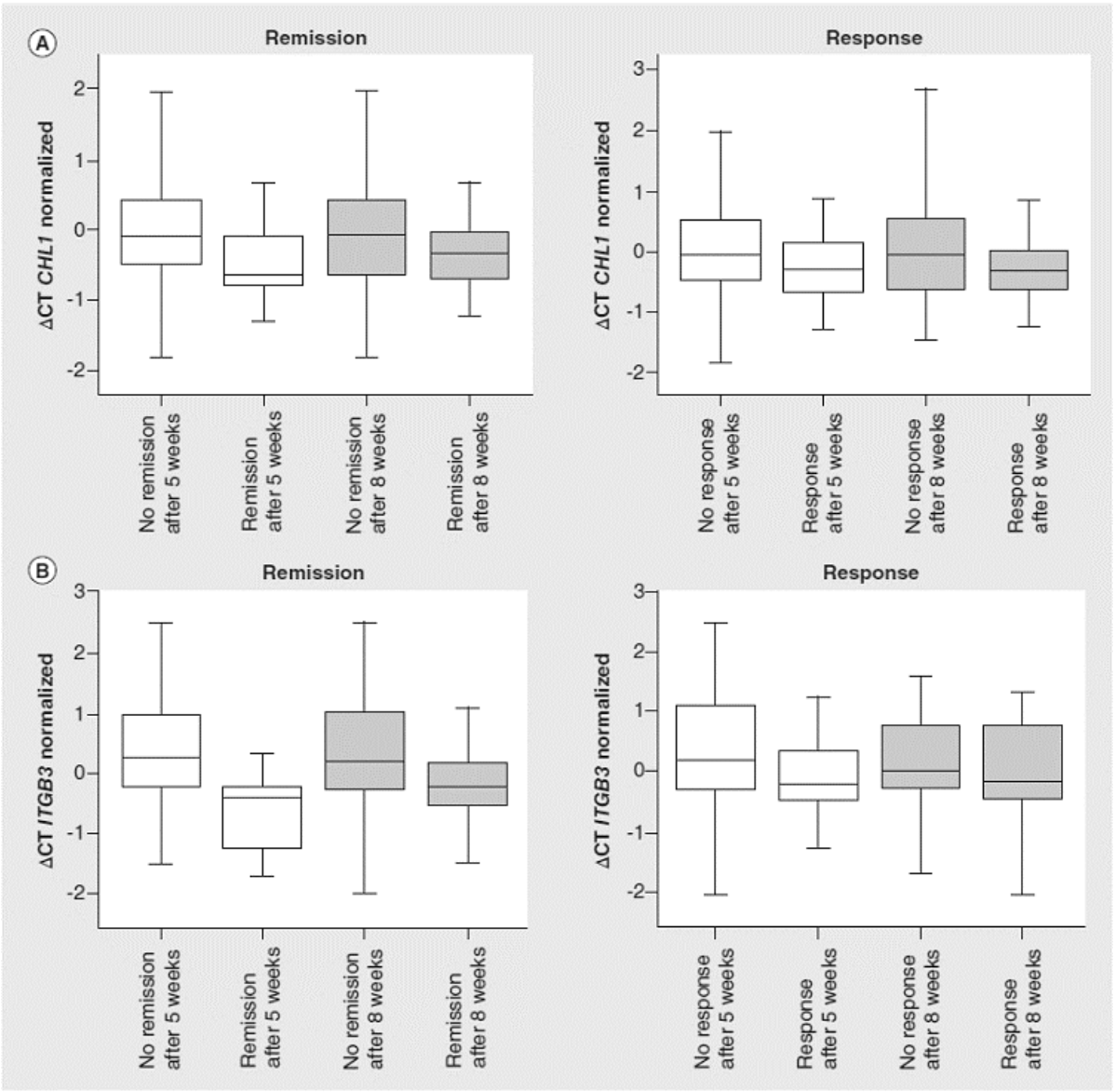


Abbildung 6: Korrelationen der Therapieansprechen mit den normalisierten Geneexpressionen von *CHL1* (A) und *ITGB3* (B). Die Genexpressionen wurden mit der Response (rechte Box Plots) und den Remissionen (linke Box Plots) der MARS-Patienten nach 5 und 8 Wochen korreliert. Patienten mit früher Remission nach 5 Wochen (n=13) zeigten signifikant höhere *CHL1* ($p = 6{,}0 \times 10^{-3}$) und *ITGB3* ($p = 4{,}5 \times 10^{-4}$) Genexpressionen als Nicht-Remitter. Dieser Zusammenhang findet sich nach 8 Wochen nicht mehr (*CHL1*: p = 0,107; *ITGB3*: p = 0,054). Eine Korrelation zwischen Therapieansprechen und Response wurde nicht gefunden: Zweistichproben-t-Test (Welch-Test), p>0,05.
ΔCT: Differenz der Ct-Werte zwischen Ziel- und Referenzgen; Response: Abfall des HDRS-Wertes um die Hälfte des Ausgangswertes; Remission: HDRS-Wert <8. *(Abb. entnommen aus [163, S. 10])*

3.7 Genetische Varianten in *CHL1*

Sechs verschiedene Polymorphismen (SNPs) im *CHL1* Gen wurden bestimmt. Dafür wurde DNA aus den LCLs der Patienten isoliert. Alle Genotypen waren im Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) und die Allelfrequenzen entsprachen denen von in anderen Populationsstudien beschriebenen Häufigkeitsverteilungen in Kaukasiern. Eine Übersicht über die Polymorphismen und Genotyphäufigkeiten zeigt Tabelle 18.

Tabelle 18: CHL1 Genotyphäufigkeiten und Allelfrequenzen; HWE: Hardy-Weinberg- Equilibrium

Polymorphismus	Genotyphäufigkeit			Allelfrequenz		HWE [p-Wert]
rs1516338 (C>T)	**CC**	**CT**	**TT**	**C**	**T**	0,737
	5	21	31	0,27	0,73	
rs1516340 (C>T)	**CC**	**CT**	**TT**	**C**	**T**	0,188
	17	23	16	0,49	0,51	
rs2133402 (T>G)	**TT**	**GT**	**GG**	**T**	**G**	1,0
	46	12	0	0,90	0,10	
rs4003413 (C>A)	**AA**	**AC**	**CC**	**A**	**C**	0,789
	21	27	10	0,59	0,41	
rs2272522 (C>T)	**CC**	**CT**	**TT**	**C**	**T**	0,061
	21	21	15	0,55	0,45	
rs9841789 (T>C)	**CC**	**CT**	**TT**	**C**	**T**	1,0
	20	28	10	0,59	0,41	

3.8 Genetische Varianten im *ITGB3*

Von 58 Patienten-LCLs wurden fünf Polymorphismen (SNPs) im *ITGB3* Gen bestimmt. Eine Übersicht über die Polymorphismen und deren Genotyphäufigkeiten und Allelfrequenzen findet sich in Tabelle 19. Zwei Genotypen (rs15908 und rs3851807) waren nicht im Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE). Die anderen drei Genotypen lagen im HWE und die Allelfrequenzen entsprachen denen von in anderen Populationsstudien beschriebenen Häufigkeitsverteilungen in Kaukasiern. Es bestand kein alters- bzw. geschlechtsspezifischer Zusammenhang der Patienten.

Tabelle 19: *ITGB3* Genotyphäufigkeiten und Allelfrequenzen;
SNP rs3851807 und rs15908 lagen nicht im HWE (Hardy-Weinberg- Equilibrium)

Polymorphismus	Genotyphäufigkeit			Allelfrequenz		HWE [p-Wert]
rs15908 (A>C)	**AA**	**AC**	**CC**	**A**	**C**	< 0,01
	3	5	50	0,095	0,905	
rs2056131 (A>G)	**AA**	**AG**	**GG**	**A**	**G**	1
	9	28	21	0,4	0,6	
rs3809865 (T>A)	**AA**	**TA**	**TT**	**A**	**T**	0,35
	7	21	30	0,30	0,70	
rs3851807 (C>G)	**CC**	**CG**	**GG**	**C**	**G**	< 0,01
	31	14	13	0,66	0,34	
rs8074094 (T>C)	**CC**	**CT**	**TT**	**T**	**C**	1
	2	17	39	0,82	0,18	

3.9 Genetische Varianten im *SLC6A4*

Die ermittelten Genotypverteilungen für den 5-HTTLPR (inklusive rs25531) bzw. STin2 VNTR finden sich in Tabelle 20 und 21. Die Genotyphäufigkeiten lagen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (p = 0,371 bzw. p = 0,777). Keiner der Patienten hatte den STin2 VNTR 12/9 bzw. 10/9 Genotyp. Von den ursprünglich 60 Patienten konnte von 3 Patienten der 5-HTTLPR (inklusive rs25531) bzw. STin2 VNTR Genotyp nicht bestimmt werden.

Tabelle 20: Genotyphäufigkeiten des 5-HTTLPR in der Promoterregion von *SLC6A4*

	44-bp Ins/Del				
	L/L	L/s	s/s		
Anzahl Patienten	20 (35,1 %)	29 /50,1 %)	8 (14 %)		
	44-bp Ins/Del + rs25531				
	LA/LA	LA/LG	LA/s	LG/s	s/s
Anzahl Patienten	19 (33,3 %)	1 (0,02 %)	25 (43,9 %)	4 (0,07 %)	8 (14 %)

Tabelle 21: Genotyphäufigkeiten des STin2 VNTR im Intron 2 von *SLC6A4*

	17-bp VNTR		
	12/12	12/10	10/10
Anzahl Patienten	21 (36,8 %)	29 (50,1 %)	7 (12,3 %)

3.10 Genetische Varianten in *CHL1* und *in vitro* Sensitivitäten

Beim Testen auf einen Zusammenhang zwischen *CHL1* Polymorphismen und der *in vitro* Sensitivität ergab der SNP rs4003413 eine Korrelation; Träger der Variante AA (n=21) zeigten eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Paroxetin als Träger des CC Genotyps (n=10). Dieser SNP korrelierte jedoch nicht mit den IC_{50} für Imipramin bzw. Mirtazapin. Für die anderen SNPs wurden keine Korrelationen der Genotypen mit den IC_{50}-Werten festgestellt (Tab. 22 und Abb. 7).

Tabelle 22: Korrelationen zwischen *CHL1* Polymorphismen und von mit Paroxetin, Imipramin und Mirtazapin behandelten LCLs: linearer Trend Test [p-Wert].
Für den SNP rs4003413 fand sich ein Zusammenhang mit der Empfindlichkeit auf Paroxetin-Exposition, p=0,014). Träger des AA Genotyps (n=21) zeigten sich empfindlicher auf die Inkubation mit Paroxetin als Träger des CC Genotyps (n=10).

Polymorphismus	IC_{50} Paroxetin	IC_{50} Imipramin	IC_{50} Mirtazapin
rs1516340	0,495	0,682	0,716
rs1516338	0,952	0,344	0,309
rs2272522	0,803	0,888	0,914
rs4003413	**0,014***	0,138	0,530
rs9841789	0,392	0,481	0,173
rs2133402	0,789	0,208	0,646

.

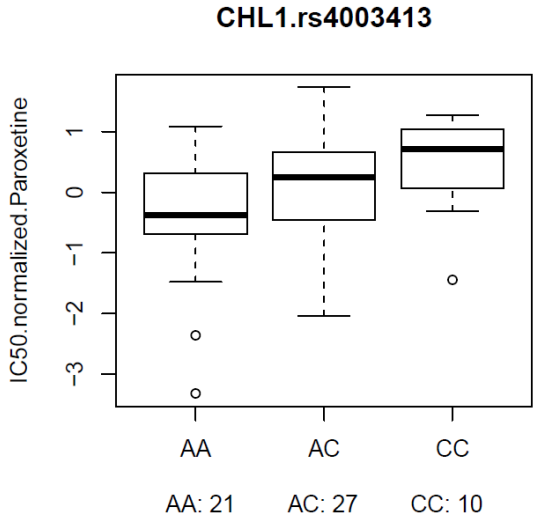


Abbildung 7: *CHL1* SNP rs4003413 korrelierte signifikant mit den normalisierten IC_{50}-Werten von mit Paroxetin behandelten LCLs der MARS-Patienten (n = 58). Träger der Variante AA (n=21) zeigten eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Paroxetin als Träger des CC (n=10): linearer Trend Test [p=0,014]. IC50: Konzentration, bei der eine Hemmung des Zellwachstums um 50 % erreicht wird.
(Abb. entnommen aus [163, S. 8])

3.11 Genetische Varianten in *ITGB3* und *in vitro* Sensitivitäten

Das Testen auf eine Korrelation zwischen den Polymorphismen im ITGB3 und den IC_{50}-Werten von Paroxetin, Imipramin und Mirtazapin ergab keinen Zusammenhang (linearer Trend Test). Die SNPs rs3851807 und rs15908 lagen nicht im HWE, aus diesem Grunde wurden die p-Werte nicht ausgewertet.

3.12 Genetische Varianten in *SLC6A4* und *in vitro* Sensitivitäten

Es wurde eine schwach signifikante Assoziation des 5-HTTLPR (+ rs25531) mit der IC_{50} von Paroxetin gefunden. Getestet wurden 2 Gruppen (L-Träger versus s-Träger): LA/LA + LA/LG + LA/s, n=45 gegen LG/s + s/s, n=12 (Tab. 20). Tendenziell zeigten Träger des L-Genotyps höhere IC_{50}-Werte von Paroxetin als Träger des s-Genotyps (Zweistichproben-t-Test (Welch-Test), p=0,045, s. Abb. 8).
Für Varianten des STin2 VNTR Genotyps (Tab. 21) erfolgte die Testung mit den 3 Gruppen: 12/12 (n=21), 12/10 (n=29) und 10/10 (n=7) gegen die IC_{50} von Paroxetin, Imipramin und Mirtazapin. Es wurden keine Korrelationen gefunden (linearer Trend Test, p>0,05, Tab. 23).

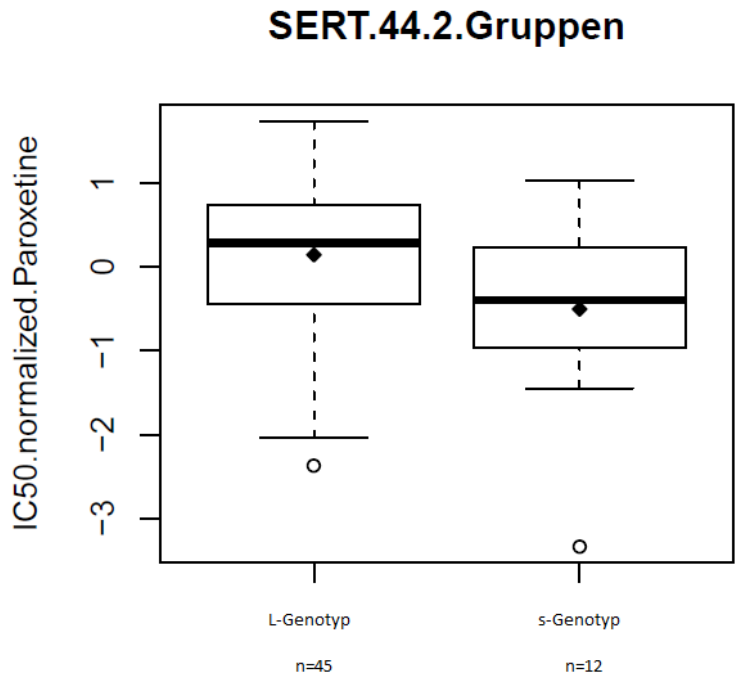


Abbildung 8: 5-HTTLPR Polymorphismus: SERT.44 -2 Gruppen: Träger des L-Genotyps (LA/LA + LA/LG + LA/s, n=45) zeigten höhere IC_{50}-Werte von Paroxetin als Träger des s-Genotyps (s/s + LG/s, n=12): Zweistichproben-t-Test (Welch-Test), (p = 0,045, n=57).
IC_{50}: Konzentration, bei der eine Hemmung des Zellwachstums um 50 % erreicht wird.

Tabelle 23: Korrelationen zwischen *SLC6A4* Polymorphismen 5-HTTLPR (SERT.44: 2 Gruppen mit LA/LA+ LA/s, n=45 oder s/s, n=12) und STin2 VNTR (SERT.17 VNTR): 12/12, n=21, 12/10, n=29 und 10/10, n=7 und den IC_{50} von mit Paroxetin, Imipramin und Mirtazapin behandelten LCLs (normalisierte IC_{50}-Werte), linearer Trend Test [p-Wert]. Träger des L-Genotyps hatten höhere IC_{50}-Werte bei der Inkubation mit Paroxetin, zeigen sich also unempfindlicher (p=0,045). Ein Zusammenhang des STin2 VNTR Genotyps mit IC_{50}-Werten nach Inkubation mit den drei Antidepressiva fand sich nicht.

SLC6A4 Genotyp	IC_{50} Imipramin	IC_{50} Mirtazapin	IC_{50} Paroxetin
SERT.44 (2 Gruppen)	0,362	0,321	**0,045***
SERT.17 VNTR (3 Gruppen)	0,372	0,121	0,795

3.13 Genetische Varianten in *CHL1*, *ITGB3*, *SLC6A4* und Genexpressionen

3.13.1 *CHL1* Genotypen und Genexpressionen

Die sechs untersuchten Polymorphismen im *CHL1* Gen (Tab. 18) ergaben keinen Zusammenhang mit den Genexpressionen von *CHL1*, *SLC6A4* und *ITGB3* (linearer Trend Test, p>0,05).

3.13.2 *ITGB3* Genotypen und Genexpressionen

Ein Zusammenhang der fünf untersuchten Polymorphismen im *ITGB3* (Tab. 19) und den Genexpressionen von *CHL1*, *ITGB3* und *SLC6A4* wurde nicht gefunden (linearer Trend Test, p>0,05).

3.13.3 *SLC6A4* Genotypen und Genexpressionen

Die Polymorphismen im Serotonintransporter (Genotypen L/L, L/s und s/s) und genetische Varianten mit dem SNP rs25531 (Genotypen LA/LA, LA/LG, LA/s, LG/s und s/s) zeigten keine Korrelationen mit den Expressionen der drei untersuchten Gene *CHL1*, *ITGB3* und *SLC6A4* (linearer Trend Test, p>0,05). Es konnten ebenfalls keine Korrelationen zwischen dem STin2 VNTR Genotyp (3 Gruppen: 12/12 (n=21), 12/10 (n=29) und 10/10 (n=7) und den Genexpressionen von *CHL1*, *ITGB3* und *SLC6A4* festgestellt werden (linearer Trend Test, p>0,05).

3.14 Therapieansprechen und Polymorphismen in *CHL1*, *ITGB3* und *SLC6A4*

3.14.1 Polymorphismen im *CHL1* und Therapieansprechen der MARS-Patienten

Beim Testen auf eine Korrelation der Polymorphismen im *CHL1* und dem Ansprechen auf die Behandlung mit Antidepressiva (Response und Remission nach 5 bzw. 8 Wochen) fanden sich zwei Varianten als assoziiert mit dem Therapieansprechen (Tab. 24). Beim SNP rs1516338 zeigten Patienten mit dem TT Genotyp eher Remission nach 5 Wochen als Träger mit dem CC Genotyp (linearer Trend Test, p = 0,05, Abb. 9). Beim SNP rs2133402 gingen die Patienten mit dem TT Genotyp eher in Remission nach 8 Wochen als Träger des GT Genotyps (linearer

Trend Test, p = 0,048, Abb. 10). Für die anderen SNPs konnten keine Korrelationen mit den Therapie-ergebnissen nach 5 bzw. 8 Wochen festgestellt werden. Für den SNP rs1516338 war der Genotyp bei einem Patienten nicht bestimmbar.

Tabelle 24: Korrelationen zwischen *CHL1* Polymorphismen und Response/Remission**:** linearer Trend Test [p-Wert]. Für den SNP rs2133402 fand sich ein Zusammenhang mit der Remission nach 8 Wochen: Patienten mit dem TT Genotyp gingen eher in Remission als solche mit dem GT Genotyp (p=0,048). Patienten mit dem TT Genotyp bezüglich des SNP rs1516338 gingen eher in Remission nach 5 Wochen (p = 0,05) als Träger mit dem CC Genotyp.
Response: Abfall des HDRS-Wertes um die Hälfte des Ausgangswertes; Remission: HDRS-Wert <8

Polymorphismus	**Response 5 Wochen (n=26)**		**Response 8 Wochen (n=29)**		**Remission 5 Wochen (n=14)**		**Remission 8 Wochen (n=18)**	
rs1516340	CC n=8 CT n=10 TT n=8	n.s.	CC n=11 CT n=10 TT n=8	n.s.	CC n=5 CT n=5 TT n=4	n.s.	CC n=7 CT n=6 TT n=5	n.s.
rs1516338	TT n=16 CT n=7 CC n=3	n.s.	TT n=16 CT n=10 CC n=2	n.s.	TT n=9 CT n=4 CC n=1	**0.05***	TT n=12 CT n=5 CC n=1	n.s.
rs2272522	TT n=7 CT n=10 CC n=9	n.s.	TT n=8 CT n=10 CC n=11	n.s.	TT n=3 CT n=6 CC n=5	n.s.	TT n=5 CT n=8 CC n=5	n.s.
rs4003413	AA n=9 AC n=11 CC n=6	n.s.	AA n=10 AC n=14 CC n=5	n.s.	AA n=5 AC n=5 CC n=4	n.s.	AA n=8 AC n=6 CC n=4	n.s.
rs9841789	CC n=8 CT n=15 TT n=3	n.s.	CC n=8 CT n=17 TT n=4	n.s.	CC n=4 CT n=8 TT n=2	n.s.	CC n=5 CT n=11 TT n=2	n.s.
rs2133402	TT n=23 GT n=3 GG n=0	n.s.	TT n=24 GT n=5 GG n=0	n.s.	TT n=14 GT n=0 GG n=0	n.s.	TT n=17 GT n=1 GG n=0	**0,048***

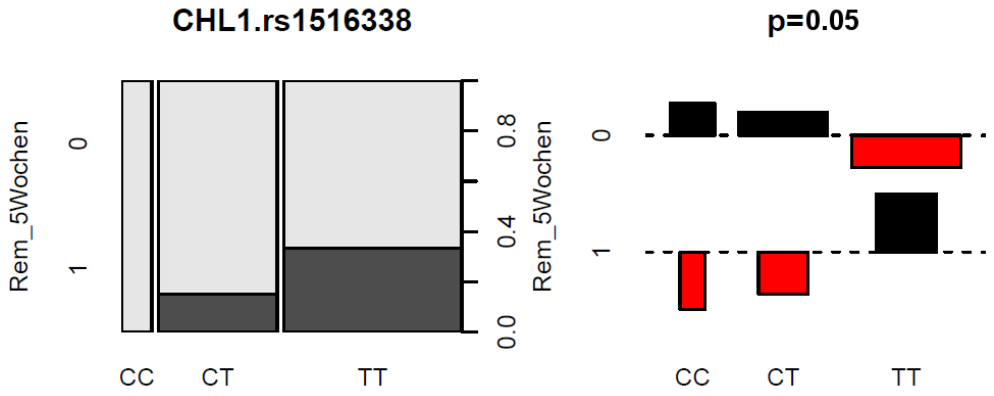


Abbildung 9: Der *CHL1* SNP rs1516338 war assoziiert mit dem Therapieansprechen der MARS-Patienten: linearer Trend Test (p=0,05). Träger des TT Genotyps (n=9) gingen eher in Remission nach 5 Wochen als solche mit dem CC Genotyp (n=1), (0=keine Remission; 1=Remission).

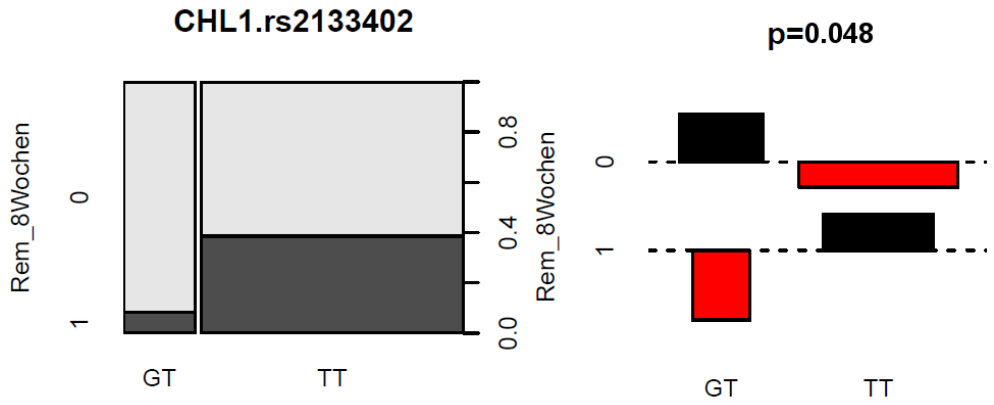


Abbildung 10: Der *CHL1* SNP rs2133402 war assoziiert mit der Remission der MARS-Patienten: linearer Trend Test (p=0,048). Träger des TT Genotyps (n=17) gingen eher in Remission nach 8 Wochen als solche mit dem GT Genotyp (n=1), (0=keine Remission; 1=Remission).

3.14.2 Polymorphismen in *ITGB3* und Therapieansprechen der MARS-Patienten

Es wurde kein Zusammenhang von den fünf untersuchten Polymorphismen im *ITGB3* und dem Therapieansprechen der MARS-Patienten (n=58) gefunden (Tab. 25). Von einem Patienten konnten alle fünf *ITGB3* SPNs nicht bestimmt werden.

Tabelle 25: Korrelationen zwischen *ITGB3* Polymorphismen und Response/Remission: linearer Trend Test [p-Wert].
Response: Abfall des HDRS-Wertes um die Hälfte des Ausgangswertes; Remission: HDRS-Wert <8, HWE: Hardy-Weinberg- Equilibrium

Polymor-phismus	Response 5 Wochen (n=27)		Response 8 Wochen (n=30)		Remission 5 Wochen (n=13)		Remission 8 Wochen (n=17)	
rs15908	AA n=2 AC n=1 CC n=24	HWE <0,01	AA n=2 AC n=3 CC n=24	HWE <0,01	AA n=0 AC n=0 CC n=13	HWE <0,01	AA n=1 AC n=0 CC n=16	HWE <0,01
rs2056131	AA n=4 GA n=16 GG n=7	n.s.	AA n=3 GA n=17 GG n=9	n.s.	AA n=2 GA n=8 GG n=3	n.s.	AA n=2 GA n=10 GG n=5	n.s.
rs3809865	AA n=5 TA n=12 TT n=10	n.s.	AA n=3 TA n=11 TT n=15	n.s.	AA n=1 TA n=7 TT n=5	n.s.	AA n=2 TA n=8 TT n=7	n.s.
rs3851807	CC n=15 GC n=6 GG n=6	HWE <0,01	CC n=14 GC n=7 GG n=8	HWE <0,01	CC n=8 GC n=2 GG n=3	HWE <0,01	CC n=10 GC n=2 GG n=5	HWE <0,01
rs8074094	CC n=2 CT n=9 TT n=16	n.s.	CC n=2 CT n=9 TT n=18	n.s.	CC n=1 CT n=3 TT n=9	n.s.	CC n=1 CT n=4 TT n=12	n.s.

3.14.3 Polymorphismen im *SLC6A4* und Therapieansprechen der MARS-Patienten

Es wurden Polymorphismen im Serotonintransporter auf Assoziationen mit dem Therapieansprechen (Response und Remission nach 5 bzw. 8 Wochen) der MARS-Patienten getestet. Es fand sich kein Zusammenhang zwischen dem Längenpolymorphismus (Genotypen L/L, L/s und s/s) und dem SNP rs25531 innerhalb dieser Region (Genotypen LA/LA, LA/LG, LA/s, LG/s und s/s) und einem Ansprechen auf eine Behandlung mit Antidepressiva. Auch für den Serotonintransportergenotyp STin2 VNTR (Genotypen 12/12, 12/10 und 10/10) ergaben sich keine Assoziationen mit dem Therapieansprechen.

4 Diskussion

Trotz der Vielfalt an Antidepressiva mit verschiedenen Wirkmechanismen ist die Behandlung von Depressionen mit hoher Rate an Nicht-Respondern belastet. Biomarker ermöglichen eine zuverlässige und genaue Krankheitsdiagnose, ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen, eine Vorhersage über den Krankheitsverlauf oder eine Überwachung der Therapie. Darüber hinaus bieten sie Möglichkeiten zur Identifizierung von (neuen) therapeutischen Ansätzen und Medikamenten. Biomarker bieten damit die Vorteile einer frühen Diagnose, die nicht nur für psychiatrische Erkrankungen kritisch ist und idealerweise einer personalisierten Therapie [47] [104]. Die Suche nach Biomarkern zum Ansprechen auf eine antidepressive Behandlung stellt sich jedoch aufgrund der Komplexität und Individualität von Depressionen als große Herausforderung dar. Genetische Untersuchungen zum Ansprechen auf eine Behandlung mit Antidepressiva mittels DNA von Patienten haben wenig auf alle Patienten anwendbare eindeutige Ergebnisse gebracht [50] [51] [86] [208]. Es stellt sich die Frage, ob die untersuchten Gene überhaupt an der antidepressiven Wirkung beteiligt sind, oder ob Studienergebnisse vom Studiendesign bzw. von der Art der Auswertung der Daten abhängen. In den seltensten Fällen besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Genotyp und Arzneimittelwirkung, nämlich wenn die Arzneimittelwirkung an nur eine einzige genetische Variante gebunden ist. Es gibt jedoch einige vielversprechende Ansätze, die zumindest bei einem Teil der Patienten Hoffnung auf schnellere und erfolgreiche Behandlung hoffen lassen. Beispielsweise kann der behandelnde Arzt auf der Basis von CYP Genotypen ungeeignete Antidepressiva ausschließen bzw. Dosisanpassungen vornehmen. Weiterhin gibt die Bestimmung von Genvarianten im *ABCB1* Aufschluss über Nicht-Ansprechen auf einige Antidepressiva [13] [210]. Es besteht ebenfalls die Hypothese, dass bei Depressionen Entzündungen beteiligt sind. So detektiert ein neuartiger Bluttest den Makrophagen Migrations-Inhibitions Faktor (MIF) und Interleukin (IL-ß). mRNA-Level dieser Entzündungsparameter deuten auf eine Resistenz gegen bestimmte Antidepressiva hin [24].

Neben den herkömmlichen Kandidatengenansätzen, die sich auf gut erforschte Kandidatengene und -wege konzentrieren, werden in zunehmendem Maße genomweite Assoziationsstudien (GWAs) anhand von Zelllinien durchgeführt mit dem Ziel, das gesamte menschliche Genom gleichzeitig auf Assoziationen mit Arzneimittelreaktionen und Toxizität zu testen [227]. So werden in der Pharmakogenetik LCLs als *ex vivo* Modell aufgrund ihrer breiten Verfügbarkeit von verschiedenen Individuen und ihrer Eigenschaft, die individuellen Spendereigenschaften darzustellen, eingesetzt, um somit die Untersuchung verschiedener Phänotypen wie Apoptose,

Zellwachstumshemmung oder Genexpressionen zu ermöglichen [192]. Diese Herangehensweise wird stark im onkologischen Bereich, aber zunehmend beispielsweise auch in der Kardiologie, Schmerztherapie, Demenzforschung und bei psychischen Erkrankungen angewendet [4] [14] [15] [34] [55] [117] [125] [138] [154] [158] [216] [218]. Auf diesem Wege wird nach Biomarkern gesucht, die prognostisch eine Aussage über Krankheitsverläufe vorhersagen, als Risikomarker für bestimmte Erkrankungen dienen, diagnostischer Natur sind, oder auch prädiktiv die Wirksamkeit oder Toxizität einer Therapie vorhersagen können.

Das individuelle Ansprechen bzw. Nichtansprechen depressiver Menschen auf eine medikamentöse Therapie stellt ein bisher nicht zufriedenstellendes Problem dar. In dieser Arbeit wurde methodisch untersucht, ob Genexpressionen oder pharmakologische Assays wie Zellwachstumhemmungs-Assays in LCLs Möglichkeiten zur Biomarkerfindung bezüglich Response auf Antidepressiva bieten. Dafür wurden, in Kooperation mit dem Max Planck Institut in München, LCLs von depressiven, stationär aufgenommenen Patienten der MARS-Studie verwendet [2] [63].

Im Rahmen des PADRE-Projekts wurden bei Vorarbeiten an LCLs gesunder Spender genomweite Analysen des Transkriptoms durchgeführt und mit den *in vitro* Empfindlichkeiten gegenüber der Wachstumshemmung durch das Antidepressivum Paroxetin verglichen [144]. Verschiedene Gene, die unter anderem mit Synapto- und Neurogenese in Verbindung gebracht werden, wiesen starke Genexpressionsunterschiede beim Vergleich von Paroxetin-sensitiven mit Paroxetin-nichtsensitiven LCLs auf. *CHL1* zeigte die höchsten Unterschiede, Paroxetin-empfindliche Zelllinien hatten eine 6,3-fach geringere Genexpression [144]. Eine ähnliche Herangehensweise fand in einer weiteren Vorarbeit statt [155]. Dabei wurden genomweite Genexpresssionsanalysen an LCLs gesunder Spender ohne Paroxetin-Exposition und nach 21-tägiger Paroxetin-Inkubation durchgeführt. Hier zeigte Integrin beta-3 (*ITGB3*) die höchsten Genexpressionsunterschiede. LCLs, die Paroxetin ausgesetzt waren, wiesen 1,92-fach höhere *ITGB3*-Genexpressionen auf.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Ergebnisse aus den Vorarbeiten, die anhand von LCLs von gesunden Spendern gewonnen wurden, an LCLs von Patienten der MARS-Studie repliziert werden. Dabei standen die beiden „Top"-Gene, *CHL1* und *ITGB3* aus den genannten Vorarbeiten, sowie der Serotonintransporter im Fokus. Beiden Genen wird eine Rolle beim Wirkmechanismus durch SSRIs, und somit ein Zusammenhang bei der Behandlung von Depressionen, zugeschrieben. Die Zielsetzung bestand darin, beide Gene auf mögliche Assoziationen mit dem Therapieausgang der Patienten zu untersuchen und somit deren Bedeutung bezüglich potentieller Antidepressiva Response Biomarker zu prüfen. Dem

Serotonintransporter wird seit langem eine Beteiligung bezüglich der Prävalenz, an Depressionen zu erkranken, zugeschrieben [21] [37] [226] . Auch CHL1 und ITGB3 standen bereits im Zusammenhang mit Depressionen. So fielen genetische Varianten von *CHL1* bezüglich Nebenwirkungen bei der Therapie mit Antidepressiva in der STAR*D Studie auf [32]. ITGB3 wurde in der Vergangenheit bereits in Verbindung mit dem Ansprechen auf Antidepressiva gebracht. In einer diesbezüglichen Untersuchung wiesen Responder im Vergleich zu Nicht-Respondern höhere ITGB3 Proteingehalte auf [132]. Im Rahmen dieser Arbeit war ebenfalls interessant, ob sich weitere Beziehungen zwischen den beiden Kandidatengenen *CHL1* und *ITGB3* sowie dem Serotonintransporter finden lassen. Bisherige Studien wiesen bereits auf Verbindungen von ITGB3, CHL1 und dem Serotonintransporter hin. So lieferten oben erwähnte erhöhte Genexpressionen von *ITGB3* in LCLs nach Paroxetin Exposition einen möglichen Hinweis auf einen Zusammenhang von *ITGB3* und diesem Transporter. Ebenso fand man auch schon direkte Interaktionen zwischen ITGB3 und dem Serotonintransporter [20] [123] [221]. ITGB3 interagiert direkt mit dem C-Terminus des Serotonintransporters und ist somit an dessen Aktivität beteiligt [20]. ITGB3 und CHL1 sind Zelladhäsionsmoleküle und spielen eine Rolle bei Synaptogenese sowie synaptischer Plastizität. Beide sind für die korrekte neuroanatomische Entwicklung des Gehirns notwendig. Eine Studie fand eine Kolokalisation und Assoziation zwischen CHL1 und verschiedenen Integrinen, darunter auch αVβIII (ITGB3) auf der Zelloberfläche von Neuronen des Kleinhirns [94]. Eine direkte Beteiligung von CHL1 an der Integrin-vermitttelten Zellmigration wurde ebenfalls nachgewiesen [17].

In dieser Arbeit wurden zum einen basale Genexpressionen sowie genetische Varianten der drei Gene in den Patienten-LCLs bestimmt. Zum anderen wurden die LCLs dieser Patienten genutzt, um Änderungen im Zellwachstum (*in vitro* Sensitivität) als Antwort auf die Exposition mit Antidepressiva verschiedener Wirkstoffklassen zu untersuchen. Bei früheren Untersuchungen an LCLs von gesunden Spendern stellt man fest, dass diese Zelllinien individuelle Empfindlichkeiten bezüglich der Wachstumshemmung durch ein gegebenes Arzneimittel zeigen. Dabei reagierte jede Zelllinie mit ähnlicher *in vitro* Sensitivität auf Wirkstoffe der gleichen Arzneimittelklasse, welche vergleichbare Signalwege aufweisen [130] [143]. Deshalb wurden *in vitro* Sensitivitäten von LCLs mit Antidepressiva von verschiedenen Arzneistoffklassen untersucht: Paroxetin als SSRI, welches durch Bindung an den Serotonin-transporter die Serotoninwiederaufnahme hemmt und damit die Konzentration dieses Neurotransmitters im synaptischen Spalt erhöht; Imipramin als Trizyklisches Antidepressivum, welches ebenfalls an den Serotonintransporter bindet und somit teilweise im Signalweg dem

von Paroxetin ähnelt und Mirtazapin, ein noradrenerges und spezifisch serotonerg wirkendes Antidepressivum (NASSA) [139]. Mirtazapin wirkt antagonistisch an präsynaptischen adrenergen α_2-Autorezeptoren sowie 5-HT_2- und 5-HT_3- Rezeptoren. Es verstärkt somit die noradrenerge und serotonerge Signalübertragung im Gehirn, steigert indirekt die Freisetzung von Dopamin und Noradrenalin, beeinflusst den Serotoninspiegel jedoch nur unwesentlich [53]. Die ermittelten Daten zu Genexpressionen, *in vitro* Sensitivitäten und genetischen Polymorphismen wurden mit den klinischen Daten der Patienten korreliert, um mögliche Zusammenhänge aufzudecken und um CHL1 sowie ITGB3 im Hinblick auf potentielle klinisch verwendbare Response Biomarker zu prüfen. Da LCLs als *ex vivo* bzw. *in vitro* Modell individuell auf die Exposition mit Arzneistoffen mit unterschiedlichen *in vitro* Sensitivitäten reagieren, sollte auch untersucht werden, ob diese Eigenschaft zur Antidepressiva Response Biomarkerfindung dienen kann.

4.1 LCLs als Modell zur Response Biomarkerfindung

Arzneimittelreaktionen an Menschen zu testen, ist grundsätzlich problematisch. Alternativ hierzu bieten zellbasierte Modelle eine gute Möglichkeit zur Identifizierung und Charakterisierung von genetischen Markern, die mit Ansprechen bzw. den Nebenwirkungen auf ein bestimmtes Medikament assoziiert sind. Lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) werden häufig in Studien verwendet, um genetische Variationen und deren Rolle in Krankheiten und Pharmakologie von Arzneistoffen zu untersuchen. Änderungen in der Genexpression oder Zellwachstum als Antwort auf Arzneistoffexposition sind ebenfalls messbar. Viele Studien kreieren dafür ihre eigenen Zelllinien. Für diese Arbeit wurden LCLs von an Depression erkrankten, stationär aufgenommenen Patienten des MARS-Projektes [63] verwendet.
LCLs sind etablierte humane Zelllinien, die aus B-Lymphozyten durch Immortalisierung mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) gewonnen werden. Das EBV Genom wird bei der Transformation der B-Lymphozyten durch das Eppstein-Barr-Virus zwar teilweise in die Zell-DNA inkorporiert, Studien zeigen jedoch eine weitgehende Übereinstimmung der DNA, gewonnen aus LCLs und herkömmlichen Quellen wie Blut [83] [113] [183]. Die nukleäre DNA der LCLs repräsentiert somit weitgehend die ererbte Genmasse des Spenders [122] [183]. Auch die individuellen epigenetischen Eigenschaften (Methylierungsprofil) der Spender bleiben überwiegend erhalten. Beim Vergleich von Peripheren Blutzellen (PBMCs) mit LCLs fanden sich größtenteils ähnliche DNA-Methylierungsprofile [201]. Die gefundenen Unterschiede in Methylierungsmustern könnten teilweise aber auch zellbedingt sein, denn es wurden PBMCs

mit LCLs verglichen. LCLs werden jedoch aus B-Lymphozyten gewonnen und B-Zellen umfassen nur einen kleinen Teil der Gesamtmenge an den peripheren Blutzellen [19]. LCLs zeigen ähnliches phänotypisches Verhalten gegen Arzneistoffe gleicher Klassen [130] [143]. Diese arzneistoffklassenspezifische Wachstumshemmung blieb auch nach mehreren Jahren in Kultur gehaltenen LCLs erhalten [130]. Erste Studien in den 80iger und 90iger Jahren, bei denen LCLs von Patienten, die an einer bestimmten Krankheit litten, mit denen von Gesunden verglichen wurden, zeigten Erfolge insofern, als dass Assoziationen zwischen genetischen Variabilitäten und Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Arzneistoffen aufgedeckt werden konnten [216]. Um eines Tages möglicherweise Antidepressiva Response Biomarker anhand von peripheren Blutzellen von Patienten zu identifizieren, dienten LCLs in Vorarbeiten sowie in dieser Arbeit als Ersatzmodell für B-Lymphozyten. Voraussetzung sind vergleichbare Signalwege bzw. Genexpressionen in diesen Zellen. So exprimieren Zellen des zentralen Nervensystems ebenso wie menschliche periphere Blutzellen (Lymphozyten) [5] und LCLs [75] [76] einen funktionellen Serotonintransporter. Integrine sind in nahezu allen Geweben exprimiert und interagieren als Zelladhäsionsproteine mit anderen Zelladhäsionsmolekülen wie CHL1 [17]. Im Zusammenhang mit Signalwegen bzw. Wirkmechanismen von Antidepressiva sind *ITGB3* und *CHL1* einerseits in den Vorarbeiten durch pharmakologische Untersuchungen an LCLs aufgefallen [144] [155]. Andererseits fielen *CHL1* schon bezüglich Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Antidepressiva in der STAR*D Studie [32] und ITGB3 im Zusammenhang mit Antidepressiva Response [132] auf. Genomweite Transkriptomanalysen zeigten, dass CHL1 und ITGB3 auch in LCLs exprimiert werden [144] [155].

4.2 *In vitro* Sensitivitäten der LCLs der Patienten der MARS-Studie

In dieser Arbeit wurden anhand von LCLs, gewonnen aus dem Blut depressiver Patienten der MARS-Studie, systematisch die *in vitro* Sensitivitäten durch Antidepressiva untersucht. Dafür wurden die LCLs mit unterschiedlichen Konzentrationen von Imipramin, Paroxetin und Mirtazapin inkubiert und anhand von Konzentrations-Wirkungskurven die individuellen IC_{50}-Werte bestimmt. Die Zelllinien wurden maximal 3 Monate in Kultur gehalten. In dieser Zeit änderten sich die individuellen *in vitro* Sensitivitäten nicht, wie auch andere Untersuchungen zeigten [130] [144]. Die individuellen IC_{50}-Werte blieben auch nach Auftauen eines neuen Aliquots derselben Zelllinie erhalten. Der Phänotyp in Bezug auf arzneistoffbedingte *in vitro* Sensitivität scheint also von Natur aus in jeder Zelllinie stabil zu sein und damit einzigartig für jedes Individuum. Es konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Sensitivitäten einer Zelllinie

(intraindividuelle Varianz) kleiner waren als die *in vitro* Sensitivitäten zwischen den Zelllinien (interindividuelle Varianz). Dies stellt sich als ein wichtiger Aspekt dar, um die individuelle Reaktion einer Zelllinie auf eine Substanz zu untersuchen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die individuellen *in vitro* Sensitivitäten als Reaktion auf die Exposition mit einem Arzneistoff möglicherweise durch die EBV Transformation beeinflusst werden. In diesem Zusammenhang wurden der Einfluss von zellulären Wachstumsraten, Baseline ATP Spiegel und die Anzahl der EBV-Genomkopien (EBV Copy number) in Bezug auf Zelltoxizität in verschiedenen Studien untersucht. Hier zeigte sich, dass Anzahl der EBV-Genomkopien und ATP Spiegel die zelluläre Wachstumsrate und medikamenteninduzierte *in vitro* Sensitivität nicht beeinflussten [191]. Eine dieser Studien führte zu dem Ergebnis, dass experimentell- und umweltbedingte Unterschiede zu individuellen Wachstumsraten führten [30]. In dieser Arbeit wurden die individuellen Wachstumsraten der LCLs nicht bestimmt. Die Wachstums-hemmungs-Assays wurden an drei verschiedenen Tagen, aber immer an gleichen Tagen nach Passagen durchgeführt. Da alle Zelllinien gleich behandelt wurden, können somit experimentell bedingte Unterschiede größtenteils ausgeschlossen werden. Das Resultat einer anderen Studie fand die individuellen Wachstumsraten größtenteils als genetisch bedingt [193]. Diese unterschiedlichen Wachstumsraten hatten einen Einfluss auf die Zytotoxizität, wobei sich schneller teilende Zellen empfindlicher auf manche Arzneistoffe zeigten, genau wie schneller wachsende Tumorzellen besser auf Chemotherapeutika ansprechen [191]. Eine langfristige Inkubation von LCLs von Patienten des MARS-Projekts mit dem Antidepressivum Fluoxetin zeigte zwar eine große Variabilität der relativen Proliferationsraten im Vergleich zu unbehandelten LCLs derselben Spender, jedoch keinen Zusammenhang mit dem Therapieansprechen [14]. Um auszuschließen, dass individuelle Wachstumsraten, insbesondere bei kurzzeitigen Inkubationen und Konzentrationen, die nicht den üblichen physiologischen Plasmakonzentrationen entsprechen, Einfluss nehmen, sollten bei weiteren Untersuchungen der *in vitro* Sensitivität von LCLs gegen Arzneistoffe unbedingt die individuellen Wachstumsraten bestimmt und mit einbezogen werden. In LCLs des HapMap Projektes wurde festgestellt, dass die zellulären Wachstumsraten von LCLs unterschiedlicher Populationen variieren [193]. Da die ethische Herkunft eine nicht unbedeutende Rolle spielt, sollte deshalb auf den ethnischen Hintergrund des Spenders geachtet werden [191]. In die MARS-Studie wurden nur Patienten kaukasischer Abstammung eingeschlossen. Wie oben erwähnt, zeigten Untersuchungen an LCLs von gesunden Spendern eine arzneistoffklassenspezifische Wachstumshemmung [143]. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Antidepressiva aus drei verschiedenen Wirkstoffklassen gewählt: Paroxetin als SSRI, Imipramin als Trizyklisches Antidepressivum

(TCA) und Mirtazapin als noradrenerges und spezifisch serotonerg wirkendes Antidepressivum (NASSA). Paroxetin und Imipramin ähneln sich z.T. in ihren Wirkmechanismus. Mirtazapin dagegen beeinflusst die Dopamin- und Noradrenalinspiegel. Aus diesem Grund sollten sich Korrelationen in den *in vitro* Sensitivitäten für Paroxetin und Imipramin finden, nicht jedoch für Mirtazapin und Paroxetin bzw. Mirtazapin und Imipramin.

Eine arzneistoffklassenspezifische Hemmung des Wachstums wurde für die LCLs der Patienten tatsächlich bewiesen. Die IC_{50}-Werte zeigten eine starke Korrelation ($R^2 = 0{,}62$, $p = 2{,}5 \times 10^{-7}$) für Imipramin und Paroxetin, jedoch nicht für Mirtazapin und Paroxetin ($R^2 = 0{,}15$, p = n.s.) bzw. Mirtazapin und Imipramin ($R^2 = 0{,}25$, p = n.s.). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den IC_{50}-Werten und dem Alter oder Geschlecht der Patienten festgestellt. Somit scheint die *in vitro* Sensitivität von LCLs gegenüber Arzneistoffen eine individuelle Eigenschaft zu sein und kann als Modell zum Untersuchen von Arzneimitteleffekten in Individuen dienen.

4.3 Genetische Varianten von *SLC6A4* und *in vitro* Sensitivitäten

Polymorphismen im Serotonintransportergen (*SLC6A4*) wurden in zahlreichen Studien in Zusammenhang mit psychischen Störungen gebracht [21] [89] [206] [226]. Eine Deletion (s-Allel) in der Promoterregion (5-HTTLPR Polymorphismus) führt zu einer geringeren Expression dieses Transporters [62] [74] [111]. Es besteht die Vermutung, dass sich die Prävalenz für psychische Störungen dadurch erhöht [37]. In dieser Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen Genvarianten und den IC_{50}-Werten der Patienten-LCLs untersucht. Es fand sich eine Assoziation der *in vitro* Sensitivitäten mit Paroxetin und Trägern des s- (n=12) bzw. L-Genotyps (n=45, p=0,045). Die LCLs von Patienten mit einer Deletion zeigten sich empfindlicher auf die Exposition mit dem SSRI Paroxetin als solche mit der Normvariante (L-Allel). Paroxetin bindet an den Serotonintransporter. Wird dieser weniger in den LCLs exprimiert, reagieren diese anscheinend auch sensitiver auf dieses Antidepressivum. Mirtazapin als noradrenerges und spezifisch serotonerges Antidepressivum beeinflusst den Serotonintransporter nicht, es wurden auch keine Assoziationen der IC_{50}-Werte mit *SLC6A4* Genotypen gefunden. Obwohl die IC_{50}-Werte von Paroxetin und Imipramin stark korrelierten, fand sich kein Zusammenhang der *in vitro* Sensitivitäten von Imipramin und dem 5-HTTLRP Polymorphismus in den Patienten-LCLs. Ein möglicher Grund läge an dem Wirkmechanismus dieses Arzneistoffs. Imipramin bindet zwar auch an den Serotonintransporter, ist jedoch weniger selektiv.

4.4 Genexpressionen von *CHL1*, *ITGB3* und Serotonintransporter

LCLs dienen u. a. als *in vitro* Modell zur Untersuchung von Mechanismen der Genregulation durch interindividuelle Genexpressionsunterschiede. Viele eQTLs (expression quantitative trait loci; regulieren die Expressionslevel von RNA), die in LCLs vorhanden sind, befinden sich ebenfalls in Grundgewebe und anderen Geweben wie Nieren, Lunge, Leber und Herz [18]. Die Genexpression in LCLs spiegelt eine Vielzahl von Stoffwechselwegen wieder. Sie repräsentiert somit die individuellen Eigenschaften des Spenders, von der die Zellen stammen. LCLs wurden ebenfalls dazu verwendet, um anhand von Unterschieden in den Genexpressionen „Krankheitsgene“ zu identifizieren [6] [91] [183]. Durch die EBV-Transformation der B-Lymphozyten blieben die individuellen Unterschiede in den Genexpressionslevel der LCLs weitgehend erhalten [19] [227]. Untersuchungen fanden nur für wenige Gene Unterschiede in den Genexpressionen, die mit der Anzahl der EBV-Genkopien assoziiert waren [19]. Da die LCLs die Genexpressionen der unterschiedlichen Spender repräsentieren, wurden in den Patienten-LCLs die basalen Genexpressionen von *CHL1* und *ITGB3* und des Serotonin-transporters (*SLC6A4*) mittels Real-time PCR bestimmt, um einen Zusammenhang aufzudecken. Ergebnis war eine signifikante Korrelation der Genexpressionswerte zwischen *CHL1* und *ITGB3* ($R^2 = 0{,}654$, $p = 2{,}5 \times 10^{-08}$). Diese Korrelation der Genexpressionen weist auf einen Zusammenhang von *CHL1* mit *ITGB3* hin und spricht für eine regulatorische Interaktion zwischen beiden Genen. Zusammenhänge zwischen den Proteinen CHL1 und ITGB3 wurden bereits in anderen Studien aufgezeigt [17] [94]. Untersuchungen über einen Zusammenhang der Genexpressionen zwischen beiden Genen fanden jedoch in dieser Arbeit erstmalig statt. Weiterhin wurden die Genexpressionen des Serotonintransporters, der an der Wirkung der Antidepressiva Paroxetin und Imipramin beteiligt ist, mit den Genexpressionen von *CHL1* und *ITGB3* korreliert. Obwohl Vorarbeiten an LCLs nach Inkubation mit dem SSRI Paroxetin auf einen möglichen Zusammenhang von ITGB3 mit dem Serotonintransporter schließen lassen [155] und mehreren Studien zufolge ITGB3 und der Serotonintransporter miteinander interagieren [20] [215], fanden sich keine Assoziationen zwischen den Genexpressionen von *SLC6A4* und *ITGB3*. Trotz Interaktionen der beiden Proteine scheinen die Genexpressionen in keinem Zusammenhang zu stehen.

4.5 Genexpressionen und *in vitro* Sensitivitäten

Ein Zusammenhang der *in vitro* Sensitivität der Patienten-LCLs gegen Imipramin, Paroxetin und Mirtazapin mit den basalen Genexpressionen der Kandidatengene *CHL1*, *ITGB3* und *SLC6A4* stellten sich in dieser Arbeit nicht dar. Vorarbeiten an LCLs gesunder Spender fanden einen Zusammenhang der *in vitro* Sensitivitäten gegen Paroxetin und den Genexpressionen von *CHL1*. Paroxetin-sensitive LCLs zeigten eine 6,3-fache niedrigere *CHL1* Genexpressionen im Vergleich zu weniger empfindlichen LCLs [144]. In der vorliegenden Arbeit konnte dies mit LCLs von Patienten für Paroxetin nicht repliziert werden. Es fand sich kein Zusammenhang der *in vitro* Sensitivitäten mit den basalen Genexpressionen von *CHL1*. Dies könnte zum einen mit der Art der statistischen Auswertung begründet werden. In der Studie mit LCLs von gesunden Spendern wurden genomweite Genexpressionsanalysen von „Ausreißern“, d. h. LCLs mit extremen Phänotypen, also mit hoher bzw. geringer Sensitivität gegen Paroxetin, durchgeführt [144]. Dafür wurden aus 80 untersuchten Zelllinien jeweils 7 „Eckzelllinien“ ausgewählt. In der vorliegenden Arbeit wurden keine „Eckzelllinien“, sondern alle LCLs auf eine Assoziation zwischen der IC_{50} und Genexpressionen getestet. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Effektstärke durch diese Art der Herangehensweise an solche Analysen im Gegensatz zum Auswählen von extremen Phänotypen erheblich geringer ist [54]. Weiterhin wurden die IC_{50} in der vorliegenden Arbeit anhand Dosis-Wirkungskurven ermittelt, in der bereits erwähnten anderen Studie dienten die Wachstumshemmungen bei einer Paroxetin-Konzentration von 10 µM als Grundlage für die Auswahl der „Extrematazelllinien“. Zum anderen könnte die Herkunft der LCLs eine Rolle spielen. Möglicherweise reagieren LCLs von Patienten mit Depressionen anders auf die Exposition mit Antidepressiva als die von gesunden Spendern. In einer weiteren Vorarbeit zeigten LCLs gesunder Spender nach 21-tägiger Paroxetin Exposition im Vergleich zum unbehandelten LCLs veränderte Genexpressionen von *ITGB3* [155]. Deshalb wird für ITGB3 ein Zusammenhang mit der Wirkweise des SSRI Paroxetin - Bindung an den Serotonintransporter - vermutet. In der vorliegenden Arbeit wurden an Patienten-LCLs keine Korrelationen der Wachstumshemmung, weder durch Paroxetin noch für Imipramin und Mirtazapin mit den Genexpressionen von ITGB3 gefunden. So scheinen zumindest die Wachstumshemmungen von Patienten-LCLs durch die drei verwendeten Wirkstoffe nicht in Beziehung zu den basalen Genexpressionen der drei in dieser Arbeit untersuchten Gene *CHL1*, *ITGB3* und *SLC6A4* zu stehen. Andererseits konnten durch Bestimmungen der *in vitro* Sensitivitäten an LCLs gesunder Spender, einer Auswahl von LCLs mit bestimmten Phänotypen und deren genomweiten Genexpressionsprofilen, Gene wie *CHL1* und *ITGB3*

aufgedeckt werden. Diese Gene stehen im Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus von Antidepressiva und wären somit als potentielle Response Biomarker in der Therapie mit Antidepressiva einsetzbar. Die Herangehensweise wie in den Vorarbeiten, nämlich genomweite Transkriptomsanalysen nach Auswahl von phänotypisch extremen Zelllinien nach Exposition mit verschiedenen Antidepressiva, scheint vielversprechend zu sein. In weiteren Untersuchungen könnten solche Methoden an LCLs von Patienten zu neuen Kandidatengenen führen.

4.6 *CHL1* und *ITGB3* als mögliche Response Biomarker für den Therapieausgang

Hinweise auf eine Beteiligung an psychiatrischen Erkrankungen wurden sowohl für ITGB3 als auch für Mitglieder der L1-Familie, wie CHL1 gefunden. Polymorphismen im *CHL1* waren mit einem höherem Risiko an Schizophrenie zu erkranken, assoziiert [27] [173]. Genetische Varianten im *ITGB3* waren assoziiert mit der Ätiologie des Autismus und hatten Einfluss auf Serotoninspiegel in Thrombozyten [35]. Auch in Verbindung mit Depressionen bzw. dem Ansprechen auf eine Behandlung mit Antidepressiva waren beide Gene bereits auffällig. So wurden genetische Varianten im *CHL1* bezüglich höherer Tendenz zu Nebenwirkungen bei der Behandlung von Citalopram + Buspiron in der pharmakogenomischen STAR*D Studie beobachtet [32]. ITGB3 fiel bei einer Studie im Zusammenhang mit Antidepressiva-Response bei Patienten der MARS-Studie auf [132]. Dabei wurde das Proteom von mononukleären Zellen von Respondern versus Nicht-Respondern verglichen. Patienten, die auf ihre Therapie mit Antidepressiva ansprachen (Responder), wiesen höhere ITGB3 Proteingehalte auf als diejenigen, die nicht erfolgreich behandelt wurden.

Um die Rolle dieser vielversprechenden Gene als Response Biomarker zu prüfen, wurden die Genexpressionen von *CHL1* und *ITGB3* der LCLs der MARS-Patienten mit den Therapieergebnissen auf Assoziationen untersucht. Dabei fiel auf, dass Patienten, deren LCLs eine höhere Genexpression von *CHL1* und *ITGB3* aufwiesen, eher in Remission nach 5 Wochen gingen als solche mit niedrigerer *CHL1* und *ITGB3* Genexpression. CHL1 und ITGB3 wird eine Beteiligung an der synaptischen Plastizität, Zelldifferentierung, Zellwachstum, Zellmigration und Neuro- und Synaptogenese zugeschrieben [29] [38] [61] [81] [135] [175]. Erhöhte Genexpressionen solcher Moleküle scheinen demnach notwendig für das Ansprechen auf eine antidepressive Behandlung zu sein, steht doch Remission von einer Depression in

Verbindung mit Neuro- und Synaptogenese [22] [36] [57]. So hängt eine erfolgreiche Therapie wahrscheinlich mit hochregulierter *ITGB3* und *CHL1* Genexpression zusammen. Neben diesem Zusammenspiel der Genexpressionen von *CHL1* und *ITGB3* mit dem Therapieansprechen wurde beim Testen der untersuchten genetischen Varianten im *CHL1* Gen ein Polymorphismus gefunden, der sich ebenfalls mit dem Therapieansprechen nach 5 Wochen als assoziiert zeigte. Bei diesem SNP rs1516338 in der Nähe des Promoters, bei dem es zum Basenaustausch von T durch C kommt, fand sich eine signifikant höhere Remission bei Trägern des TT Genotyps im Vergleich zu Trägern von 2 C-Allelen (CC). Des Weiteren fand sich ein zweiter SNP rs2133402, der ebenfalls schwach signifikant mit dem Therapieausgang korrelierte. Hier zeigten Patienten mit dem TT Genotyp eher Remission nach 8 Wochen im Gegensatz zu denen mit einem GT Genotyp. Diese Ergebnisse sind jedoch kritisch zu betrachten. So war beim SNP rs1516338 nur ein Patient mit dem CC Genotyp vertreten, beim SNP rs2133402 fand sich kein GG Genotyp und nur ein Träger des GT Genotyps. Größere Patientenkohorten in weiteren Studien ließen hier bessere Rückschlüsse auf mögliche Zusammenhänge von genetischen Varianten und dem Therapieausgang zu. Für beide SNPs gibt es bisher keine Daten über deren funktionelle Bedeutung. Hier könnten weitere Untersuchungen deren Einfluss beispielsweise auf das Spleißen von RNA oder die Genregulation klären.

Ein weiterer Polymorphismus im *CHL1* (SNP rs4003413) korrelierte mit der *in vitro* Sensitivität der LCLs der MARS-Patienten gegen Paroxetin. Dieser SNP fand sich bereits in einer anderen Studie als assoziiert mit besserer Remissionsrate in 285 MDD Patienten (Major depressive disorder), die Träger des C Alleles sind [43]. Bei SNP rs4003413 kommt es zum Basenaustausch in der Intron-Region von C gegen A, dessen funktionelle Relevanz ist jedoch nach derzeitiger Datenlage nicht untersucht. Bei den MARS-Patienten zeigten Träger des AA Genotyps (n=21) eine signifikant höhere Empfindlichkeit (kleinere IC_{50}) bei Exposition mit Paroxetin als Träger des CC Genotyps (p= 0,014, S. 45, Abbildung 7). Für diesen SNP wären weitere Untersuchungen bezüglich dessen funktionelle Bedeutung interessant, bisher existieren darüber keine Informationen. Die gewonnenen Daten in der vorliegenden Arbeit unterstützen die Annahme einer Beteiligung von CHL1 und ITGB3 an psychischen Erkrankungen, wie depressive und bipolare Störungen sowie einen Zusammenhang zwischen CHL1 und ITGB3. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestärken jedoch insbesondere CHL1 und auch ITGB3 als potentielle Biomarker für das Ansprechen auf eine Behandlung mit Antidepressiva. Sie weisen ebenfalls darauf hin, dass eine Heilung von einer Depression mit Änderungen der Expression von Proteinen wie CHL1 und ITGB3, die in Verbindung mit Synapto- und Neurogenese gebracht werden, einhergehen.

4.7 Ausblick

Bisher wurde kein prognostischer Response Biomarker eindeutig in mehreren Studien gefunden und in Patientenstudien bewiesen. Sollte sich herausstellen, dass über Genexpressions-unterschiede, wie hier von *CHL1 und ITGB3*, eine Vorhersage getroffen werden könnte, welcher Patient von einer antidepressiven Therapie profitieren würde, wäre dies ein Schritt in Richtung prädiktiver Biomarker. Solche Genexpressionstests sind bereits für andere Krankheiten auf dem Markt (Oncotype DX®, EndoPredict®, MammaPrint) [1] [52] [150]. Zur Bestimmung prädiktiver Biomarker ist auch die leichte Gewinnbarkeit von Testmaterial erwünscht, wie Speichel oder Blut. Die Isolierung von B-Lymphozyten aus dem Blut von Patienten ist relativ einfach und würde gutes Probenmaterial bieten, sollten sich die bisherigen Daten über *CHL1* bzw. *ITGB3* in weiteren Studien bestätigen und auf Lymphozyten von Patienten übertragen lassen. Letztlich spielen aber auch ökonomische Aspekte eine Rolle, wie ein positives Kosten-Nutzen-Verhältnis oder Dauer der Testverfahren [209]. Antidepressiva erhöhen die Konzentrationen von Neurotransmittern (Serotonin und Catecholamine) im synaptischen Spalt. Der rasche Anstieg der extrazellulären Level zeigt aber keinen ebenso rasch einsetzenden klinischen Effekt. Die antidepressive Wirkung tritt in der Regel erst mit einer Verzögerung von mehreren Wochen bis Monaten nach Therapiebeginn ein. Diese Tatsache lässt vermuten, dass auch andere, langsamere neurochemische Prozesse und strukturelle Veränderungen im limbischen System die Wirkung antidepressiver Medikamente beeinflussen. Bei Depressiven findet man neuronale Atrophie in Hirnregionen wie dem Hippocampus und dem präfrontalen Kortex [41] [127] [182] [197]. Ursachen können vermehrter Untergang/ Reduktion von Dendriten, Zerstörung bestehender Zellen oder verminderte Neubildung sein. Durch eine langfristige Anwendung von Antidepressiva, Lithium, aber auch der Elektrokrampf-therapie wird die Neurogenese, Bildung neuer Synapsen und dendritischer Verzweigungen sowie das Überleben von Nervenzellen positiv beeinflusst. Eine Heilung von einer Depression durch Neurogeneration und Wiederherstellung der Plastizität scheint somit nicht substanzabhängig, sondern durch jedwede Art von antidepressiver Therapie möglich zu sein [126] [129]. Die zugrundeliegenden Mechanismen, die zur Synapto- und Neurogenese beitragen, könnten auf pharmakodynamischer Seite Aufschluss darüber geben, wieso es zu den individuellen Unterschieden im Ansprechen auf eine antidepressive Therapie kommt.

Bei der Einleitung einer antidepressiven Therapie kommt große Verantwortung auf den behandelnden Arzt zu. Bis zur Etablierung eines prognostischen Response Biomarker Tests kann er aufgrund Familienanamnese, anderen Erkrankungen, Medikamenteneinnahme sowie in

der Vergangenheit eingenommenen Antidepressiva geeignete bzw. ungeeignete Antidepressiva auszuprobieren. Bezüglich genetischer Profile gibt es bereits Ansätze: Auf Grundlage der Bestimmung von Genvarianten des P-Glykoprotein (*ABCB1*) lassen sich bestimmte Antidepressiva ausschließen [13] [210]. Anhand von CYP Genotypen können Dosierungen angepasst oder alternative Antidepressiva verschrieben werden [100] [167] [219]. Der Vorteil, die Auswahl und Dosierung eines Arzneimittels auf Grundlage von genetischen Merkmalen zu treffen, liegt darin, dass die Bestimmung therapierelevanter Genotypen nur einmal vorgenommen werden muss, da sich diese im Laufe des Lebens nicht ändern. Inzwischen bieten verschiedene Dienstleister arztvermittelt solche Gentests für verschiedene Medikamente (neben Antidepressiva u.a. für Statine und Clopidogrel) an, die über Apotheken bezogen werden können und dem Patienten eine optimierte und individualisierte Therapie (auf Grundlage des Stoffwechselstatus) versprechen [190]. Ebenso ist es bereits möglich, präventiv ohne eine direkte Indikation, bestimmte pharmakologische Zielstrukturen genotypisieren zu lassen [82]. Diese Daten wären dann im Falle einer Verordnung eines bestimmten Medikaments Grundlage für Dosierungen oder Ausschluss eines Arzneimittels [200]. Weiterhin existiert die Hypothese, eine Depression ist eine Entzündung [7] [48] [56] [88] [124]. Daraus entstehen Überlegungen, Entzündungsparameter als Biomarker heranzuziehen [24] Immunregulatoren einzusetzen [42] oder gar Impfungen zu entwickeln [168]. Ins Zentrum des Interesses gerutscht ist seit neuestem das Injektionsanästhetikum Ketamin. Innerhalb von Stunden besserten sich Symptome bei depressiven Patienten [199]. Hier ist der antidepressive Wirkmechanismus noch nicht geklärt, könnte aber zu interessanten neuen Ansätzen in der Behandlung von Depressionen führen [157]. Schließlich kommen große ethische Fragen auf die Gesetzgeber zu, wie die Speicherung und Weitergabe genetischer und persönlicher Daten sicher und vor Missbrauch geschützt werden können. Täglich werden im klinischen Bereich und in der Forschung neue Daten zu Wirkungen und Nebenwirkungen generiert. Hier wird der Einsatz von Big und open Data in den kommenden Jahren einen großen Beitrag im Bereich der personalisierten Medizin spielen [133] [156]. Durch Vernetzung und Zugang zu entsprechenden Programmen können solche Patienten- und Studiendaten hinsichtlich bestimmter Fragestellungen ausgewertet und für weitere Studien genutzt werden. Durch Analysen dieser gewaltigen Datenmengen von Patientenkohorten und Populationen ist es dann vielleicht möglich, Vorhersagen über einen Behandlungserfolg durch zum Beispiel genetische Dispositionen zu treffen, wie es schon im Bereich der Onkologie erfolgt, oder Aussagen über eventuelle Neben- und Wechselwirkungen zu treffen. Wahrscheinlich werden als Grundlage für die Auswahl und Dosierung eines Antidepressivums Algorithmen eingesetzt, ähnlich wie für Warfarin [213], die das komplexe Zusammenspiel von

persönlichen Faktoren, Umweltfaktoren und Genen berücksichtigen. So können Responder von Nicht-Respondern auf Antidepressiva eines Tages im Vorfeld erkannt und individuell behandelt werden.

Bei einer erfolglosen Behandlung mit Antidepressiva sollte man jedoch auch an andere Faktoren denken. Nicht immer sind unzureichende Behandlungserfolge auf genetische Ursachen zurückzuführen. Schätzungen zufolge liegt für Antidepressiva und Antipsychotika zu 20-80 % unzureichende Compliance vor [66]. Manchmal steckt auch eine andere Erkrankung dahinter, mitunter eine falsche Diagnose oder eine durch andere Medikamente hervorgerufene Depression [16]. Ein Therapeutisches Drug Monitoring (TDM) gibt Aufschluss darüber, ob therapeutisch wirksame Arzneistoffspiegel vorliegen. So sollte das TDM zum Beispiel bei Verdacht auf Non-Compliance, Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, bei Nebenwirkungen, Nicht-Ansprechen, bei relevanten anderen Erkrankungen (z. B. Leber- oder Niereninsuffizienz) oder aus Sicherheitsgründen bei bestimmten Medikamenten (z. B. Lithium) angewendet werden [8]. Dem Arzt kommt die große Aufgabe zu, ausreichend Anamnese zu erheben, um Dosierungsfehler zu vermeiden. Neben individuellen und genetischen Faktoren können auch pharmakokinetische Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten einen Einfluss auf den Wirkstoffspiegel haben [8]. Nicht zu vernachlässigen sind außerdem individuelle Behandlungen. Personalisierte Medizin sollte nicht nur Medikamente im Blickpunkt haben, sondern auch die Diversität der Psyche berücksichtigen. Möglicherweise wäre eine Psychotherapie eher das Mittel der Wahl und sollte immer, insbesondere als Begleittherapie in Betracht gezogen werden [171].

5 Zusammenfassung

Bis heute ist es nicht möglich, einem Patienten das für ihn am besten wirkende Antidepressivum mit der optimalen Dosis zu verschreiben. Bei gleicher Dosis eines Medikaments kann es zu unterschiedlichsten Reaktionen bei Patienten kommen, die von keiner Wirkung bis hin zu schweren Nebenwirkungen variieren können [131]. Es besteht dringender Bedarf an prädiktiven Biomarkern für eine individuelle maßgeschneiderte Therapie für an Depressionen erkrankten Menschen. Für die Identifikation von Response Biomarkern stellen Untersuchungen der genomweiten Variabilität im Transkriptom eine alternative Methode zur herkömmlichen Kandidatengenforschung dar. So können Gene gefunden werden, die bisher nicht mit Depressionen bzw. dem Ansprechen auf Antidepressiva im Fokus standen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Methoden wie Genexpressionen oder Wachstumshemmungs-Assays (XTT) von LCLs Möglichkeiten zur Biomarkerfindung bezüglich Response auf Antidepressiva bieten. Im Rahmen des PADRE Projekts wurden in Vorarbeiten zwei Kandidatengene, *CHL1* und *ITGB3*, anhand von LCLs gesunder Spender mittels Untersuchung der Wachstumshemmung und Änderungen der Genexpressionen durch Antidepressiva identifiziert. Die LCLs, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, stammen von Patienten, die an Depressionen oder bipolaren Störungen erkrankt waren, an der MARS-Studie teilnahmen und deren Therapieverlauf sowie die Medikation über acht Wochen wöchentlich dokumentiert wurde. Die Zielsetzung bestand unter anderem darin, mittels pharmakologischer Methoden *CHL1* und *ITGB3* auf einen Zusammenhang zum Therapieverlauf der MARS-Patienten zu prüfen. Die Bestimmung der individuellen *in vitro* Sensitivitäten der Patienten-LCLs wurde systematisch anhand Wachstumshemmungs-Assays (XTT) mit Antidepressiva von verschiedenen Wirkstoffklassen durchgeführt: Paroxetin als Vertreter eines SSRI, Imipramin als TCA und Mirtazapin als NASSA. Des Weiteren wurden die basalen Genexpressionen der Patienten-LCLs bestimmt. Da unterschiedliche Genvarianten Einfluss auf die Wirkung von Arzneistoffen haben können, wurden Polymorphismen von *CHL1* und *ITGB3* ermittelt. Der Serotonintransporter stand als drittes Gen im Fokus dieser Arbeit. Hiervon wurden neben genetischen Varianten ebenfalls die basalen Genexpressionen der LCLs bestimmt. Paroxetin hemmt die Serotoninwiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt, indem es an diesen Transporter bindet. Imipramin ist als trizyklisches Antidepressivum weniger selektiv, inhibiert aber ebenfalls den Reuptake von Serotonin. Studien zeigen außerdem Zusammenhänge von CHL1, ITGB3, psychischen Störungen und dem Serotonintransporter. Die Daten, die anhand basaler Genexpressionen und Wachstumshemmungsassays (XTT) von

den LCLs der MARS-Patienten sowie Polymorphismen gewonnen wurden, sind vielversprechend. Erstens zeigten sich die individuellen *in vitro* Sensitivitäten der Patienten-LCLs als Reaktion auf die Wirkstoffe als stabil und klassenspezifisch. Die normalisierten IC_{50}-Werte von Paroxetin und Imipramin wiesen eine starke Korrelation auf. Arzneistoffe, die ähnliche Wirkmechanismen aufweisen, sie reagieren mit ähnlichen *in vitro* Sensitivitäten auf Exposition mit Substanzen. Imipramin und Paroxetin stimmen teilweise in ihrem Wirkmechanismus (Bindung an den Serotonintransporter) überein. Weiterhin reagierten die LCLs der Patienten sehr unterschiedlich bezüglich der Wachstumshemmung durch die Antidepressiva, ein wichtiger Aspekt, um das individuelle Wachstumsverhalten von Zelllinien auf Exposition mit Wirkstoffen heranzuziehen. Zweitens variierten die individuellen basalen Genexpressionen von *SLC6A4, CHL1* und *ITGB3* in den LCLs sehr stark. Es wurde gefunden, dass LCLs von denjenigen Patienten, die nach 5 Wochen eine Remission zeigten, signifikant höhere *CHL1* und *ITGB3* Genexpressionen aufwiesen. Möglicherweise sind erhöhte Genexpressionen von solchen Zelladhäsionsproteinen wie CHL1 und ITGB3 für eine Remission von einer Depression notwendig. Auch könnte damit die verzögert einsetzende Wirkung von Antidepressiva zumindest teilweise durch eine langsam stattfindende Hochregulierung der Genexpressionen erklärt werden. Die zwei SNPs im *CHL1* rs1516338 und rs2133402, die sich als assoziiert mit dem Therapieansprechen der Patienten zeigten, bedürfen weiterer Untersuchungen mit höheren Patientenzahlen, um hier einen tatsächlichen Einfluss zu bestätigen. Für den SNP rs4003413 im *CHL1* fand sich ein Zusammenhang mit der Wachstumshemmung durch Paroxetin. Da diese genetische Variation bereits in einer anderen Studie mit Patienten der MARS-Studie bezüglich Antidepressiva Response auffiel, wären hier weiterführende Untersuchungen auch im Hinblick auf die funktionelle Bedeutung interessant. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass LCLs aufgrund individueller *in vitro* Sensitivitäten geeignet sind, um Arzneimitteleffekte zu untersuchen. Zum anderen können Genexpressionsunterschiede in den LCLs zum Finden potentieller Response Biomarker genutzt werden. Hier sind weiterführende Studien notwendig, um zu prüfen, ob auch mit B-Lymphozyten von depressiven Patienten erhöhte Genexpressionen von *CHL1* bzw. *ITGB3* ein Ansprechen auf eine Therapie vorhersagen lassen. Sollten sich *CHL1* und *ITGB3* als potentielle Response Biomarker bestätigen, würde sich zeigen, dass alternative Ansätze wie Wachstumshemmungs-Assays und Genexpressionsprofile an Zellmodellen neben genetischen Untersuchungen auf DNA-Basis für die Biomarkerfindung geeignet wären.

6 Literaturverzeichnis

[1] Agendia “MammaPrint,” “http://www.mammaprint.de/.” [Online]. Available: http://www.mammaprint.de/. [Accessed: 07-Jul-2015].

[2] M. A. Anderson and J. F. Gusella, “Use of Cyclosporin a in Establishing Epstein-Barr Virus-Transformed Human Lymphoblastoid Cell Lines,” *In Vitro*, vol. 20. Society for In Vitro Biology, pp. 856–858.

[3] H. Arimochi and K. Morita, “Desipramine induces apoptotic cell death through nonmitochondrial and mitochondrial pathways in different types of human colon carcinoma cells.,” *Pharmacology*, vol. 81, no. 2, pp. 164–72, Jan. 2008.

[4] V. L. Arthur, E. Shuldiner, E. F. Remmers, A. Hinks, A. A. Grom, D. Foell, A. Martini, M. Gattorno, S. Özen, S. Prahalad, A. S. Zeft, J. F. Bohnsack, N. T. Ilowite, E. D. Mellins, R. Russo, C. Len, S. Oliveira, R. S. M. Yeung, A. M. Rosenberg, L. R. Wedderburn, J. Anton, J.-P. Haas, A. Rösen-Wolff, K. Minden, A. M. Szymanski, W. Thomson, D. L. Kastner, P. Woo, and M. J. Ombrello, “IL1RN Variation Influences both Disease Susceptibility and Response to Human Recombinant IL-1RA Therapy in Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis,” *Arthritis & Rheumatology*, Apr. 2018.

[5] T. Barkan, D. Gurwitz, G. Levy, A. Weizman, and M. Rehavi, “Biochemical and pharmacological characterization of the serotonin transporter in human peripheral blood lymphocytes.,” *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, vol. 14, no. 3, pp. 237–43, May 2004.

[6] C. A. Baron, S. Y. Liu, C. Hicks, and J. P. Gregg, “Utilization of lymphoblastoid cell lines as a system for the molecular modeling of autism.,” *Journal of autism and developmental disorders*, vol. 36, no. 8, pp. 973–82, Nov. 2006.

[7] M. E. Bauer, A. Papadopoulos, L. Poon, P. Perks, S. L. Lightman, S. Checkley, and N. Shanks, “Altered glucocorticoid immunoregulation in treatment resistant depression,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 28, pp. 49–65, 2003.

[8] P. Baumann, S. Ulrich, G. Eckermann, M. Gerlach, H.-J. Kuss, G. Laux, B. Müller-Oerlinghausen, M. L. Rao, P. Riederer, G. Zernig, and C. Hiemke, “The AGNP-TDM Expert Group Consensus Guidelines: focus on therapeutic monitoring of antidepressants.,” *Dialogues in clinical neuroscience*, vol. 7, no. 3, pp. 231–47, Jan. 2005.

[9] L. Bertilsson, M.-L. Dahl, P. Dalén, and A. Al-Shurbaji, “Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs.,” *British journal of clinical pharmacology*, vol. 53, no. 2, pp. 111–22, Feb. 2002.

[10] E. B. Binder, H. E. Künzel, T. Nickel, N. Kern, A. Pfennig, M. Majer, M. Uhr, M. Ising, and F. Holsboer, “HPA-axis regulation at in-patient admission is associated with antidepressant therapy outcome in male but not in female depressed patients,” *Psychoneuroendocrinology*, vol. 34, pp. 99–109, 2009.

[11] J. M. Bolton, J. Pagura, M. W. Enns, B. Grant, and J. Sareen, “A population-based longitudinal study of risk factors for suicide attempts in major depressive disorder.,” *Journal of psychiatric research*, vol. 44, no. 13, pp. 817–26, Oct. 2010.

[12] N. Bozina, A. M. Peles, M. Sagud, H. Bilusic, and M. Jakovljevic, “Association study of

paroxetine therapeutic response with SERT gene polymorphisms in patients with major depressive disorder.," *The world journal of biological psychiatry : the official journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, vol. 9, no. 3, pp. 190–7, Jan. 2008.

[13] B. Breitenstein, S. Scheuer, H. Pfister, M. Uhr, S. Lucae, F. Holsboer, M. Ising, and T. M. Brückl, "The clinical application of ABCB1 genotyping in antidepressant treatment: a pilot study.," *CNS spectrums*, vol. 19, no. 2, pp. 165–75, Apr. 2014.

[14] J. Breitfeld, C. Scholl, M. Steffens, K. Brandenburg, K. Probst-Schendzielorz, O. Efimkina, D. Gurwitz, M. Ising, F. Holsboer, S. Lucae, and J. C. Stingl, "Proliferation rates and gene expression profiles in human lymphoblastoid cell lines from patients with depression characterized in response to antidepressant drug therapy," *Translational Psychiatry*, vol. 6, no. 11, pp. e950–e950, Nov. 2016.

[15] J. Breitfeld, C. Scholl, M. Steffens, G. Laje, and J. C. Stingl, "Gene expression and proliferation biomarkers for antidepressant treatment resistance," *Translational Psychiatry*, vol. 7, no. 3, p. e1061, Mar. 2017.

[16] T. Bschor, M. Bauer, and M. Adli, "Chronic and treatment resistant depression: diagnosis and stepwise therapy.," *Deutsches Ärzteblatt international*, 2014.

[17] M. Buhusi, B. R. Midkiff, A. M. Gates, M. Richter, M. Schachner, and P. F. Maness, "Close homolog of L1 is an enhancer of integrin-mediated cell migration.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 27, pp. 25024–31, Jul. 2003.

[18] K. Bullaughey, C. I. Chavarria, G. Coop, and Y. Gilad, "Expression quantitative trait loci detected in cell lines are often present in primary tissues.," *Human molecular genetics*, vol. 18, no. 22, pp. 4296–303, Nov. 2009.

[19] M. Caliskan, D. A. Cusanovich, C. Ober, and Y. Gilad, "The effects of EBV transformation on gene expression levels and methylation profiles.," *Human molecular genetics*, vol. 20, no. 8, pp. 1643–52, Apr. 2011.

[20] A. M. D. Carneiro, E. H. Cook, D. L. Murphy, and R. D. Blakely, "Interactions between integrin alphaIIbbeta3 and the serotonin transporter regulate serotonin transport and platelet aggregation in mice and humans.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 118, no. 4, pp. 1544–52, Apr. 2008.

[21] A. Caspi, K. Sugden, T. E. Moffitt, A. Taylor, I. W. Craig, H. Harrington, J. McClay, J. Mill, J. Martin, A. Braithwaite, and R. Poulton, "Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 301, no. 5631, pp. 386–9, Jul. 2003.

[22] E. Castrén, "Neurotrophic effects of antidepressant drugs.," *Current opinion in pharmacology*, vol. 4, no. 1, pp. 58–64, Feb. 2004.

[23] A. Cattaneo, L. Bocchio-Chiavetto, R. Zanardini, E. Milanesi, A. Placentino, and M. Gennarelli, "Reduced peripheral brain-derived neurotrophic factor mRNA levels are normalized by antidepressant treatment.," *The international journal of neuropsychopharmacology / official scientific journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, vol. 13, no. 1, pp. 103–8, Feb. 2010.

[24] A. Cattaneo, C. Ferrari, R. Uher, L. Bocchio-Chiavetto, M. A. Riva, and C. M. Pariante, "Absolute Measurements of Macrophage Migration Inhibitory Factor and Interleukin-1-β mRNA Levels Accurately Predict Treatment Response in Depressed Patients,"

International Journal of Neuropsychopharmacology, vol. 19, no. 10, p. pyw045, Oct. 2016.

[25] A. Cattaneo, M. Gennarelli, R. Uher, G. Breen, A. Farmer, K. J. Aitchison, I. W. Craig, C. Anacker, P. A. Zunsztain, P. McGuffin, and C. M. Pariante, "Candidate Genes Expression Profile Associated with Antidepressants Response in the GENDEP Study: Differentiating between Baseline 'Predictors' and Longitudinal 'Targets,'" *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, pp. 1–9, Oct. 2012.

[26] P. Chavis and G. Westbrook, "Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse.," *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 317–21, May 2001.

[27] Q.-Y. Chen, Q. Chen, G.-Y. Feng, K. Lindpaintner, Y. Chen, X. Sun, Z. Chen, Z. Gao, J. Tang, and L. He, "Case-control association study of the close homologue of L1 (CHL1) gene and schizophrenia in the Chinese population.," *Schizophrenia research*, vol. 73, no. 2–3, pp. 269–74, Mar. 2005.

[28] S. Chen, J. Xuan, L. Wan, H. Lin, L. Couch, N. Mei, V. N. Dobrovolsky, and L. Guo, "Sertraline, an antidepressant, induces apoptosis in hepatic cells through the mitogen-activated protein kinase pathway.," *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, vol. 137, no. 2, pp. 404–15, Feb. 2014.

[29] S. Chen, N. Mantei, L. Dong, and M. Schachner, "Prevention of Neuronal Cell Death by Neural Adhesion Molecules L1 and CHL1," *Journal of neurobiology*, vol. Prevention, no. 3, pp. 1–3, 1999.

[30] E. Choy, R. Yelensky, S. Bonakdar, R. M. Plenge, and R. Saxena, "Genetic Analysis of Human Traits In Vitro : Drug Response and Gene Expression in Lymphoblastoid Cell Lines," *PLoS Genetics*, vol. 4, no. 11, p. e1000287, 2008.

[31] L. A. Cingolani, A. Thalhammer, L. M. Y. Yu, M. Catalano, T. Ramos, M. A. Colicos, and Y. Goda, "Activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor composition and abundance by beta3 integrins.," *Neuron*, vol. 58, no. 5, pp. 749–62, Jun. 2008.

[32] S. L. Clark, D. E. Adkins, K. Aberg, J. M. Hettema, J. L. McClay, R. P. Souza, and E. J. C. G. van den Oord, "Pharmacogenomic study of side-effects for antidepressant treatment options in STAR*D.," *Psychological medicine*, vol. 42, no. 6, pp. 1151–62, Jun. 2012.

[33] Coriell Institute. [Online]. Available: https://www.coriell.org/. [Accessed: 19-May-2018].

[34] P. Coskun, P. Helguera, Z. Nemati, R. C. Bohannan, J. Thomas, S. E. Samuel, J. Argueta, E. Doran, D. C. Wallace, I. T. Lott, and J. Busciglio, "Metabolic and Growth Rate Alterations in Lymphoblastic Cell Lines Discriminate Between Down Syndrome and Alzheimer's Disease," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 55, no. 2, pp. 737–748, Nov. 2016.

[35] A. M. Coutinho, I. Sousa, M. Martins, C. Correia, T. Morgadinho, C. Bento, C. Marques, A. Ataíde, T. S. Miguel, J. H. Moore, G. Oliveira, and A. M. Vicente, "Evidence for epistasis between SLC6A4 and ITGB3 in autism etiology and in the determination of platelet serotonin levels.," *Human genetics*, vol. 121, no. 2, pp. 243–56, Apr. 2007.

[36] C. D'Sa and R. S. Duman, "Antidepressants and neuroplasticity," *Bipolar Disorders*, vol.

4, no. 3, pp. 183–194, Jun. 2002.

[37] A. Daniele, R. Divella, A. Paradiso, V. Mattioli, F. Romito, F. Giotta, P. Casamassima, and M. Quaranta, “Serotonin Transporter Polymorphism in Major Depressive Disorder (MDD), Psychiatric Disorders, and in MDD in Response to Stressful Life Events: Causes and Treatment with Antidepressant,” *In Vivo*, vol. 25, no. 6, pp. 895–901, Nov. 2011.

[38] M. Delannet, F. Martin, B. Bossy, D. A. Cheresh, L. F. Reichardt, and J. L. Duband, “Specific roles of the alpha V beta 1, alpha V beta 3 and alpha V beta 5 integrins in avian neural crest cell adhesion and migration on vitronectin.,” *Development (Cambridge, England)*, vol. 120, no. 9, pp. 2687–702, Sep. 1994.

[39] G. P. Demyanenko, P. F. Siesser, A. G. Wright, L. H. Brennaman, U. Bartsch, M. Schachner, and P. F. Maness, “L1 and CHL1 Cooperate in Thalamocortical Axon Targeting.,” *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)*, vol. 21, no. 2, pp. 401–12, Feb. 2011.

[40] N. Dreimüller, A. Tadić, A. Dragicevic, K. Boland, B. Bondy, K. Lieb, G. Laux, W. Maier, M. J. Müller, M. L. Rao, M. Rietschel, J. Röschke, P. Zill, and C. Hiemke, “The serotonin transporter promoter polymorphism (5-HTTLPR) affects the relation between antidepressant serum concentrations and effectiveness in major depression.,” *Pharmacopsychiatry*, vol. 45, no. 3, pp. 108–13, May 2012.

[41] W. C. Drevets, “Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders.,” *Current opinion in neurobiology*, vol. 11, no. 2, pp. 240–9, Apr. 2001.

[42] P. Ellul, E. Mariotti-Ferrandiz, M. Leboyer, and D. Klatzmann, “Regulatory T Cells As Supporters of Psychoimmune Resilience: Toward Immunotherapy of Major Depressive Disorder.,” *Frontiers in neurology*, vol. 9, p. 167, 2018.

[43] C. Fabbri, C. Crisafulli, D. Gurwitz, J. Stingl, R. Calati, D. Albani, G. Forloni, M. Calabrò, R. Martines, S. Kasper, J. Zohar, A. Juven-Wetzler, D. Souery, S. Montgomery, J. Mendlewicz, G. D. Girolamo, and A. Serretti, “Neuronal cell adhesion genes and antidepressant response in three independent samples.,” *The pharmacogenomics journal*, Apr. 2015.

[44] Y.-C. Fang, C.-T. Chou, C.-C. Pan, Y.-D. Hsieh, W.-Z. Liang, D. Chao, J.-Y. Tsai, W.-C. Liao, D.-H. Kuo, P. Shieh, C.-C. Kuo, C.-R. Jan, and C.-F. Shaw, “Paroxetine-induced Ca2+ movement and death in OC2 human oral cancer cells.,” *The Chinese journal of physiology*, vol. 54, no. 5, pp. 310–7, Oct. 2011.

[45] FDA, “Drug Safety and Availability - FDA Drug Safety Communication: Revised recommendations for Celexa (citalopram hydrobromide) related to a potential risk of abnormal heart rhythms with high doses,” 2012. [Online]. Available: https://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm297391.htm. [Accessed: 22-May-2018].

[46] B. Felding-Habermann, S. Silletti, F. Mei, C. H. Siu, P. M. Yip, P. C. Brooks, D. A. Cheresh, T. E. O’Toole, M. H. Ginsberg, and A. M. Montgomery, “A single immunoglobulin-like domain of the human neural cell adhesion molecule L1 supports adhesion by multiple vascular and platelet integrins.,” *The Journal of cell biology*, vol. 139, no. 6, pp. 1567–81, Dec. 1997.

[47] R. Frank and R. Hargreaves, “Clinical biomarkers in drug discovery and development,” *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 2, no. 7, pp. 566–580, Jul. 2003.

[48] P. Gałecki, E. Gałecka, M. Maes, M. Chamielec, A. Orzechowska, K. Bobińska, A. Lewiński, and J. Szemraj, "The expression of genes encoding for COX-2, MPO, iNOS, and sPLA2-IIA in patients with recurrent depressive disorder," *Journal of Affective Disorders*, vol. 138, no. 3, pp. 360–366, May 2012.

[49] E. R. Gamazon, R. S. Huang, N. J. Cox, and M. E. Dolan, "Chemotherapeutic drug susceptibility associated SNPs are enriched in expression quantitative trait loci.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 20, pp. 9287–92, May 2010.

[50] H. A. Garriock, J. B. Kraft, S. I. Shyn, E. J. Peters, J. S. Yokoyama, G. D. Jenkins, M. S. Reinalda, S. L. Slager, P. J. McGrath, and S. P. Hamilton, "A genomewide association study of citalopram response in major depressive disorder.," *Biological psychiatry*, vol. 67, no. 2, pp. 133–8, Jan. 2010.

[51] GENDEP Investigators, MARS Investigators, and STAR*D Investigators, "Common genetic variation and antidepressant efficacy in major depressive disorder: a meta-analysis of three genome-wide pharmacogenetic studies.," *The American journal of psychiatry*, vol. 170, no. 2, pp. 207–17, Feb. 2013.

[52] Genomic Health, "Oncotype IQ®." [Online]. Available: http://www.oncotypeiq.com/de-DE/. [Accessed: 25-Apr-2018].

[53] P. K. Gillman, "A systematic review of the serotonergic effects of Mirtazapine in humans: Implications for its dual action status," *Human Psychopharmacology*, vol. 21, no. 2, pp. 117–125, 2006.

[54] L. T. Guey, J. Kravic, O. Melander, N. P. Burtt, J. M. Laramie, V. Lyssenko, A. Jonsson, E. Lindholm, T. Tuomi, B. Isomaa, P. Nilsson, P. Almgren, S. Kathiresan, L. Groop, A. B. Seymour, D. Altshuler, and B. F. Voight, "Power in the phenotypic extremes: a simulation study of power in discovery and replication of rare variants.," *Genetic epidemiology*, vol. 35, no. 4, pp. 236–46, May 2011.

[55] A. Hadar, E. Milanesi, A. Squassina, P. Niola, C. Chillotti, M. Pasmanik-Chor, O. Yaron, P. Martásek, M. Rehavi, D. Weissglas-Volkov, N. Shomron, I. Gozes, and D. Gurwitz, "RGS2 expression predicts amyloid-β sensitivity, MCI and Alzheimer's disease: genome-wide transcriptomic profiling and bioinformatics data mining," *Translational Psychiatry*, vol. 6, no. 10, pp. e909–e909, Oct. 2016.

[56] J. Hannestad, N. DellaGioia, and M. Bloch, "The effect of antidepressant medication treatment on serum levels of inflammatory cytokines: a meta-analysis.," *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, vol. 36, no. 12, pp. 2452–9, Nov. 2011.

[57] N. D. Hanson, M. J. Owens, and C. B. Nemeroff, "Depression, antidepressants, and neurogenesis: a critical reappraisal.," *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, vol. 36, no. 13, pp. 2589–602, Dec. 2011.

[58] A. L. Hansson, Z. Xia, M. C. Berglund, A. Bergstrand, J. W. Depierre, and L. Nässberger, "Reduced cell survival and morphological alterations induced by three tricyclic antidepressants in human peripheral monocytes and lymphocytes and in cell lines derived from these cell types," *Toxicology in Vitro*, vol. 11, no. 1–2, pp. 21–31, Feb. 1997.

[59] C. M. Hartford, S. Duan, S. M. Delaney, S. Mi, E. O. Kistner, J. K. Lamba, R. S. Huang,

and M. E. Dolan, “Population-specific genetic variants important in susceptibility to cytarabine arabinoside cytotoxicity,” *Blood*, vol. 113, no. 10, pp. 2145–2153, Mar. 2009.

[60] K. Hashimoto, “Brain-derived neurotrophic factor as a biomarker for mood disorders: an historical overview and future directions.,” *Psychiatry and clinical neurosciences*, vol. 64, no. 4, pp. 341–57, Aug. 2010.

[61] J. W. M. Heemskerk, N. J. A. Mattheij, and J. M. E. M. Cosemans, “Platelet-based coagulation: different populations, different functions.,” *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, vol. 11, no. 1, pp. 2–16, Jan. 2013.

[62] A. Heils, A. Teufel, S. Petri, G. Stöber, P. Riederer, D. Bengel, and K. P. Lesch, “Allelic variation of human serotonin transporter gene expression.,” *Journal of neurochemistry*, vol. 66, no. 6, pp. 2621–4, Jun. 1996.

[63] J. M. Hennings, T. Owashi, E. B. Binder, S. Horstmann, A. Menke, S. Kloiber, T. Dose, B. Wollweber, D. Spieler, T. Messer, R. Lutz, H. Künzel, T. Bierner, T. Pollmächer, H. Pfister, T. Nickel, A. Sonntag, M. Uhr, M. Ising, F. Holsboer, and S. Lucae, “Clinical characteristics and treatment outcome in a representative sample of depressed inpatients - findings from the Munich Antidepressant Response Signature (MARS) project.,” *Journal of psychiatric research*, vol. 43, no. 3, pp. 215–29, Jan. 2009.

[64] J. K. Hicks, J. R. Bishop, K. Sangkuhl, D. J. Müller, Y. Ji, S. G. Leckband, J. S. Leeder, R. L. Graham, D. L. Chiulli, A. LLerena, T. C. Skaar, S. A. Scott, J. C. Stingl, T. E. Klein, K. E. Caudle, and A. Gaedigk, “Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes and Dosing of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors.,” *Clinical pharmacology and therapeutics*, May 2015.

[65] C. Hiemke, P. Baumann, N. Bergemann, A. Conca, O. Dietmaier, K. Egberts, M. Fric, M. Gerlach, C. Greiner, G. Gründer, E. Haen, U. Havemann-Reinecke, E. Jaquenoud Sirot, H. Kirchherr, G. Laux, U. C. Lutz, T. Messer, M. J. Müller, B. Pfuhlmann, B. Rambeck, P. Riederer, B. Schoppek, J. Stingl, M. Uhr, S. Ulrich, R. Waschgler, and G. Zernig, “AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011.,” *Pharmacopsychiatry*, vol. 44, no. 6, pp. 195–235, Sep. 2011.

[66] C. Hiemke, “Drug Monitoring und Toxikologie Therapeutisches Drug Monitoring von Antidepressiva und Antipsychotika Therapeutic monitoring of antidepressant and antipsychotic drugs,” *J Lab Med*, vol. 28, no. 4, pp. 326–333, 2004.

[67] R. Hillenbrand, M. Molthagen, D. Montag, and M. Schachner, “The close homologue of the neural adhesion molecule L1 (CHL1): patterns of expression and promotion of neurite outgrowth by heterophilic interactions.,” *The European journal of neuroscience*, vol. 11, no. 3, pp. 813–26, Mar. 1999.

[68] A. Holmes, D. L. Murphy, and J. N. Crawley, “Abnormal behavioral phenotypes of serotonin transporter knockout mice: parallels with human anxiety and depression.,” *Biological psychiatry*, vol. 54, no. 10, pp. 953–9, Nov. 2003.

[69] A. Holmes, R. J. Yang, K.-P. Lesch, J. N. Crawley, and D. L. Murphy, “Mice lacking the serotonin transporter exhibit 5-HT(1A) receptor-mediated abnormalities in tests for anxiety-like behavior.,” *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, vol. 28, no. 12, pp. 2077–88, Dec. 2003.

[70] F. Holsboer, “The corticosteroid receptor hypothesis of depression.,” *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of*

Neuropsychopharmacology, vol. 23, no. 5, pp. 477–501, Nov. 2000.

[71] F. Holsboer and M. Ising, "Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy.," *Annual review of psychology*, vol. 61, pp. 81–109, C1-11, Jan. 2010.

[72] C.-J. Hong, T.-J. Chen, Y. W.-Y. Yu, and S.-J. Tsai, "Response to fluoxetine and serotonin 1A receptor (C-1019G) polymorphism in Taiwan Chinese major depressive disorder.," *The pharmacogenomics journal*, vol. 6, no. 1, pp. 27–33, Jan. 2006.

[73] S. Horschitz, R. Hummerich, and P. Schloss, "Structure, function and regulation of the 5-hydroxytryptamine (serotonin) transporter.," *Biochemical Society transactions*, vol. 29, no. Pt 6, pp. 728–32, Nov. 2001.

[74] D. Hranilovic, J. Stefulj, I. Furac, M. Kubat, M. Balija, and B. Jernej, "Serotonin transporter gene promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR) polymorphisms in Croatian suicide victims.," *Biological psychiatry*, vol. 54, no. 9, pp. 884–9, Nov. 2003.

[75] V. W. Hu, B. C. Frank, S. Heine, N. H. Lee, and J. Quackenbush, "Gene expression profiling of lymphoblastoid cell lines from monozygotic twins discordant in severity of autism reveals differential regulation of neurologically relevant genes.," *BMC genomics*, vol. 7, p. 118, Jan. 2006.

[76] X.-Z. Hu, R. H. Lipsky, G. Zhu, L. A. Akhtar, J. Taubman, B. D. Greenberg, K. Xu, P. D. Arnold, M. A. Richter, J. L. Kennedy, D. L. Murphy, and D. Goldman, "Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder.," *American journal of human genetics*, vol. 78, no. 5, pp. 815–26, May 2006.

[77] J.-K. Huang, H.-T. Chang, C.-T. Chou, S.-S. Shu, C.-C. Kuo, J.-Y. Tsai, W.-C. Liao, J.-L. Wang, K.-L. Lin, Y.-C. Lu, I.-S. Chen, S.-I. Liu, C.-M. Ho, and C.-R. Jan, "The mechanism of sertraline-induced [Ca(2+)](i) rise in human PC3 prostate cancer cells.," *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, vol. 109, no. 2, pp. 103–10, Aug. 2011.

[78] R. S. Huang, S. Duan, W. K. Bleibel, E. O. Kistner, W. Zhang, T. A. Clark, T. X. Chen, A. C. Schweitzer, J. E. Blume, N. J. Cox, and M. E. Dolan, "A genome-wide approach to identify genetic variants that contribute to etoposide-induced cytotoxicity.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 23, pp. 9758–63, Jun. 2007.

[79] R. S. Huang, S. Duan, S. J. Shukla, E. O. Kistner, T. A. Clark, T. X. Chen, A. C. Schweitzer, J. E. Blume, and M. E. Dolan, "Identification of genetic variants contributing to cisplatin-induced cytotoxicity by use of a genomewide approach.," *American journal of human genetics*, vol. 81, no. 3, pp. 427–37, Sep. 2007.

[80] R. S. Huang, S. E. Johnatty, E. R. Gamazon, H. K. Im, D. Ziliak, S. Duan, W. Zhang, E. O. Kistner, P. Chen, J. Beesley, S. Mi, P. H. O'Donnell, Y. S. Fraiman, S. Das, N. J. Cox, Y. Lu, S. Macgregor, E. L. Goode, R. A. Vierkant, B. L. Fridley, E. Hogdall, S. K. Kjaer, A. Jensen, K. B. Moysich, M. Grasela, K. Odunsi, R. Brown, J. Paul, D. Lambrechts, E. Despierre, I. Vergote, J. Gross, B. Y. Karlan, A. Defazio, G. Chenevix-Trench, and M. E. Dolan, "Platinum sensitivity-related germline polymorphism discovered via a cell-based approach and analysis of its association with outcome in ovarian cancer patients.," *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 17, no. 16, pp. 5490–500, Aug. 2011.

[81] X. Huang, L. Zhu, T. Zhao, L. Wu, K. Wu, M. Schachner, Z.-C. Xiao, and M. Fan, "CHL1 negatively regulates the proliferation and neuronal differentiation of neural progenitor cells through activation of the ERK1/2 MAPK pathway.," *Molecular and cellular*

neurosciences, vol. 46, no. 1, pp. 296–307, Jan. 2011.

[82] Humatrix. [Online]. Available: https://www.humatrix.de/. [Accessed: 25-Apr-2018].

[83] E. A. Hurley, S. Agger, J. A. McNeil, J. B. Lawrence, A. Calendar, G. Lenoir, and D. A. Thorley-Lawson, "When Epstein-Barr virus persistently infects B-cell lines, it frequently integrates.," *Journal of virology*, vol. 65, no. 3, pp. 1245–54, Mar. 1991.

[84] M. Ising, S. Horstmann, S. Kloiber, S. Lucae, E. B. Binder, N. Kern, H. E. Künzel, A. Pfennig, M. Uhr, and F. Holsboer, "Combined Dexamethasone/Corticotropin Releasing Hormone Test Predicts Treatment Response in Major Depression-A Potential Biomarker?," *Biological Psychiatry*, vol. 62, pp. 47–54, 2007.

[85] M. Ising, H. E. Künzel, E. B. Binder, T. Nickel, S. Modell, and F. Holsboer, "The combined dexamethasone/CRH test as a potential surrogate marker in depression," *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, vol. 29, no. 6, pp. 1085–1093, Jul. 2005.

[86] M. Ising, S. Lucae, E. B. Binder, T. Bettecken, M. Uhr, S. Ripke, M. A. Kohli, J. M. Hennings, S. Horstmann, S. Kloiber, A. Menke, B. Bondy, R. Rupprecht, K. Domschke, B. T. Baune, V. Arolt, A. J. Rush, F. Holsboer, and B. Müller-Myhsok, "A genomewide association study points to multiple loci that predict antidepressant drug treatment outcome in depression.," *Archives of general psychiatry*, vol. 66, no. 9, pp. 966–75, Sep. 2009.

[87] K. Ito, K. Yoshida, K. Sato, H. Takahashi, M. Kamata, H. Higuchi, T. Shimizu, K. Itoh, K. Inoue, T. Tezuka, T. Suzuki, T. Ohkubo, K. Sugawara, and K. Otani, "A variable number of tandem repeats in the serotonin transporter gene does not affect the antidepressant response to fluvoxamine.," *Psychiatry research*, vol. 111, no. 2–3, pp. 235–9, Aug. 2002.

[88] D. G. A. Janssen, R. N. Caniato, J. C. Verster, and B. T. Baune, "A psychoneuroimmunological review on cytokines involved in antidepressant treatment response.," *Human psychopharmacology*, vol. 25, no. 3, pp. 201–15, Apr. 2010.

[89] G. Juhasz, X. Gonda, G. Hullam, N. Eszlari, D. Kovacs, J. Lazary, D. Pap, P. Petschner, R. Elliott, J. F. W. Deakin, I. M. Anderson, P. Antal, K.-P. Lesch, and G. Bagdy, "Variability in the effect of 5-HTTLPR on depression in a large European population: the role of age, symptom profile, type and intensity of life stressors.," *PloS one*, vol. 10, no. 3, p. e0116316, Jan. 2015.

[90] M. F. Juruena, C. M. Pariante, A. S. Papadopoulos, L. Poon, S. Lightman, and A. J. Cleare, "Prednisolone suppression test in depression: prospective study of the role of HPA axis dysfunction in treatment resistance.," *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, vol. 194, no. 4, pp. 342–9, Apr. 2009.

[91] C. Kakiuchi, M. Ishiwata, S. Nanko, N. Ozaki, N. Iwata, T. Umekage, M. Tochigi, K. Kohda, T. Sasaki, A. Imamura, Y. Okazaki, and T. Kato, "Up-regulation of ADM and SEPX1 in the lymphoblastoid cells of patients in monozygotic twins discordant for schizophrenia.," *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, vol. 147B, no. 5, pp. 557–64, Jul. 2008.

[92] K. R. Kalari, S. J. Hebbring, H. S. Chai, L. Li, J.-P. A. Kocher, L. Wang, and R. M. Weinshilboum, "Copy number variation and cytidine analogue cytotoxicity: a genome-wide association approach.," *BMC genomics*, vol. 11, p. 357, 2010.

[93] H. Karlsson, Y. Gu, J. DePierre, and L. Nässberger, “Induction of apoptosis in proliferating lymphocytes by tricyclic antidepressants.,” *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, vol. 3, no. 4, pp. 255–60, Sep. 1998.

[94] J. Katic, G. Loers, R. Kleene, N. Karl, C. Schmidt, F. Buck, J. W. Zmijewski, I. Jakovcevski, K. T. Preissner, and M. Schachner, “Interaction of the cell adhesion molecule CHL1 with vitronectin, integrins, and the plasminogen activator inhibitor-2 promotes CHL1-induced neurite outgrowth and neuronal migration.,” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 34, no. 44, pp. 14606–23, Oct. 2014.

[95] M. Kato and A. Serretti, “Review and meta-analysis of antidepressant pharmacogenetic findings in major depressive disorder.,” *Molecular psychiatry*, vol. 15, no. 5, pp. 473–500, May 2010.

[96] S. Kenwrick, “Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations,” *Human Molecular Genetics*, vol. 9, no. 6, pp. 879–886, Apr. 2000.

[97] D. K. Kim, S. W. Lim, S. Lee, S. E. Sohn, S. Kim, C. G. Hahn, and B. J. Carroll, “Serotonin transporter gene polymorphism and antidepressant response.,” *Neuroreport*, vol. 11, no. 1, pp. 215–9, Jan. 2000.

[98] J. Kirchheiner, K. Brosen, M. L. Dahl, L. F. Gram, S. Kasper, I. Roots, F. Sjoqvist, E. Spina, and J. Brockmoller, “CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages,” *Acta Psychiatrica Scandinavica*, vol. 104, no. 3, pp. 173–192, Sep. 2001.

[99] J. Kirchheiner, C. Meisel, M. Goldammer, T. Gerloff, R. Kaiser, and I. Roots, “Pharmakogenetik als Basis neuer Therapiekonzepte,” *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, vol. 46, no. 10, pp. 835–844, Oct. 2003.

[100] J. Kirchheiner, K. Brøsen, M. L. Dahl, L. F. Gram, S. Kasper, and I. Roots, “CYP2D6 and CYP2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants : a first step towards subpopulation-specific dosages,” pp. 173–192, 2001.

[101] J. Kirchheiner, K. Nickchen, M. Bauer, M.-L. Wong, J. Licinio, I. Roots, and J. Brockmöller, “Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response.,” *Molecular psychiatry*, vol. 9, no. 5, pp. 442–73, May 2004.

[102] J. Kirchheiner, C. Klein, I. Meineke, J. Sasse, U. M. Zanger, T. E. Mürdter, I. Roots, and J. Brockmöller, “Bupropion and 4-OH-bupropion pharmacokinetics in relation to genetic polymorphisms in CYP2B6.,” *Pharmacogenetics*, vol. 13, no. 10, pp. 619–26, Oct. 2003.

[103] J. Kirchheiner and A. Seeringer, “Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes.,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1770, no. 3, pp. 489–94, Mar. 2007.

[104] F. Kobeissy, A. Alawieh, S. Mondello, R.-M. Boustany, and M. S. Gold, “Biomarkers in psychiatry: how close are we?,” *Frontiers in psychiatry*, vol. 3, p. 114, 2012.

[105] J. B. Kraft, E. J. Peters, S. L. Slager, G. D. Jenkins, M. S. Reinalda, P. J. McGrath, and S. P. Hamilton, “Analysis of association between the serotonin transporter and antidepressant response in a large clinical sample.,” *Biological psychiatry*, vol. 61, no. 6, pp. 734–42, Mar. 2007.

[106] E. A. Kramár, J. A. Bernard, C. M. Gall, and G. Lynch, “Integrins modulate fast excitatory transmission at hippocampal synapses.,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, no. 12, pp. 10722–30, Mar. 2003.

[107] H. E. Künzel, E. B. Binder, T. Nickel, M. Ising, B. Fuchs, M. Majer, A. Pfennig, G. Ernst, N. Kern, D. A. Schmid, M. Uhr, F. Holsboer, and S. Modell, “Pharmacological and nonpharmacological factors influencing hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis reactivity in acutely depressed psychiatric in-patients, measured by the Dex-CRH test.,” *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, vol. 28, no. 12, pp. 2169–78, Dec. 2003.

[108] K. Laine, G. Tybring, S. Härtter, K. Andersson, J. O. Svensson, J. Widén, and L. Bertilsson, “Inhibition of cytochrome P4502D6 activity with paroxetine normalizes the ultrarapid metabolizer phenotype as measured by nortriptyline pharmacokinetics and the debrisoquin test.,” *Clinical pharmacology and therapeutics*, vol. 70, no. 4, pp. 327–35, Oct. 2001.

[109] B.-H. Lee and Y.-K. Kim, “The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment.,” *Psychiatry investigation*, vol. 7, no. 4, pp. 231–5, Dec. 2010.

[110] C. S. Lee, Y. J. Kim, E. R. Jang, W. Kim, and S. C. Myung, “Fluoxetine induces apoptosis in ovarian carcinoma cell line OVCAR-3 through reactive oxygen species-dependent activation of nuclear factor-kappaB.,” *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, vol. 106, no. 6, pp. 446–53, Jun. 2010.

[111] K. P. Lesch, D. Bengel, A. Heils, S. Z. Sabol, B. D. Greenberg, S. Petri, J. Benjamin, C. R. Müller, D. H. Hamer, and D. L. Murphy, “Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region.,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 274, no. 5292, pp. 1527–31, Nov. 1996.

[112] G. D. Leschziner, T. Andrew, M. Pirmohamed, and M. R. Johnson, “ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: a critical review and recommendations for future research.,” *The pharmacogenomics journal*, vol. 7, no. 3, pp. 154–79, Jun. 2007.

[113] V. S. Lestou, M. De Braekeleer, S. Strehl, G. Ott, H. Gadner, and P. F. Ambros, “Non-random integration of Epstein-Barr virus in lymphoblastoid cell lines.,” *Genes, chromosomes & cancer*, vol. 8, no. 1, pp. 38–48, Sep. 1993.

[114] M. R. Levinstein and B. A. Samuels, “Mechanisms underlying the antidepressant response and treatment resistance.,” *Frontiers in behavioral neuroscience*, vol. 8, p. 208, Jan. 2014.

[115] L. Li, B. Fridley, K. Kalari, G. Jenkins, A. Batzler, S. Safgren, M. Hildebrandt, M. Ames, D. Schaid, and L. Wang, “Gemcitabine and cytosine arabinoside cytotoxicity: association with lymphoblastoid cell expression.,” *Cancer research*, vol. 68, no. 17, pp. 7050–8, Sep. 2008.

[116] L. Li, B. L. Fridley, K. Kalari, G. Jenkins, A. Batzler, R. M. Weinshilboum, and L. Wang, “Gemcitabine and arabinosylcytosin pharmacogenomics: genome-wide association and drug response biomarkers.,” *PloS one*, vol. 4, no. 11, p. e7765, Jan. 2009.

[117] L. Li, B. L. Fridley, K. Kalari, N. Niu, G. Jenkins, A. Batzler, R. P. Abo, D. Schaid, and L. Wang, “Discovery of genetic biomarkers contributing to variation in drug response of cytidine analogues using human lymphoblastoid cell lines,” *BMC Genomics*, vol. 15, no.

1, p. 93, 2014.

[118] K.-L. Lin, C.-T. Chou, J.-S. Cheng, H.-T. Chang, W.-Z. Liang, C.-C. Kuo, I.-L. Chen, L.-L. Tseng, P. Shieh, R.-F. Wu, D.-H. Kuo, and C.-R. Jan, "Effect of Fluoxetine on [Ca^{2+}]i and Cell Viability in OC2 Human Oral Cancer Cells.," *The Chinese journal of physiology*, vol. 57, no. 5, pp. 256–64, Oct. 2014.

[119] K.-H. Liu, S.-T. Yang, Y.-K. Lin, J.-W. Lin, Y.-H. Lee, J.-Y. Wang, C.-J. Hu, E.-Y. Lin, S.-M. Chen, C.-K. Then, and S.-C. Shen, "Fluoxetine, an antidepressant, suppresses glioblastoma by evoking AMPAR-mediated calcium-dependent apoptosis.," *Oncotarget*, Dec. 2014.

[120] Q. Liu, N. D. Dwyer, and D. D. O'Leary, "Differential expression of COUP-TFI, CHL1, and two novel genes in developing neocortex identified by differential display PCR.," *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 20, no. 20, pp. 7682–90, Oct. 2000.

[121] M. T. Lobmeyer, L. Wang, I. Zineh, S. T. Turner, J. G. Gums, A. B. Chapman, R. M. Cooper-DeHoff, A. L. Beitelshees, K. R. Bailey, E. Boerwinkle, C. J. Pepine, and J. A. Johnson, "Polymorphisms in genes coding for GRK2 and GRK5 and response differences in antihypertensive-treated patients.," *Pharmacogenetics and genomics*, vol. 21, no. 1, pp. 42–9, Jan. 2011.

[122] E. R. Londin, M. A. Keller, M. R. D'Andrea, K. Delgrosso, A. Ertel, S. Surrey, and P. Fortina, "Whole-exome sequencing of DNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and EBV-transformed lymphocytes from the same donor.," *BMC genomics*, vol. 12, no. 1, p. 464, Jan. 2011.

[123] D. Q. Ma, R. Rabionet, I. Konidari, J. Jaworski, H. N. Cukier, H. H. Wright, R. K. Abramson, J. R. Gilbert, M. L. Cuccaro, M. A. Pericak-Vance, and E. R. Martin, "Association and gene-gene interaction of SLC6A4 and ITGB3 in autism.," *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, vol. 153B, no. 2, pp. 477–83, Mar. 2010.

[124] M. Maes, "Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis.," *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, vol. 19, no. 1, pp. 11–38, Jan. 1995.

[125] P. A. E. Main, P. Thomas, A. Esterman, and M. F. Fenech, "Necrosis is increased in lymphoblastoid cell lines from children with autism compared with their non-autistic siblings under conditions of oxidative and nitrosative stress," *Mutagenesis*, vol. 28, no. 4, pp. 475–484, Jul. 2013.

[126] J. E. Malberg, A. J. Eisch, E. J. Nestler, and R. S. Duman, "Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus," *J. Neurosci.*, vol. 20, no. 24, pp. 9104–9110, Dec. 2000.

[127] N. V Malykhin, R. Carter, P. Seres, and N. J. Coupland, "Structural changes in the hippocampus in major depressive disorder: contributions of disease and treatment.," *Journal of psychiatry & neuroscience : JPN*, vol. 35, no. 5, pp. 337–43, Sep. 2010.

[128] L. M. Mangravite, M. W. Medina, J. Cui, S. Pressman, J. D. Smith, M. J. Rieder, X. Guo, D. A. Nickerson, J. I. Rotter, and R. M. Krauss, "Combined influence of LDLR and HMGCR sequence variation on lipid-lowering response to simvastatin.," *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, vol. 30, no. 7, pp. 1485–92, Jul.

2010.

[129] H. K. Manji, J. A. Quiroz, J. Sporn, J. L. Payne, K. Denicoff, N. A. Gray, C. A. Zarate, and D. S. Charney, "Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression," *Biological Psychiatry*, vol. 53, no. 03, pp. 707–742, 2003.

[130] L. Markasz, G. Stuber, E. Flaberg, A. G. Jernberg, S. Eksborg, E. Olah, H. Skribek, and L. Szekely, "Cytotoxic drug sensitivity of Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid B-cells.," *BMC cancer*, vol. 6, p. 265, Jan. 2006.

[131] S. Marsh and H. L. McLeod, "Pharmacogenomics: from bedside to clinical practice.," *Human molecular genetics*, vol. 15 Spec No, pp. R89-93, Apr. 2006.

[132] D. Martins-de-Souza, G. Maccarrone, M. Ising, S. Kloiber, S. Lucae, F. Holsboer, and C. W. Turck, "Blood Mononuclear Cell Proteome Suggests Integrin and Ras Signaling as Critical Pathways for Antidepressant Treatment Response," *Biological Psychiatry*, vol. 76, no. 7, pp. e15–e17, 2014.

[133] J. E. McDermott, J. Wang, H. Mitchell, B.-J. Webb-Robertson, R. Hafen, J. Ramey, and K. D. Rodland, "Challenges in Biomarker Discovery: Combining Expert Insights with Statistical Analysis of Complex Omics Data.," *Expert opinion on medical diagnostics*, vol. 7, no. 1, pp. 37–51, Jan. 2013.

[134] A. B. Mcgeachie, A. E. Skrzypiec, L. A. Cingolani, M. Letellier, R. Pawlak, and Y. Goda, "B3 Integrin Is Dispensable for Conditioned Fear and Hebbian Forms of Plasticity in the Hippocampus," *European Journal of Neuroscience*, vol. 36, no. February, pp. 2461–2469, 2012.

[135] A. B. McGeachie, L. A. Cingolani, and Y. Goda, "Stabilising influence: integrins in regulation of synaptic plasticity.," *Neuroscience research*, vol. 70, no. 1, pp. 24–9, May 2011.

[136] U. A. Meyer and U. M. Zanger, "Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism.," *Annual review of pharmacology and toxicology*, vol. 37, pp. 269–96, Jan. 1997.

[137] U. A. Meyer, "Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity.," *Nature reviews. Genetics*, vol. 5, no. 9, pp. 669–76, Sep. 2004.

[138] E. Milanesi, I. Voinsky, A. Hadar, A. Srouji, C. Maj, T. Shekhtman, M. Gershovits, S. Gilad, C. Chillotti, A. Squassina, J. B. Potash, T. G. Schulze, F. S. Goes, P. Zandi, J. R. Kelsoe, and D. Gurwitz, "RNA sequencing of bipolar disorder lymphoblastoid cell lines implicates the neurotrophic factor HRP-3 in lithium's clinical efficacy," *The World Journal of Biological Psychiatry*, pp. 1–13, Sep. 2017.

[139] M. J. Millan, A. Gobert, J. M. Rivet, A. Adhumeau-Auclair, D. Cussac, A. Newman-Tancredi, A. Dekeyne, J. P. Nicolas, and F. Lejeune, "Mirtazapine enhances frontocortical dopaminergic and corticolimbic adrenergic, but not serotonergic, transmission by blockade of alpha2-adrenergic and serotonin2C receptors: a comparison with citalopram.," *The European journal of neuroscience*, vol. 12, no. 3, pp. 1079–95, Mar. 2000.

[140] W. Min, T. Li, X. Ma, Z. Li, T. Yu, D. Gao, B. Zhang, Y. Yun, and X. Sun, "Monoamine transporter gene polymorphisms affect susceptibility to depression and predict antidepressant response.," *Psychopharmacology*, vol. 205, no. 3, pp. 409–17, Aug. 2009.

[141] A. K. Mitra, K. Crews, S. Pounds, X. Cao, J. R. Downing, S. Raimondi, D. Campana, R. C. Ribeiro, J. E. Rubnitz, and J. K. Lamba, "Impact of genetic variation in FKBP5 on clinical response in pediatric acute myeloid leukemia patients: a pilot study.," *Leukemia*, vol. 25, no. 8, pp. 1354–6, Aug. 2011.

[142] M. Montag-Sallaz, A. Baarke, and D. Montag, "Aberrant neuronal connectivity in CHL1-deficient mice is associated with altered information processing-related immediate early gene expression.," *Journal of neurobiology*, vol. 57, no. 1, pp. 67–80, Oct. 2003.

[143] A. Morag, J. Kirchheiner, M. Rehavi, and D. Gurwitz, "Human lymphoblastoid cell line panels: novel tools for assessing shared drug pathways.," *Pharmacogenomics*, vol. 11, no. 3, pp. 327–40, Mar. 2010.

[144] A. Morag, M. Pasmanik-Chor, V. Oron-Karni, M. Rehavi, J. C. Stingl, and D. Gurwitz, "Genome-wide expression profiling of human lymphoblastoid cell lines identifies CHL1 as a putative SSRI antidepressant response biomarker.," *Pharmacogenomics*, vol. 12, no. 2, pp. 171–84, Feb. 2011.

[145] F. Morellini, E. Lepsveridze, B. Kähler, A. Dityatev, and M. Schachner, "Reduced reactivity to novelty, impaired social behavior, and enhanced basal synaptic excitatory activity in perforant path projections to the dentate gyrus in young adult mice deficient in the neural cell adhesion molecule CHL1.," *Molecular and cellular neurosciences*, vol. 34, no. 2, pp. 121–36, Feb. 2007.

[146] A. M. Moyer, B. L. Fridley, G. D. Jenkins, A. J. Batzler, L. L. Pelleymounter, K. R. Kalari, Y. Ji, Y. Chai, K. K. S. Nordgren, and R. M. Weinshilboum, "Acetaminophen-NAPQI hepatotoxicity: a cell line model system genome-wide association study.," *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, vol. 120, no. 1, pp. 33–41, Mar. 2011.

[147] D. A. Mrazek, A. J. Rush, J. M. Biernacka, D. J. O'Kane, J. M. Cunningham, E. D. Wieben, D. J. Schaid, M. S. Drews, V. L. Courson, K. A. Snyder, J. L. Black, and R. M. Weinshilboum, "SLC6A4 variation and citalopram response.," *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, vol. 150B, no. 3, pp. 341–51, Apr. 2009.

[148] D. Muller, C. Wang, G. Skibo, N. Toni, H. Cremer, V. Calaora, G. Rougon, and J. Z. Kiss, "PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity.," *Neuron*, vol. 17, no. 3, pp. 413–22, Sep. 1996.

[149] A.-R. Mun, S.-J. Lee, G.-B. Kim, H.-S. Kang, J.-S. Kim, and S.-J. Kim, "Fluoxetine-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells.," *Anticancer research*, vol. 33, no. 9, pp. 3691–7, Sep. 2013.

[150] Myriad Genetics, "'Endopredict.'" [Online]. Available: https://endopredict.com/. [Accessed: 07-May-2018].

[151] W. Myung, S.-W. Lim, S. Kim, H. Kim, J. W. Chung, M. Y. Seo, J.-W. Kim, B. J. Carroll, and D. K. Kim, "Serotonin transporter genotype and function in relation to antidepressant response in Koreans.," *Psychopharmacology*, vol. 225, no. 2, pp. 283–90, Jan. 2013.

[152] C. B. Nemeroff, "The corticotropin-releasing factor (CRF) hypothesis of depression: new findings and new directions.," *Molecular psychiatry*, vol. 1, no. 4, pp. 336–42, Sep. 1996.

[153] T. Niitsu, C. Fabbri, F. Bentini, and A. Serretti, “Pharmacogenetics in major depression: a comprehensive meta-analysis.,” *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, vol. 45, pp. 183–94, Aug. 2013.

[154] N. Niu, Y. Qin, B. L. Fridley, J. Hou, K. R. Kalari, M. Zhu, T.-Y. Wu, G. D. Jenkins, A. Batzler, and L. Wang, “Radiation pharmacogenomics: A genome-wide association approach to identify radiation response biomarkers using human lymphoblastoid cell lines,” *Genome Research*, vol. 20, no. 11, pp. 1482–1492, Oct. 2010.

[155] K. Oved, A. Morag, M. Pasmanik-Chor, M. Rehavi, N. Shomron, and D. Gurwitz, “Genome-wide expression profiling of human lymphoblastoid cell lines implicates integrin beta-3 in the mode of action of antidepressants.,” *Translational psychiatry*, vol. 3, no. 10, p. e313, Jan. 2013.

[156] M. Panahiazar, V. Taslimitehrani, A. Jadhav, and J. Pathak, “Empowering Personalized Medicine with Big Data and Semantic Web Technology: Promises, Challenges, and Use Cases.,” *International Conference on Big Data*, vol. 2014, pp. 790–795, Oct. 2014.

[157] R. Pérez-Esparza, “Ketamine for Treatment-Resistant Depression: a New Advocate,” *Revista de investigacion Clinica*, vol. 70, no. 2, pp. 65–7, Apr. 2018.

[158] E. J. Peters, A. T. Kraja, S. J. Lin, J. L. Yen-Revollo, S. Marsh, M. A. Province, and H. L. McLeod, “Association of thymidylate synthase variants with 5-fluorouracil cytotoxicity.,” *Pharmacogenetics and genomics*, vol. 19, no. 5, pp. 399–401, May 2009.

[159] J. R. Piccotti, M. S. LaGattuta, S. A. Knight, A. J. Gonzales, and M. R. Bleavins, “Induction of apoptosis by cationic amphiphilic drugs amiodarone and imipramine.,” *Drug and chemical toxicology*, vol. 28, no. 1, pp. 117–33, Jan. 2005.

[160] B. G. Pollock, R. E. Ferrell, B. H. Mulsant, S. Mazumdar, M. Miller, R. A. Sweet, S. Davis, M. A. Kirshner, P. R. Houck, J. A. Stack, C. F. Reynolds, and D. J. Kupfer, “Allelic variation in the serotonin transporter promoter affects onset of paroxetine treatment response in late-life depression.,” *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, vol. 23, no. 5, pp. 587–90, Nov. 2000.

[161] S. Porcelli, C. Fabbri, and A. Serretti, “Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with antidepressant efficacy.,” *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, vol. 22, no. 4, pp. 239–58, Apr. 2012.

[162] S. C. Preissner, M. F. Hoffmann, R. Preissner, M. Dunkel, A. Gewiess, and S. Preissner, “Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy.,” *PloS one*, vol. 8, no. 12, p. e82562, Jan. 2013.

[163] K. Probst-Schendzielorz, C. Scholl, O. Efimkina, E. Ersfeld, R. Viviani, A. Serretti, C. Fabbri, D. Gurwitz, S. Lucae, M. Ising, A. M. Paul, M.-L. Lehmann, M. Steffens, C. Crisafulli, M. Calabrò, F. Holsboer, and J. Stingl, “CHL1, ITGB3 and SLC6A4 gene expression and antidepressant drug response: results from the Munich Antidepressant Response Signature (MARS) study.,” *Pharmacogenomics*, pp. 1–13, May 2015.

[164] K. Probst-Schendzielorz, R. Viviani, and J. C. Stingl, “Effect of Cytochrome P450 polymorphism on the action and metabolism of selective serotonin reuptake inhibitors.,” *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, pp. 1–14, Jun. 2015.

[165] G. Pula, A. Pistilli, C. Montagnoli, A. M. Stabile, M. G. Rambotti, and M. Rende, “The

tricyclic antidepressant amitriptyline is cytotoxic to HTB114 human leiomyosarcoma and induces p75(NTR)-dependent apoptosis.," *Anti-cancer drugs*, vol. 24, no. 9, pp. 899–910, Oct. 2013.

[166] M. S. Reddy, "Depression: the disorder and the burden.," *Indian journal of psychological medicine*, vol. 32, no. 1, pp. 1–2, Jan. 2010.

[167] M. V. Relling and T. E. Klein, "CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network.," *Clinical pharmacology and therapeutics*, vol. 89, no. 3, pp. 464–7, Mar. 2011.

[168] G. A. W. Rook, C. L. Raison, and C. A. Lowry, "Can we vaccinate against depression?," *Drug discovery today*, vol. 17, no. 9–10, pp. 451–8, May 2012.

[169] A. J. Rush, M. E. Thase, and S. Dubé, "Research issues in the study of difficult-to-treat depression.," *Biological psychiatry*, vol. 53, no. 8, pp. 743–53, Apr. 2003.

[170] A. J. Rush, M. H. Trivedi, S. R. Wisniewski, A. A. Nierenberg, J. W. Stewart, D. Warden, G. Niederehe, M. E. Thase, P. W. Lavori, B. D. Lebowitz, P. J. McGrath, J. F. Rosenbaum, H. A. Sackeim, D. J. Kupfer, J. Luther, and M. Fava, "Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report.," *The American journal of psychiatry*, vol. 163, no. 11, pp. 1905–17, Nov. 2006.

[171] S3-Leitlinie/Nationale VersorgungsLeitlinie Unipolare Depression - Kurzfassung, 2. Auflage. Version 1," 2017.

[172] T. Sakaeda, T. Nakamura, and K. Okumura, "Pharmacogenetics of drug transporters and its impact on the pharmacotherapy.," *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 4, no. 13, pp. 1385–98, Jan. 2004.

[173] K. Sakurai, O. Migita, M. Toru, and T. Arinami, "An association between a missense polymorphism in the close homologue of L1 (CHL1, CALL) gene and schizophrenia.," *Molecular psychiatry*, vol. 7, no. 4, pp. 412–5, Jan. 2002.

[174] C. F. Samer, K. I. Lorenzini, V. Rollason, Y. Daali, and J. A. Desmeules, "Applications of CYP450 testing in the clinical setting.," *Molecular diagnosis & therapy*, vol. 17, no. 3, pp. 165–84, Jun. 2013.

[175] R. S. Schmid and P. F. Maness, "L1 and NCAM adhesion molecules as signaling coreceptors in neuronal migration and process outgrowth.," *Current opinion in neurobiology*, vol. 18, no. 3, pp. 245–50, Jun. 2008.

[176] J. B. Schuch, D. Muller, R. G. Endres, C. A. Bosa, D. Longo, L. Schuler-Faccini, J. Ranzan, M. M. Becker, R. dos Santos Riesgo, and T. Roman, "The role of β3 integrin gene variants in Autism Spectrum Disorders--diagnosis and symptomatology.," *Gene*, vol. 553, no. 1, pp. 24–30, Dec. 2014.

[177] M. G. Scordo, E. Spina, M.-L. Dahl, G. Gatti, and E. Perucca, "Influence of CYP2C9, 2C19 and 2D6 genetic polymorphisms on the steady-state plasma concentrations of the enantiomers of fluoxetine and norfluoxetine.," *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, vol. 97, no. 5, pp. 296–301, Nov. 2005.

[178] A. Serafeim, M. J. Holder, G. Grafton, A. Chamba, M. T. Drayson, Q. T. Luong, C. M. Bunce, C. D. Gregory, N. M. Barnes, and J. Gordon, "Selective serotonin reuptake inhibitors directly signal for apoptosis in biopsy-like Burkitt lymphoma cells.," *Blood*, vol. 101, no. 8, pp. 3212–9, Apr. 2003.

[179] A. Serretti, M. Kato, D. De Ronchi, and T. Kinoshita, “Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with selective serotonin reuptake inhibitor efficacy in depressed patients.,” *Molecular psychiatry*, vol. 12, no. 3, pp. 247–57, Mar. 2007.

[180] A. Serretti, P. Artioli, and R. Quartesan, “Pharmacogenetics in the treatment of depression: pharmacodynamic studies.,” *Pharmacogenetics and genomics*, vol. 15, pp. 61–67, 2005.

[181] T. E. Shaltout, K. A. Alali, S. Bushra, A. M. Alkaseri, E. D. Jose, M. Al-Khainji, R. Saleh, A. Salama Dahir, H. Shaltout, M. Al-Abdullah, and N. M. Rizk, “Significant association of close homologue of L1 gene polymorphism rs2272522 with schizophrenia in Qatar.,” *Asia-Pacific psychiatry : official journal of the Pacific Rim College of Psychiatrists*, vol. 5, no. 1, pp. 17–23, Mar. 2013.

[182] Y. I. Sheline, “Neuroimaging studies of mood disorder effects on the brain.,” *Biological psychiatry*, vol. 54, no. 3, pp. 338–52, Aug. 2003.

[183] L. Sie, S. Loong, and E. K. Tan, “Utility of lymphoblastoid cell lines.,” *Journal of neuroscience research*, vol. 87, no. 9, pp. 1953–9, Jul. 2009.

[184] S. Silletti, F. Mei, D. Sheppard, and A. M. Montgomery, “Plasmin-sensitive dibasic sequences in the third fibronectin-like domain of L1-cell adhesion molecule (CAM) facilitate homomultimerization and concomitant integrin recruitment.,” *The Journal of cell biology*, vol. 149, no. 7, pp. 1485–502, Jun. 2000.

[185] S. C. Sim, C. Risinger, M.-L. Dahl, E. Aklillu, M. Christensen, L. Bertilsson, and M. Ingelman-Sundberg, “A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants.,” *Clinical pharmacology and therapeutics*, vol. 79, no. 1, pp. 103–13, Jan. 2006.

[186] A. S. Singh, R. Chandra, S. Guhathakurta, S. Sinha, A. Chatterjee, S. Ahmed, S. Ghosh, and U. Rajamma, “Genetic association and gene-gene interaction analyses suggest likely involvement of ITGB3 and TPH2 with autism spectrum disorder (ASD) in the Indian population.,” *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, vol. 45, pp. 131–43, Aug. 2013.

[187] E. Smeraldi, R. Zanardi, F. Benedetti, D. Di Bella, J. Perez, and M. Catalano, “Polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene and antidepressant efficacy of fluvoxamine.,” *Molecular psychiatry*, vol. 3, no. 6, pp. 508–11, Nov. 1998.

[188] K. M. Smits, L. J. M. Smits, J. S. A. G. Schouten, F. F. Stelma, P. Nelemans, and M. H. Prins, “Influence of SERTPR and STin2 in the serotonin transporter gene on the effect of selective serotonin reuptake inhibitors in depression: a systematic review.,” *Molecular psychiatry*, vol. 9, no. 5, pp. 433–41, May 2004.

[189] E. Spina, V. Santoro, and C. D’Arrigo, “Clinically relevant pharmacokinetic drug interactions with second-generation antidepressants: an update.,” *Clinical therapeutics*, vol. 30, no. 7, pp. 1206–27, Jul. 2008.

[190] STADA Diagnostik, “DNA_individuell_therapieren.pdf.” [Online]. Available: https://www.stada.de/uploads/tx_pnstdbooklets/docs/Informationsfolder_DNA_individuell_therapieren.pdf. [Accessed: 04-Mar-2018].

[191] A. L. Stark, W. Zhang, S. Mi, S. Duan, P. H. O’Donnell, R. S. Huang, and M. E. Dolan,

"Heritable and non-genetic factors as variables of pharmacologic phenotypes in lymphoblastoid cell lines.," *The pharmacogenomics journal*, vol. 10, no. 6, pp. 505–12, Dec. 2010.

[192] A. L. Stark and M. E. Dolan, "Lymphoblastoid cell lines in pharmacogenomics: how applicable are they to clinical outcomes?," *Pharmacogenomics*, vol. 14, no. 5, pp. 447–50, Apr. 2013.

[193] A. L. Stark, W. Zhang, T. Zhou, P. H. O'Donnell, C. M. Beiswanger, R. S. Huang, N. J. Cox, and M. E. Dolan, "Population differences in the rate of proliferation of international HapMap cell lines.," *American journal of human genetics*, vol. 87, no. 6, pp. 829–33, Dec. 2010.

[194] Statistisches Bundesamt, "Krankheitskosten," 2013. [Online]. Available: http://www.gbe-bund.de. [Accessed: 29-Apr-2018].

[195] J. C. Stingl, J. Brockmöller, and R. Viviani, "Genetic variability of drug-metabolizing enzymes: the dual impact on psychiatric therapy and regulation of brain function.," *Molecular psychiatry*, vol. 18, no. 3, pp. 273–87, Mar. 2013.

[196] J. C. Stingl Kirchheiner and J. Brockmöller, "Why, when, and how should pharmacogenetics be applied in clinical studies?: current and future approaches to study designs.," *Clinical pharmacology and therapeutics*, vol. 89, no. 2, pp. 198–209, 2011.

[197] C. A. Stockmeier, G. J. Mahajan, L. C. Konick, J. C. Overholser, G. J. Jurjus, H. Y. Meltzer, H. B. M. Uylings, L. Friedman, and G. Rajkowska, "Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression.," *Biological psychiatry*, vol. 56, no. 9, pp. 640–50, Nov. 2004.

[198] B. E. Stranger, M. S. Forrest, A. G. Clark, M. J. Minichiello, S. Deutsch, R. Lyle, S. Hunt, B. Kahl, S. E. Antonarakis, S. Tavaré, P. Deloukas, and E. T. Dermitzakis, "Genome-wide associations of gene expression variation in humans.," *PLoS genetics*, vol. 1, no. 6, p. e78, Dec. 2005.

[199] S. E. Strasburger, P. M. Bhimani, J. H. Kaabe, J. T. Krysiak, D. L. Nanchanatt, T. N. Nguyen, K. A. Pough, T. A. Prince, N. S. Ramsey, K. H. Savsani, L. Scandlen, M. J. Cavaretta, and R. B. Raffa, "What is the mechanism of Ketamine's rapid-onset antidepressant effect? A concise overview of the surprisingly large number of possibilities," *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, vol. 42, no. 2, pp. 147–154, Apr. 2017.

[200] Stratipharm, "STRATIPHARM - Ein Service Ihrer Apotheke." [Online]. Available: http://www.stratipharm.de/. [Accessed: 21-May-2018].

[201] Y. V. Sun, S. T. Turner, J. A. Smith, P. I. Hammond, A. Lazarus, J. L. Van De Rostyne, J. M. Cunningham, and S. L. R. Kardia, "Comparison of the DNA methylation profiles of human peripheral blood cells and transformed B-lymphocytes.," *Human genetics*, vol. 127, no. 6, pp. 651–8, Jun. 2010.

[202] A. Tadić, L. Müller-Engling, K. F. Schlicht, A. Kotsiari, N. Dreimüller, A. Kleimann, S. Bleich, K. Lieb, and H. Frieling, "Methylation of the promoter of brain-derived neurotrophic factor exon IV and antidepressant response in major depression.," *Molecular psychiatry*, vol. 19, no. 3, pp. 281–3, Mar. 2014.

[203] M. Taler, I. Gil-Ad, L. Lomnitski, I. Korov, E. Baharav, M. Bar, A. Zolokov, and A. Weizman, "Immunomodulatory effect of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)

on human T lymphocyte function and gene expression," *European Neuropsychopharmacology*, vol. 17, no. 12, pp. 774–780, 2007.

[204] J. W. Tamkun, D. W. DeSimone, D. Fonda, R. S. Patel, C. Buck, A. F. Horwitz, and R. O. Hynes, "Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin.," *Cell*, vol. 46, no. 2, pp. 271–82, Jul. 1986.

[205] M. J. Taylor, S. Sen, and Z. Bhagwagar, "Antidepressant response and the serotonin transporter gene-linked polymorphic region.," *Biological psychiatry*, vol. 68, no. 6, pp. 536–43, Sep. 2010.

[206] A. Tomoda, S. Nishitani, N. Matsuura, T. X. Fujisawa, J. Kawatani, D. Toyohisa, M. Ono, and K. Shinohara, "No interaction between serotonin transporter gene (5-HTTLPR) polymorphism and adversity on depression among Japanese children and adolescents.," *BMC psychiatry*, vol. 13, p. 134, Jan. 2013.

[207] R. Uher, P. Huezo-Diaz, N. Perroud, R. Smith, M. Rietschel, O. Mors, J. Hauser, W. Maier, D. Kozel, N. Henigsberg, M. Barreto, A. Placentino, M. Z. Dernovsek, T. G. Schulze, P. Kalember, A. Zobel, P. M. Czerski, E. R. Larsen, D. Souery, C. Giovannini, J. M. Gray, C. M. Lewis, A. Farmer, K. J. Aitchison, P. McGuffin, and I. Craig, "Genetic predictors of response to antidepressants in the GENDEP project," *The Pharmacogenomics Journal*, vol. 9, no. 4, pp. 225–233, Apr. 2009.

[208] R. Uher, N. Perroud, M. Y. M. Ng, J. Hauser, N. Henigsberg, W. Maier, O. Mors, A. Placentino, M. Rietschel, D. Souery, T. Zagar, P. M. Czerski, B. Jerman, E. R. Larsen, T. G. Schulze, A. Zobel, S. Cohen-Woods, K. Pirlo, A. W. Butler, P. Muglia, M. R. Barnes, M. Lathrop, A. Farmer, G. Breen, K. J. Aitchison, I. Craig, C. M. Lewis, and P. McGuffin, "Genome-wide pharmacogenetics of antidepressant response in the GENDEP project.," *The American journal of psychiatry*, vol. 167, no. 5, pp. 555–64, May 2010.

[209] R. Uher, K. E. Tansey, K. Malki, and R. H. Perlis, "Biomarkers predicting treatment outcome in depression: what is clinically significant?," *Pharmacogenomics*, vol. 13, no. 2, pp. 233–40, Jan. 2012.

[210] M. Uhr, A. Tontsch, C. Namendorf, S. Ripke, S. Lucae, M. Ising, T. Dose, M. Ebinger, M. Rosenhagen, M. Kohli, S. Kloiber, D. Salyakina, T. Bettecken, M. Specht, B. Pütz, E. B. Binder, B. Müller-Myhsok, and F. Holsboer, "Polymorphisms in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression.," *Neuron*, vol. 57, no. 2, pp. 203–9, Jan. 2008.

[211] Y. Wakabayashi, S. Uchida, H. Funato, T. Matsubara, T. Watanuki, K. Otsuki, M. Fujimoto, A. Nishida, and Y. Watanabe, "State-dependent changes in the expression levels of NCAM-140 and L1 in the peripheral blood cells of bipolar disorders, but not in the major depressive disorders.," *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, vol. 32, no. 5, pp. 1199–205, Jul. 2008.

[212] K.-S. Wang, X. Liu, T. B. Arana, N. Thompson, H. Weisman, C. Devargas, C. Mao, B. Bin Su, C. Camarillo, M. A. Escamilla, and C. Xu, "Genetic association analysis of ITGB3 polymorphisms with age at onset of schizophrenia.," *Journal of molecular neuroscience : MN*, vol. 51, no. 2, pp. 446–53, Oct. 2013.

[213] WarfarinDosing. [Online]. Available: http://www.warfarindosing.org/Source/Home.aspx. [Accessed: 02-Mar-2018].

[214] L. A. Weiss, G. Kosova, R. J. Delahanty, L. Jiang, E. H. Cook, C. Ober, and J. S. Sutcliffe, "Variation in ITGB3 is associated with whole-blood serotonin level and autism

susceptibility.," *European journal of human genetics : EJHG*, vol. 14, no. 8, pp. 923–31, Aug. 2006.

[215] L. A. Weiss, J. Veenstra-Vanderweele, D. L. Newman, S.-J. Kim, H. Dytch, M. S. McPeek, S. Cheng, C. Ober, E. H. Cook, and M. Abney, "Genome-wide association study identifies ITGB3 as a QTL for whole blood serotonin.," *European journal of human genetics : EJHG*, vol. 12, no. 11, pp. 949–54, Nov. 2004.

[216] M. Welsh, L. Mangravite, M. W. Medina, K. Tantisira, W. E. I. Zhang, R. S. Huang, H. Mcleod, and M. E. Dolan, "Pharmacogenomic Discovery Using Cell-Based Models," *Pharmacological reviews*, vol. 61, no. 4, pp. 413–429, 2009.

[217] H. E. Wheeler, L. K. Gorsic, M. Welsh, A. L. Stark, E. R. Gamazon, N. J. Cox, and M. E. Dolan, "Genome-wide local ancestry approach identifies genes and variants associated with chemotherapeutic susceptibility in African Americans," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 7, 2011.

[218] H. E. Wheeler and M. E. Dolan, "Lymphoblastoid cell lines in pharmacogenomic discovery and clinical translation.," *Pharmacogenomics*, vol. 13, no. 1, pp. 55–70, Jan. 2012.

[219] M. Whirl-Carrillo, E. M. McDonagh, J. M. Hebert, L. Gong, K. Sangkuhl, C. F. Thorn, R. B. Altman, and T. E. Klein, "Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine.," *Clinical pharmacology and therapeutics*, vol. 92, no. 4, pp. 414–7, Oct. 2012.

[220] H. A. Whiteford, L. Degenhardt, J. Rehm, A. J. Baxter, A. J. Ferrari, H. E. Erskine, F. J. Charlson, R. E. Norman, A. D. Flaxman, N. Johns, R. Burstein, C. J. L. Murray, and T. Vos, "Global burden of disease attributable to mental and substance use disorders: findings from the Global Burden of Disease Study 2010.," *Lancet*, vol. 382, no. 9904, pp. 1575–86, Nov. 2013.

[221] A. Whyte, T. Jessen, S. Varney, and A. M. D. Carneiro, "Serotonin transporter and integrin beta 3 genes interact to modulate serotonin uptake in mouse brain.," *Neurochemistry international*, vol. 73, pp. 122–6, Jul. 2014.

[222] M.-L. Wong, C. Dong, J. Maestre-Mesa, and J. Licinio, "Polymorphisms in inflammation-related genes are associated with susceptibility to major depression and antidepressant response.," *Molecular psychiatry*, vol. 13, no. 8, pp. 800–12, Aug. 2008.

[223] T.-Y. Wu, B. L. Fridley, G. D. Jenkins, A. Batzler, L. Wang, and R. M. Weinshilboum, "Mycophenolic acid response biomarkers: a cell line model system-based genome-wide screen.," *International immunopharmacology*, vol. 11, no. 8, pp. 1057–64, Aug. 2011.

[224] A. J. Wyrobek, C. F. Manohar, V. V Krishnan, D. O. Nelson, M. R. Furtado, M. S. Bhattacharya, F. Marchetti, and M. A. Coleman, "Low dose radiation response curves, networks and pathways in human lymphoblastoid cells exposed from 1 to 10cGy of acute gamma radiation.," *Mutation research*, vol. 722, no. 2, pp. 119–30, Jun. 2011.

[225] Z. Xia, J. W. DePierre, and L. Nässberger, "Modulation of apoptosis induced by tricyclic antidepressants in human peripheral lymphocytes.," *Journal of biochemical and molecular toxicology*, vol. 12, no. 2, pp. 115–23, Jan. 1998.

[226] G. Zalsman, Y.-Y. Huang, M. A. Oquendo, A. K. Burke, X.-Z. Hu, D. A. Brent, S. P. Ellis, D. Goldman, and J. J. Mann, "Association of a triallelic serotonin transporter gene promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with stressful life events and severity of

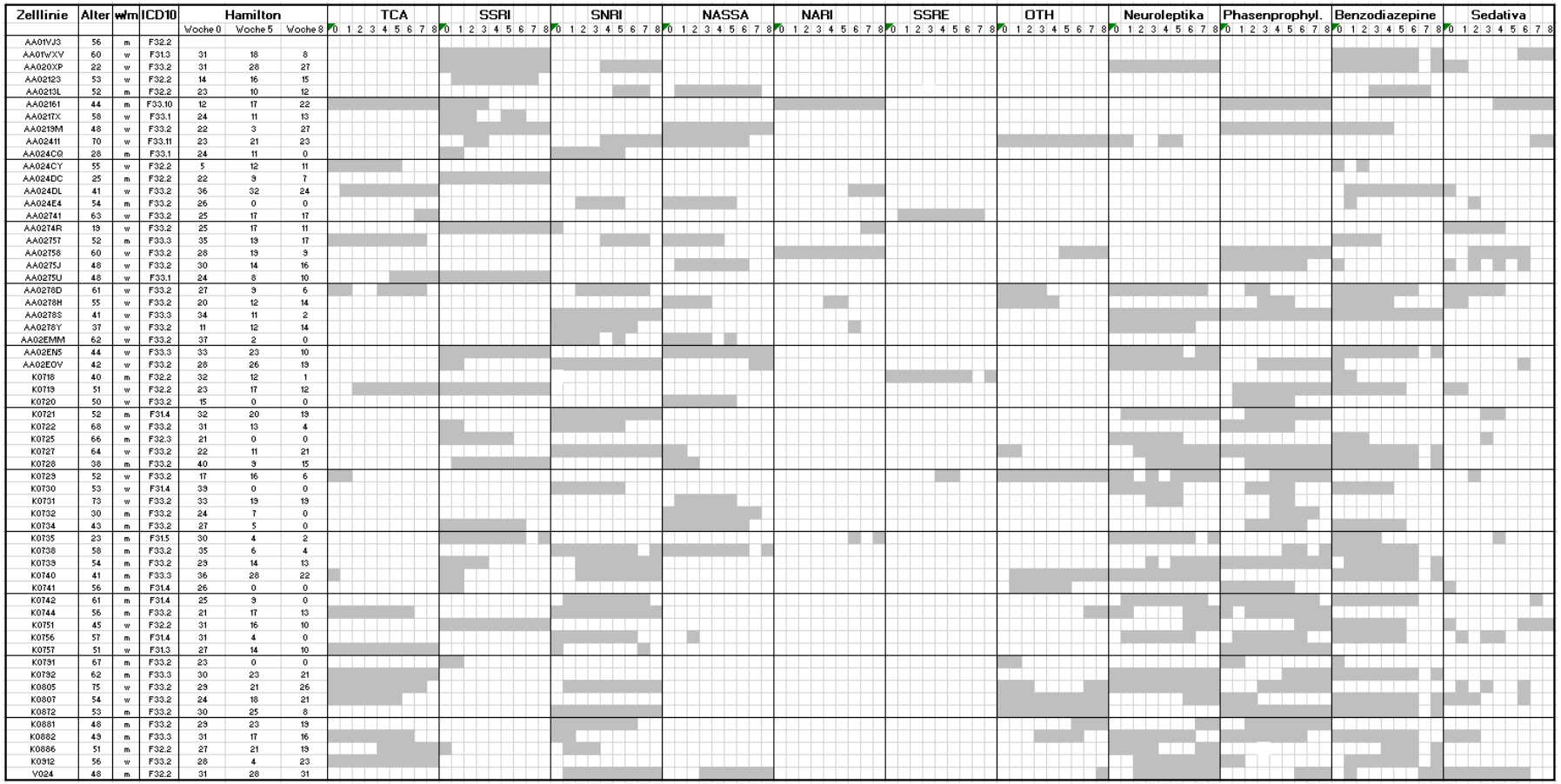
depression.," *The American journal of psychiatry*, vol. 163, no. 9, pp. 1588–93, Sep. 2006.

[227] W. Zhang and M. E. Dolan, "Use of cell lines in the investigation of pharmacogenetic loci.," *Current pharmaceutical design*, vol. 15, no. 32, pp. 3782–95, Jan. 2009.

[228] D. Ziliak, P. H. O'Donnell, H. K. Im, E. R. Gamazon, P. Chen, S. Delaney, S. Shukla, S. Das, N. J. Cox, E. E. Vokes, E. E. W. Cohen, M. E. Dolan, and R. S. Huang, "Germline polymorphisms discovered via a cell-based, genome-wide approach predict platinum response in head and neck cancers.," *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, vol. 157, no. 5, pp. 265–72, May 2011.

[229] A. Žourková and E. Hadašová, "Paroxetine-Induced Conversion of Cytochrome P450 2D6 Phenotype and Occurence of Adverse Effects," pp. 103–113, 2003.

Übersicht über die klinischen Daten der Patienten des MARS-Projekts



Zelllinie	Alter	w/m	ICD10	Hamilton			TCA	SSRI	SNRI	NASSA	NARI	SSRE	OTH	Neuroleptika	Phasenprophyl.	Benzodiazepine	Sedativa
				Woche 0	Woche 5	Woche 8	0 1 2 3 4 5 6 7 8	0 1 2 3 4 5 6 7 8	0 1 2 3 4 5 6 7 8	0 1 2 3 4 5 6 7 8	0 1 2 3 4 5 6 7 8	0 1 2 3 4 5 6 7 8	0 1 2 3 4 5 6 7 8	0 1 2 3 4 5 6 7 8	0 1 2 3 4 5 6 7 8	0 1 2 3 4 5 6 7 8	0 1 2 3 4 5 6 7 8
AA01VJ3	56	m	F32.2														
AA01WXV	60	w	F31.3	31	18	8											
AA020XP	22	w	F33.2	31	28	27											
AA02123	53	w	F32.2	14	16	15											
AA0213L	52	m	F32.2	23	10	12											
AA02161	44	m	F33.10	12	17	22											
AA021TX	58	w	F33.1	24	11	13											
AA0219M	48	w	F33.2	22	3	27											
AA02411	70	w	F33.11	23	21	23											
AA024C0	28	m	F33.1	24	11	0											
AA024CY	55	w	F32.2	5	12	11											
AA024DC	25	m	F32.2	22	9	7											
AA024DL	41	w	F33.2	36	32	24											
AA024E4	54	m	F33.2	26	0	0											
AA02741	63	w	F33.2	25	17	17											
AA0274R	19	w	F33.2	25	17	11											
AA02757	52	m	F33.3	35	19	17											
AA02758	60	w	F33.2	28	19	9											
AA0275J	48	w	F33.2	30	14	16											
AA0275U	48	w	F33.1	24	8	10											
AA0278D	61	w	F33.2	27	9	6											
AA0278H	55	w	F33.2	20	12	14											
AA0278S	41	w	F33.3	34	11	2											
AA0278Y	37	w	F33.2	11	12	14											
AA02EMM	62	w	F33.2	37	2	0											
AA02EN5	44	w	F33.3	33	23	10											
AA02EOV	42	w	F33.2	28	26	19											
K0718	40	m	F32.2	32	12	1											
K0719	51	w	F32.2	23	17	12											
K0720	50	w	F33.2	15	0	0											
K0721	52	m	F31.4	32	20	19											
K0722	68	w	F33.2	31	13	4											
K0725	66	m	F32.3	21	0	0											
K0727	64	w	F33.2	22	11	21											
K0728	38	m	F33.2	40	9	15											
K0729	52	w	F33.2	17	16	6											
K0730	53	w	F31.4	39	0	0											
K0731	73	w	F33.2	33	19	19											
K0732	30	m	F33.2	24	7	0											
K0734	43	m	F33.2	27	5	0											
K0735	23	m	F31.5	30	4	2											
K0738	58	m	F33.2	35	6	4											
K0739	54	m	F33.2	29	14	13											
K0740	41	m	F33.3	36	28	22											
K0741	56	m	F31.4	26	0	0											
K0742	61	m	F31.4	25	9	0											
K0744	56	m	F33.2	21	17	13											
K0751	45	w	F32.2	31	16	10											
K0756	57	m	F31.4	31	4	0											
K0757	51	w	F31.3	27	14	10											
K0791	67	m	F33.2	23	0	0											
K0792	62	m	F33.3	30	23	21											
K0805	75	w	F33.2	29	21	26											
K0807	54	w	F33.2	24	16	21											
K0872	53	m	F33.2	30	25	8											
K0881	48	m	F33.2	29	23	19											
K0882	49	m	F33.3	31	17	16											
K0886	51	m	F32.2	27	21	19											
K0912	56	w	F33.2	28	4	23											
V024	48	m	F32.2	31	28	31											

Diese Übersicht zeigt die klinischen Daten der Patienten: Alter, Geschlecht, Diagnose, HDRS-Wert (Hamilton; Hamilton rating scale for depression) zum Zeitpunkt 0 (Aufnahme in die Studie) und nach 5 und 8 Wochen sowie die Medikation zum Zeitpunkt 0 (Aufnahme in die Studie) über die Dauer der Studie (8 Wochen). **Abkürzungen**: w: weiblich; m: männlich; ICD 10: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme; TCA: Trizyklische Antidepressiva; SSRI: Selektive Serotonin Wiederaufnahmehemmer; SNRI: Selektive Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (Venlafaxin, Duloxetin); NASSA: noradrenerge und spezifisch serotonerge Antidepressiva (Mirtazapin, Maprotilin); NARI: selektive Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (Reboxetin); SSRE: Serotonin-Reuptake-Enhancer (Tianeptin); OTH: MAO-Hemmer und andere; Benzodiazepine (Lorazepam ≥ 0.5 mg); Sedativa (Lorazepam < 0,5 mg, Mirtazapin ≤ 15 mg, Trimipramin ≤ 50 mg);

Publikationen

D. Fuerst, S. Parmar, C. Schumann, S. Rüdiger, S. Boeck, V. Heinemann, V. Kaechele, K. Stiebel, T. Paul, T. Seufferlein, J. Mytilineos, and J. C. Stingl, "HLA polymorphisms influence the development of skin rash arising from treatment with EGF receptor inhibitors," *Pharmacogenomics*, vol. 13, no. 13, pp. 1469–1476, Oct. 2012.

K. Probst-Schendzielorz, C. Scholl, O. Efimkina, E. Ersfeld, R. Viviani, A. Serretti, C. Fabbri, D. Gurwitz, S. Lucae, M. Ising, A. M. Paul, M.-L. Lehmann, M. Steffens, C. Crisafulli, M. Calabrò, F. Holsboer, and J. Stingl, "CHL1, ITGB3 and SLC6A4 gene expression and antidepressant drug response: results from the Munich Antidepressant Response Signature (MARS) study.," *Pharmacogenomics*, pp. 1–13, May 2015.

K. Probst-Schendzielorz, R. Viviani, and J. C. Stingl, "Effect of Cytochrome P450 polymorphism on the action and metabolism of selective serotonin reuptake inhibitors.," *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, pp. 1–14, Jun. 2015.

J. Breitfeld, C. Scholl, M. Steffens, K. Brandenburg, K. Probst-Schendzielorz, O. Efimkina, D. Gurwitz, M. Ising, F. Holsboer, S. Lucae, and J. C. Stingl, "Proliferation rates and gene expression profiles in human lymphoblastoid cell lines from patients with depression characterized in response to antidepressant drug therapy," *Translational Psychiatry*, vol. 6, no. 11, pp. e950–e950, Nov. 2016.

Poster Präsentationen

Kristina Stiebel, Eva Ersfeld, Susanne Lucae, Marcus Ising, Julia Stingl „Lymphoblastoid Cell Lines as Models for Pharmacogenomics" , *28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology* (Stockholm, 2012)

Eva Ersfeld, Kristina Stiebel, Susanne Lucae, Marcus Ising, Julia Stingl „Lymphoblastoid Cell Lines as Models for Pharmacogenomics in Psychopharmacology", *28th CINP World Congress of Neuropsychopharmacology* (Stockholm, 2012)