

Fakultät für Medizin

**Pharmakogenetische und epigenetische Untersuchungen
ausgewählter Gene zur Individualisierung der Arzneimitteltherapie**

Charlotte Roswitha Schröder

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Stefan Engelhardt

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Jürgen Ruland
2. Prof. Dr. Frank Johannes

Die Dissertation wurde am 30.04.2018 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 05.11.2019 angenommen.

Danksagung

Prof. Dr. Werner Steimer danke ich für die interessante Themenstellung, das großzügige Vertrauen in meine Arbeit und die wissenschaftlichen Anregungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn *Prof. Dr. Jürgen Ruland* für die Möglichkeit dieser Dissertation an dem von ihm geleiteten Institut durchzuführen, sowie für die Bereitschaft diese Promotion als Erstgutachter zu betreuen.

Prof. Dr. Jerzy Adamski danke ich für die Teilnahme an den Feedback-Gesprächen. *Prof. Dr. Frank Johannes* danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn *Prof. Dr. Leucht* sowie allen an der Datengenerierung beteiligten Ärzten danke ich für die Betreuung der Studie an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar, sowie die Bereitstellung der Studiendaten.

Dr. Dr. Christof Winter, Dr. Andreas Bietenbeck und insbesondere *Dr. Silvia Thöne* danke ich für die zahlreichen erlösenden Ratschläge und die immerwährende Hilfe in allen Belangen. *Ramona Secci* möchte ich für das schnelle und zuverlässige Vermessen meiner Proben an der ddPCR danken.

Dr. Fabian Czerwensky und *Ruoyu Sun* danke ich für die Einarbeitung. Zudem möchte ich mich bei *Anita Schreiegg, Christine Grubmüller, Caroline Wallner* und *Christine Uhlich* für die ausgezeichnete Unterstützung sowie die nette Arbeitsatmosphäre im PCR-Labor des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie. Vielen Dank für die stets aufmunternden Worte.

Robert Niemuth möchte ich für die Möglichkeit danken, Teilzeit in der Sterilabteilung der Bahnhof Apotheke Puchheim zu arbeiten und mir somit die Doktorarbeit zu finanzieren. Dem gesamten Team vielen Dank für die tolle Zusammenarbeit und die Ablenkung neben der Promotion.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Familie für die große moralische und finanzielle Unterstützung. Besonderer Dank gilt meinem Mann *Arne Schröder*. Vielen Dank für die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge, die vielen Stunden Korrekturlesen dieser Arbeit aber vor allem einfach für deine Anwesenheit und dass du mir mit deiner Liebe immer wieder gezeigt hast, dass es noch wichtigere Dinge im Leben gibt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abstraktum	I
Abstract	III
1 Einleitung	1
1.1 <i>Identifizierung von Markern in Bezug auf die Antipsychotika-vermittelte Gewichtszunahme</i>	1
1.1.1 Klassifizierung und Krankheitsbild von Psychosen	1
1.1.2 Antipsychotika-Therapie	3
1.1.3 Pharmakogenetik	7
1.1.3.1 Polymorphismen in der Antipsychotika-induzierten Gewichtszunahme.....	12
1.1.3.2 Kandidatengene und Polymorphismen	13
1.1.4 Epigenetik	18
1.1.4.1 Bedeutung von 5-Methylcytosin	19
1.1.4.2 Hypoxia-inducible factor 3 alpha (HIF3A)	20
1.1.4.3 Stabilität von 5-Methylcytosin.....	22
1.1.5 Ziel der Studie	23
1.2 <i>Identifizierung von pharmakogenetischen Einflüssen auf die Therapie von Morbus Alzheimer</i>	25
1.2.1 Krankheitsbild des Morbus Alzheimer	25
1.2.2 Donepezil in der Alzheimer-Therapie	26
1.2.3 Das Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6).....	27
1.2.4 Ziel der Studie	28
2 Material und Methoden	29
2.1 <i>Beschreibung der Antipsychotika-Studie</i>	29
2.1.1 Studiendesign	29
2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	29
2.1.3 Datenerhebung	30
2.2 <i>Beschreibung der Alzheimer-Studie</i>	32
2.3 <i>Statistische Auswertung</i>	33
2.4 <i>Analyse genetischer Marker</i>	35
2.4.1 DNA Extraktion.....	36
2.4.2 Sonden-basierte Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion am LightCycler	36

2.4.3	Konventionelle PCR am Thermocycler	39
2.4.4	Enzymatischer Verdau.....	41
2.4.5	Allel-spezifische PCR	42
2.4.6	Gelelektrophorese	42
2.4.7	Konstruktion der Primer	43
2.4.8	Konstruktion der Sonden	44
2.4.9	Optimierung der PCR Bedingungen	45
2.4.10	Allgemeiner Ablauf und Durchführung einer Genotypisierungsreaktion	46
2.4.11	Nachweis genetischer Polymorphismen im Rahmen der Antipsychotika-vermittelter Gewichtszunahme	48
2.4.11.1	rs6971 und rs6973 Polymorphismus (TSPO)	48
2.4.11.2	rs8087522 Polymorphismus (MC4R)	54
2.4.11.3	rs6435326, rs1801318 und rs1053517 Polymorphismus (NDUFS1).....	56
2.4.11.4	rs7185735 und rs17817288 Polymorphismus (FTO)	64
2.4.11.5	rs9939609 Polymorphismus (FTO)	70
2.4.12	Nachweis genetischer Polymorphismen im Rahmen der Alzheimer-Studie	71
2.5	<i>Analyse epigenetischer Marker</i>	72
2.5.1	Bisulfit-Konvertierung	73
2.5.2	Konstruktion der Primer	74
2.5.3	Pyrosequenzierung am GS Junior	76
2.5.4	Droplet Digital PCR.....	79
2.5.5	Konstruktion der Sonden für die Droplet Digital PCR	80
2.5.6	Durchführung der Methylierungsbestimmung von HIF3A mittels Pyrosequenzierung am GS Junior	82
2.5.7	Durchführung der Methylierungsbestimmung von HIF3A mittels Droplet Digital PCR	87
2.5.8	Bestimmung der Stabilität von 5'-Methylcytosin in Blutproben.....	90
3	Ergebnisse	91
3.1	<i>Genotypisierungsmethoden</i>	91
3.2	<i>Methoden zur Methylierungsbestimmung</i>	93
3.3	<i>Charakterisierung der Antipsychotika-Studienpopulation</i>	94
3.3.1	Demographische Beschreibung	94
3.3.2	Medikation	98
3.3.3	Gewichtsentwicklung der Studienpopulationen.....	100
3.3.4	Klinische Einflussfaktoren und Wechselwirkungen	101
3.4	<i>Genotypisierungen der Antipsychotika-Population</i>	104
3.4.1	Exemplarisches Vorgehen	104

3.4.2	Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf die Gewichtszunahme	105
3.4.2.1	rs6971 und rs6973 Polymorphismus (TSPO)	105
3.4.2.2	rs8087522 Polymorphismus (MC4R)	112
3.4.2.3	rs6435326, rs1801318 und rs1053517 Polymorphismus (NDUFS1).....	115
3.4.2.4	rs7185735 und rs17817288 Polymorphismus (FTO)	120
3.4.2.5	rs7185735 und rs9939609	129
3.4.3	kombinierte Auswertung: FTO rs7185735 und MC4R rs17782313.....	131
3.5	<i>Genotypisierung der Alzheimer-Population</i>	134
3.5.1	Charakterisierung der Studienpopulation.....	134
3.5.2	Ergebnisse der Genotypisierung der Alzheimer-Population	134
3.6	<i>Bestimmung der Methylierungslevel</i>	137
3.6.1	Qualität der Sequenzierläufe	137
3.6.2	Vergleich GS Junior – Droplet Digital PCR	148
3.6.3	Methylierung von HIF3A	153
3.6.4	Stabilität von Methylcytosin	161
4	Diskussion	171
4.1	<i>Klinische Interaktionen und Wechselwirkungen</i>	171
4.2	<i>pharmakogenetische Einflüsse auf die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme</i>	174
4.2.1	TSPO	174
4.2.2	MC4R.....	176
4.2.3	NDUF1 rs6435326, rs1053517 und rs1801318	178
4.2.4	FTO	179
4.2.5	Kombination der Risikoallele von FTO und MC4R.....	183
4.3	<i>pharmakogenetische Einflüsse auf die Therapie von Morbus Alzheimer</i>	185
4.4	<i>Bestimmung der Methylierungslevel</i>	186
4.4.1	Qualität der Sequenzierläufe	186
4.4.2	Vergleich GS Junior – Droplet Digital PCR	189
4.4.3	Methylierung von HIF3A	192
4.4.4	Stabilität von Methylcytosin	196
5	Zusammenfassung	201
6	Abkürzungsverzeichnis	205
7	Literaturverzeichnis	209

8	Publikationen	225
9	Anhänge	226
9.1	<i>Übersicht über die verwendeten Reagenzien, Geräte und Software</i>	226
9.2	<i>Selbst- und Fremdbeurteilungsskalen</i>	230
9.2.1	Paranoid-Depressivitäts-Skala	230
9.2.2	Clinical-Global-Impressions-Skala	232
9.2.3	Dosage Record and Treatment Emergent Symptom	233
9.3	<i>Häufigkeiten der untersuchten Polymorphismen</i>	234
9.4	<i>Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden für die Genotypenbestimmung</i>	235
9.5	<i>Übersicht über die verwendeten Primer für die Sequenzierung</i>	237
9.6	<i>Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden für die ddPCR.....</i>	238
9.7	<i>Messdaten ddPCR.....</i>	239
9.8	<i>Stabilitätsreihe für einzelne CpG-Stellen.....</i>	251

Abstraktum

Schwerpunkt dieser Promotionsarbeit war die Identifizierung von genetischen und epigenetischen Markern zur Vorhersage der Gewichtsentwicklung unter Therapie mit Antipsychotika der zweiten Generation. Hierfür wurden neue molekularbiologische Tests entwickelt mit dem Ziel, diese in der klinischen Praxis einzusetzen.

Psychische Erkrankungen haben in der heutigen Gesellschaft eine zunehmende Prävalenz. Eine Einschränkung in der Therapie ist die Gewichtszunahme, die häufig als Nebenwirkung einer Psychopharmaka-Behandlung auftritt. Hieraus resultieren oft ernsthafte Folgeerkrankungen sowie eine schlechte Adhärenz und somit das Ausbleiben des Therapieerfolgs. Ziel dieser Arbeit war daher, potenzielle Risikomarker für die Ausbildung einer Gewichtszunahme zu identifizieren und Empfehlungen für eine mögliche psychiatrische Arzneimitteltherapie auf Grundlage von pharmakogenetischen und -epigenetischen Untersuchungen zu erarbeiten. Anhand einer Studienpopulation von 350 psychisch erkrankten Patienten wurden insgesamt acht verschiedene Polymorphismen sowie das Methylierungsmuster eines Abschnitts des HIF3A-Gens untersucht. Diese Marker wurden in vorangegangenen Studien bereits mit Übergewicht im Allgemeinen in Verbindung gebracht und sollten nun auf einen möglichen Einfluss auf die Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie in einer klinischen Population untersucht werden. Neben dem Polymorphismus rs9939609 des FTO-Gen konnte im Rahmen dieser Untersuchung erstmals rs7185735 im gleichen Gen als vielversprechender Risikomarker identifiziert werden. Eine kombinierte Betrachtung der Risikoallele dieser Marker und des MC4R-Gens, das bereits in vorangegangenen Untersuchungen als Risikofaktor identifiziert worden war, zeigte einen additiven Effekt. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Erfolg in Richtung individualisierter Psychopharmaka-Therapie zur Vermeidung von Gewichtszunahme.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Überprüfung der Alzheimer-Therapie mit Donepezil. Hierfür wurden CYP2D6-Genotypisierungen der Patienten durchgeführt. Anhand unserer Ergebnisse konnte die Arbeitsgruppe von Prof Grimmer der Technischen Universität München untersuchen, ob eine individualisierte Dosierung auf Grundlage genetischer Faktoren gegenüber der zurzeit üblichen Standarddosierung Vorteile bringt.

Im Rahmen der epigenetischen Untersuchungen wurde zudem die Stabilität der Methylierung in Blutproben getestet. Derzeit verwenden viele Studien gelagertes Probenmaterial ohne jedoch mögliche, lagerungsbedingte Veränderungen zu hinterfragen. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass methylierte DNA im Vergleich zu unmethylierter stabiler ist. Nach einer Lagerung von zehn Monaten zeigte

die Analyse für das HIF3A-Gen höhere Methylierungswerte. Diese Untersuchungen sind ein wesentlicher Beitrag, um die Verlässlichkeit epigenetischer Studien sicher zu stellen.

Abstract

The focus of this doctoral thesis was the identification of genetic and epigenetic markers to predict weight gain under therapy with second-generation antipsychotics. Therefore, we developed new molecular biology tests with the aim of employing them in clinical practice.

Modern society is characterized by an increasing prevalence of mental disorders. One limitation faced in therapy is weight gain, which often occurs as a side effect of treatment with antipsychotics. This often results in serious complications as well as poor compliance, and consequently, in an absence of therapeutic success. The aim of this thesis was therefore to identify potential risk markers for weight gain and to develop guidelines for the therapy with antipsychotics based on pharmacogenetic and epigenetic studies. Based on a study population of 350 patients with mental disorders, eight different polymorphisms as well as the methylation pattern of a section of the HIF3A gene were investigated. Previous studies had already associated these markers with obesity in general and should now be analyzed for a possible effect on weight gain as side effect of antipsychotic therapy in a clinical population. In addition to the polymorphism rs9939609 of the FTO gene, we identified rs7185735 of the same gene as a promising risk marker for the first time. A combined consideration of risk alleles of these markers and of MC4R gene, which had already been identified as a risk factor in previous studies, demonstrated an additive effect. These results are a further success towards individualized antipsychotic therapy to prevent weight gain.

Another aspect of this thesis was the examination of Alzheimer's therapy with donepezil. Therefore, we conducted CYP2D6 genotyping of these patients. With the help of our results, the group of Prof. Grimmer of the Technical University of Munich was able to investigate, whether an individual dosage based on genetic factors is beneficial with respect to therapeutic response compared to the current standard dosage.

As part of the epigenetic studies, we also tested the stability of methylation in blood samples. At present, many studies use stored sample material, however without questioning potential storage-related modifications. Our results suggest that methylated DNA is more stable than unmethylated. After storage for ten months, the analysis of the HIF3A gene revealed higher methylation values. These investigations represent a major contribution to ensure the reliability of epigenetic studies.

1 Einleitung

1.1 Identifizierung von Markern in Bezug auf die Antipsychotika-vermittelte Gewichtszunahme

1.1.1 Klassifizierung und Krankheitsbild von Psychosen

Als Psychosen werden psychische Erkrankungen bezeichnet, die mit einem zeitweiligen Realitätsverlust einhergehen. Dabei ist Psychose als Überbegriff zu verstehen, der eine Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder umfasst. Psychosen können zum einen organische Ursachen haben, d.h. die Psychose entsteht als Folge einer Grunderkrankung wie z.B. einer Demenz oder einem Tumor. Bei nicht-organischen Psychosen ist die Ursache nicht so einfach zu erklären. Hierzu zählen schizophrene und affektive Psychosen. Genetische Prädisposition aber auch psychische Stressfaktoren oder Störungen der Kindheit werden als mögliche Risikofaktoren für die Entwicklung einer Psychose diskutiert.¹⁻⁶

Zwillingsstudien sowie auffällige familiäre Häufungen haben gezeigt, dass genetische Faktoren einen großen Anteil an der Prävalenz von Psychosen haben müssen.^{7, 8} Allerdings ist die Datenlage hier sehr komplex. Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) postulieren regelmäßig neue Genorte als Risikofaktoren für die Entstehung der Schizophrenie.⁹⁻¹¹ Ripke et al. schätzen, dass bis zu 8.300 unabhängige Polymorphismen zum Auftreten der Schizophrenie beitragen.¹²

Die Behandlung erfolgt optimaler Weise durch eine Kombination aus pharmakologischer und Psychotherapie. Neuroleptika sind dabei sowohl zur Akutbehandlung als auch zur Prophylaxe Mittel der Wahl. Sozialtherapeutische Maßnahmen beeinflussen die Heilungschancen positiv. Pauschalisiert lässt sich bei der Prognose die 1/3 Regel anwenden: Bei ca. einem Drittel der Erkrankten kann eine Heilung oder eine deutliche Besserung der Symptome erreicht werden, bei einem weiteren Drittel bleibt der Krankheitszustand weitgehend unverändert und ein weiteres Drittel zeigt eine deutliche Verschlechterung.¹³

Im Rahmen dieser Studie wurden nur Patienten mit nichtorganischen Psychosen berücksichtigt. Im Folgenden soll daher auf die verschiedenen Formen der nichtorganischen Psychose genauer eingegangen werden:

Schizophrene Psychosen

Schizophrene Psychosen finden sich in der Internationalen Klassifikation der Krankheiten Version 10 (ICD-10) unter den Kapiteln F20-F29 (Schizophrenie, schizotype und wahnhaftige Störungen). Eine Psychose kann prinzipiell nicht mit einer Schizophrenie gleichgesetzt werden, die Klassifizierung ist jedoch oft nicht eindeutig. Auch der Begriff Schizophrenie beschreibt eine sehr heterogene Gruppe von psychischen Erkrankungen. In Deutschland sowie auch weltweit leiden ca. 0,5-1% der Bevölkerung unter diesem Krankheitsbild.^{14, 15}

Der Begriff Schizophrenie wird oft zu Unrecht mit einer Persönlichkeitsspaltung in Verbindung gebracht. Dies muss nicht immer der Fall sein. Eine schizophrene Psychose äußert sich in der Regel durch eine sogenannte Positivsymptomatik. Der Betroffene hat Wahnvorstellung, Halluzinationen und ein gestörtes Selbstbild. Er isoliert sich und leidet auch oft unter Schlaf- und Konzentrationsproblemen. Dazu kommt die Negativsymptomatik, die durch Antriebs- und Kommunikationsarmut und kognitive Defizite geprägt ist.¹⁴

Auf biochemischer Ebene geht man davon aus, dass sich schizophrene Psychosen aus einer Störung des Stoffwechsels von Neurotransmittern, vor allem Dopamin, heraus manifestieren. Dabei werden Gehirnregionen mit einer Überstimulation von Dopamin-Rezeptoren für die Positivsymptomatik, Regionen mit einer Unterstimulation für die Minussymptomatik verantwortlich gemacht.¹⁶

Affektive Psychosen

Affektive Psychosen gehören nach ICD-10 Klassifikation zu den affektiven Störungen (F30-F39). Hier leiden die Betroffenen unter extremen Stimmungen. Am Häufigsten ist hier die unipolare Depression: Antriebslosigkeit, emotionale Gleichgültigkeit und der komplette Verlust der Aktivität sind hierfür typisch. Laut Daten des Robert Koch Instituts liegt die Wahrscheinlichkeit in Europa im Laufe des Lebens an einer Depression zu erkranken bei ca. 19%, Tendenz steigend.¹⁷ Allerdings werden nur sehr schwere Depressionen auch zu den Psychosen gezählt. Der Übergang ist jedoch auch hier fließend. Seltener treten unipolare Hochstimmungen, sogenannte Manien, auf. Sie sind gekennzeichnet durch Größenwahn, Selbstüberschätzung und Hyperaktivität. Leidet der Patient unter bipolaren Störungen erlebt er einen ständigen Wechsel zwischen den Stimmungsextremen.¹⁸

Auch bei diesem Krankheitsbild liegt ein Ungleichgewicht verschiedener Neurotransmitter vor, was sich auch in der Psychopharmakotherapie widerspiegelt. Depressive Stimmungen werden in der Regel mit Antidepressiva (z.B. trizyklische Antidepressiva, Serotonin- und/oder Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer), Manien hingegen mit Neuroleptika behandelt.¹⁹

Weitere Krankheitsbilder, die sich in geringerem Umfang in der Studienpopulation wieder fanden und die einen Einsatz von Antipsychotika der 2. Generation notwendig machten, können nur eingeschränkt den Psychosen zugeordnet werden. Zu ihnen zählen zum einen **neurotische, Belastungs- und somatoforme Störungen** (ICD-10: F40-F48). Dies sind psychische Störungen die in Verbindung mit Störungen des Sozialverhaltens auftreten wie z.B. Phobien, Angst-, Zwangs- und Anpassungsstörungen. Des Weiteren traten **Verhaltensauffälligkeiten mit körperlichen Störungen und Faktoren** (ICD-10: F50-F59) auf. Hierzu gehören unter anderem Ess- und Schlafstörungen. Ein weiteres Krankheitsbild waren **Persönlichkeits- und Verhaltensstörungen** (ICD-10: F60- F69). Dies sind klinisch auffällige meist länger anhaltende Zustandsbilder und Verhaltensmuster. Sie spiegeln sich in gegenüber der Allgemeinbevölkerung deutlichen Abweichungen im Wahrnehmen, Denken, Fühlen und in den Beziehungen zu anderen wieder. Oft entstehen sie aus persönlichem Leiden und negativen sozialen Erfahrung heraus.²⁰

1.1.2 Antipsychotika-Therapie

Antipsychotika, auch als Neuroleptika bezeichnet, sind Arzneistoffe aus der Gruppe der Psychopharmaka und haben eine antipsychotische Wirkung. Hauptsächlich werden sie bei Manien und schizophrenen Störungen eingesetzt, aber auch bei anderen psychischen Erkrankungen wie z.B. Depressionen und Autismus gewinnen sie immer mehr an Bedeutung.²¹⁻²³

Aus historischer Sicht lassen sich die Antipsychotika in zwei Gruppen einteilen: Die frühen Vertreter der Antipsychotika werden gerne als typische Antipsychotika (Typika) bezeichnet. Zu ihnen gehören unter anderem Chlorpromazin, das 1950 der erste zugelassene Vertreter dieser Substanzklasse war, sowie Haloperidol, Melperon und Perphenazin. Rund 20 Jahre später kamen die atypischen Antipsychotika (Atypika) auf den Markt. Hierzu zählen unter anderem Clozapin, Olanzapin, Risperidon, Amisulprid, Quetiapin und Paliperidon.^{19, 24} Diese Aufteilung erfährt heutzutage eine immer größere Erweiterung und Aufweichung, sodass viele Ärzte und Wissenschaftler mittlerweile zu einer Abkehr

von dieser Einteilung raten. Gerhard Gründer bevorzugt im Handbuch der Psychopharmakotherapie die Unterscheidung in Antipsychotika der ersten und zweiten Generation, wobei auch bei dieser Einteilung Substanzen mit sehr unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften zusammengefasst werden.²⁴ Im Rahmen dieser Arbeit wird die Einteilung in typische und atypische bzw. Antipsychotika der ersten und zweiten Generation zum einfacheren Verständnis weiterhin verwendet.

Leucht et al. stellte ebenfalls diese vorherrschende Zweigruppeneinteilung in Frage und versuchte daher in Hinblick auf ihre Wirkung und Nebenwirkung eine Rangordnung der einzelnen Substanzen zu erstellen.²⁵ In einer Meta-Analyse verglich er 15 verschiedene Antipsychotika miteinander. Alle Antipsychotika waren effektiver als Placebo, sodass deren Wirksamkeit und Nutzen nicht angezweifelt werden sollte. Die Unterschiede in der Wirksamkeit zwischen den einzelnen Antipsychotika waren dabei minimal, jedoch unterschieden sich die einzelnen Medikamente stark in ihrem Nebenwirkungsprofil.

Prinzipiell lassen sich Wirkung und Nebenwirkung von Antipsychotika auf ihre Affinität gegenüber bestimmten Neurorezeptoren zurückführen. **Tabelle 1** gibt eine Übersicht über die wichtigsten Angriffspunkte und den entsprechenden Auswirkungen der Antipsychotika. Ihnen gemeinsam ist eine antagonistische Wirkung am Dopamin₂ (D₂)-Rezeptor. Diese Dopamin-Rezeptorblockade ist verantwortlich für die antipsychotische Wirkung.²⁶ Die Wirkung der Typika ist dabei jedoch nicht besonders spezifisch. Sie erstreckt sich auf das gesamte dopaminerge System, was starke extrapyramidale motorische Störungen (EPMS) zur Folge hat. EPMS sind gekennzeichnet durch Störungen des Bewegungsablaufs, wie z.B. Rigor, Tremor und Akinesie.^{19, 24}

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Targets von Antipsychotika und den wichtigsten entsprechenden Auswirkungen nach Holsboer et al.²⁴

Rezeptor	erwünschte Wirkung	unerwünschte Wirkung
Dopamin₂ (D₂)	antipsychotisch	EPMS, Prolaktinerhöhung, sexuelle Dysfunktion, antiemetisch
Dopamin₁ (D₁)	antipsychotisch	EPMS (fraglich)
Dopamin₄ (D₄)	verringerte EPMS, antipsychotisch	
Serotonin (5-HT₂)	verringerte EPMS, antidepressiv/Wirkung gegen Negativsymptomatik	Appetit-, Gewichtszunahme, Sedation
Muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mACh)	verringerte EPMS	Mundtrockenheit, Obstipation, Glaukom, Tachykardie, Verwirrung/Delirium
α₁-Adrenorezeptor		Sedierung, Schwindel, Blutdruckabfall
α₂-Adrenorezeptor		Sedierung, Schwindel, Blutdruckabfall
Histamin (H₁)	Sedation	Müdigkeit, Sedation, Gewichtszunahme

Diese Nebenwirkung ist bei den Atypika weniger stark ausgeprägt, was auch zu dieser Namensgebung geführt hat. Diese Substanzgruppe zeichnet sich zudem durch ein erweitertes Wirkprofil an weiteren Neurorezeptoren aus (z. B. Serotonin-, Histamin-, Noradrenalin-Rezeptor).²⁴ Daraus leitet sich zum einen eine zusätzliche antidepressive Wirkung und somit ein möglicher Einsatz bei der Minussymptomatik ab. Zum anderen sind im Gegensatz zu Typika andere Nebenwirkungen stärker ausgeprägt. Eine sehr ausgeprägte Nebenwirkung, die auch oft limitierend für die Therapie mit Antipsychotika der zweiten Generation sein kann, ist die Gewichtszunahme. Sie ist vor allem bei der Therapie mit Clozapin und Olanzapin stark ausgeprägt.²⁵ Eine Übersicht über die verschiedenen, in dieser Studienpopulation eingesetzten atypischen Antipsychotika mit ihren Rezeptoraffinitäten ist in **Tabelle 2** dargestellt. Nur für Paliperidon konnten keine vergleichbaren Daten gefunden werden. Die Vor- und Nachteile der in dieser Population am häufigsten verwendeten Neuroleptika zeigt **Tabelle 3**.

Tabelle 2: Relative Affinität der in der Studienpopulation verschriebenen Antipsychotika der zweiten Generation bei therapeutischen Dosen zu ausgewählten Neurorezeptoren basierend auf Miyamoto et al.²⁷ (- = minimale bis keine Affinität; + = niedrig; ++ = mittel; +++ = hoch; ++++ = sehr hoch)

Antipsychotikum	Rezeptor							
	D ₂	D ₁	D ₄	5-HT _{2A}	mACh	α ₁	α ₂	H ₁
Clozapin	+	+	++	+++	++++	+++	+	+++
Olanzapin	++	++	++	+++	+++	+++	+	+++
Risperidon	+++	+	-	++++	-	+++	++	-
Amisulprid	++++	-	-	-	-	-	-	-
Quetiapin	+	-	-	++	++	+++	-	++
Ziprasidon	+++	+	++	++++	-	++	-	-
Aripiprazol	++++	-	+	+++	-	+	+	+
Sertindol	+++	++	+	++++	-	++	+	+

Die Wirkung von Antipsychotika setzt etwas verzögert nach mehreren Tagen bis zu mehreren Wochen ein und manifestiert sich erst langsam, obwohl eine Rezeptorblockade des Dopamin-Rezeptors direkt nachweisbar ist. Dies wird erklärt durch die Blockade der präsynaptischen, die Freisetzung von Dopamin hemmenden Dopamin-Rezeptoren. Dadurch erfolgt initial eine gesteigerte Dopamin-Freisetzung. Erst nach längerer Behandlungsdauer wird die Dopamin-Freisetzung wieder gemindert und der antagonistische Effekt der Antipsychotika an der postsynaptischen Membran kommt immer stärker zum Tragen.¹⁹

Tabelle 3: Vor- und Nachteile der in dieser Studienpopulation verschriebenen atypischen Antipsychotika nach Aktories et al.¹⁹

Antidepressivum	Vorteile	Nachteile
Clozapin	kaum EPMS, Wirkung gegen Negativsymptomatik, 30-60% Wirksamkeit bei sonst therapieresistenter Schizophrenie	Gefahr der Agranulozytose, Sedierung, ausgeprägte Gewichtszunahme
Olanzapin	selten EPMS, Wirkung gegen Negativsymptomatik	ausgeprägte Gewichtszunahme, erhöhte Blutfettwerte
Quetiapin	selten EPMS, Wirkung gegen Negativsymptomatik	ausgeprägte Sedierung
Amisulprid	selten EPMS, Wirkung gegen Negativsymptomatik, kaum Sedierung	erhöhte Prolaktinsekretion
Risperidon	selten EPMS, Wirkung gegen Negativsymptomatik, Depotformulierung verfügbar	Blutdruckabfall
Aripiprazol	selten EPMS, Wirkung gegen Negativsymptomatik, geringe Gewichtszunahme	im Einzelfall verschlechterte psychotische Symptomatik

1.1.3 Pharmakogenetik

Die Pharmakogenetik beschäftigt sich mit dem Einfluss genetischer Faktoren auf die Arzneimitteltherapie und ermöglicht so im besten Fall eine Vorhersage auf die individuelle Wirkung eines Medikaments im Körper. Solche genetischen Faktoren sind in erste Linie Mutationen in Genen, die direkt oder indirekt über ihre Transkriptionsprodukte mit dem Arzneistoff interagieren. Diese Interaktion lässt sich in Pharmakokinetik und Pharmakodynamik unterscheiden (**Abbildung 1**). Die Pharmakokinetik beschreibt den Einfluss des Organismus auf das Arzneimittel, also Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Eliminierung. Die Pharmakodynamik behandelt die Wirkung des Arzneimittels auf den Körper (Wirkung und Nebenwirkung).

Genetische Variationen lassen sich auf Mutationen zurückführen, sodass verschiedene Varianten eines Gens (Allele) entstehen. Sie werden in Gen-, Chromosom- und Genommutationen unterteilt. Der Einzelbasenaustausch oder *Single* Nukleotid Polymorphismus (SNPs) stellt dabei die häufigste Gen-

mutation dar. Andere Genmutationen sind Insertionen, Deletionen sowie Abweichungen der Kopienanzahl ganzer Genabschnitte (copy number variants). Mutationen, die in der Bevölkerung eine Häufigkeit von mindestens 1% aufweisen, bezeichnet man als Polymorphismen. Sie lassen sich zum Beispiel auf Schädigungen oder Anpassungen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) durch äußere Einflüsse (z.B. ultraviolettes [UV-] Licht oder Chemikalien) oder auf Fehler bei der Genreplikation, die anschließend vererbt wurden, zurückführen.²⁸ Die Auswirkungen einer solchen Mutation sind oft nur schwer vorauszusagen. *Missense*-Mutationen oder nicht-synonyme Mutationen führen zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des codierten Gens. Dies kann die Proteinfunktion beeinflussen. Außerdem gibt es sogenannte stille Mutationen die keine sichtbare Auswirkung auf das Genprodukt haben. Allerdings können diese je nach Lage der Mutation Einfluss auf die Transkription oder die Stabilität der *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) haben.^{29, 30}

Auf derartige Variationen des Genoms lassen sich teilweise bestimmte Krankheiten bzw. ein erhöhtes Krankheitsrisiko zurückführen. So führt bei der Sichelzellanämie eine bestimmte Punktmutation im β -Globin-Gen bei homozygoten Merkmalsträgern immer zu dieser spezifischen Blutbildungsstörung.³¹ Bestimmte Varianten des Brustkrebsgens 1 (BRCA) gehen mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einher.³² Auch bei der Entstehung von Psychosen und Schizophrenie werden genetische Varianten als Ursache diskutiert (siehe **Kapitel 1.1.1**). Aus Mutationen können aber auch individuelle Unterschiede bezüglich der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Arzneistoffen resultieren. Pharmakokinetische Schwankungen werden z.B. durch genetisch bedingte Aktivitätsunterschiede von Cytochrom P450 (CYP)-Enzymen hervorgerufen, die für die Metabolisierung und den Abbau vieler Arzneistoffe verantwortlich sind. Über CYP2D6 und CYP1A2 werden viele psychotrope Substanzen verstoffwechselt.³³ Neben dem Wirkstoffabbau kann auch der Arzneistofftransport durch genetische Veränderungen beeinträchtigt sein. Schon der Austausch zweier Nukleotide in der Sequenz des *ATP binding cassette* (ABC)-Transportergens ABCB1 kann sich auf die Plasmaspiegel häufig verabreichter Xenobiotika, wie z.B. Digoxin und Fexofenadin auswirken.^{34, 35} Auch Mutationen am Zielort sind denkbar. Die Krebsmedikament Erlotinib, Cetuximab und Panitumumab greifen über Interaktion mit dem humanem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-Rezeptor in das Zellwachstum von Krebszellen ein. Allerdings ist ihre Anwendung auf bestimmte Genvarianten beschränkt. Während Erlotinib bei Vorliegen der L858R-Mutation am effektivsten wirkt, ist eine Behandlung mit Cetuximab und Panitumumab nur bei nicht mutiertem *Ras*-Gen sinnvoll.³⁶⁻³⁸

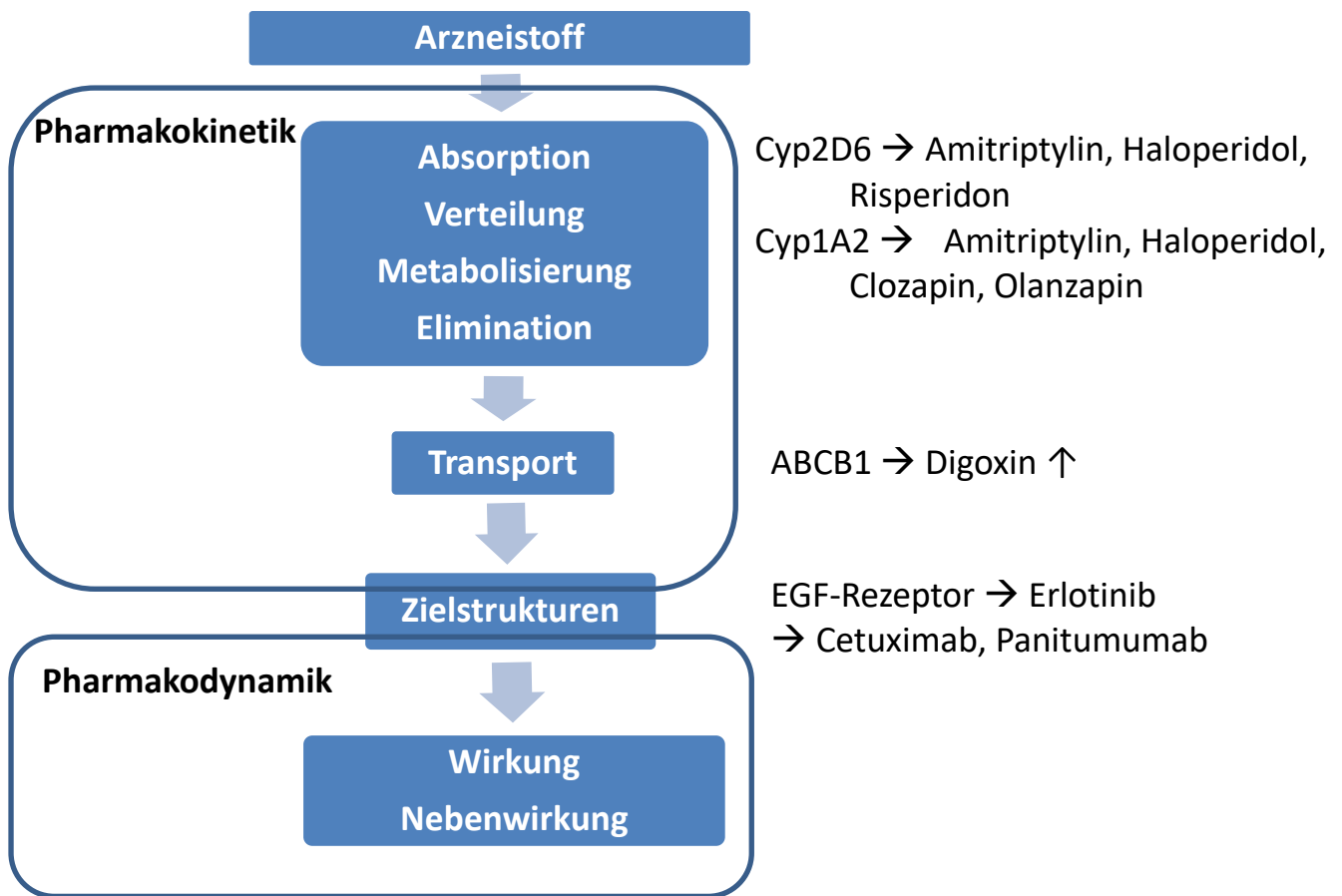


Abbildung 1: Pharmakogenetische Mechanismen variabler Arzneistoffwirkungen mit Beispielen.

Die Pharmakogenetik bietet daher über eine Individualisierung der Arzneimitteltherapie ein Instrument ineffektive und somit unnötige Therapien zu vermeiden. Aber auch Therapien, die für manche Menschen mit zu vielen Nebenwirkungen behaftete sind, können direkt durch Alternativen ersetzt werden. Ebenso lässt sich die optimale Dosierung über Pharmakogenetik bestimmen. Dieses Vorgehen führt nicht nur zu einer Erleichterung für den Patienten, sondern kann auch erhebliche Kosten, die durch Therapieabbrüche und schwere Nebenwirkungen entstehen, einsparen.³⁹

Neben der genetischen Variabilität haben auch epigenetische Veränderungen einen wichtigen Anteil an individuell unterschiedlichem Ansprechen auf Arzneimittel.⁴⁰ Hierbei handelt es sich um erbliche aber auch durch äußere Faktoren hervorgerufene Veränderungen des Phänotyps einer Zelle oder eines Organismus, die nicht durch deren Genotyp verursacht werden. Sie äußern sich durch Modifikationen an Histonen bzw. DNA in Form von Alkylierungen, Ubiquitinierung und Phosphorylierung. Nach heutigem Kenntnisstand führen sie in erster Linie zu Veränderungen der Genexpression (siehe **Kapitel 1.1.4**).^{41, 42}

Pharmakogenetischer Wissenstand

Die Pharmakogenetik ist ein wachsendes Feld. Die ersten Beobachtungen zur unterschiedlichen Wirkdauer von Arzneimitteln stammen aus den 50iger Jahren. Damals suchten erste Studien in der Genetik nach möglichen Ursachen.^{43, 44} Seit 1950 hat sich auf diesem Gebiet viel getan. Das zunehmende Verständnis des menschlichen Genoms und der biochemischen Prozesse von Krankheiten treibt auch die pharmakogenetische Forschung voran. Zudem bietet die Entwicklung neuer Methoden, wie das *Next Generation Sequencing* (NGS) immer weitreichendere Möglichkeiten. Aufgrund der immer schneller und kostengünstiger werdenden Sequenzierung des gesamten Genoms nehmen pharmakogenetische Daten in Bezug auf Pathogenese und Arzneimittelwirkung von Krankheiten exponentiell zu.⁴⁵

Ein Gebiet, auf dem pharmakogenetische Untersuchungen weit verbreitet sind, ist die Tumorthherapie. So findet bereits seit den 1980er Jahren Tamoxifen nur bei Vorhandensein eines Östrogen-Rezeptor positiven Brustkrebs Anwendung.⁴⁶ Im Jahr 1998 wurde Trastuzumab, ein spezifischer Antikörper gegen Her-2-Rezeptoren, welcher nur bei Überexpression dieser Rezeptorart Verwendung findet, in Deutschland zugelassen.⁴⁷ Mit Pertuzumab und Trastuzumab-Emantansin folgten weitere Arzneistoffe bei diesem Anwendungsgebiet. Bereits erwähnt wurde der Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib, der bei Vorliegen der L858R-Mutation des EGF-Rezeptors die besten Therapieergebnisse erzielt sowie die Antikörper Cetuximab und Panitumumab, die nur bei KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*)-Gen Wildtypen eingesetzt werden.^{38, 36}

In anderen Bereichen findet die pharmakogenetische Diagnostik in der medizinischen Praxis jedoch verhältnismäßig wenig Anwendung. So postuliert die *Food and Drug Administration* (FDA) mittlerweile für über 100 Arzneimittel pharmakogenetische Einflüsse auf deren Wirkung, jedoch ohne entsprechende Handlungsanweisungen zu geben.⁴⁸ In dieser Liste finden sich auch viele Antipsychotika. Hier empfiehlt die *FDA* Tests in Bezug auf die Genvarianten der CYP-Enzyme. Ein Grund für die geringe Verwendung genetischer Tests in der Arzneimitteltherapie ist die große Komplexität dieses Forschungsfeldes. Oft sind die Zusammenhänge kompliziert und nicht zweifelsfrei geklärt und die Studienlage erscheint nicht ganz eindeutig. Ein anderer Grund kann darin liegen, dass einige genetische Varianten sehr selten sind. In den Augen mancher Ärzte mag der Nutzen für diese wenigen Patienten den Aufwand entsprechender Tests nicht rechtfertigen.⁴⁹ Voraussetzung für die klinische Anwendung ist die Entwicklung klarer Guidelines, die vorgeben, welche Tests in welcher Situation durchzuführen sind und welche Konsequenzen aus den Ergebnissen gezogen werden müssen.

Pharmakogenetik in der Psychopharmakotherapie

Auch in der Psychopharmakotherapie bietet die individualisierte Therapie großes Potenzial. Das Problem in der Behandlung psychischer Störungen ist das unterschiedliche Therapieansprechen vieler Patienten. Rund 30-50% aller Patienten reagieren nicht ausreichend auf die initiale Therapie.^{27, 50, 51} Hinzu kommen der oft verzögerte Wirkeintritt und die vorzeitig auftretenden oft sehr ausgeprägten Nebenwirkungen psychotroper Substanzen.¹⁹ All das führt zu einer schlechten *Compliance* der Patienten und einer hohen Rate an Therapieabbrüchen.⁵² Probleme bei Diagnostik und Therapie entstehen durch den Mangel eines objektiv messbaren Parameters zur Einschätzung des Krankheitszustandes. Diese beruht lediglich auf subjektiver Selbst- und Fremdbeurteilung. Genetische Marker, die Rückschlüsse auf Wirksamkeit und das Auftreten von Nebenwirkungen geben könnten, würden die Arzneimitteltherapie sowohl für den Patienten als auch für den Arzt deutlich erleichtern.^{50, 53} Zudem ließen sich so Kosten, die durch Therapieabbrüche, Medikamentenwechsel und starke Nebenwirkungen entstehen einsparen.⁵⁴

Eine grundlegende Überlegung in der Pharmakologie ist, dass die Konzentration eines Wirkstoffes Auswirkungen auf das Ausmaß von Wirkungen und Nebenwirkungen hat. Es rückten daher zu Beginn der Forschung zunächst die Pharmakogenetik der Enzyme des Arzneimittelmetabolismus in den Vordergrund.⁵⁵ Mithilfe dieser Strukturen konnte aber nur ein Teil der beobachteten Variabilitäten erklärt werden. Daher wurden in Folge auch genetische Veränderungen der Zielstrukturen und somit die genetischen Grundlagen der pharmakodynamischen Wirkung von Arzneimitteln untersucht.⁵¹ Trotz zahlreicher Studien auf diesem Gebiet gibt es noch kaum allgemeine Empfehlungen für eine individualisierte antipsychotische Therapie. Vielmehr basiert die Therapiefindung meist auf dem Prinzip Versuch und Irrtum. Eine Vielzahl potenzieller Kandidatengene wurde bisher identifiziert, von denen jedoch keines als gesichert relevant gilt. Der Einfluss verschiedener anderer nichtgenetischer Kofaktoren, wie z.B. Alter, Geschlecht, Lebensstil, Herkunft, Komedikation, macht die Interpretation umso schwieriger. Allein die Rolle der CYP-Enzyme im Metabolismus vieler Antipsychotika gilt als sicher.⁵⁶ Zwar sind mittlerweile auch einige kommerzielle Testsysteme auf dem Markt, obligate Tests zur Arzneimittel- und Dosisfindung vor Therapiebeginn sind bisher jedoch erst wenig etabliert und beschränken sich auf einige wenige Medikamente (trizyklische Antidepressiva, Carbamazepin, Phenytoin). Vielmehr erfolgt ein Test auf die CYP-Enzym-Varianten meist erst nach mehreren erfolglosen Therapieversuchen.⁵⁷

1.1.3.1 Polymorphismen in der Antipsychotika-induzierten Gewichtszunahme

Die Gewichtszunahme gilt als eine der wichtigsten Nebenwirkungen in der Therapie mit Antipsychotika, vor allem der zweiten Generation. Ca. 40% der Patienten leiden unter einer ausgeprägten Gewichtszunahme. Clozapin und Olanzapin sind dabei die beiden Substanzen die das größte Risiko für Antipsychotika-vermittelte Gewichtszunahme aufweisen. In einer Meta-Analyse lag die durchschnittliche Gewichtszunahme in den ersten drei Therapiemonaten für Olanzapin bei 2,3 kg pro Monat für Clozapin bei 1,7 kg pro Monat.⁵⁸ Das höhere Gewicht ist nicht nur ein kosmetisches Problem, es kann außerdem eine Vielzahl weiterer Erkrankungen, wie Typ 2 Diabetes, kardiovaskuläre Erkrankungen und Metabolisches Syndrom, nach sich ziehen.⁵⁹ Zum anderen führt sie aber auch zu einer schlechten *Compliance* der betroffenen Patienten und zu zahlreichen Therapieabbrüchen.⁶⁰

Das Auftreten von Gewichtszunahme scheint in einem Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren begründet zu sein. Demografische Parameter wie Alter und Geschlecht werden dabei genauso diskutiert wie Lebens- und Essgewohnheiten der Patienten.^{61, 62} Detaillierter beschrieben sind die möglichen Einflussfaktoren auf die Gewichtszunahme in Kapitel **3.3.4 Klinische Einflussfaktoren und Wechselwirkungen**. Zwillingsstudien lassen jedoch ebenfalls auf einen Einfluss genetischer Faktoren schließen.^{63, 64} Studien konnten bereits Polymorphismen im Serotonin-, Cannabinoid- und Leptinrezeptorgen als mögliche Risikofaktoren identifizieren.⁶⁵ Czerwensky et al. haben in unserer Studienpopulation einen signifikanten Zusammenhang zwischen zwei Polymorphismen des Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R)-Gens und der Antipsychotika-induzierten Gewichtszunahme gefunden.^{66, 67}

Die genannten Risikogene sind alle an der Energiehomöostase beteiligt und stellen somit interessante Kandidatengene für einen Einfluss auf das Gewicht dar. Über Blockade von Neurorezeptoren könnten Antipsychotika indirekt Einfluss auf den Energiehaushalt nehmen, was eine Beeinflussung des Gewichts erklären könnte. Die Affinität der Antipsychotika zum Histamin-Rezeptor ist der beste Vorhersagefaktor für deren Risiko eine Gewichtszunahme zu verursachen.²⁴ Dieses Vorgehen stellt einen möglichen Ansatz bei der Suche nach relevanten Risikomarkern dar. Im Rahmen seiner Doktorarbeit hat Fabian Czerwensky in dieser Studienpopulation weitere Gene der Energiehomöostase auf mögliche Zusammenhänge zwischen Polymorphismen und dem Auftreten von Gewichtszunahme untersucht.⁶⁸

Ein anderer Ansatz sind sogenannte GWAS. Hierbei wird eine Vielzahl von Genorten von möglichst vielen Probanden gleichzeitig untersucht. Über signifikante Ergebnisse lassen sich so neue Genloci

im Zusammenhang mit bestimmten Wirkungen identifizieren. Sie können somit Aufschlüsse über mögliche Wirkmechanismen geben und völlig neue Theorien begründen. Nachteil solcher GWAS ist allerdings, dass aufgrund der großen Zahl an getesteten Genorten einige Zusammenhänge leichter übersehen werden. Kritiker verweisen oft auf statistische Mängel. Außerdem werden seltene Polymorphismen meist gar nicht erst berücksichtigt.⁶⁹

Ausgehend von dem Ansatz den auch Dr. Fabian Czerwensky verfolgt hat, wurden im Rahmen dieser Arbeit Marker untersucht, die bereits als mögliche Einflussfaktoren auf die Gewichtsregulation im Allgemeinen identifiziert worden waren. Die Hypothese dabei war, dass Risikovarianten, die ein erhöhtes Gewicht bzw. einen erhöhten *Body Mass Index* (BMI) begünstigen auch eine verstärkte Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie fördern. Die Studienpopulation war dabei sehr heterogen und wurde mit verschiedenen antipsychotischen Therapien und Komedikationen behandelt. Die Vorhersage des spezifischen Einflusses einzelner Antipsychotika wird somit erschwert. Auf der anderen Seite bildet dieses Patientenkollektiv den Klinikalltag realistisch ab und erhöht somit die klinische Relevanz der identifizierten Marker. Die Gewichtszunahme innerhalb der ersten vier Wochen nach Therapiebeginn ist dabei ein guter Indikator für die Langzeitentwicklung des Gewichts.⁷⁰

⁷¹ Die untersuchten Gene und Polymorphismen werden auf den folgenden Seiten näher beschrieben.

1.1.3.2 Kandidatengene und Polymorphismen

Translocator Protein (TSPO) Gen

Das TSPO-Gen ist auf 22q13.2 lokalisiert und kodiert ein 18 kDa großes Transmembranprotein der äußeren Mitochondrienmembran, das *Translocator Protein* (TSPO). Dieses wird auch als peripherer Benzodiazepin-Rezeptor (PBR) bezeichnet. Zwei wesentliche Funktionen von TSPO sind zum heutigen Zeitpunkt bekannt: Zum einen ist das Protein an der Synthese und dem Transport von Steroidhormonen, zum anderen an der Synthese und dem Transport von Porphyrin, einer Vorstufe von Häm, beteiligt.⁷² Des Weiteren wird TSPO mittlerweile mit einer Vielzahl von Krankheiten in Zusammenhang gebracht. So scheint es z.B. bei Alzheimer, Parkinson, Multipler Sklerose und Angststörungen eine Rolle zu spielen.⁷²⁻⁷⁴ TSPO ist außerdem bei Entzündungsprozessen involviert. Es vermittelt Signale zwischen Mikroglia und Hirnneuronen und kontrolliert auf diese Weise die Entzündungsreaktion als Immunantwort auf Verletzungen. Da TSPO bei Entzündungsprozessen hochreguliert ist, kann es als Biomarker bei Neuroinflammation genutzt werden.^{75, 76} Synthetische TSPO-Liganden werden bereits bei Positronenemissionstomographien (PET) eingesetzt. Mit deren Hilfe lassen sich

ein erhöhtes TSPO-Vorkommen und somit Entzündungsprozesse nachweisen. So konnte unter anderem auch gezeigt werden, dass während depressiver Episoden vermehrt Entzündungsprozesse in bestimmten Hirnarealen ablaufen.⁷⁷

TSPO wird mit der Gewichtsregulation im Allgemeinen sowie in Bezug auf die antipsychotische Therapie in Verbindung gebracht.^{78, 79} Eine Studie hat gezeigt, dass Patienten, die mit Clozapin behandelt werden, signifikant erhöhte TSPO-Bindungslevel besitzen.⁸⁰ Eine weitere Studie fand heraus, dass schizophrene Patienten, die zusätzlich mit Minocyclin behandelt werden, eine stärkere Verbesserung der Schizophrenie sowie eine geringe Gewichtszunahme aufweisen als Patienten ohne Minocyclinzugabe.⁸¹ Minocyclin ist ein Antibiotikum, das die Mikroglia-Aktivität inhibiert und dadurch die TSPO-Bindungslevel erniedrigt.

Auch wenn die genauen molekularbiologischen Vorgänge noch nicht geklärt sind, deuten diese Studien auf eine Rolle von TSPO im Krankheitsbild der Schizophrenie sowie deren Behandlung hin.

rs6971 und rs6973

Sowohl rs6971 als auch rs6973 befinden sich im Exon 5, dem TSPO-Gen nachgelagert. Rs6971 ist ein nicht-synonymer SNP. Er impliziert einen Basenaustausch von Cytosin zu Thymin und verursacht dadurch einen Austausch der Aminosäure Alanin zu Threonin in der Ligandenbindetasche, der eine schlechtere Bindung des TSPO Liganden zur Folge hat. Rs6973 impliziert einen Basenaustausch von Guanin zu Thymin.

Rs6971 wurde bereits mit dem Auftreten von bipolaren Störung in Zusammenhang gebracht. Colasanti et al. vermuteten, dass durch den Aminosäureaustausch die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse, die über Steroide kommuniziert, beeinflusst wird.⁸² Dies scheint zu einem erhöhten Risiko für bipolare Störungen zu führen. In einer vorangegangenen großen Untersuchung, bei der insgesamt 64 Polymorphismen untersucht wurden, konnte die Gruppe um Professor Müller einen signifikanten Zusammenhang zwischen den TSPO Polymorphismen rs6971 und rs6973 und Antipsychotika-induzierter Gewichtszunahme nachweisen.⁸³ Dieser Fund sollte in einer weiteren gezielten Studie verifiziert werden.

Humanes Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R) Gen

Das MC4R-Gen ist auf Chromosom 18q22 lokalisiert und kodiert den humanen Melanocortin-4-Rezeptor. Dieser besteht aus 332 Aminosäuren und gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Er stellt einen der fünf Subtypen (MC1R-MC5R) der Melanocortin-Rezeptorfamilie dar. MC4R wird im zentralen Nervensystem, vor allem im Gehirn, exprimiert, wo er Einfluss auf das Hungergefühl und den Energieverbrauch hat.^{84, 85} Die Bindung seines Liganden, des α -Melanozyten-stimulierenden Hormons (α -MSH), führt zu erhöhtem Grundumsatz und verminderter Nahrungsaufnahme und somit zu einem Gewichtsverlust.⁸⁶ Bisher sind über 150 Mutationen des MC4R-Gens dokumentiert. Viele davon sind funktional und werden unter anderem mit Übergewicht in Zusammenhang gebracht.⁸⁷ So wurde beispielsweise der Polymorphismus rs17782313 in der Nähe des MC4R-Gens im Rahmen von GWAS als Assoziationsmarker für Übergewicht identifiziert.⁸⁸

Czerwensky et al. konnten in dieser Studienpopulation einen signifikanten Zusammenhang des rs17782313 mit von Antipsychotika der zweiten Generation (SGA) induzierter Gewichtszunahme identifizieren.⁶⁶ Weitere Studien zeigten einen Effekt des rs489693 auf Gewichtszunahme unter atypischer Antipsychotika-Therapie.^{67, 89}

Beide Polymorphismen befinden sich in einem Downstream-Bereich des MC4R-Gens, für den bisher kein funktioneller Zusammenhang mit dem MC4R-Gen hergestellt werden konnte. Im Rahmen ihrer Masterarbeit untersuchte Ruoyu Sun das MC4R-Gen inklusive seines Promotorbereichs mittels Pyrosequenzierung auf weitere genetische Marker für Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme und deren Zusammenhang mit rs17782313 und rs489693.⁹⁰

rs8087522

Der rs8087522 Polymorphismus liegt ca. 500 bp *upstream* des MC4R-Gens in der Promotorregion und stellt eine Punktmutation des Wildtyp-Allels Cytosin zu Thymin dar. Bei ihren Untersuchungen konnte Ruoyu Sun für diesen Polymorphismus einen signifikanten Einfluss des Genotyps auf die relative Gewichtszunahme identifizieren. Es wurden die 178 Patienten der adjustierten Subpopulation (siehe **Kapitel 3.3.1**) analysiert. Im Rahmen dieser Arbeit sollten zum einen die Ergebnisse der Sequenzierung mittels einer weiteren Methode validiert werden. Zum anderen sollte die Gesamtpopulation genotypisiert werden, um dadurch den möglichen Einfluss des rs8087522 auf das Gewicht anhand eines größeren Patientenkollektivs zu verifizieren.

Zudem konnten Chowdhury et al. einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem rs8087522 Genotyp und der Gewichtszunahme unter Clozapin-Therapie feststellen.⁹¹ A-Allel-Träger haben nach 6 Wochen Therapie im Schnitt 5,38% Gewicht zugenommen, während G-Allel homozygote Patienten nur 2,43% ihres Körpergewichts zunahmen ($p = 0,027$).

NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase 75 kDa Untereinheit 1 (NDUFS1) Gen

Das NDUFS1-Gen liegt auf Chromosom 2q33.3 und kodiert die NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase 75 kDa Untereinheit 1. Dieses 75 kDa große Protein gehört zum Komplex I der Atmungskette auf der inneren Mitochondrienmembran. Es dient dem Elektronentransfer von oxidiertem Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) auf Ubiquinon und schleust somit Elektronen in die Atmungskette ein. Mutationen innerhalb des Gens werden mit einem Funktionsverlust des Komplex I in Verbindung gebracht.

Bei Schizophrenie wurden Fehlfunktionen der Mitochondrien nachgewiesen und Studien haben gezeigt, dass unter Antipsychotika-Therapie die Genexpression in den Mitochondrien verändert ist. So vermindern Clozapin, Risperidon und Haloperidol beispielsweise die Aktivität des Komplex I.⁹² Es wird vermutet, dass dies eine Folge von Proteinoxidationen und oxidativem Stress ist, der durch die Antipsychotika ausgelöst wird.^{93, 94} Dieser oxidative Stress könnte ebenfalls ein Grund für die Entwicklung eines metabolischen Syndroms und Diabetes sein.⁹⁴ Olanzapin ist zwar nicht dafür bekannt oxidativen Stress auszulösen, allerdings zeigen Patienten unter Olanzapingabe eine erniedrigte Oxidation von Fettsäuren, was eine Gewichtszunahme begünstigt.^{95, 96}

Goncalves et al. haben daher 60 Polymorphismen in insgesamt 28 Mitochondrien-Genen auf ihren Einfluss auf Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme untersucht.⁸³ Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass Polymorphismen in Mitochondrien-Genen, die am Energiehaushalt beteiligt sind, Einfluss auf die Gewichtszunahme unter Antipsychotika der zweiten Generation haben.

rs6435326, rs1801318 und rs1053517

Der rs6435326 liegt im Intron 13 des NDUFS1-Gen und impliziert einen Basenaustausch von Adenin zu Thymin, rs1053517 liegt in Exon 19 und hat einen Basenaustausch von Cytosin zu Thymin zur Folge. Rs1801318 ist ein synonyme Basenaustausch, er ist in Exon 12 lokalisiert und impliziert einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin. Beide Triplets codieren die Aminosäure Arginin. Goncalves

et al. konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus rs6435326 und der Gewichtszunahme feststellen. Patienten, die Risikoallele aller drei Polymorphismen besaßen (T-C-G), nahmen ebenfalls signifikant an Gewicht zu.⁸³ Die Autoren schließen daher auf eine Verbindung zwischen den NDUFS1 Polymorphismen und Antipsychotika-induzierter Gewichtszunahme.

Fat mass and obesity associated (FTO) Gen

Das FTO-Gen, auch bekannt als Alpha-Ketoglutarat abhängige Dioxygenase, liegt auf Chromosom 16q12.2 und kodiert eine Demethylase, die die Transkription anderer Gene beeinflussen kann.^{97, 98} Die genaue Funktion von FTO ist immer noch unklar. Es wird allerdings vermutet, dass FTO indirekt die Adipogenese reguliert und in direktem Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme und dem Energiehaushalt steht.^{99, 100} Mittlerweile konnten mehrere GWAS Polymorphismen innerhalb des Gens mit Übergewicht und Diabetes in Verbindung bringen.^{101, 102} Änderungen der FTO-Genexpression in Mäusen bewirkten Veränderungen des Körpergewichts.^{103, 104}

rs9939609

Der rs9939609 Polymorphismus ist im ersten Intron des FTO-Gens lokalisiert und hat einen Basenaustausch von Thymin zu Adenin zur Folge. Er ist der erste und der am häufigsten mit Übergewicht in Verbindung gebrachte Polymorphismus.^{101, 105, 106} Aufgrund seiner Lage im Intron 1 wird vermutet, dass rs9939609 einen Einfluss sowohl auf die FTO-Gentranskription an sich, als auch auf die Transkription anderer Gene, die mit Übergewicht assoziiert sind, hat.^{100, 107} In Bezug auf den Einfluss von rs9939609 auf die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme ist die Studienlage zweigeteilt. Es liegen Publikationen vor, die einen signifikanten Zusammenhang beschreiben, andere Studien konnten diesen Einfluss jedoch nicht bestätigen.¹⁰⁸⁻¹¹³ Der Polymorphismus wurde daher von Fabian Czerwensky im Rahmen seiner Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Steimer analysiert.

rs7185735 und rs17817288

Die Polymorphismen rs7185735 und rs17817288 sind ebenfalls im ersten Intron des FTO Gens lokalisiert und stellen eine Punktmutation von Adenin zu Guanin bzw. von Guanin zu Adenin dar. Beide Polymorphismen sind weitere interessante potenzielle Marker in Bezug auf die Gewichtszunahme unter Antipsychotika der zweiten Generation. Sie wurden in einer GWAS durch Tan et al. als die am stärksten mit BMI und Übergewicht assoziierten Polymorphismen identifiziert.¹¹⁴

1.1.4 Epigenetik

Neuronen, Drüsenzellen und Erythrozyten sind nur drei Beispiele für ca. 210 verschiedene Zelltypen, die den menschlichen Organismus aufbauen.¹¹⁵ Trotz stark unterschiedlicher Morphologie und Aufgaben besitzen sie alle eine identische DNA-Sequenz. Für die Entwicklung zu hoch spezialisierten Zelltypen müssen Zellen daher Mechanismen besitzen, die es ihnen ermöglichen, die Genexpression räumlich und zeitlich zu regulieren. Ferner müssen diese Aktivitätsmuster auch an die Zellen der nächsten Generation vererbt werden können. Es muss neben der DNA-Sequenz eine weitere Informationsebene geben, die die Genexpression regelt.

Mit diesem Thema befasst sich das Forschungsgebiet der Epigenetik.¹¹⁶ Die heute allgemeingültige und wissenschaftlich anerkannte Definition bezieht sich auf mitotisch oder meiotisch vererbare Merkmale und Veränderungen, die die Genexpression beeinflussen, aber nicht auf die zugrunde liegende DNA-Sequenz zurückzuführen sind.^{42, 117, 118} Neben der Modifikation von Histon-Proteinen sind Modifikationen von DNA-Nukleobasen von besonderer Bedeutung. Diese beiden Formen der Regulation stehen möglicherweise in direkter Wechselwirkung.^{119, 120} Epigenetische Merkmale sind aber auch durch äußere Einflüsse veränderbar. Zwillingsstudien haben gezeigt, dass das Epigenom in frühen Lebensjahren noch nahezu identisch ist, sich aber mit zunehmendem Alter immer weiter voneinander unterscheidet. Diese Unterschiede sind umso stärker ausgeprägt, umso unterschiedlicher die Lebensführung der Zwillinge ist.¹²¹ Außerdem ist bekannt, dass sich das epigenetische Muster altersabhängig verändert.¹²²⁻¹²⁴

Aberrante Prozesse und Veränderungen innerhalb dieses Epigenoms können zur Entstehung von verschiedenen Krankheiten wie z.B. Krebs, Autoimmun-, neurodegenerativen oder auch Stoffwechselerkrankungen führen.¹²⁵⁻¹²⁷ Forscher erhoffen sich von der Epigenetik neue Erkenntnisse in Bezug auf die Entstehung von Krankheiten, die die Genetik bisher nicht erbringen konnte. So auch in Bezug auf die Schizophrenie.¹²⁸ Postmortem Gehirnuntersuchungen von schizophrenen Patienten haben deutliche Unterschiede im Methylierungsmuster im Vergleich zu gesunden Probanden gezeigt. Forscher vermuten, dass traumatische Erfahrungen im frühen Kindesalter oder auch schon während der Entwicklung im Mutterleib zu epigenetischen Veränderungen führen, die sich im Erwachsenenalter in einer Entwicklung einer Schizophrenie niederschlagen können.¹²⁹⁻¹³¹

Auch in Bezug auf Übergewicht erhoffen sich Forscher aus der Epigenetik neue Erkenntnisse. Es gibt Hinweise darauf, dass DNA-Methylierungen zur Entwicklung von Übergewicht beiträgt.¹³²⁻¹³⁴ Eine

in *Nature Genetics* publizierte Studie konnte nachweisen, dass Stoffwechselstörungen wie Fettleibigkeit und Diabetes in Mäusen epigenetisch vererbt werden.¹³⁵ Dazu ließen sie künstlich befruchtete Eizellen übergewichtiger und an Diabetes erkrankter Tiere von Leihmüttern austragen, sodass Einflussfaktoren während der Schwangerschaft ausgeschlossen werden konnten. Auch die Nachkommen litten später an Übergewicht und Diabetes. Die Informationsweitergabe erfolgte hierbei über 5-Methylcytosin.

1.1.4.1 Bedeutung von 5-Methylcytosin

Die zeitlich am längsten bekannte DNA-Modifikation ist 5-Methylcytosin (mC) (siehe **Abbildung 2**). Dessen Existenz wurde bereits 1925 postuliert, 1950 nachgewiesen und es gilt heutzutage als die am meisten erforschte epigenetische Modifikation.^{119, 125, 127, 136-139} Die Modifizierung wird postreplikativ durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) mit dem Kofaktor S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendedonor eingeführt. In Eukaryoten sind drei Enzyme dieser Klasse bekannt: DNMT1, eine *maintenance* Methyltransferase, sorgt während der DNA-Replikation dafür, dass im Genom bereits bestehende Methylierungen erhalten bleiben, wodurch mC zu einer vererbaren Modifikation wird. Zusätzlich sind DNMT3a und DNMT3b bekannt, welche für die *de novo*-Methylierung verantwortlich sind.^{140, 141} Von entscheidender Bedeutung ist die Tatsache, dass die DNA-Methylierung für die Entwicklung von Säugetieren unentbehrlich ist. DNMT1-, DNMT3a- oder DNMT3b-*Knockout*-Mäuse sterben im Verlauf ihrer Entwicklung.¹⁴¹⁻¹⁴³

In Eukaryoten sind 3-5% aller Cytosine methyliert, vorwiegend in einem CpG-Kontext (Cytosin-Phosphat-Guanin), wobei es zelltypspezifische Unterschiede gibt.¹⁴⁴ Eine besonders hohe Dichte an CpG-Dinukleotiden kann in Promotorregionen gefunden werden. Hier befinden sich ca. 10% aller CpG-Dinukleotide.^{125, 145} Bereits 1969 wurde für mC eine regulatorische Funktion postuliert und 1975 durch zwei Gruppen bestätigt.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸ Die Anwesenheit einer Methylgruppe verändert die Wechselwirkung von Proteinen mit der DNA.¹³⁷ Hierdurch hat mC direkten Einfluss auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren sowie Chromatin remodulierenden Proteinen und kann z.B. eine Inhibierung der Transkription und somit der Genexpression bewirken.^{149, 150}

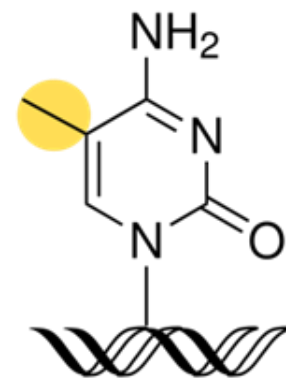


Abbildung 2: 5'-Methylcytosin

1.1.4.2 Hypoxia-inducible factor 3 alpha (HIF3A)

HIF3A ist eine von drei α -Untereinheiten des *hypoxia inducible transcription factor* (HIF). Neben HIF1A, EPAS1 und HIF3A gehört noch die β -Untereinheit ARNT zum HIF-Komplex. Das HIF3A-Gen befindet sich auf Chromosom 19 und ist 43 kb groß. Bisher sind acht verschiedene Splicevarianten dieses Gens bekannt.¹⁵¹ Der HIF-Komplex reguliert über die Genexpression eine Vielzahl von zellbiologischen Prozessen als Antwort auf veränderte Sauerstoffkonzentrationen.¹⁵² Neue Studien vermuten, dass HIF zudem eine Schlüsselrolle im Energiehaushalt und der Entwicklung von Übergewicht einnimmt. In Mäusen bewirkte eine Störung des HIF-Komplexes bzw. eine erniedrigte HIF-Genexpression einen erhöhten Energieumsatz, geringere Fettbildung und einen Schutz vor Übergewicht.^{153, 154} Die HIF3A-Untereinheit ist in Bezug auf diese Fragestellung noch nicht so gut untersucht wie die anderen Untereinheiten, sie scheint aber eine Rolle bei der Zellantwort auf Glucose und Insulin zu spielen.¹⁵⁵ Zudem beschleunigt sie die Adipozytendifferenzierung.¹⁵⁶

Eine epigenomweite Assoziationsstudie (EWAS) testete den Methylierungsstatus von 485.000 CpG-Stellen aus Blutproben von 479 Patienten europäischer Abstammung auf einen Zusammenhang mit dem Gewicht. Die Autoren fanden eine Assoziation zwischen drei CpG-Stellen (cg22891070, cg27146050 und cg16672562) im Intron 1 des HIF3A-Gens mit dem *Body Mass Index*.¹⁵⁷ Dabei war jede Erhöhung der Methylierung von cg22891070 um 10 Prozentpunkte (der Ausdruck „Prozentpunkt“ wurde im Rahmen dieser Arbeit als Einheit für die absolute Methylierung verwendet) mit einem höheren BMI von 3,6% assoziiert. Dieses Ergebnis konnte in zwei Replikationspopulationen verifiziert werden. Weitere unabhängige Studien bestätigten mittlerweile diesen Zusammenhang in unterschiedlichen Populationen.¹⁵⁸⁻¹⁶¹

Unklar ist bisher jedoch, ob der erhöhte BMI die Methylierung des HIF3A-Gens bedingt oder eine Kausalität in die andere Richtung gegeben ist. Eine dritte Möglichkeit wäre, dass beide Parameter über einen weiteren, bisher unbekanntem Faktor bestimmt werden. Bisher kann darüber nur spekuliert werden. Dick et al. halten eine Änderung der Methylierung aufgrund des höheren BMI für wahrscheinlicher.¹⁵⁷ Zum einen konnten sie keinen Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus und anderen BMI-assoziierten Parametern, wie z.B. dem Auftreten von Diabetes finden. Zum anderen konnten sie zwei Polymorphismen identifizieren (rs8102595 und rs3826795), die zwar mit dem Methylierungsstatus, nicht aber mit dem BMI korrelierten. Dick et al. folgerten daher, dass die erhöhte HIF3A-Methylierung aus dem erhöhten BMI resultiert. Im Gegensatz dazu untersuchten Huang et al.

den Zusammenhang zwischen dem HIF3A-Polymorphismus rs3826795, der mit dem Methylierungsstatus assoziiert ist, und dem BMI im Kontext einer Vitamin B Supplementierung.¹⁶² Vitamin B agiert als Coenzym bei der Methylgruppenübertragung. Sie fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem rs3826795 Genotypen und dem BMI in Abhängigkeit von der Vitamin B Einnahme ($p < 0.01$). Studienteilnehmer, die höhere Dosen Vitamin B bekamen, nahmen signifikant mehr zu. Aus den Ergebnissen folgerten sie, dass die DNA-Methylierung den BMI direkt beeinflusst und dieser Effekt durch eine Vitamin B Substitution verstärkt wird. Eine Schwäche dieser Studie ist jedoch, dass die Autoren auf eine direkte Messung der Methylierung verzichteten.

Wir haben in unserer Studienpopulation die drei CpG-Stellen in Bezug auf eine Antipsychotika-vermittelte Gewichtszunahme untersucht (CpG5 = cg22891070, CpG1 = cg27146050 und CpG7 = cg16672562). Falls die Methylierung Einfluss auf den BMI nimmt, wäre es interessant zu sehen, ob dieser Effekt auch auf die Gewichtsänderung als Nebenwirkung einer antipsychotischen Medikation übertragbar ist. Ein Zusammenhang wäre zudem ein Indikator für einen Methylierungslevel-abhängigen BMI.

Falls der BMI die Methylierung beeinflusst, könnte dies ebenfalls in unserer Studienpopulation sichtbar sein. Im Laufe der Behandlung hat ein Großteil der Patienten an Gewicht zugenommen. Der Zeitpunkt der Blutprobenabnahme variiert innerhalb der Studienpopulation sehr stark. So wurde bei einigen Patienten bei Einweisung bzw. zu Beginn der Behandlung, bei anderen erst nach einigen Woche Therapie eine Blutprobe entnommen. Patienten, bei denen die Blutabnahme vor Therapiebeginn mit Ausgangsgewicht stattgefunden hat, sollten daher eine niedrige Methylierung aufweisen. Patienten, die erst nach längerer Therapie und daraus resultierender Gewichtszunahme Blut abgenommen bekamen, sollten höher Methylierungslevel besitzen.

Bisher sind noch keine Studien in Bezug auf einen Zusammenhang zwischen der Methylierung von HIF3A oder der Methylierung anderer Gene und der Antipsychotika-vermittelten Gewichtszunahme bekannt. Aufgrund der beschriebenen Fragestellungen ist eine Untersuchung in diesem Kontext von großem Interesse.

1.1.4.3 Stabilität von 5-Methylcytosin

Die Blutproben dieser Studienpopulationen wurden von 2002 - 2009 gesammelt und unter verschiedenen Bedingungen gelagert. Da die Methylierung eine quantitative und veränderbare Messgröße ist, stellt sich die Frage, ob die Lagerungsbedingungen einen Einfluss auf den Methylierungsstatus haben. Unterschiedliche Stabilitäten der methylierten und der nicht methylierten DNA sind denkbar. Ein Einfluss der Lagerungsbedingungen auf den Gehalt und die Qualität der extrahierten DNA wurde bereits nachgewiesen. Molekularbiologische Analysen könnten dadurch verfälscht werden.¹⁶³ Zudem haben Studien gezeigt, dass sich bei längerer Lagerung das Verhältnis der einzelnen Subtypen weißer Blutkörperchen ändert.^{164, 165} Da unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche Methylierungsmuster aufweisen, könnten daraus ebenfalls veränderte mC-Level resultieren. Enzymaktivitäten, die auch *in vitro* stattfinden, aber auch mechanische Einflüsse wären weitere mögliche Gründe für veränderte Methylierungswerte. Die Ermittlung von verlässlichen Lagerungs- und Transportbedingungen ist daher unerlässlich, um den Vergleich von verschiedenen Studien zu gewährleisten.

Die Studienlage war hierzu zu Beginn der Untersuchung sehr schlecht. In vielen Studien werden keine Angaben in Bezug auf die Lagerungsbedingungen und -zeiten gemacht. Viele Studien lagern die Blutproben bei -80 °C, jedoch ohne Nachweis, dass sich das Methylierungsmuster nicht ändert. Ziel der Studie war daher den Einfluss der Lagerungsbedingungen auf die DNA-Qualität in einem Zeitraum von bis zu zehn Monaten zu evaluieren.¹⁶⁶

2016 veröffentlichten Bulla et al. eine ähnliche Studie, in der sie Blut bei -80 °C, -20 °C, bei 4 °C und bei Raumtemperatur über bis zu einem Jahr lagerten.¹⁶⁷ Sie konnten zwar über die Zeit geringere Ausbeuten an DNA, aber keine Veränderung der Methylierungswerte feststellen. Weitere Studien in Sperma und Plazentagewebe konnten ebenfalls keine Änderung der Methylierung in Abhängigkeit der Lagerzeit finden.^{168, 169} Allerdings wurden hier jeweils nur kurze Lagerzeiten von 72 bzw. 24 Stunden und auch nur bei Kühlschrank- bzw. bei Raumtemperaturen untersucht.

1.1.5 Ziel der Studie

Psychische Erkrankungen gewinnen immer mehr an Bedeutung. So stieg die Zahl der Krankheitsausfälle aufgrund von psychischen Störungen laut Daten der DAK aus dem Jahr 2015 in den letzten 20 Jahren um mehr als 200%. Im Vergleich dazu stieg die Anzahl der Fehltage in Bezug auf alle Erkrankungen im gleichen Zeitraum nur um 21%. Psychische Erkrankungen gehören zu den häufigsten Gründen für Arbeitsunfähigkeit und Frühberentung.¹⁷⁰ Die Depression ist dabei mit einer Prävalenz von rund 8% in Deutschland am häufigsten.¹⁷¹ Schizophrene und bipolare Störungen haben in Deutschland ein Prävalenz von jeweils ca. 1%.¹⁵

Wie bereits in **Kapitel 1.1.2** beschrieben bringt die Psychopharmakotherapie in diesem Bereich einige Herausforderungen mit sich. Mittel der ersten Wahl sind Neuroleptika, wobei heutzutage die Antipsychotika der zweiten Generation aufgrund ihres besseren Nebenwirkungsprofil denen der ersten Generation vorgezogen werden.¹⁹ Probleme hierbei sind das unterschiedliche Therapieansprechen vieler Patienten, der oft verzögerte Wirkeintritt und die trotzdem zum Teil erheblichen Nebenwirkungen. Hieraus resultieren eine schlechte Therapietreue der Patienten und eine hohe Rate an Therapieabbrüchen.⁵² Studien haben gezeigt, dass mangelnde Therapietreue sowie Medikamentenwechsel zu längeren Krankenhausaufenthalten und insgesamt höheren Therapiekosten führt.^{54, 172} Sun et al. berechneten, dass sich die so verursachten Kosten 2005 allein in den USA auf 1479 Millionen US\$ beliefen.¹⁷²

Vor allem Gewichtszunahme ist eine schwerwiegende Nebenwirkung mit hoher klinischer Relevanz und Häufigkeit in der Therapie von psychisch Erkrankten. Eine deutliche Gewichtszunahme führt zu erheblichen zusätzlichen somatischen und psychischen Problemen was eine Depression verstärken kann. Nicht selten führt dies zu einer *Non-Compliance* und somit zum Ausbleiben des Therapieerfolgs. Des Weiteren können sich aus der Gewichtszunahme ernsthafte Folgeerkrankungen z.B. des Herz-Kreislaufsystems und Diabetes Typ 2 entwickeln.^{59, 60}

Durch molekularbiologische Untersuchungen könnten Patienten mit bestimmten Risikogenvarianten möglicherweise schon vor Therapiebeginn erkannt werden. Dieses Vorgehen würde die Effektivität einer bisweilen langwierigen und schwierigen Therapie wesentlich verbessern und ein erhebliches Einsparungspotential mit sich bringen.^{57, 173} Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag daher auf der Gewichtszunahme als einer möglichen Nebenwirkung der psychiatrischen Arzneimitteltherapie. Es sollte untersucht werden, ob verschiedene genetische und epigenetische Marker einen Einfluss auf

den Behandlungserfolg stationär aufgenommener psychiatrischer Patienten mit Neuroleptika haben. Der Schwerpunkt lag dabei auf Genvarianten, die bereits mit Übergewicht in der Allgemeinbevölkerung in Verbindung gebracht wurden. Langzeitziel ist es, einen genetischen bzw. epigenetischen Algorithmus in Bezug auf diese Fragestellung zu entwickeln und so durch gezieltes Genscreening vor Therapiebeginn eine Empfehlung für eine mögliche individuelle psychiatrische Arzneimitteltherapie geben zu können.

Des Weiteren sollte die Kausalität in Bezug auf den Zusammenhang zwischen dem Gewicht und dem Methylierungsstatus von HIF3A weiter aufgeklärt werden.

1.2 Identifizierung von pharmakogenetischen Einflüssen auf die Therapie von Morbus Alzheimer

1.2.1 Krankheitsbild des Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer ist die häufigste Form der Demenz. Eine genaue Ursache ist bisher nicht bekannt. Allerdings scheinen genetische Faktoren für einen Teil der Alzheimererkrankungen vor allem bei jungen Patienten verantwortlich zu sein. So wurden Mutationen des Apolipoprotein E (ApoE) sowie in Präsenilin-1 und -2 und des Amyloid-Vorläuferproteins (APP) mit dem Auftreten von Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Neben genetischen Faktoren und dem Alter gelten Diabetes, Bluthochdruck, kardiovaskuläre Erkrankungen sowie hohe Cholesterinwerte als Risikofaktoren.¹⁷⁷⁻¹⁸⁰ Die Erkrankung ist durch eine Atrophie des Gehirns gekennzeichnet. Mikroskopisch lassen sich intrazelluläre Aggregate des Tau-Proteins sowie extrazelluläre Beta-Amyloid-Plaques erkennen. Diese lagern sich an die Nervenzellen an und beeinträchtigen sie in ihrer Funktionsfähigkeit. Zudem ist die Acetylcholinausschüttung vermindert.^{181, 182}

Alzheimer tritt typischer Weise ab dem 65. Lebensjahr auf. Symptomatisch lässt sich ein Verlust kognitiver und emotionaler Fähigkeiten feststellen. Betroffene leiden in der Regel unter Merk- und Orientierungsstörungen bis hin zum Verlust des Sprachverständnisses und alltäglicher Fähigkeiten.¹⁹ Eine Diagnose wird in der Regel über sogenannte neuropsychologische Tests wie z.B. den Uhrentest gestellt. Dies sind Test in denen Gedächtnisleistung und kognitive Fähigkeiten getestet werden. Bei Unsicherheiten können auch labordiagnostische Untersuchungen (Blutbild, Liquoruntersuchungen) und bildgebende Verfahren (Computertomographie, Magnetresonanztomographie, PET) für die Diagnose mitherangezogen werden.¹⁸³

Prinzipiell ist Morbus Alzheimer bis heute nicht heilbar. Eine Therapie besteht aus der Kombination von Medikamenten und Gedächtnistraining mit dem Ziel den Verlauf der Erkrankung zu mindern. Als Arzneistoffe stehen Acetylcholinesteraseinhibitoren (Donepezil, Rivastigmin, Galantamin) sowie der Achetylcholin- und N-Methyl-D-Aspartat-Antagonist (NMDA-Antagonist) Memantin zur Verfügung. Ginkgo-Präparate sollen ebenfalls die kognitiven Fähigkeiten erhöhen. Alle Behandlungsstrategien zielen darauf ab, die Symptome abzuschwächen, eine ursächliche Behandlung gibt es bisher nicht.¹⁹

Derzeit leiden in Deutschland ca. 1,6 Millionen Menschen an Morbus Alzheimer. Aufgrund der immer älter werdenden Bevölkerung wird allerdings mit weiter steigenden Zahlen in den nächsten Jahren gerechnet.¹⁸⁴

1.2.2 Donepezil in der Alzheimer-Therapie

Donepezil gehört zu den reversiblen Cholinesterasehemmern und wird bei der leichten bis mittelschweren Form des Morbus Alzheimer eingesetzt. Es blockiert reversibel das aktive Zentrum der Acetylcholinesterase, wodurch die Spaltung des Neurotransmitters Acetylcholin gehemmt wird. Dadurch können cholinerge Nervenzellen besser aktiviert werden.¹⁸⁵

Die Dosierung beträgt 5 mg/Tag und kann bei Bedarf auf 10 mg/Tag erhöht werden. Donepezil wird oral eingenommen, wobei die Bioverfügbarkeit bei 100% liegt. Die maximale Plasmakonzentration wird nach drei bis vier Stunden, der *Steady State* wird nach ca. drei Wochen Einnahme erreicht. Die optimale Plasmakonzentration liegt bei 30 bis 70 ng/ml. Donepezil wird sowohl unverändert als auch als Metabolit zum größten Teil über den Urin ausgeschieden. Die Metabolisierung findet in der Leber durch CYP2D6 und CYP3A4 statt.¹⁸⁶

Zu den häufigsten Nebenwirkungen von Donepezil zählen Übelkeit, Durchfall und Kopfschmerzen (Häufigkeit > 10%). Zudem können auch Infektionen, Appetitlosigkeit, Halluzinationen, Erregung, Angstzustände, Synkopen, Schwindel, Schlaflosigkeit, Müdigkeit, Schmerzen, Verletzungen, Magen-Darm-Beschwerden, einschließlich Erbrechen, Ausschlag, Juckreiz, Muskelkrämpfe und Harninkontinenz auftreten (häufig: 1 bis 10%).

Acetylcholinesterasehemmer sind Mittel der Wahl bei der leichten bis mittelschweren Alzheimer Erkrankung und sollen eine Besserung der kognitiven Fähigkeit und der Bewältigung des Alltags bewirken. Eine Langzeitbehandlung ist möglich. Es sollte die maximale verträgliche Dosis gegeben werden. Hinsichtlich der Wirksamkeit sind alle Medikamente der Acetylcholinesterasehemmer vergleichbar. Welches Medikament aus dieser Gruppe ausgewählt wird, richtet sich nach dem Neben- und Wechselwirkungsprofil. Für Donepezil gibt es zudem Hinweise auf eine Wirksamkeit im schweren Krankheitsstadium.¹⁸³

1.2.3 Das Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6)

Cytochrom P450-Enzyme dienen dazu, durch Biotransformationsreaktionen im menschlichen Organismus Substanzen mit lipophilen Eigenschaften chemisch so zu verändern, dass sie in wasserlöslicher Form über den Urin oder die Gallenflüssigkeit ausgeschieden werden können. Sie katalysieren dabei oxidative Reaktionen im Phase-I-Metabolismus. Cytochrom P450-Systeme kommen hauptsächlich in der Leber, zu geringen Anteilen aber auch in der Darmmukosa, der Niere, der Lunge und in anderen Geweben vor.^{187, 188} Viele Medikamente werden über die verschiedenen Cytochrom P450-Enzyme verstoffwechselt.¹⁸⁹ Das in dieser Studie untersuchte Donepezil wird über das Isoenzym Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6) metabolisiert.¹⁹⁰

Anhand von Homologien ihrer Aminosäuresequenz werden Cytochrom P450-Systeme in Familien, Subfamilien und Isoenzyme eingeteilt.¹⁹¹ Das CYP2D6-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 22 lokalisiert und besteht aus neun Exons und acht Introns. Zusammen mit zwei flankierenden Pseudogenen (CYP2D8P und CYP2D7P) umfasst der CYP2D6-Genlocus etwa 45 kb.¹⁹²⁻¹⁹⁵ Bis jetzt sind über 100 verschiedene Allele dieses Gens beschrieben worden, welche nach dem internationalen Nomenklatorsystem mit arabischen Zahlen gekennzeichnet werden.^{196, 197}

Viele dieser Mutationen sind funktional. CYP2D6*1 wird als Wildtyp bezeichnet und besitzt eine normale Enzymaktivität. Andere Allele führen dazu, dass das CYP2D6-Enzym nicht gebildet wird und haben somit einen kompletten Funktionsverlust zur Folge.¹⁹⁸ Diese sogenannten „Nullallele“ führen z.B. zu Fehlern im *Splicing* (z.B. bei CYP2D6*4), zu *Frameshift*-Mutationen (z.B. CYP2D6*3 und *6) oder zur Deletion des gesamten Gens (CYP2D6*5).

Bei anderen Allelen wie dem CYP2D6*9, charakterisiert durch eine Deletion, oder dem CYP2D6*10 oder *41, charakterisiert durch Substitutionen, kommt es durch die daraus resultierenden spezifischen Veränderungen in der Aminosäureabfolge des Genprodukts zu einer Einschränkung der katalytischen Aktivität des CYP2D6-Enzyms.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Bei Duplikation des gesamten Gens, erhöht sich die Anzahl des entsprechenden Enzyms und somit auch dessen Aktivität. Der Genotyp eines Individuums erlaubt also Rückschlüsse auf die Stoffwechsellistung des daraus resultierenden Phänotyps. Die Bestimmung des Genotyps ist daher gerade für die Arzneimitteltherapie von großer Bedeutung und so wurden unter anderem im Arbeitskreis von Prof. Steimer verschiedene Methoden zur Genotypisierung des CYP2D6 entwickelt.^{202, 203}

Um eine bessere Vergleichbarkeit der CYP2D6-Funktion zu erreichen, wurden den verschiedenen Allelen Gendosen zugeordnet. Über die Gendosis lässt sich der entsprechende Stoffwechsellyp zuordnen. Dabei bezeichnet man Individuen mit einer Gendosis von 0 und somit einem defizienten Metabolismus als *poor* Metabolisierer (PM) im Vergleich zu *extensive* Metabolisierern (EM) mit normaler Stoffwechselkapazität (Gendosis 2, 1,5 und je nach Definition auch 1). Zudem lassen sich noch die *intermediate* Metabolisierer (IM) mit einer Gendosis von 0,5 (und je nach Definition auch 1) und somit einer beeinträchtigten Stoffwechselleistung und die *ultrarapid* Metabolisierer (UM) mit stark erhöhtem Metabolismus (Gendosis > 2) abgrenzen.²⁰⁴

Inwieweit sich die Ergebnisse der Genotypisierung auf den wirklichen Phänotypen übertragen lassen ist immer noch strittig. Ein eindeutiger Rückschluss vom Genotyp auf den Phänotyp ist nicht immer möglich.

1.2.4 Ziel der Studie

Aktueller Goldstandard in der Therapie von Morbus Alzheimer mit Donepezil ist eine Standardtagesdosis von 5 oder 10 mg/Tag. Mit dem Hintergrundwissen, dass Donepezil über CYP-Enzyme, vor allem CYP2D6, verstoffwechselt wird und deren Aktivität stark von der entsprechenden Genvariante abhängig ist, erscheint eine Standarddosierung wenig sinnvoll. Noetzli et al. konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der CYP2D6-Variante und der *Clearance* von Donepezil nachweisen ($p < 0,01$).²⁰⁵ So zeigten *ultrarapid* Metabolisierer bei gleicher Tagesdosis eine bis zu 67% schnellere und *poor* Metabolisierer eine bis zu 37% langsamere Elimination von Donepezil im Vergleich zu *extensive* Metabolisierern. Andere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem CYP2D6-Genotypen und dem Therapieansprechen bzw. der Donepezilserumkonzentration im Steady State und dem Therapieansprechen aufstellen.²⁰⁶⁻²⁰⁸ Alle diese Studien deuten auf ein Nutzen der individualisierten Donepezildosierung und der Überprüfung der Serumspiegel hin.

Im Rahmen dieser Studie sollten daher der CYP2D6-Genotyp mit den Donepezilserumspiegeln sowie dem Therapieansprechen in direkten Zusammenhang gebracht werden. Es sollte geklärt werden, inwieweit der CYP2D6-Genotyp Rückschlüsse auf die Serumspiegel von Donepezil und das Therapieansprechen der Patienten zulässt. Und inwiefern eine Genotypisierung im Vorfeld der Therapie die Medikamentenauswahl und -dosierung positiv beeinflussen kann.

2 Material und Methoden

2.1 Beschreibung der Antipsychotika-Studie

2.1.1 Studiendesign

Die vorliegende Arbeit basiert auf einer Diagnostikstudie, die am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München in einer Kooperation zwischen der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie und dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie im Zeitraum von Mai 2002 bis Dezember 2009 durchgeführt wurde. Verantwortlicher Projektleiter war Herr Prof. Dr. med. W. Steimer, Oberarzt des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie. Die Studie wurde weiterhin überwacht von Herrn Dr. med. W. Kissling und Herrn Prof. Dr. med. S. Leucht, Oberärzte der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie. Die Studie war prospektiv und pharmakogenetisch doppelblind angelegt, die Auswertung erfolgte retrospektiv. Das Studienprotokoll wurde im Vorfeld durch die Ethikkommission der Fakultät für Medizin der TU München genehmigt und entspricht der Deklaration von Helsinki. In Bezug auf den pharmakogenetischen Einfluss der Antidepressiva-Therapie auf die Gewichtszunahme standen 350 Patientenproben zur Verfügung.

2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie eingeschlossen wurden alle volljährigen, neu stationär in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar aufgenommenen Patienten mit einer Grunderkrankung, die eine Therapie mit Antidepressiva oder Antipsychotika notwendig macht (ICD-10: F2 – F6-Diagnosen). Die Patienten mussten nach Aufklärung über die Studie schriftlich der Teilnahme zustimmen. Diese Einverständniserklärung kann jederzeit widerrufen werden.

Ausschlusskriterien stellten Abhängigkeitserkrankungen, organisch bedingte Psychosen oder Depressionen, Demenzen sowie Schwangerschaft und Stillzeit dar. Weiterhin wurden keine Patienten in die Studie aufgenommen, die auf gerichtliche oder behördliche Anordnung in die Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar eingewiesen wurden.

2.1.3 Datenerhebung

Bei der stationären Aufnahme wurden demographische Daten, psychiatrische Vorgeschichte und aktueller Krankenstand festgehalten. Größe, Gewicht, Informationen zum Lebensstil, die Einfluss auf den Medikamentenstoffwechsel haben können (z.B. Raucherstatus, Alkoholkonsum), sowie aktuelle medikamentöse Therapien wurden ebenfalls erfasst.

Der Krankheitszustand jedes Patienten wurde mit Hilfe der Paranoid-Depressivitäts-Skala (PD-S) und der *Clinical Global Impressions*-Skala (CGI-Skala) zum Zeitpunkt der Aufnahme und nach vier Wochen erfasst.^{209, 210} Die Diagnose wurde nach ICD-10 gestellt. Die Therapie erfolgte nach lokaler, klinischer Praxis, eine individuelle Dosisanpassung war aufgrund des offenen Studiendesigns möglich. Die verabreichten Medikamente inklusiver Komedikation wurden dokumentiert. Nach vier Wochen stationärer Behandlung wurde der Therapieerfolg anhand der CGI- und der PD-Skala erfasst. Zudem wurde erneut das Gewicht bestimmt. Nebenwirkungen wurden mittels einer leicht veränderten Version der *Dosage Record and Treatment Emergent Symptom*-Skala (DOTES-Skala) registriert.²¹¹ Zusätzlich wurde im Falle eines Therapieerfolges der Zeitpunkt des Ansprechens durch den behandelnden Arzt dokumentiert sowie die Dauer des stationären Aufenthalts jedes Patienten erfasst.

Den Patienten wurden im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Blutentnahme zusätzlich 2,7 ml Blut mit Zusatz des Chelatbildners Ethylendiamintetraacetat (EDTA-Blut) zur Bestimmung des pharmakogenetischen Status abgenommen.

PD-S (Paranoid-Depressivitäts-Skala)

Bei der PD-S handelt es sich um eine Selbstbeurteilungsskala, mit einer P-Skala zur Erfassung paranoider Symptome und einer D-Skala zur Feststellung ängstlich-depressiver Krankheitsanzeichen.²⁰⁹ Jede der beiden Skalen umfasst 16 zu bewertende Einzelaussagen (*Items*) und zusätzlich acht Kontroll-*Items* zur Messung der Krankheitsverleugnung sowie drei *Items* zur Feststellung der Testmotivation der Probanden (**Anhang 9.2.1**). Auf Grund möglicher hoher Placebo-Responseraten von 41% in Placebo kontrollierten Studien wurde nur eine Verringerung der P- bzw. D-Werte um mindestens 50% als Behandlungserfolg gewertet.^{212, 213}

CGI-Skala (Skala für den Klinischen Gesamteindruck/*Clinical Global Impressions Scale*)

Bei der CGI-Skala handelt es sich um eine Fremdbeurteilungsskala, deren Anwendung durch den behandelnden Arzt ausgefüllt wird.²¹⁰ Dieser beurteilt den Patienten im Vergleich zur gleichen Patientengruppe. Die CGI-Skala gliedert sich in einen Teil zur Einschätzung des aktuellen Symptomschwere der Krankheit (CGI 1 bzw. CGI-S), zur Zustandsänderung eines Patienten (CGI 2 bzw. CGI-I) und zum Verhältnis aus gewünschten und unerwünschten Arzneimittelwirkungen (CGI 3, therapeutischen Wirksamkeitsindex). Die Beurteilung für CGI 1 und CGI 2 erfolgt in sieben Stufen, für CGI 3 in vier Stufen (**Anhang 9.2.2**). Patienten, die nach vier Wochen einen sehr verbesserten oder verbesserten Zustand (CGI 2-Werte 1 und 2) wurden als *Responder* eingestuft, alle Patienten, die eine nur wenig Verbesserung bis hin zu einer Verschlechterung zeigten, (CGI 2-Werte 3 bis 7) wurden als *Non-Responder* gewertet.

DOTES-Skala (*Dosage Record and Treatment Emergent Symptom Scale*)

Zur Beurteilung der Nebenwirkungen wurde eine leicht abgewandelte Form der DOTES-Skala verwendet.²¹¹ Hierbei dokumentierte der behandelnde Psychiater während der vierwöchigen Therapie Art und Umfang (gering, mäßig oder stark) der aufgetretenen Nebenwirkungen (**Anhang 9.2.3**). Für die Einteilung der Patienten nach nebenwirkungs-positiv und nebenwirkungs-negativ wurde die abschließende Bewertung des Arztes herangezogen, wie stark die Begleitsymptome den Patienten beeinträchtigten. Patienten die überhaupt nicht oder sehr wenig unter Nebenwirkungen litten, wurden als nebenwirkungs-negativ gewertet, Patienten, die mäßig oder deutlich beeinträchtigt wurden als nebenwirkungs-positiv eingestuft.

2.2 Beschreibung der Alzheimer-Studie

Die Daten basieren auf einer Studie, die am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München in einer Kooperation zwischen der Klinik für Psychiatrie und dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie im Zeitraum von 2013 bis 2015 durchgeführt wurde. Verantwortlicher Projektleiter war Privatdozent Dr. med. T. Grimmer vom Zentrum für kognitive Störungen und Rehabilitation der Klinik für Psychiatrie des Klinikums rechts der Isar. Die Studie war prospektiv und pharmakogenetisch doppelblind angelegt, die Auswertung erfolgte retrospektiv. Das Studienprotokoll wurde im Vorfeld durch die Ethikkommission der Fakultät für Medizin der TU München genehmigt und entspricht der Deklaration von Helsinki.

Die Studienteilnehmer wurden in der Demenz-Ambulanz des Klinikums rechts der Isar sowie in der Gedächtnisambulanz der Klinikums der Universität München am Campus Großhadern rekrutiert. Eingeschlossen wurden alle volljährigen Patienten, bei denen Morbus Alzheimer diagnostiziert wurde und die in diesem Rahmen Donepezil erhielten. Alle Patienten waren zu Beginn der Studie naiv für Antidementiva. Alzheimer wurde daher entweder gerade erst neu diagnostiziert oder die Patienten waren nach bestehender Diagnose bisher noch nicht mit einem Antidementivum behandelt worden. Bei der ersten Vorstellung in der Klinik erfolgte die Diagnostik mittels neuropsychologischer Tests. Bei Diagnose von Morbus Alzheimer und Beginn der medikamentösen Therapie mit Donepezil erfolgte eine zweite Untersuchung nach drei bis 12 Monaten. Der Krankheitsstand wurde mittels neuropsychologischer Tests und Selbsteinschätzung der Patienten erneut ermittelt. Den Patienten wurden zusätzlich 2,7 ml EDTA-Blut zur Bestimmung des pharmakogenetischen Status sowie Vollblut/Serum zur Bestimmung der Arzneimittelkonzentration abgenommen. Die Arzneimittelkonzentration im Blut befand sich zu diesem Zeitpunkt im *steady state*. Dieser ist für Donepezil nach ca. 14-21 Tagen Therapie erreicht.^{214, 215} Zudem wurden Größe, Gewicht und Komedikationen erfasst. Die Patienten mussten nach Aufklärung über die Studie schriftlich der Teilnahme zustimmen. Diese Einverständniserklärung kann jederzeit widerrufen werden. Insgesamt wurden 48 Patienten, die im Rahmen einer Morbus Alzheimer Erkrankung im Klinikum rechts der Isar in Behandlung waren und Donepezil-Therapie erhielten, in die Studie eingeschlossen.

Ausschlusskriterium stellte eine mögliche Vorbehandlung mit Antidementiva dar.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen *SPSS 21*, *EXCEL 2010* und *R*. Ergebnisse mit einem Signifikanzwert (p) von ≤ 0.05 (zweiseitig) wurden als statistisch signifikant betrachtet. Aufgrund des explorativen Charakters der Studie und der schwierigen Interpretation von Subgruppenanalysen wurde auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet.²¹⁶ Die Beurteilung der Normalverteilung (NV) erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnov- bzw. Shapiro-Wilk-Test und Boxplot bzw. Histogramm. Bei Vorliegen einer Normalverteilung wurden quantitative, unabhängigen Variablen mittels T-Test (zwei Gruppen) bzw. Varianzanalyse (ANOVA) ($>$ zwei Gruppen) verglichen. In Bezug auf den T-Test wurde stets von einer Varianzheterogenität ausgegangen. Zur Berücksichtigung von Verzerrungseffekten wurden außerdem Kovarianzanalysen (ANCOVA) durchgeführt.²¹⁷ Zur simultanen Betrachtung von Effekten mehrerer Variablen wurde eine lineare Regression durchgeführt, wobei alle Variablen in gleichem Maß in die Analyse einbezogen wurden (Einschluss-Methode).²¹⁸ Nicht normalverteilte Variablen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests (zwei Gruppen) und des Kruskal-Wallis-Tests ($>$ zwei Gruppen) untersucht. Korrelationen zwischen zwei quantitativen Variablen wurde mittels Pearson-Korrelation (NV) und Spearman-Korrelation (keine NV) getestet.²¹⁹

Zum Test auf Verschiedenheit zwischen quantitativen, abhängigen Variablen wurde bei Normalverteilung der T-Test angewendet. Bei nicht normalverteilten Variablen wurde mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (zwei Gruppen) bzw. Friedmann-Test ($>$ zwei Gruppen) getestet. Zum Test auf Gleichheit zwischen zwei quantitativen Variablen wurde ein Bland-Altman-Plot erstellt.^{220, 221} Zum Vergleich von Messmethoden wurde zudem der Konkordanz-Korrelationskoeffizient berechnet.²²²

Zur Untersuchung des Kopplungsgleichgewichts (*Linkage Disequilibrium [LD]*) wurde das *CubeX Online Tool* verwendet.²²³ Der Parameter D' beschreibt das Ausmaß des LDs relativ zu dem maximal möglich annehmbaren Wert. Bei einem D' -Wert von ± 1 (sogenanntes *complete LD*) wird mindestens einer der vier möglichen Haplotypen in der betroffenen Population nicht beobachtet (kein Nachweis für eine Rekombination der Marker). Allerdings könnte ein hoher D' -Wert bei kleiner Population aufgrund fehlender Haplotypen durch niedrige Populationsgröße verursacht werden. Die Korrelationskoeffizient r^2 bestimmt ebenfalls das Ausmaß des LDs. Bei einem r^2 -Wert gleich 1 (sogenanntes *perfect LD*) liefern die beiden untersuchten Marker identische Informationen. Ein r^2 -Wert von 0 bedeutet, dass ein perfektes Equilibrium beider Marker herrscht. Um das Vorhandensein eines *Linkage Disequilibriums* zu beurteilen sollten sowohl der D' - als auch der r^2 -Wert in Kombination berücksichtigt werden.

Das Vorliegen des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (HWE) der jeweiligen untersuchten Polymorphismen wurde mittels Chi²-Test unter Verwendung des angegebenen Online Tools geprüft.²²⁴ Die Ergebnisse sind in **Anhang 9.3** dargestellt, wobei ein p-Wert von $> 0,05$ ein Entsprechen des HWE anzeigt.

2.4 Analyse genetischer Marker

Zu Beginn standen ausführliche Literaturrecherchen über mögliche Zielstrukturen. Anschließend wurden in experimenteller Arbeit molekularbiologische Methoden aufgebaut, mit denen der individuelle pharmakogenetische und epigenetische Status der Patienten untersucht wurde. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung von Methoden für den Routineeinsatz. Die Fluoreszenz-basierende Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) am *LightCycler* (LC) ist eine schnelle, spezifische und verlässliche Methode zur Genotypisierung. Zudem sind nur geringe DNA-Mengen zu einer erfolgreichen Analyse nötig, die Probenvorbereitung ist simpel und die Kontaminationsgefahr ist gering. Da diese PCR-Methode somit für den Routinegebrauch geeignet ist, wurde sie als Methode der Wahl entwickelt. Im Folgenden wird der generelle Ablauf der Methodenentwicklung beschrieben, auf die einzelnen Arbeitsschritte wird in den **Kapiteln 2.4.10** und **2.4.11** genauer eingegangen. Alle verwendeten Reagenzien, Geräte und Software sind in **Anhang 9.1** aufgeführt.

Zu Beginn des Arbeitsprozesses wurde die DNA aus den Leukozyten aus EDTA-Blut der Patienten extrahiert. Anschließend wurde jeweils eine neue Methode zur Genotypisierung am *LightCycler* entwickelt und optimiert. Eine Validierung erfolgte entweder mittels Allel-spezifischer PCR am *Thermocycler* oder, falls ein geeignetes Restriktionsenzym zur Verfügung stand, mittels enzymatischem Verdau. Hierfür wurde entweder das PCR-Produkt der *LightCycler*-Reaktion verwendet oder es wurde, falls dieses aufgrund mehrerer Schnittstellen für den weiteren Gebrauch ungeeignet war, ein neues PCR-Produkt mit neuen Primer am *Thermocycler* erzeugt. Die jeweiligen DNA-Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels UV-Detektion sichtbar gemacht.

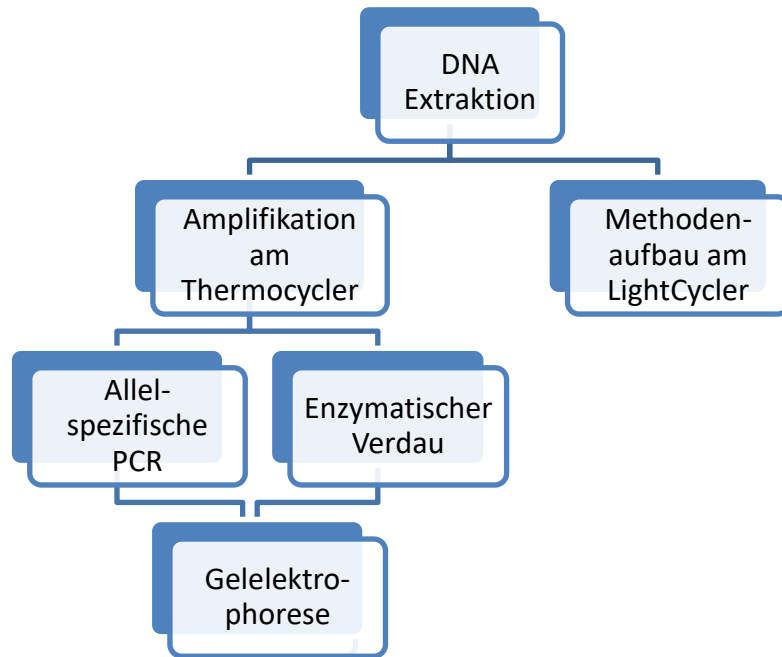


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Bestimmung genetischer Marker.

2.4.1 DNA Extraktion

Jedem Patienten wurde bei Aufnahme in die Studienpopulation 2,7 ml EDTA-Blut in einer Sarstedt-Monovette® abgenommen. Direkt im Anschluss wurde aus den so erhaltenen Leukozyten mit Hilfe eines Extraktionskits (*Wizard Genomic DNA Purification Kit*) die DNA nach Herstellerangaben isoliert. Für jeden Patienten wurden zwei Extraktionen mit je 300 µl EDTA-Blut durchgeführt. Daraus konnten abhängig von der Leukozytenzahl jedes Patienten ein DNA-Extrakt mit einer Konzentration von 50-150 ng/µl erhalten werden. Ein Aliquot der so gewonnenen DNA und das EDTA-Blut wurde bei -70 °C bzw. die Blutproben der J-Proben bei -20 °C gelagert. Das zweite Aliquot der DNA-Proben wurde bei 4-8°C gelagert und direkt für die folgenden Analysen weiterverwendet. Wurden die DNA-Aliquots aufgebraucht, wurde erneut DNA aus den gefrorenen Blutproben extrahiert.

2.4.2 Sonden-basierte Genotypisierung mittels Polymerase-Kettenreaktion am LightCycler

Der *LightCycler* ist eine sehr schnelle Methode zur Genotypen-Bestimmung einzelner Polymorphismen. Auf Grund der hohen Heiz- und Kühlraten (bis zu 20 °C/s) von *LightCycler*-Geräten und der

damit verbundenen kurzen Zyklusdauer (20 bis 60 s) gelingt die Durchführung einer PCR wesentlich schneller als mit herkömmlichen *Thermocyclern*. Die Zugabe von fluoreszenzmarkierten Sonden zum Reaktionsansatz ermöglicht die Amplifikation der Proben-DNA in Echtzeit zu verfolgen und die Ergebnisse direkt auszuwerten.

Der *LightCycler 2.0*, der für diese Arbeit verwendet wurde, verfügt über fünf verschiedene Detektionskanäle, die zur Messung der von angeregten Sonden emittierten Fluoreszenz verschiedener Wellenlängen (530 nm, 610 nm, 640 nm, 670 nm und 705 nm) dienen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der Schmelzpunktanalyse gearbeitet. Diese erfolgt nach der Amplifikation und ermittelt die Schmelztemperatur (T_m) des DNA-Doppelstranges. Hierbei wurden zwei Arten von Sonden verwendet: Hybridisierungssonden und *SimpleProbe*-Sonden. Das Detektionsprinzip beider Sondenarten basiert auf einem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Der *LightCycler* ermöglicht allerdings auch Amplifikationsanalysen (qualitative und quantitative Methoden).²²⁵ Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht verwendet und werden daher im Folgenden auch nicht näher beschrieben.

Für die Genotypisierung mit Hybridisierungssonden (*HybProbe-Format*) wird neben Primern, Puffer, DNA und Polymerase noch eine Sensor- und eine Ankersonde benötigt (siehe **Abbildung 4**). Die Sensorsonde liegt über der Mutationsstelle, Sensor- und Ankersonde befinden sich auf der DNA in einem Abstand von ca. 2-5 Basenpaaren (bp). Der an einer Sonde gebundene Donorfarbstoff Fluorescein wird durch Absorption von Licht mit einer Wellenlänge von 470 nm in einen energetisch angeregten Zustand versetzt (A). Binden beide Sonden an die DNA wird ein Teil dieser Anregungsenergie auf den an der benachbarten Sonde gebundenen Akzeptorfarbstoff *LightCycler-Rot (LC-Red)* übertragen. Der Akzeptorfarbstoff emittiert nachfolgend abhängig von seiner Struktur Licht in den oben angegebenen Wellenlängen (B), was vom *LightCycler*-Fluorometer detektiert wird. Dieser Vorgang ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer. Bei steigender Temperatur während der Schmelzkurvenanalyse kommt es zur Ablösung des Sondenpaares von der Proben-DNA (C). Der Energietransfer kann nicht mehr stattfinden und es wird kein Licht durch den Akzeptorfarbstoff mehr emittiert. Der Schmelzpunkt ist als die Temperatur definiert, bei der 50% der Sonden gebunden und 50% ungebunden vorliegen. Er bildet den Wendepunkt der Funktion der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Temperatur. Die negative erste Ableitung dieser Funktion zeigt den Schmelzpeak (Maximum). Liegt im Bereich der Sonden eine Mutation vor, führt dies zu einer Destabilisierung des Doppelstrangs und somit zu einer niedrigeren Temperatur des Schmelzpunktes.

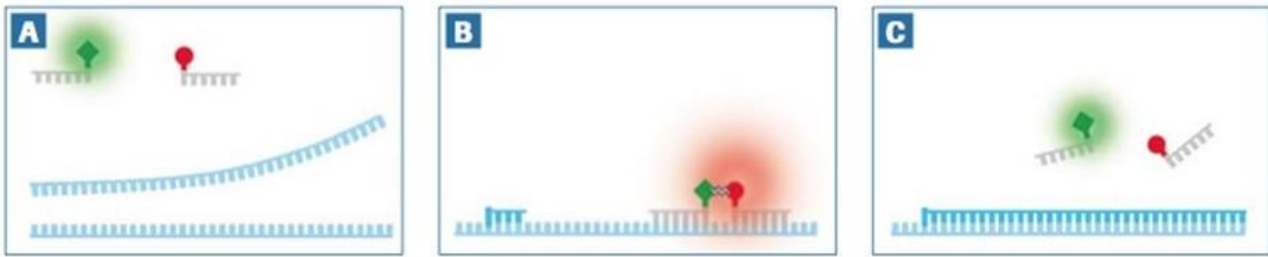


Abbildung 4: Funktionsweise von Hybridisierungssonden²²⁶: Anregung des Donorfarbstoff Fluorescein (A); Sensor- und Ankersonde sind an die DNA gebunden, FRET kann stattfinden und der Akzeptorfarbstoff LC-Red emittiert Licht, was vom LightCycler-Fluorometer detektiert wird (B); Bei steigender Temperatur löst sich das Sondenpaar von der DNA, der Energietransfer kann nicht mehr stattfinden und es wird kein Licht mehr durch den Akzeptorfarbstoff mehr emittiert (C).

Eine besondere Form der Hybridisierungssonden sind *SimpleProbe*-Sonden (siehe **Abbildung 5**). Sie tragen einen Rezeptorfarbstoff (Fluorescein), der über einen *Quencher* mit der Sonde verbunden ist (A). Bei in Lösung befindlichen *SimpleProbe*-Sonden unterdrückt der *Quencher* die Lichtemission (A, C und D). Ist die Sonde an die Zielsequenz gebunden, wird dieser Effekt reduziert und es kommt zur Emission eines Fluoreszenzsignals (B). Durch eine Erhöhung der Temperatur löst sich die Sonde wieder vom Amplikon (D). Auch hier verursacht eine Mutation eine Schmelzpunktniedrigung.

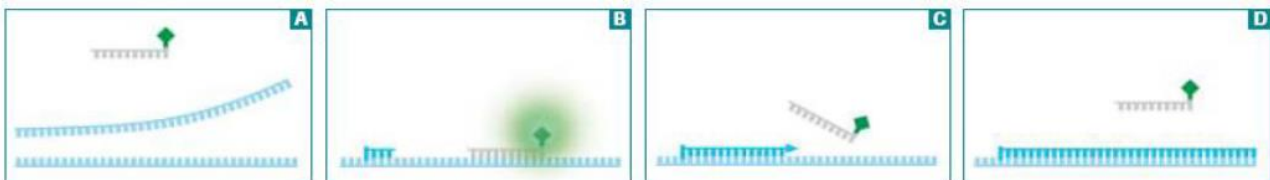
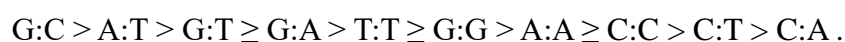


Abbildung 5: Funktionsweise von SimpleProbe-Sonden²²⁶: Liegt die *SimpleProbe*-Sonde in Lösung vor, unterdrückt der *Quencher* die Lichtemission (A, C, D); bindet die Sonde an die Ziel-DNA wird dieser Effekt reduziert und Fluorescein sendet ein Fluoreszenzsignal aus (B).

Ist die Temperatur des Schmelzpunkts zwischen Wildtyp und Mutation groß genug ($> 5 \text{ }^\circ\text{C}$) lassen sich auf diese Weise die verschiedenen Genotypen unterscheiden. Die Ausprägung der Stabilitätsänderung hängt von der Art der Fehlpaarung, ihrer Position und den benachbarten Basenpaaren ab. So sind SNPs, die von G:C-Paaren flankiert werden, durch die stärkere Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen stabiler als solche, die von A:T-Paaren umgeben sind. Nachfolgend ist die empirisch ermittelte Basenpaarstabilität für Sonden-DNA-Duplexe in abnehmender Stabilität aufgeführt:²²⁷



Durch die fünf unterschiedlichen Detektionswellenlängen ist die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Polymorphismen in einem Ansatz möglich (Multiplexbestimmung).

2.4.3 Konventionelle PCR am Thermocycler

Die Polymerase-Kettenreaktion gehört zu den Standardmethoden eines molekularbiologischen Labors. Sie dient zur *in vitro*-Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte und ist damit sowohl die Grundlage für den Nachweis genetischer Veränderungen, als auch für andere Anwendungen wie die Klonierung von Genen und den Nachweis verschiedener Krankheitserreger. Hierbei reichen kleinste DNA-Mengen aus, um in kurzer Zeit große Mengen eines spezifischen Amplikons zu generieren. Benötigt werden neben der zu vervielfältigenden DNA als Vorlage zwei Primer (Oligonukleotide) mit einer Länge zwischen 16 und 30 Basenpaaren, die die zu vervielfältigende DNA flankieren und sich komplementär an das 5'- und 3'-Ende der Zielsequenz anlagern. Weiterhin sind die vier verschiedenen Desoxyribonukleosid-Triphosphat-Bausteine und eine thermostabile DNA-Polymerase notwendig. Für optimale Reaktionsbedingungen wird eine Pufferlösung verwendet, die meist Kalium- und Magnesiumchlorid enthält. Die optimale Pufferzusammensetzung ist hierbei für jede Reaktion spezifisch, da die Kalium- und Magnesium-Ionen entscheidend für die Stabilität und Aktivität der DNA-Polymerase sind.

Zu Beginn einer PCR-Reaktion erfolgt eine initiale Denaturierungsphase, bei der der Reaktionsansatz je nach eingesetzter Polymerase bis zu zehn Minuten einer Temperatur von 94-95 °C ausgesetzt wird. Hierbei werden die Wasserstoffbrückenbindungen des DNA-Doppelstrangs gespalten, sodass Einzelstränge entstehen. Zudem gibt es Polymerasen, sogenannte *Hot Start*-Polymerasen, die durch diese initiale Phase erst aktiviert werden. Die eigentliche PCR-Reaktion erfolgt anschließend in 30-40 Zyklen, die jeweils in drei Phasen unterteilt werden können: der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation. Während der Denaturierung wird zu Beginn jedes Zyklus der DNA-Doppelstrang bei 94-95 °C nochmals wenige Sekunden denaturiert. Anschließend kommt es in der Hybridisierungsphase für 20-30 Sekunden zur spezifischen Anlagerung der Primer an die komplementären DNA-Einzelstränge. Dies erfolgt wenige Grad Celsius unter der Schmelztemperatur der Primer (50% der Primer sind an die DNA-Einzelstränge gebunden). In diesem Temperaturbereich lagern sich genug Primer an, um ein PCR-Produkt zu garantieren, unspezifische Nebenreaktionen werden jedoch minimiert. Während der anschließenden Elongation wird die DNA durch eine DNA-Polymerase beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers komplementär zum vorliegenden DNA-Strang in 3'-5'-Richtung mit Nukleotiden aufgefüllt. Somit entsteht erneut ein DNA-Doppelstrang. Bei einer Zielsequenzlänge von 500 Basenpaaren dauert dieser Vorgang ca. 30 Sekunden. Die Reaktionstemperatur wird durch die optimale Arbeitstemperatur der Polymerase bestimmt. Nach dem letzten Zyk-

lus wird ein abschließender Elongationsschritt über drei bis zehn Minuten durchgeführt, um eine vollständige Amplifikation zu gewährleisten. Anschließend erfolgt eine Abkühlung der Proben auf $< 10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Die Menge des entstehenden PCR-Produkts ist abhängig von der Anzahl der durchgeführten Zyklen „n“. Da die DNA exponentiell vervielfältigt wird, beträgt die theoretische Produktmenge 2^n . Tatsächlich werden aber aufgrund von unspezifischen Nebenprodukten und Degradation thermolabiler Reagenzien nur 70-80% erreicht.

Die so entstandenen PCR-Produkte wurden im Rahmen dieser Arbeit als Ausgangsprodukt für den enzymatischen Verdau verwendet oder wurden, falls eine Allel-spezifischen PCR durchgeführt wurde, direkt mittels Gelelektrophorese untersucht. Des Weiteren wurden die so gewonnenen Amplikons als Grundlage für die DNA-Bibliothek für die Sequenzierungsreaktion verwendet.

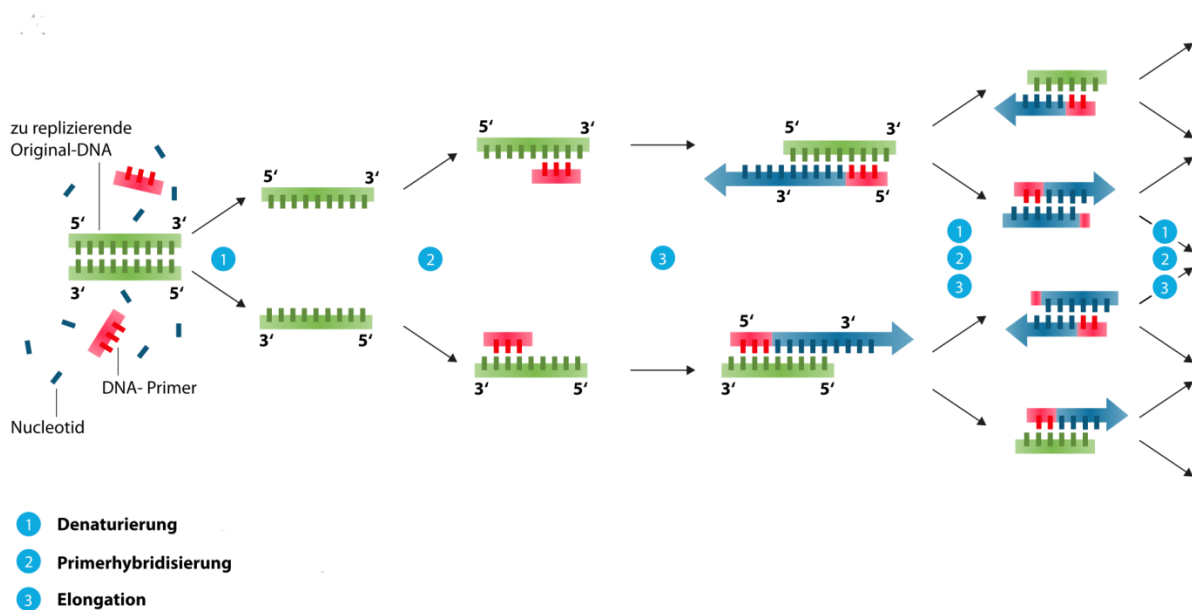


Abbildung 6: schematische Darstellung einer Polymerase-Kettenreaktion²²⁸: Während der Denaturierung wird zu Beginn jedes Zyklus der DNA-Doppelstrang bei $94-95\text{ }^{\circ}\text{C}$ nochmals wenige Sekunden denaturiert (1); In der Hybridisierungsphase erfolgt die spezifischen Anlagerung der Primer an die komplementären DNA-Einzelstränge (2); Während der Elongation wird die DNA durch eine DNA-Polymerase komplementär zum vorliegenden DNA-Strang aufgebaut (3).

2.4.4 Enzymatischer Verdau

Mittels enzymatischem Verdau oder Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) lassen sich bekannte Punktmutationen bestimmen. Hintergrund ist, dass bestimmte Enzyme, sogenannte Restriktionsendonukleasen, die DNA an spezifischen Positionen schneiden können. DNA-Sequenzen von vier bis zehn Basenpaaren dienen den Enzymen dabei als Erkennungssequenz. Liegt eine solche Sequenz vor, schneidet das Enzym die DNA an einer spezifischen Stelle. Zur Unterscheidung von Genotypen verwendet man ein Enzym, in dessen Erkennungssequenz der entsprechende Polymorphismus liegt. Je nachdem, ob eine Punktmutation vorliegt oder nicht, schneidet das Enzym die DNA. Nach anschließender Auftrennung der DNA-Fragmente mit Hilfe der Gelelektrophorese kann man zwischen verschiedenen Genotypen unterscheiden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden mit Hilfe des Programms *NEBcutter* bestimmt und sind in **Tabelle 4** aufgeführt.²²⁹ Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und die genauen Reaktionsbedingungen sind den jeweiligen Methoden (**Kapitel 2.4.11**) zu entnehmen. Alle Restriktionsenzyme und Puffer wurden von der Firma *New England BioLabs GmbH* (Frankfurt/Main) bezogen.

Tabelle 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme.

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz und Schnittstelle	Polymorphismus
BstU1	CG/CG	rs6971
NIaIV	GGN/NCC	rs6973
TSP45I	/GTSAC	rs1053517
EcoRI	G/AATTC	rs1801318
NIaIII	CATG/	rs7185735

N = A/T/G/C, S = G/C

2.4.5 Allel-spezifische PCR

Die Allel-spezifische (ALS) PCR ist eine weitere Methode zur Bestimmung von Punktmutationen und wurde in dieser Arbeit verwendet, wenn kein passendes Restriktionsenzym zur Verfügung stand. Hierfür werden spezifische Primer benötigt, wobei das 3'-Ende eines der beiden Primer an der zu untersuchenden Mutationsstelle sitzt. Dieser Primer wird doppelt konstruiert, sodass das 3'-Ende entweder zu der Wildtyp- oder der Mutationsbase komplementär ist. Mit diesen Primern führt man zwei getrennte PCR-Ansätze durch, wobei bei optimalen Bedingungen ein PCR-Produkt nur dann entsteht, wenn der betreffende Primer genau komplementär zur Sequenz der Proben-DNA ist. So entsteht beispielsweise bei Vorliegen des Wildtyps und Einsatz des Wildtyp-Primers das entsprechende Amplikon, während in dem Reaktionsansatz mit Mutations-Primer kein PCR-Produkt gebildet wird. Heterozygote zeigen in beiden Ansätzen ein PCR-Produkt. Die entstandenen Amplikons werden im Anschluss mit Hilfe der Gelelektrophorese sichtbar. Um die Bildung unspezifischer Produkte zu vermeiden, sollte die Hybridisierungstemperatur ausreichend hoch gewählt werden.

Um die Spezifität der beiden Primer zu erhöhen, wurden bei einigen Primern an der dem 3'-Ende benachbarten Stelle eine weitere Fehlpaarung eingebaut.^{230, 231} Hierbei wurden die Primer so konstruiert, dass bei Vorliegen eines schwachen destabilisierenden Effekts an der letzten Primerstelle, an der vorletzten Stelle eine Fehlpaarung mit stark destabilisierender Wirkung eingeführt wurde und umgekehrt.²³¹ Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit von Fehlpaarungen und somit falsch positiven Resultaten weiter minimiert.

Genaue Angaben zu den Reaktionsansätzen und Reaktionsbedingungen sind der jeweiligen Methode zu entnehmen (**Kapitel 2.4.11**).

2.4.6 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung von geladenen Molekülen und beruht auf deren Wanderung in einem elektrischen Feld. Auf diese Weise lassen sich Protein-, DNA- oder RNA-Gemische trennen und visualisieren. Die zu untersuchende DNA wird auf ein Agarosegel aufgetragen. Unter Einfluss eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe unterschiedlich schnell zur Anode. Das Agarosegel dient hierbei als Molekularsieb, durch das sich die Moleküle fortbewegen. Zusätzlich wird das Gel zur Visualisierung der

entstandenen Banden mit Ethidiumbromid versetzt. Dieses lagert sich in die DNA-Helix ein und fluoresziert nach Anregung durch UV-Strahlung. Zusätzlich aufgetragene Längenmarker ermöglichen eine Größenbestimmung der DNA-Fragmente.

2.4.7 Konstruktion der Primer

Anhand der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz (verfügbar über die *NCBI-Datenbank*²³²), wurden mit Hilfe des *Primer3plus Tools* (*Whitehead Institute for Biomedical Research*, Cambridge, USA) passende Primerpaare für jeden Polymorphismus konstruiert.^{233, 234} Dabei wurde eine Amplikonlänge von ca. 200 bp, maximal 400 bp angestrebt. Folgende Primereigenschaften wurden berücksichtigt: Die Primerlängen sollte ca. 20 bp betragen. Dies gewährte zum einen eine ausreichende Spezifität, zum anderen wurde eine hohe Anlagerungseffektivität gewährleistet. Weiterhin wurde ein Guanin/Cytosin (GC)-Gehalt von 40-60% mit einer gleichmäßigen Verteilung über die gesamte Primerlänge angestrebt. Dadurch sollte eine gleichförmige Anlagerung der Primer an die Zielsequenz erleichtert werden. Die Schmelztemperaturen (T_m) von Vorwärts- und Rückwärtsprimern sollten möglichst nah beieinanderliegen. Die in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare wiesen eine maximale Differenz von 2,5 °C auf. Ist der Temperaturunterschied der Primer zu groß (> 5 °C), kann keine optimale Hybridisierungstemperatur gefunden werden. Bei niedriger Temperatur würden so unspezifische Produkte durch Fehlanlagerung des Primers mit hoher T_m entstehen, bei hoher Anlagerungstemperatur wäre hingegen kein oder nur wenig Produkt sichtbar, da die T_m des anderen Primers bereits überschritten ist. Die Primer wurden außerdem mit Hilfe des *Oligoanalyzer 1.5 Tools* (*Gene Link*, Orlando, USA) hinsichtlich der Ausbildung von Haarnadelstrukturen und Primer-Dimeren überprüft, da diese die Effektivität einer PCR durch Aneinanderlagern komplementärer Primersequenzen bzw. durch Ausbildung von Nebenprodukten erheblich mindern können.²³⁵ Es wurde daher versucht, solche Strukturen zu vermeiden.

Die Spezifität und Fehlerfreiheit der konstruierten Primer wurde mittels des sogenannten *Basic Local Alignment Tools* (BLAST) (*National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, USA) überprüft.^{236, 237} Dabei wurden die Sequenzen der Primer mit denen des menschlichen Genoms verglichen. Die Software zeigte anschließend mit welchen Stellen des Genoms es zu Anlagerungen des Oligonukleotids kommen kann und in wie vielen Basen sich die Sequenzen gleichen. Es wurden nur Primerpaare zur Amplifikation verwendet, die nachweislich spezifisch für die Zielsequenz waren.

Die Primer wurden von *Invitrogen* (Carlsbad, USA) in lyophilisiertem Zustand bezogen und anschließend zu einer Konzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$ mit sterilem Wasser verdünnt. Nach Aliquotierung wurden die Primerlösungen bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. In **Anhang 9.4** ist ein Überblick über die Basenfolgen und Schmelztemperaturen der für die Genotypisierung genutzten Primer sowie die Länge der entstehenden PCR-Produkte gelistet.

2.4.8 Konstruktion der Sonden

Für die Konstruktion der Hybridisierungssonden gelten ähnliche Anforderungen wie für die Konstruktion der Primer. Die Länge der Sonden sollte zwischen 20 und 30 bp betragen, der GC-Gehalt sollte bei ca. 40-60% liegen und repetitive Sequenzen wurden vermieden. Die Sonden wurden ebenfalls mittels *Oligoanalyzer 1.5 Tool* auf Haarnadelstrukturen und Dimere sowohl untereinander als auch mit den verwendeten Primern getestet.²³⁵ Die Sonden wurden anhand der Zielsequenz so entwickelt, dass der zu detektierende SNP möglichst mittig, mindestens jedoch 4 bp vor Ende der Sensorsonde liegt. Die Ankersonde schließt in einem Abstand von 2-5 bp an die Sensorsonde an, sodass der Abstand zwischen Donor- und Akzeptorfarbstoff zwischen 10-50 Å beträgt. Dadurch wird eine Fluoreszenzlöschung durch sterische Behinderung vermieden, eine ausreichende Energieübertragung jedoch gewährleistet. Die Schmelztemperatur wurde ebenfalls mittels *Oligoanalyzer 1.5 Tool* und der *nearest-neighbor* Methode (T_m NN) ermittelt und sollte zwischen 5-10 $^{\circ}\text{C}$ über der der Primer liegen.²³⁵ Zur Detektion von Sequenzvariationen sollte die Ankersonde eine 5-10 $^{\circ}\text{C}$ höhere T_m als die Sensorsonde besitzen. Die Sonden wurden gemäß der unter **2.4.2** angegebenen Basenpaarstabilität so konstruiert, dass die Temperaturverschiebung durch eine Basenfehlpaarung möglichst groß war (2,6-5,8 $^{\circ}\text{C}$). Um eine Verlängerung der Sonden durch die DNA-Polymerase zu vermeiden, wurde die 3'-Position der Sonden phosphoryliert, falls diese Position nicht bereits mit Fluorescein oder einem Akzeptorfarbstoff belegt war.

In Rahmen dieser Arbeit wurden zur Genotypisierung nur Hybridisierungssonden verwendet. Diese sind aufgrund einer niedrigeren Fehler- und Abweichungsanfälligkeit den *SimpleProbe*-Sonden vorzuziehen. Lediglich für die Bestimmung von FTO rs9939609 wurde das *SimpleProbe-Format* verwendet, da hier eine Bestimmung mittels *HybProbe-Format* aufgrund der zugrundeliegenden Sequenz nicht möglich war. FTO rs9939609 wurde von Dr. Fabian Czerwensky im Rahmen seiner Promotionsarbeit vermessen und für diese Arbeit lediglich in die Auswertung miteinbezogen. Für weitere

Informationen bezüglich der Methode siehe Czerwensky.⁶⁸

Die SONDENSpezifität wurde wie die der Primer durch einen Sequenzabgleich mittels BLAST-Programm überprüft.^{236, 237} Alle Sonden wurde über *TIB Molbiol* (Berlin, Deutschland) bezogen und mit sterilem Wasser zu einer Konzentration von 3 μM verdünnt. Nach anschließender Aliquotierung wurden diese bis zur Verwendung lichtgeschützt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

In **Anhang 9.4** ist ein Überblick über die Basenfolgen und Schmelztemperaturen der für die Genotypisierung genutzten Sonden gelistet.

2.4.9 Optimierung der PCR Bedingungen

Um eine möglichst hohe Effektivität und Spezifität der Genotypisierungsreaktionen zu erzielen, wurden diese entsprechend optimiert. Neben der Primer- und Sondenwahl sind passende Temperatur- und Pufferbedingungen wichtige Kriterien für eine erfolgreiche PCR-Reaktion.²³⁸ Die Hybridisierungstemperatur und -zeit muss so gewählt werden, dass eine effiziente Amplifikation der Zielsequenz möglich ist, die Entstehung unspezifischer und damit effektivitätsmindernder Nebenprodukte aber unterbunden wird. Des Weiteren ist die Konzentration der einzelnen Komponenten für ein Gelingen der Reaktion ausschlaggebend. So wurden die Endkonzentrationen für die Sonden zwischen 0,075 bis 0,1125 μM , die der Primer zwischen 0,25 und 1 μM gewählt. Ein Überschuss an Primern ist notwendig, um die Bindung an die Zielsequenz zu gewährleisten und den komplementären DNA-Strang zu verdrängen. Ein zu hoher Primer-Gehalt hat allerdings die Bildung von Nebenprodukten und Primer-Dimeren zur Folge. Der Anteil an unspezifischen Nebenprodukten steigt ebenso beim Einsatz zu hoher Nukleotid- und DNA-Polymerase-Konzentrationen ($> 400\text{ }\mu\text{M/Nukleotid}$ und Reaktion bzw. > 2 Einheiten/Reaktion). Auch die Pufferzusammensetzung, insbesondere die Magnesium-Ionen (Mg^{2+})-Konzentration, ist für die Reaktion bedeutend. Mg^{2+} beeinflusst zum einen die Anlagerung der Primer an die DNA, zum anderen dient es als Kofaktor für die DNA-Polymerase. Zu hohe Mg^{2+} -Konzentrationen stabilisieren allerdings die Doppelstrang-DNA und behindern so die PCR. In Vorversuchen wurden daher verschiedene Reaktionsbedingungen (Temperatur, Zykluszeit und -anzahl) und Zusammensetzungen (Konzentration der Primer, Sonden und Mg^{2+}) des Reaktionsgemisches getestet und somit jede PCR-Reaktion optimiert. Konnte hierdurch noch kein zufriedenstellen-

des Ergebnis erzielt werden, wurde dem PCR-Ansatz Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Bovines Serumalbumin (BSA) zugemischt. DMSO führt durch Destabilisierung GC-reicher DNA-Abschnitte zu einer schnelleren Elongation und einem höheren Gehalt an fehlerfreien PCR-Produkten. BSA dient zur Absättigung der Oberflächen der Reaktionsgefäße und vermeidet die Adsorption der DNA-Polymerase, welche für die PCR sonst nicht mehr zur Verfügung stünde, an diese Stellen.

Bei Multiplex-Ansätzen am *LightCycler* wurde jede Methode zunächst einzeln optimiert, bevor eine Kombination versucht wurde. Dieser kombinierte Reaktionsansatz wurde im Anschluss ebenfalls weiter optimiert. Auf Grund der breiten Emissionsspektren der verschiedenen Akzeptorfarbstoffe kommt es bei Multiplex-Anwendungen zu einer spektralen Überschneidung. Um Fehler bei der Zuordnung der Genotypen zu den Schmelzkurvenmaxima zu verhindern, müssen die entstehenden Nebensignale mittels einer sogenannten *Color Compensation* beseitigt werden. Dazu wurde mit den verwendeten Sonden und der *LightCycler-Software* jeweils eine Kalibrierung gemäß Herstellerangaben durchgeführt.²³⁹

Alle Methoden zum Nachweis der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen sind mit Konzentrationsangaben und Reaktionsbedingungen unter **2.4.11** aufgeführt.

2.4.10 Allgemeiner Ablauf und Durchführung einer Genotypisierungsreaktion

Im Folgenden sind die generellen Arbeitsschritte einer Genotypisierung mittels der oben vorgestellten Methoden beschrieben:

Alle für die PCR benötigten Reagenzien (Primer, Sonden, Nukleotide, Puffer, Magnesiumchlorid [MgCl₂] und Enzyme) wurden bei -20°C gelagert. Die zu untersuchende DNA wurde entweder zum kurzfristigen Gebrauch im Kühlschrank bei 4-8 °C bzw. die Aliquots zur Reserve bei -70 °C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurden alle benötigten Komponenten (siehe **2.4.11**) gevortext und zentrifugiert. Es wurde jeweils eine Stammlösung für n+2 Proben in ein steriles 1,5 ml-Eppendorf-Cup pipettiert und erneut gevortext. Die zusätzliche Menge Stammlösung diente zum einen für die Leerkontrolle, um fälschlicherweise positive Ergebnisse durch Kontamination auszuschließen, zum anderen um eventuelle Verluste durch das Pipettieren auszugleichen. Die in den Protokollen angegebene Menge Stocklösung wurde anschließend in 200 µl-Eppendorf-Cups (für PCR am *Thermocycler*) bzw.

20 µl-*LightCycler*-Kapillaren (für PCR am *LightCycler*) vorgelegt und 1 µl DNA hinzugegeben. Die *LightCycler*-Kapillaren wurden nach dem Verschließen nochmals zentrifugiert. Alle Bestimmungen wurden am *LightCycler 2.0* durchgeführt.

Weiterhin wurde für die Allel-spezifische PCR und den enzymatischen Verdau parallel eine Positivkontrolle amplifiziert, die den untersuchten Polymorphismus in hetero- oder homozygoter Form enthielt. Für die Allel-spezifische PCR (2.4.5) wurden für jede DNA-Probe aufgrund der Verwendung von Wildtyp- bzw. Mutationsprimer zwei Reaktionsgefäße benötigt.

Zur Detektion mittels enzymatischem Verdau (2.4.4) wurden aus sterilem H₂O, Puffer und Enzym eine Stocklösung (siehe PCR-Protokolle unter 2.4.11) in ein steriles Eppendorf-Cup pipettiert, vermischt und zentrifugiert. Jeweils 10 µl Stocklösung wurden in einem neuen Eppendorf-Cup mit 10 µl PCR-Produkt versetzt und gemäß der für das verwendete Restriktionsenzym nötigen Reaktionsbedingungen im Thermoblock inkubiert.

Die Produkte der Allel-spezifischen PCR und des enzymatischen Verdaus wurden mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht. Die dazu nötigen Agarosegele wurden gemäß den Herstellerangaben aus PeqGold Universalagarose und 1x TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (UltraPure™ 10x TBE-Puffer 1:10 verdünnt) in, falls nichts anderes erwähnt wird, einer Konzentrationen von 1,5% (m/V) hergestellt. Der Lösung wurde eine definierte Menge Ethidiumbromid (1 µg/ml) im Verhältnis 1:10000 zugesetzt. Nach der Gelierung wurde das Gel mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Das jeweilige Reaktionsprodukt wurde in einem Verhältnis von 5:1 mit Gel-Ladepuffer versetzt und es wurden 5 µl in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 100 V für ca. 30 min. Die entstandenen Banden wurden anschließend unter UV-Strahlung mit Hilfe der *Photoprint*-Station sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

2.4.11 Nachweis genetischer Polymorphismen im Rahmen der Antipsychotika-vermittelte Gewichtszunahme

2.4.11.1 rs6971 und rs6973 Polymorphismus (TSPO)

Sowohl rs6971 als auch rs6973 befinden sich im Exon 5, dem TSPO-Gen nachgelagert. Rs6971 ist ein nicht-synonymer SNP. Dies bedeutet, dass er einen Basenaustausch von Cytosin (C) zu Thymin (T) und dadurch einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin impliziert, der eine schlechtere Bindung des TSPO-Liganden zur Folge hat. Rs6973 impliziert einen Basenaustausch von Guanin (G) zu Thymin.

Die Sensorsonde des rs6971 Polymorphismus (*LCRed640*-AGTTGAGTGTGGTCGCGAAGG-Phosphat) wurde bei dieser Methode komplementär zum Wildtyp C-Allel konstruiert, an ihrem 5'-Ende ist sie mit *LCRed640* markiert, am 3'-Ende ist sie mit einer Phosphatgruppe geschützt. Zwei Basen zuvor wurde die Ankersonde (CCATGGTTGTCCCGCCATACGCA-Fluorescein) angeordnet, die am 3'-Ende mit Fluorescein markiert wurde. Die Schmelzkurvenanalyse lieferte für den Wildtyp ein Maximum von 62 °C, der Basenaustausch zu Thymin wurde durch das Maximum bei 54,5 °C angezeigt. Der genaue Verlauf der Schmelzkurve ist **Abbildung 7** dargestellt.

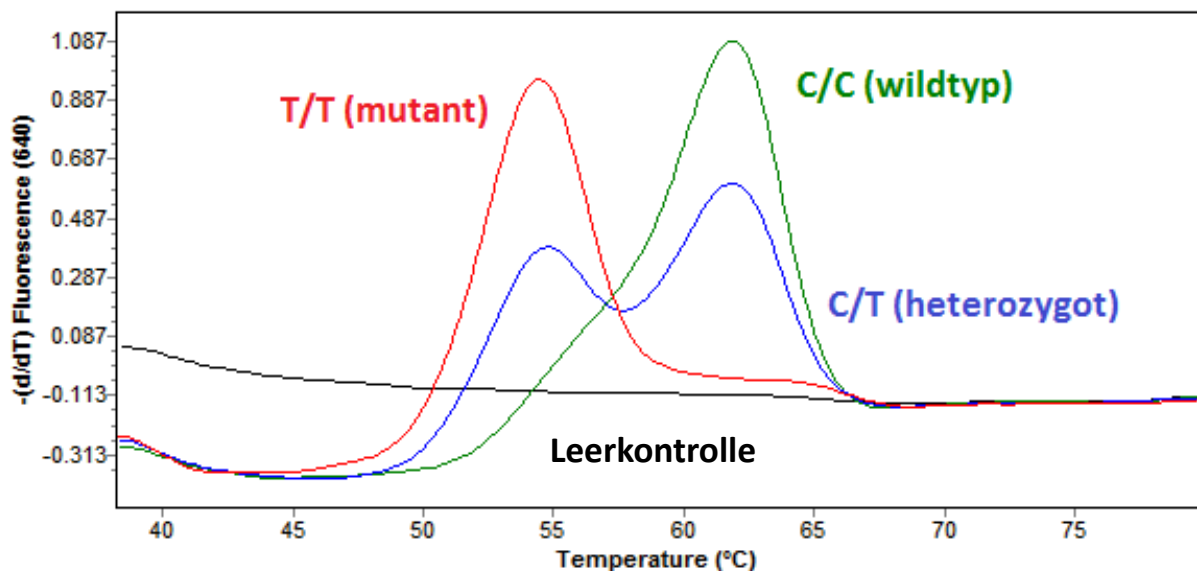


Abbildung 7: rs6971 - Schmelzkurve

Der rs6973 wurde in einem Multiplex-Ansatz simultan bestimmt. Die Sensorsonde (GGGCCACCTCTGAAGCTC-Fluorescein) bindet bei dieser Bestimmung komplementär zum Wildtyp G-Allel. In einem Abstand von drei Basen wurde die Ankersonde (*L*CRed705-TGACCCCTGGGCCAAGGC-Phosphat) angeordnet, die am 5'-Ende mit *L*CRed705 markiert wurde. Der Schmelzpunkt liegt bei 60 °C für Guanin, durch einen Austausch mit Thymin ergibt sich ein Schmelzpunkt von 49 °C (**Abbildung 8**). Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Temperaturprogramm kann **Tabelle 5** entnommen werden. Zusätzlich wurde eine *Color Compensation* durchgeführt um eine eindeutige Zuordnung der Emissionsspektren zu gewährleisten.

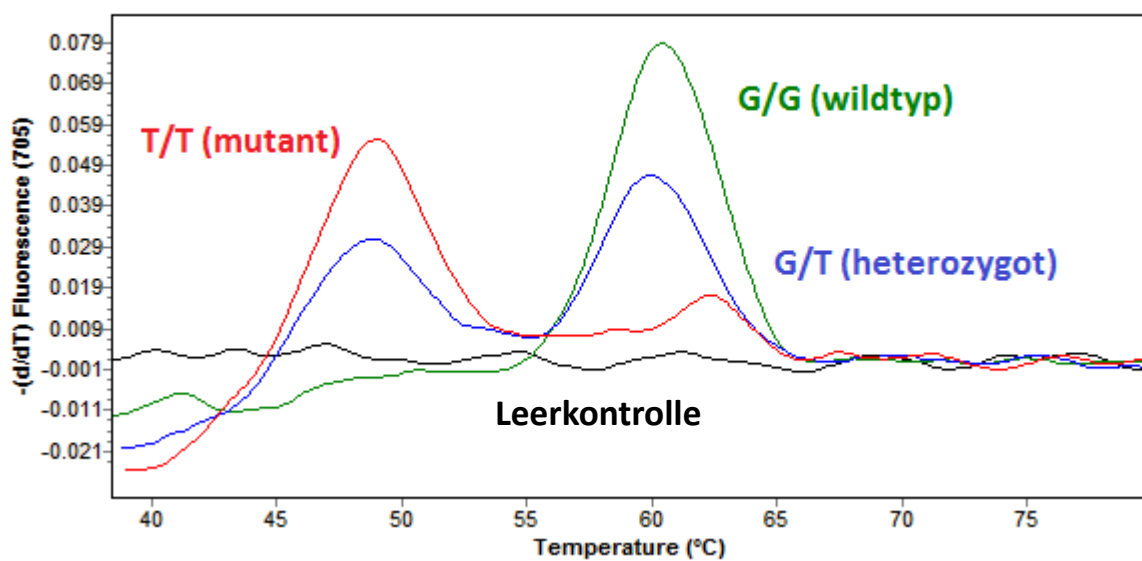


Abbildung 8: rs6973 - Schmelzkurve

Tabelle 5: rs6971 + rs6973 - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denaturierung: 95 °C, 90 sec			
Amplifikation: 40x [95 °C, 10 sec; 60 °C, 20 sec; 72 °C, 20 sec]			
Schmelzkurve: 95 °C, 30 sec; 40-80 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration*
H ₂ O	11,2		
MgCl ₂	1	25 mM	1,25 mM
TSPO rs6971_73F	0,3	25 µM	375 nM
TSPO rs6971_73R	0,5	25 µM	625 nM
TSPO rs6971 Sen	0,5	3 µM	75 nM
TSPO rs6971 Anc	0,5	3 µM	75 nM
TSPO rs6973 Sen	0,75	3 µM	112,5 nM
TSPO rs6973 Sen	0,75	3 µM	112,5 nM
DMSO	1,5		
LightCycler-DNA Master HybProbe	2	10x	1x
DNA	1		
Total	20		

*bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

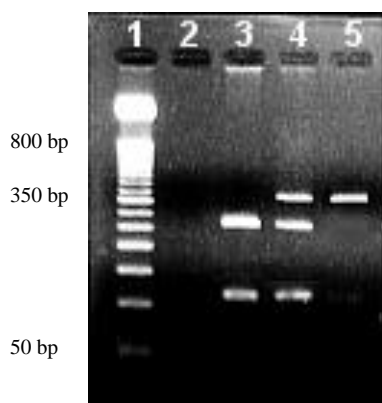
Für die Validierung der *LightCycler*-Methode wurde für rs6971 ein enzymatischer Verdau mittels des Restriktionsenzym BstU1 durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine PCR am *Thermocycler* durchgeführt. Die Zusammensetzung des Ansatzes und das Temperaturprogramm kann **Tabelle 6** entnommen werden.

Tabelle 6: rs6971 enzymatischer Verdau - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denaturierung: 94 °C, 5 min			
Amplifikation: 30x [95 °C, 30 sec; 60 °C, 30 sec; 72 °C, 30 sec]; 72 °C, 10 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration*
H ₂ O	8,1		
Premix J (Biozym)	10	2x	1x
TSPO rs6971_73F	0,3	25 µM	375 nM
TSPO rs6971_73R	0,3	25 µM	375 nM
TaqPolymerase (Qbiogene)	0,3	5 U/µl	1,5 U
DNA	1		
Total	20		

*bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

Anschließend wurden 10 µl des generierten PCR-Produktes mit 10 µl Stocklösung (6 µl H₂O, 2 µl *CutSmart* Puffer 10x, 2 µl BstU1 mit 10000 U/ml) vermischt und bei 60 °C für zwei Stunden mittels Thermoblock erhitzt. BstU1 schneidet nur den Wildtyp (Erkennungssequenz CGCG), sodass zwei Fragmente mit 258 bp und 109 bp entstehen. Das ungeschnittene Amplikon ist 367 bp lang. Die Bandenmuster können **Abbildung 9** entnommen werden. Die untersuchten Proben konnten zuverlässig einem Genotyp zugeordnet werden und stimmten zu 100% mit der *LightCycler*-Messung überein.



1. Längenmarker (50 bp DNA Ladder, Invitrogen)
2. Leerkontrolle
3. Wildtyp (258/109 bp; C/C)
4. Heterozygote (367/258/109 bp; C/T)
5. Homozygote (367 bp; T/T)

Abbildung 9: rs6971 enzymatischer Verdau mit BstU1.

Für den rs6973 Polymorphismus wurde ebenfalls ein enzymatischer Verdau durchgeführt. Als Restriktionsenzym wurde NlaIV verwendet. Da das für die vorherigen Versuche verwendete Amplikon aufgrund zu vielen verschiedenen Schnittstellen nicht für diese Reaktion geeignet war, wurden neue Primer für ein 104 bp langes PCR-Produkt entwickelt. Die Zusammensetzung des Ansatzes und das Temperaturprogramm kann **Tabelle 7** entnommen werden.

Tabelle 7: rs6973 enzymatischer Verdau - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denaturierung: 94 °C, 5 min			
Amplifikation: 30x [95 °C, 30 sec; 60 °C, 30 sec; 72 °C, 30 sec]; 72 °C, 10 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration*
H ₂ O	8,1		
Premix J	10	2x	1x
TSPO rs6973V F2	0,3	25 µM	375 nM
TSPO rs6973V R	0,3	25 µM	375 nM
TaqPolymerase (Qbiogene)	0,3	5 U/µl	1,5 U
DNA	1		
Total	20		

*bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

Anschließend wurden 10 µl des generierten PCR-Produktes mit 10 µl Stocklösung (6 µl H₂O, 2 µl *CutSmart* Puffer 10x, 2 µl NlaIV 2000 U/ml) vermischt und bei 37 °C für 150 min auf dem Thermoblock erhitzt. NlaIV schneidet nur den Wildtyp (Erkennungssequenz GGNNCC), sodass zwei Fragmente mit 54 bp und 60 bp entstehen. Das Amplikon der Mutante bleibt mit 104 bp erhalten. Für die Auftrennung mittels Gelelektrophorese wurde hier ein 2%iges Agarosegel verwendet. Die Bandenmuster können **Abbildung 10** entnommen werden.

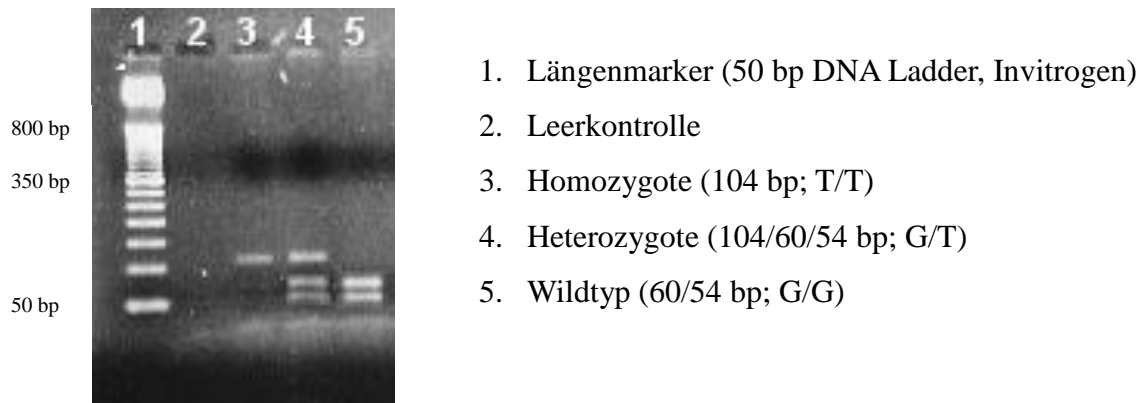


Abbildung 10: rs6973 enzymatischer Verdau mit NlaIV.

2.4.11.2 rs8087522 Polymorphismus (MC4R)

Der rs8087522 Polymorphismus liegt ca. 500 bp 5'-wärts des Gens MC4R und stellt eine Punktmutation des Wildtyp-Allels Cytosin zu Thymin dar.

Dieser Polymorphismus wurde bereits in der adjustierten Subpopulation im Rahmen der Masterarbeit von Ruoyu Sun am *GS Junior* mit Pyrosequenzierung bestimmt. Die im Folgenden beschriebene Methode am *LightCycler* diente daher der Validierung der Methode am *GS Junior* bzw. der Messung der gesamten Studienpopulation. Eine weitere Methode mittels enzymatischem Verdau oder Allelspezifischer PCR wurde daher nicht entwickelt.

Die Sensorsonde (TCTCTGTTTTTCAGGTATTTTAACTGA-Fluorescein) wurde bei dieser Methode komplementär zum Wildtyp C-Allel konstruiert und ist an ihrem 3'-Ende mit Fluorescein markiert. Mit einem Abstand von einer Base folgt die Ankersonde (LCRed640-CCACTACTGGCTGGGTTCTTAATAAA-Phosphat), die an ihrem 5'-Ende mit LCRed640 markiert und am 3'-Ende mit einer Phosphatgruppe geschützt ist. Die Schmelzkurvenanalyse lieferte für den Wildtyp ein Maximum von 59 °C, der Basenaustausch zu Thymin wurde durch das Maximum bei 54 °C angezeigt. Der genaue Verlauf der Schmelzkurve ist in **Abbildung 11** dargestellt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Temperaturprogramm kann **Tabelle 8** entnommen werden.

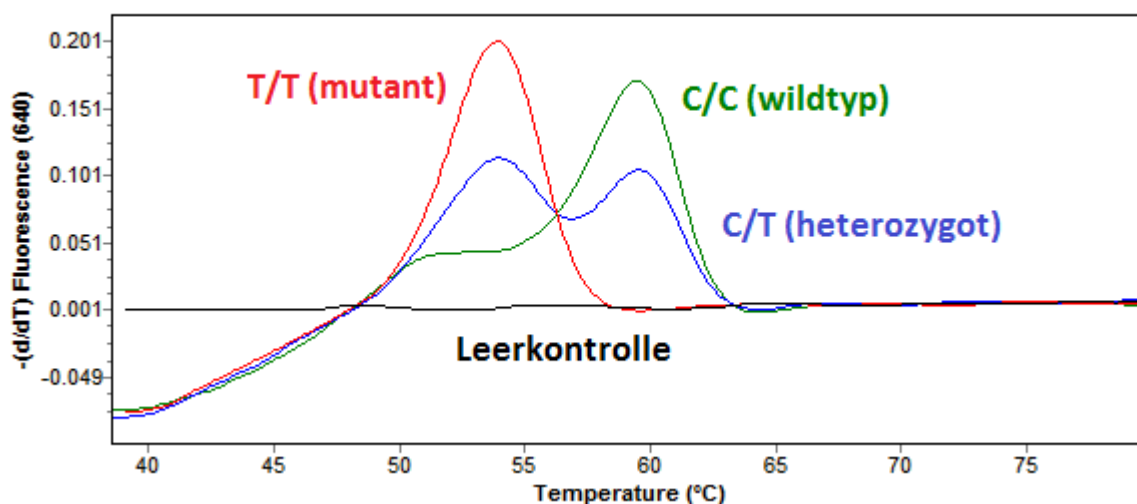


Abbildung 11: rs8087522 - Schmelzkurve

Tabelle 8: rs8087522 - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denaturierung: 95 °C, 10 min			
Amplifikation: 40x [95 °C, 10 sec; 58 °C, 20 sec; 72 °C, 20 sec]			
Schmelzkurve: 95 °C, 30 sec; 40-80 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration*
H ₂ O	14		
MgCl ₂	1	25 mM	1,25 mM
MC4Rrs8087522 Anc	0,5	25 µM	625 nM
MC4Rrs8087522 Sen	0,5	25 µM	625 nM
MC4R_rs8087522 PF	0,5	3 µM	75 nM
MC4R_rs8087522 PR	0,5	3 µM	75 nM
LightCycler-FastStart DNA Master HybProbe	2	10x	1x
DNA	1		
Total	20		

*bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

2.4.11.3 rs6435326, rs1801318 und rs1053517 Polymorphismus (NDUFS1)

Der rs6435326 liegt im Intron 13 des NDUFS1-Gen und impliziert einen Basenaustausch von Adenin (A) zu Thymin, rs1053517 liegt in Exon 19 und hat einen Basenaustausch von Cytosin zu Thymin zur Folge. Rs1801318 ist ein synonymer Basenaustausch, er ist in Exon 12 lokalisiert und impliziert einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin. Beide Triplets codieren die Aminosäure Arginin.

Die Sensorsonde des rs6435326 Polymorphismus (AACTCCTTTTGTAAATAAAGAAAGATTT-Fluorescein) wurde bei dieser Methode komplementär zum Wildtyp A-Allel konstruiert und ist an ihrem 3'-Ende mit Fluorescein markiert. Vier Basen danach folgt die Ankersonde (*LCRed610*-GAAGTTAAAAGTGCAATTCTTTCAGG-Phosphat), die an ihrem 5'-Ende mit *LCRed610* markiert und am 3'-Ende mit einer Phosphatgruppe geschützt ist. Die Schmelzkurvenanalyse lieferte für den Wildtyp ein Maximum von 55,5 °C, der Basenaustausch zu Thymin wurde durch das Maximum bei 50,5 °C angezeigt. Der genaue Verlauf der Schmelzkurve ist **Abbildung 12** dargestellt.

Rs1053517 wurde in einem Multiplex-Ansatz simultan bestimmt. Die Sensorsonde (ATGTCACAA-TATCTTTAAAACAGCAGG-Fluorescein) bindet bei dieser Bestimmung komplementär zum Wildtyp C-Allel. In einem Abstand von zwei Basen wurde die Ankersonde (*LCRed705*-CAGTGGCTCACACCTGTAAGCC-Phosphat) angeordnet, die am 5'-Ende mit *LCRed705* markiert wurde. Der Schmelzpunkt lag für Cytidin bei 62 °C, durch einen Austausch mit Thymin ergab sich ein Schmelzpunkt von 57 °C (**Abbildung 13**). Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Temperaturprogramm kann **Tabelle 9** entnommen werden. Zusätzlich wurde eine *Color Compensation* durchgeführt um eine eindeutige Zuordnung der Emissionsspektren zu gewährleisten.

Die *LightCycler* Methode zur Bestimmung von rs1801318 ließ sich nicht mit der Bestimmung der anderen beiden NDUFS1-Polymorphismen in einem Reaktionsansatz kombinieren. Daher wurde rs1801318 in einem zusätzlichen Reaktionsansatz bestimmt. Die Sensorsonde (CACTGTTTAAT-GCTAGAATTCGA-Fluorescein) wurde bei dieser Methode komplementär zum Wildtyp A-Allel konstruiert und ist an ihrem 3'-Ende mit Fluorescein markiert. Zwei Basen danach folgt die Ankersonde (*LCRed640*-GAGGTTGGTAATAGTATTTATTCAAGGTTT-Phosphat), die an ihrem 5'-Ende mit *LCRed640* markiert und am 3'-Ende mit einer Phosphatgruppe geschützt ist. Die Schmelzkurvenanalyse lieferte für den Wildtyp ein Maximum bei 52 °C, der Basenaustausch zu Guanin wurde durch das Maximum bei 47 °C angezeigt. Der genaue Verlauf der Schmelzkurve ist in **Abbildung 14**

dargestellt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Temperaturprogramm kann **Tabelle 10** entnommen werden.

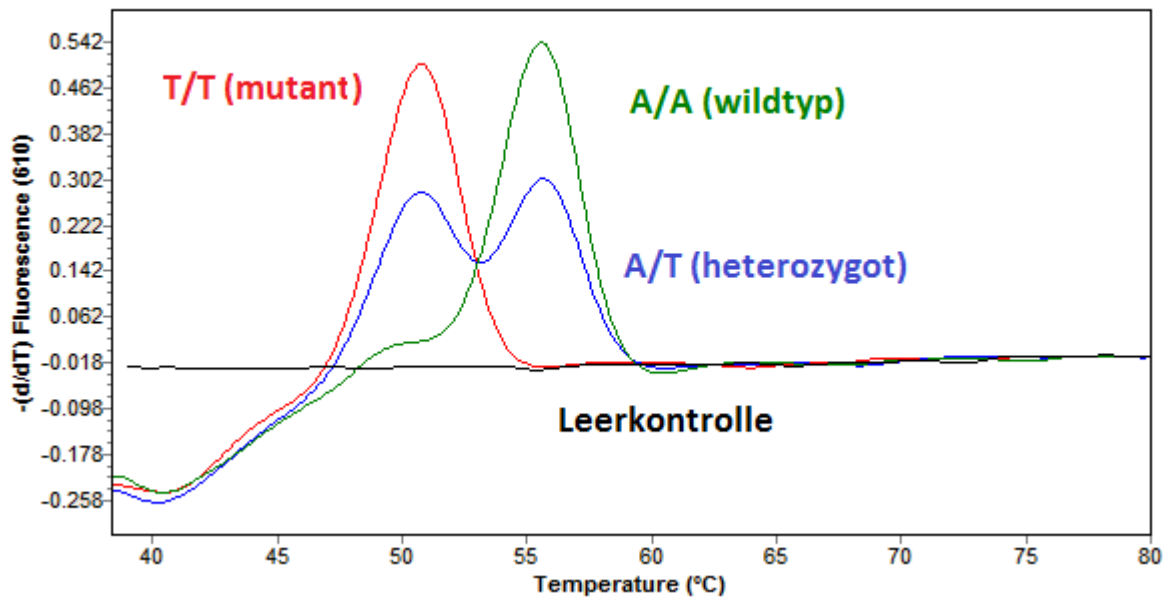


Abbildung 12: rs6435326 - Schmelzkurve

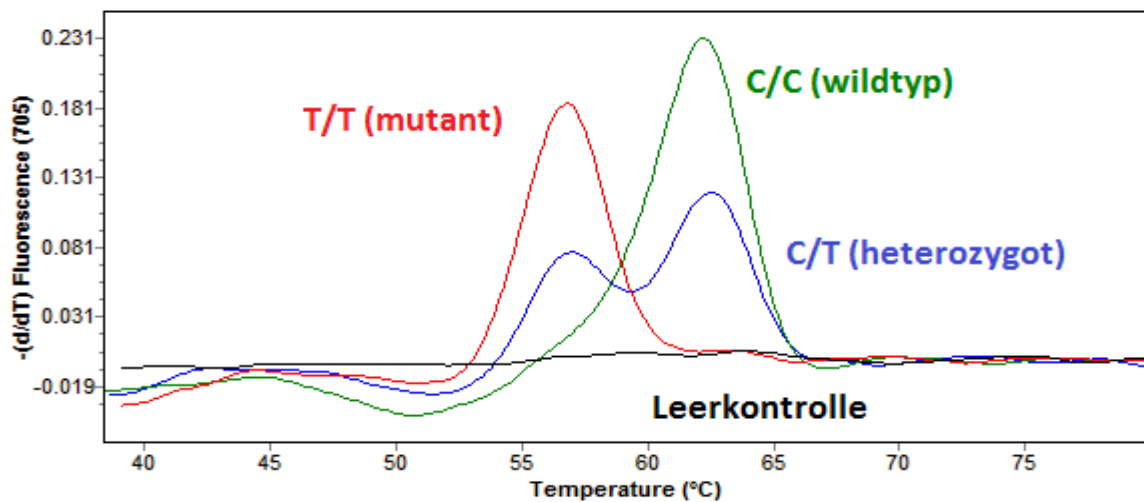


Abbildung 13: rs1053517 – Schmelzkurve

Tabelle 9: rs6435326 + rs1053517 - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denaturierung: 95 °C, 90 sec			
Amplifikation: 40x [95 °C, 10 sec; 58 °C, 20 sec; 72 °C, 20 sec]			
Schmelzkurve: 95 °C, 30 sec; 40-80 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration*
H ₂ O	11,5		
MgCl ₂	1,5	25 mM	1,875 mM
Ndufs1_rs6435326 PF1	0,5	25 µM	625 nM
Ndufs1_rs6435326 PR1	0,5	25 µM	625 nM
Ndufs1_rs1053517 PF	0,5	25 µM	625 nM
Ndufs1_rs1053517 PR	0,5	25 µM	625 nM
Ndufs6435326 Sen	0,5	3 µM	75 nM
Ndufs6435326 Anc	0,5	3 µM	75 nM
Ndufs1053517 Sen	0,5	3 µM	75 nM
Ndufs1053517 Anc	0,5	3 µM	75 nM
LightCycler-DNA Master HybProbe	2	10x	1x
DNA	1		
Total	20		

*bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

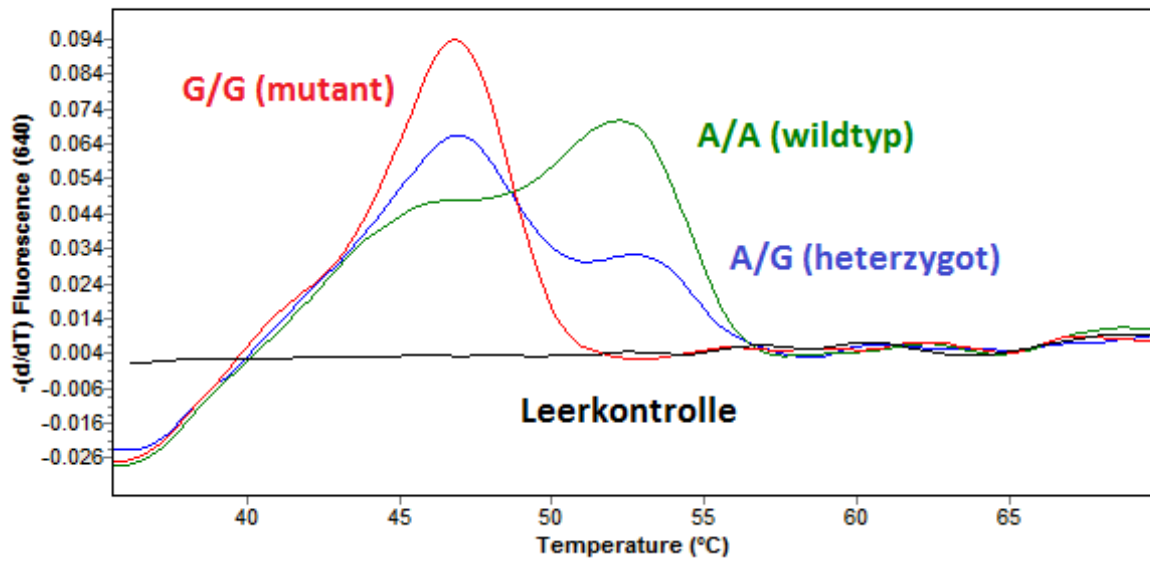


Abbildung 14: rs1801318 Schmelzkurve

Tabelle 10: rs1801318 - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denaturierung: 95 °C, 90 sec			
Amplifikation: 40x [95 °C, 10 sec; 60 °C, 20 sec; 72 °C, 20 sec]			
Schmelzkurve: 95 °C, 30 sec; 37-70 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration*
H ₂ O	12		
MgCl ₂	1	25 mM	1,25 mM
Ndufs1_rs1801318 PF	0,5	25 µM	625 nM
Ndufs1_rs1801318 PR	0,5	25 µM	625 nM
Ndufs1801318 Sen3	0,5	3 µM	75 nM
Ndufs1801318 Anc3	0,5	3 µM	75 nM
DMSO	2		
LightCycler-DNA Master HybProbe	2	10x	1x
DNA	1		
Total	20		

*bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

Für die Validierung der *LightCycler*-Methoden wurde für rs6435326 eine Allel-spezifische PCR durchgeführt, da hierfür kein geeignetes Restriktionsenzym zur Verfügung stand. Hierfür wurden ein *reverse* Primer (ACCACCCCAAACAGGTAT) sowie ein *forward* Wildtyp-Primer (GGAATAACTCCTTTTGTAATAAAGAA) und ein *forward* Mutant-Primer (GGAATAACTCCTTTTGTAATAAAGAT) entwickelt. Die Zusammensetzung der jeweiligen Reaktionsansätze sowie das Temperaturprogramm können **Tabelle 11** entnommen werden.

Tabelle 11: rs6435326 ALS PCR - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denaturierung: 94 °C, 5 min			
Amplifikation: 30x [95 °C, 30 sec; 60 °C, 30 sec; 72 °C, 30 sec]; 72 °C, 10 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration*
H ₂ O	15,4		
Inkubationspuffer (Qbiogene)	2	10x	1x
dNTP (Peqlab)	0,3	5 mM	75 µM
Ndufs1_rs6435326 PF1_V oder Ndufs1_rs6435326 PF2_V	0,5	25 µM	625 nM
Ndufs1_rs6435326 PR_V	0,5	25 µM	625 nM
Taq Polymerase (Qbiogene)	0,3	5 U/µl	1,5 U
DNA	1		
Total	20		

*bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (**Abbildung 15**). Das entstandene Amplikon hatte eine Länge von 229 Basenpaaren.

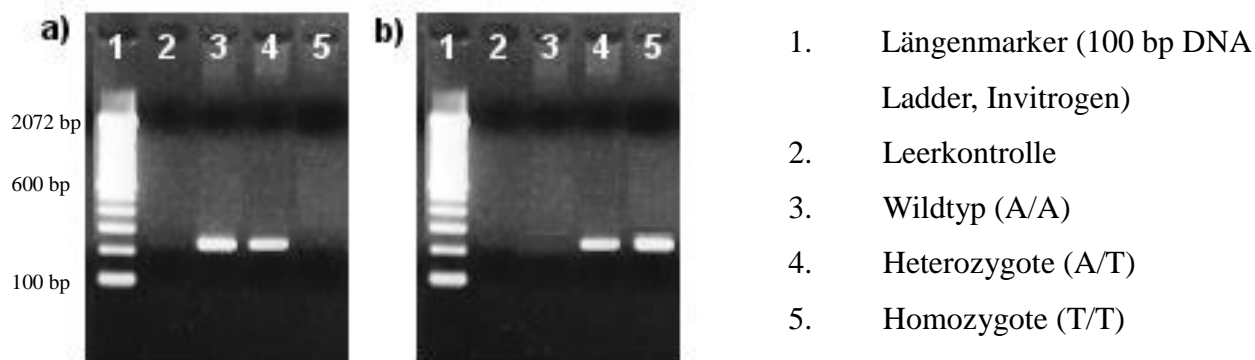


Abbildung 15: rs6435326 Allel-spezifische PCR a) Wildtyp-Primer; b) Mutant-Primer.

Für rs1053517 und rs1801318 wurde jeweils ein enzymatischer Verdau mit TSP45I bzw. EcoRI durchgeführt. Dazu wurde zunächst für beide Polymorphismen ein neues PCR-Produkt am *Thermocycler* generiert. Die jeweilige Zusammensetzung der Reaktionsansätze sowie die Temperaturprogramme können **Tabelle 12** und **Tabelle 13** entnommen werden.

Tabelle 12: rs1053517 enzymatischer Verdau - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denaturierung: 94 °C, 5 min			
Amplifikation: 30x [95 °C, 30 sec; 55 °C, 30 sec; 72 °C, 30 sec]; 72 °C, 10 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration*
H ₂ O	7,1		
Premix J (Biozym)	10	2x	1x
Ndufs1_rs1053517 PF	0,3	25 µM	625 nM
Ndufs1_rs1053517 PR	0,3	25 µM	625 nM
BSA	1		
Taq Polymerase (Qbiogene)	0,3	5 U/µl	1,5 U
DNA	1		
Total	20		

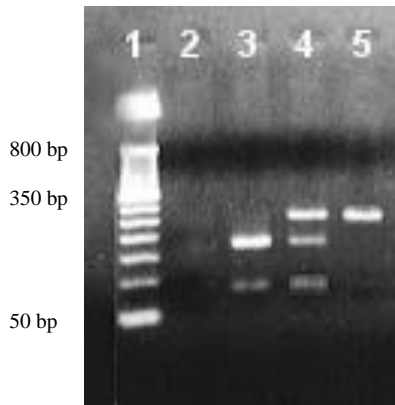
*bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

Tabelle 13: rs1801318 enzymatischer Verdau - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denat: 94 °C, 5 min			
Amp: 30x [95 °C, 30 sec; 60 °C, 30 sec; 72 °C, 30 sec]; 72 °C, 10 min;			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration*
H ₂ O	15,4		
Inkubationspuffer (Qbiogene)	2	10x	1x
dNTP (Peqlab)	0,3	5 mM	75 µM
Ndufs1_rs1801318 PF	0,5	25 µM	625 nM
Ndufs1_rs1801318 PR	0,5	25 µM	625 nM
Taq Polymerase (Qbiogene)	0,3	5 U/µl	1,5 U
DNA	1		
Total	20		

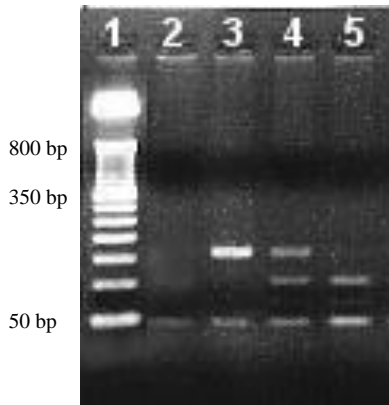
*bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

10 µl des generierten PCR-Produktes wurden anschließend mit 10 µl Stocklösung (rs1053517: 6 µl H₂O, 2 µl *CutSmart*, 2 µl TSP45I mit 5000 U/ml; rs1801318: 6 µl H₂O, 2 µl *Neb2-Buffer* 10x, 2 µl *EcoRI* mit 20000 U/ml) vermischt. Der Reaktionsansatz für rs1053517 wurde bei 65 °C für 60 Minuten auf dem Thermoblock erhitzt, für rs1801318 wurde der entsprechende Ansatz bei 37 °C für 60 Minuten inkubiert. TSP45I schneidet den Wildtyp (Erkennungssequenz GTSAC; S = G/C). Es entstehen zwei Fragmente von 61 und 182 bp, bei Vorliegen des mutierten Allels bleibt das PRC-Produkt mit einer Länge von 243 bp erhalten. *EcoRI* schneidet das Wildtyp-Allel A (Erkennungssequenz GAATTC). Die entstehenden DNA-Fragmente sind 74 und 89 bp lang, während das ungeschnittene Amplikon 163 Basenpaare lang ist. Die Bandenmuster können **Abbildung 16** und **Abbildung 17** entnommen werden.



1. Längenmarker (50 bp DNA Ladder, Invitrogen)
2. Leerkontrolle
3. Wildtyp (182/61 bp; C/C)
4. Heterozygote (243/182/61 bp; C/T)
5. Homozygote (243 bp; T/T)

Abbildung 16: rs1053517 enzymatischer Verdau mit TSP45I.



1. Längenmarker (50 bp DNA Ladder, Invitrogen)
2. Leerkontrolle
3. Homozygote (163 bp; G/G)
4. Heterozygote (163/89/74 bp; A/G)
5. Wildtyp (89/74 bp; A/A)

Abbildung 17: rs1801318 enzymatischer Verdau mit EcoRI.

2.4.11.4 rs7185735 und rs17817288 Polymorphismus (FTO)

Die Polymorphismen rs7185735 und rs1787288 sind im ersten Intron des FTO-Gens lokalisiert und stellen eine Punktmutation von Adenin zu Guanin bzw. von Guanin zu Adenin dar.

Für die Methode am *LightCycler* wurde für rs7185735 die Sensorsonde (*LCRed640*-AGG-TAACTACCCCCATGATACTAAAGAC-Phosphat) komplementär zum mutierten G-Allel konstruiert, an ihrem 5'-Ende ist sie mit *LCRed640* markiert, am 3'-Ende ist sie mit einer Phosphatgruppe geschützt. Zwei Basen davor wurde die Ankersonde (AAGGTCTCCCTACCCCCGC-Fluorescein) angeordnet, die am 3'-Ende mit Fluorescein markiert wurde. Die Schmelzkurvenanalyse lieferte für das mutierte Allel G ein Maximum bei 62 °C, das Wildtyp-Allel A wurde durch ein Maximum der Schmelzkurve bei 56 °C angezeigt. Der genaue Verlauf der Schmelzkurve ist in **Abbildung 18** dargestellt.²⁴⁰

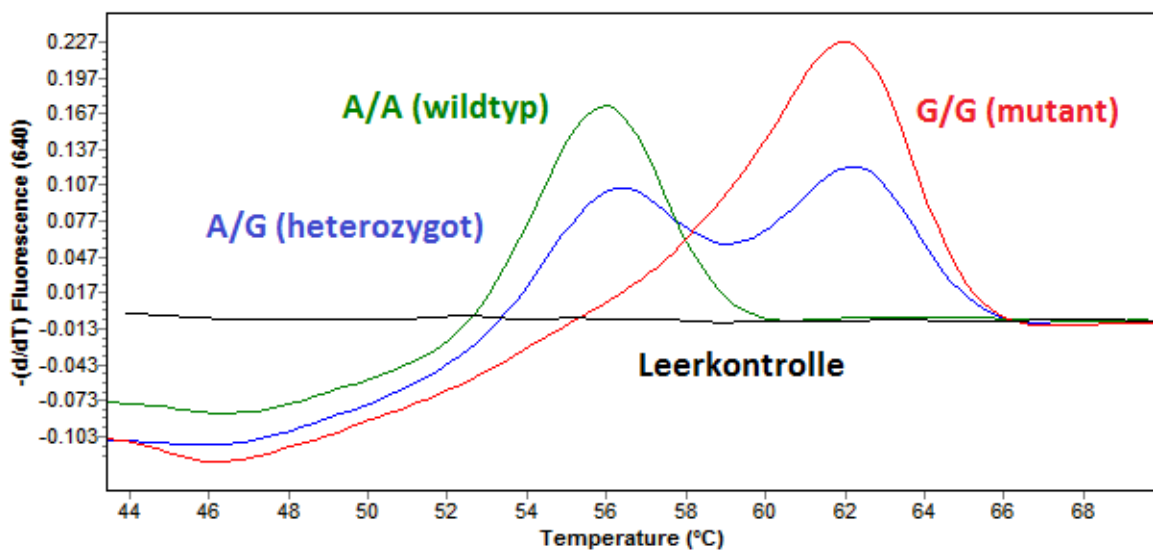


Abbildung 18: rs7185735 - Schmelzkurve

Rs1787288 wurde in einem Multiplex-Ansatz simultan bestimmt. Die Sensorsonde (*LCRed705*-AT-TCCAGCAGCTACTCATTATTTTTC-Phosphat) bindet bei dieser Bestimmung komplementär zum Wildtyp-Allel G. Sie ist an ihrem 5'-Ende mit *LCRed705* markiert und an ihrem 3'-Ende mit Phosphat geschützt. Vier Basen davor wurde die Ankersonde (CACAGTTCTGAG-TAACAAGTGTCGTCCTCA-Fluorescein) angeordnet, die am 5'-Ende mit Fluorescein markiert wurde. Die Schmelzpunkte liegen analog zu der Bestimmung von rs7185735 für das Wildtyp-Allel Guanin bei 62 °C. Durch einen Austausch mit Alanin ergibt sich ein Schmelzpunkt von 56 °C (**Abbildung**

19). Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das Temperaturprogramm können **Tabelle 14** entnommen werden. Zusätzlich wurde eine *Color Compensation* durchgeführt, um eine eindeutige Zuordnung der Emissionsspektren zu gewährleisten.

Für die Validierung der *LightCycler*-Methode wurde für rs7185735 ein enzymatischer Verdau mit Hilfe des Restriktionsenzym NlaIII durchgeführt. Dazu wurde zunächst ein neuer PCR-Ansatz am *Thermocycler* entwickelt. Die Zusammensetzung des Ansatzes und das Temperaturprogramm können **Tabelle 15** entnommen werden.²⁴⁰

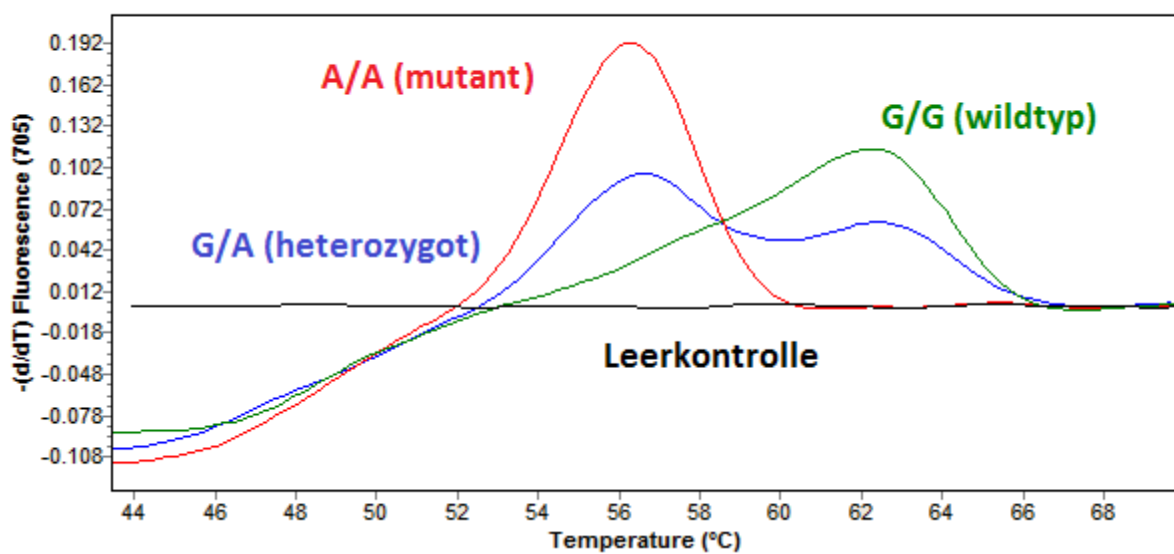


Abbildung 19: rs1787288 - Schmelzkurve

Tabelle 14: rs7185735 + rs1787288 - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denaturierung: 95 °C, 90 sec			
Amplifikation: 40x [95 °C, 10 sec; 60 °C, 20 sec; 72 °C, 20 sec]			
Schmelzkurve: 95 °C, 30 sec; 40-70 °C bei 0,1 °C/sec			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration*
H ₂ O	12,25		
MgCl ₂	0,75	25 mM	0,9375 mM
FTOrs735 F3	0,5	25 µM	625 nM
FTOrs735 R3	0,5	25 µM	625 nM
FTOrs288 F1	0,5	25 µM	625 nM
FTOrs288 R1	0,5	25 µM	625 nM
FTOrs735 Sen2	0,5	3 µM	75 nM
FTOr735 Anc2	0,5	3 µM	75 nM
FTOrs288 Sen2	0,5	3 µM	75 nM
FTOrs288 Anc2	0,5	3 µM	75 nM
LightCycler-DNA Master HybProbe	2	10x	1x
DNA	1		
Total	20		

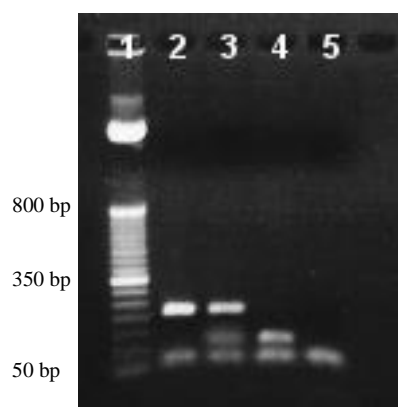
*bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

Tabelle 15: rs7185735 enzymatischer Verdau - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denaturierung: 94 °C, 5 min			
Amplifikation: 30x [94 °C, 30 sec; 60 °C, 30 sec; 72 °C, 30 sec]; 72 °C, 10 min;			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration*
H ₂ O	15,4		
Inkubationspuffer (Qbiogene)	2	10x	1x
dNTP (Peqlab)	0,3	5 mM	75 µM
FTOrs735 F3	0,5	25 µM	625 nM
FTOrs735 R3	0,5	25 µM	625 nM
Taq Polymerase (Qbiogene)	0,3	5 U/µl	1,5 U
DNA	1		
Total	20		

*bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

Anschließend wurden 10 µl des generierten PCR-Produktes mit 10 µl Stocklösung (6 µl H₂O, 2 µl *CutSmart* Puffer 10x, 2 µl NlaIII mit 10000 U/ml) vermischt und bei 37 °C für zwei Stunden mittels Thermoblock erhitzt. NlaIII schneidet nur die Mutante (Erkennungssequenz CATG), es entstehen zwei Amplikons mit 103 bp und 109 bp. Bei Vorliegen des Wildtyps bleibt das Amplikon mit 212 bp ungeschnitten. Die Bandenmuster können **Abbildung 20** entnommen werden.



1. Längenmarker (50 bp DNA Ladder, Invitrogen)
2. Wildtyp (212 bp; A/A)
3. Heterozygote (212/109/103 bp; A/G)
4. Homozygote (109/103 bp; G/G)
5. Leerkontrolle

Abbildung 20: rs7185735 enzymatischer Verdau mit NlaIII.

Bezüglich rs1787288 wurde eine Allel-spezifische PCR entwickelt. Hierfür wurden ein *forward* Primer (GGAGAAAGTTGGGAAGGTC) sowie ein *reverse* Wildtyp-Primer (TCCAATTATTCCAGCAGCTCC) und ein *reverse* Mutant-Primer (TCCAATTATTCCAGCAGCTCT) konstruiert. Die Zusammensetzung der jeweiligen Reaktionsansätze sowie das Temperaturprogramm können **Tabelle 16** entnommen werden.

Tabelle 16: rs1787288 ALS PCR - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denaturierung: 94 °C, 5 min			
Amplifikation: 40x [94 °C, 30 sec; 56 °C, 30 sec; 72 °C, 30 sec]; 72 °C, 10 min			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration*
H ₂ O	8,1		
Premix J (Biozym)	10	2x	1x
FTOrs288 PF-V	0,3	25 µM	375 µM
FTOrs288 PR5-V oder FTOrs288 PR6-V	0,3	25 µM	375 nM
Taq Polymerase (Qbiogene)	0,3	5 U/µl	1,5 U
DNA	1		
Total	20		

*bezogen auf ein Gesamtvolumen von 20 µl

Die jeweiligen PCR-Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht (**Abbildung 21**). Das entstandene Amplikon ist 240 Basenpaare lang.

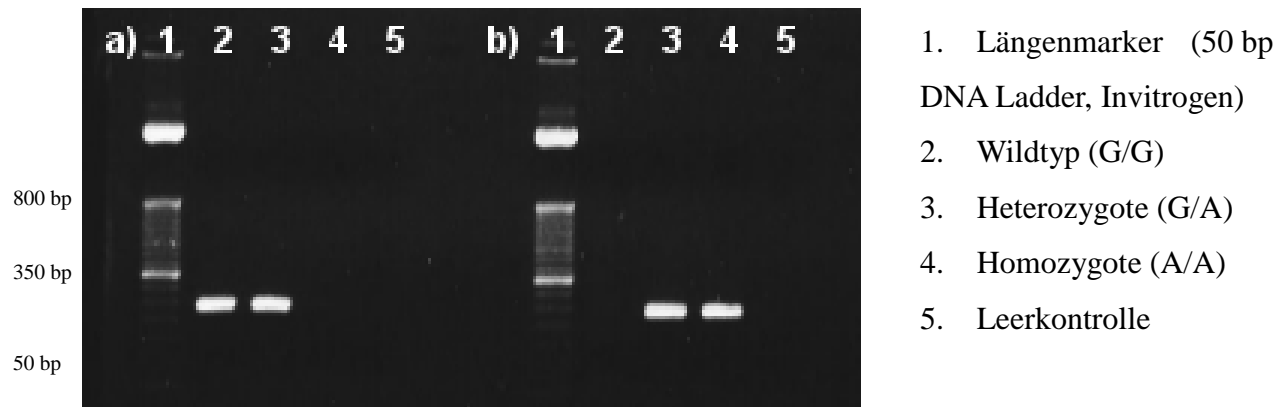


Abbildung 21: rs1787288 Allel-spezifische PCR a) Wildtyp-Primer; b) Mutant-Primer.

2.4.11.5 rs9939609 Polymorphismus (FTO)

Der rs9939609 Polymorphismus liegt ebenfalls im ersten Intron des FTO-Gens und verursacht eine Punktmutation von Adenin zu Thymin.

Die Genotypisierungsergebnisse bezüglich rs9939609 wurden im Rahmen dieser Arbeit als Ergänzung zur Auswertung von FTO rs7185735 und rs1787288 verwendet. Die Methodenentwicklung zur Bestimmung von rs9939609 sowie die Messung der Studienpopulation wurden von Dr. Fabian Czerwensky durchgeführt. Der Polymorphismus wurde am *LightCycler* mit Hilfe einer *SimpleProbe*-Sonde gemessen. Zur Kontrolle wurde eine Allel-spezifische PCR entwickelt sowie eine Sequenzierung am *GS Junior* durchgeführt. Die genaue Methodenbeschreibung sowie die Abbildungen der Ergebnisse können der Promotionsarbeit von Dr. Czerwensky entnommen werden.⁶⁸

2.4.12 Nachweis genetischer Polymorphismen im Rahmen der Alzheimer-Studie

Im Rahmen der Alzheimer-Studie wurden die bedeutensten Polymorphismen des Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6) bestimmt. Alle Messungen wurden nach bestehenden *Standard Operating Procedures* (SOP) des PCR-Labors der Klinischen Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar nach oben beschriebenen Methoden durchgeführt. Zunächst wurde aus der extrahierten DNA in einer ersten PCR das gesamte CYP2D6 präamplifiziert (SOP: C2D6 1.PCR-P PCR-1.PCR). Dieses PCR-Produkt wurde als Ausgangsmaterial für alle weiteren Untersuchungen verwendet (siehe **Tabelle 17**).

Tabelle 17: Übersicht über die im Rahmen der Alzheimer-Studie bestimmten Polymorphismen und den jeweiligen Methoden.

Polymorphismus	SOP LightCycler	SOP Thermocycler
Deletion (*5) / Duplikation	C2D6 Del-Dup LC	C2D6 Del-Dup-P PCR Del-Dup
*3	C2D6 multiplexB-S Sonde multiplexB	C2D6 multiplex-P PCR multiplex
*4, *6	C2D6 multiplexA-S Sonde multiplexA	C2D6 multiplex-P PCR multiplex
*9	C2D6 9-S Sonde-9	
*10	C2D6 10-S Sonde-10	C2D6 10-P PCR-10
*41	C2D6 41-S Sonde-41	

Die Messungen der Serumkonzentration von Donepezil wurden von Frau Marion Stange und Frau Dr. Heike Schneider mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS) durchgeführt und sind im Rahmen der Dissertation von Frau Marion Stange näher beschrieben.²⁴¹

2.5 Analyse epigenetischer Marker

Der Standard zur Bestimmung von Methylierungsmustern der DNA ist die Bisulfit-Sequenzierung. Hierfür wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methode am Sequenzierautomaten *GS Junior* von *Roche* (Basel, Schweiz) entwickelt und validiert. Nach erfolgreicher DNA-Isolation (siehe 2.4.1) wurde zunächst eine Bisulfit-Konvertierung durchgeführt. Mittels anschließender PCR-Reaktion am *Thermocycler* wurde das zu untersuchende Amplikon generiert und mit Gelelektrophorese überprüft. Nach Aufreinigung und DNA-Bibliothek-Aufbereitung wurden die Proben mittels Pyrosequenzierung am Sequenzierautomaten *GS Junior* sequenziert und mit der dazugehörigen *GS Amplicon Variant Analyzer (AVA)*-Software von *Roche* ausgewertet. Da diese Methode einigen Schwankungen unterworfen ist, wurde eine Vergleichsmethode an der *Droplet Digital PCR* entwickelt. Hierfür wurde das Bisulfit-konvertierte und aufgereinigte Amplikon eingesetzt.

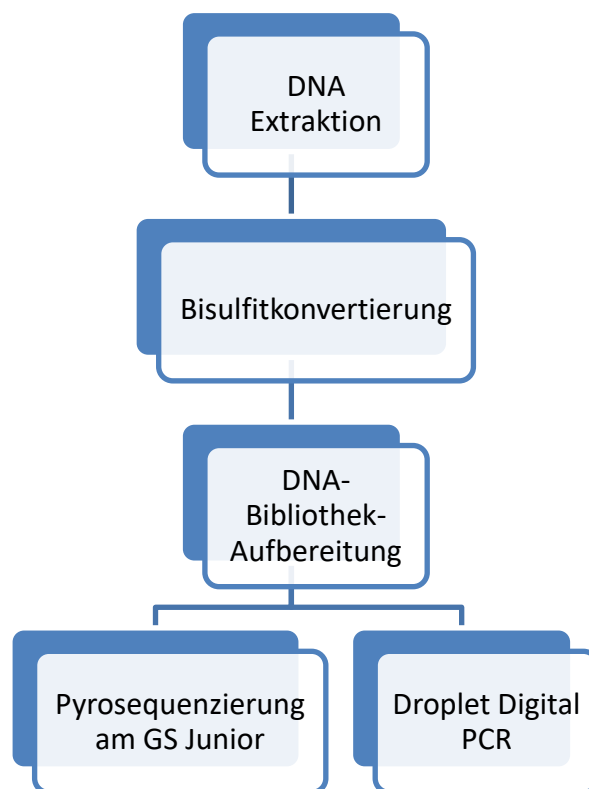


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Bestimmung epigenetischer Marker.

2.5.1 Bisulfit-Konvertierung

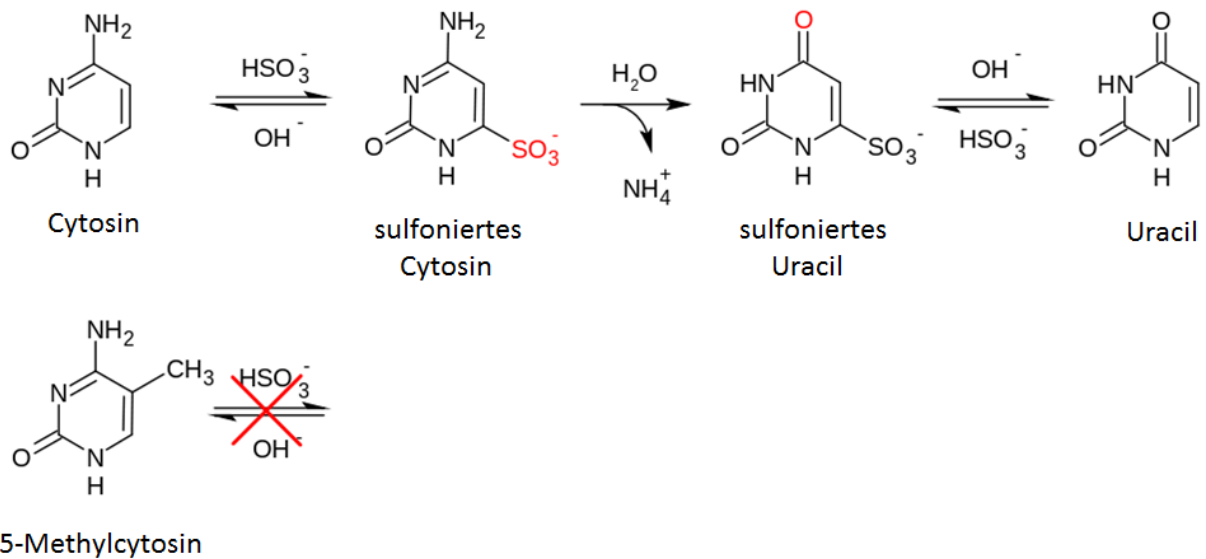


Abbildung 23: Reaktionsmechanismus der Bisulfit-Konvertierung²⁴²: Cytosin wird umgewandelt zu Uracil, während 5-Methylcytosin nicht umgesetzt wird.

Die Bisulfit-Konvertierung ist das Mittel der Wahl, um 5-Methylcytosin von unmethyliertem Cytosin zu unterscheiden. Sie beruht darauf, dass unmethyliertes Cytosin durch die Reaktion mit Sulfid-Ionen zu Uracil (U) umgewandelt wird. Hierbei reagiert Natriumbisulfit mit der 5,6-Doppelbindung des Cytosins, sodass sulfoniertes Cytosin als Zwischenprodukt entsteht. Durch eine energetisch begünstigte Deaminierung entsteht sulfoniertes Uracil. Die Sulfonatgruppe wird unter alkalischen Bedingungen abgespalten und man erhält das Reaktionsprodukt Uracil. Alle Reaktionen sind Gleichgewichtsreaktion. Während unter den gewählten Reaktionsbedingungen bei Cytosin das Gleichgewicht auf Seiten der Produkte liegt, verläuft die Sulfonierung des Methylcytosins wesentlich langsamer. Das Gleichgewicht liegt auf Seite des Edukts. Es kommt zu keiner Umsetzung. Probleme, die bei dieser Reaktion auftreten, sind eine mögliche Degradation der DNA sowie eine unvollständige Konvertierung. Um diese Probleme zu minimieren ist es wichtig, ein möglichst schonendes und kurzes aber trotzdem effektives Temperaturprogramm für die Reaktion zu verwenden. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete *EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit* verspricht eine Konvertierung von nicht methyliertem Cytosin von 99,5%, einen Erhalt von 5-Methylcytosin von ebenfalls 99,5% sowie einen DNA-Erhalt von 80%. Eine weitere Limitation dieser Methode ist die fehlende Unterscheidbarkeit zwischen Methyl- und Hydroxymethylcytosin, was durch Bisulfit ebenfalls nicht umgesetzt wird. Eine Unterscheidung wäre durch eine vorangehende Oxidation des Hydroxymethylcytosins zu

Cytosin möglich. Da der Gehalt an Hydroxymethylcytosin in der menschlichen DNA mit 0,6-0,9% sehr gering ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit auf eine genaue Unterscheidung verzichtet. Die Produkt-DNA verhält sich ähnlich zu RNA. In einer nachfolgenden PCR-Reaktion am *Thermocycler* wird bei den DNA-Amplifikaten Uracil durch Thymin ersetzt.

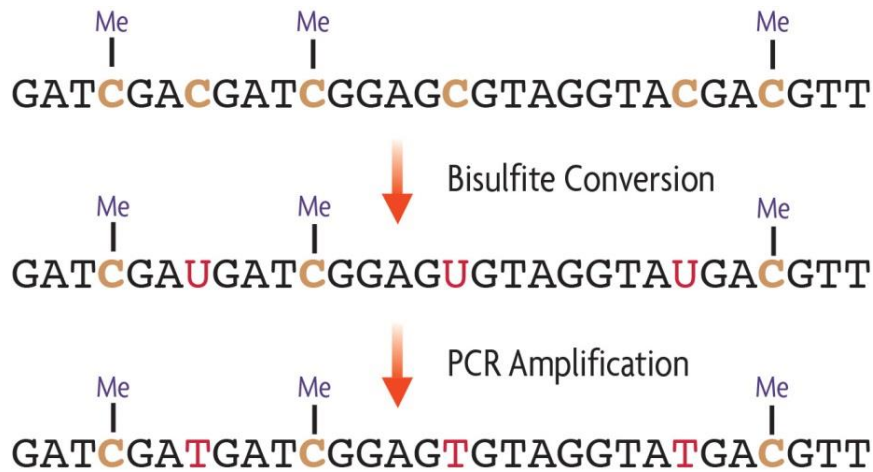


Abbildung 24: Schema der Bisulfit-Konvertierung und anschließender PCR-Reaktion²⁴³: Während der Bisulfit-Konvertierung wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, durch die PCR werden diese durch Thymin ersetzt.

2.5.2 Konstruktion der Primer

Für die Primer zur Untersuchung der Methylierungsmuster sind spezielle Anforderungen zu beachten, da es sich hierbei um Bisulfit-konvertierte DNA handelt. Durch die der PCR vorangehende Bisulfit-Konvertierung entstehen DNA-Sequenzen mit hohem Thyminanteil, sodass zum einen der angestrebte GC-Gehalt, zum anderen die Vermeidung von Haarnadelstrukturen und Primer-Dimeren nicht möglich sind. Dies führt dazu, dass die Entwicklung einer effektiven PCR deutlich erschwert wird. Die Primer sollten unter diesen Bedingungen etwas länger sein (26-30 bp). Um eine komplette Amplifikation zu gewährleisten sollte das Amplikon verhältnismäßig kurz sein (150-300 bp). Wenn möglich sollte in der Primerregion das Vorkommen von CpG-Stellen vermieden werden, falls sich doch ein CpG in der Primersequenz befindet, muss an der entsprechenden Stelle eine Mixbase verwendet werden. 35-40 Zyklen bei einer Hybridisierungstemperatur von 55-60 °C werden empfohlen. Im Rahmen der Methodenentwicklung wurde, neben dem *Primer3Plus Tool*, das *MethPrimer 2.0 Tool* zur Primerkonstruktion verwendet.²³³ Dies ist speziell für Primer zur Bisulfit-Sequenzierung konzipiert. Es wurden mehrere Primerpaare konstruiert und mittels Temperaturgradienten-PCR an der *Droplet*

digital PCR auf ihre Effektivität getestet. Das Primerpaar, das das meiste PCR-Produkt sowie die wenigsten Nebenprodukte produziert hat, wurde für die weitere Analyse verwendet (**Abbildung 25**).

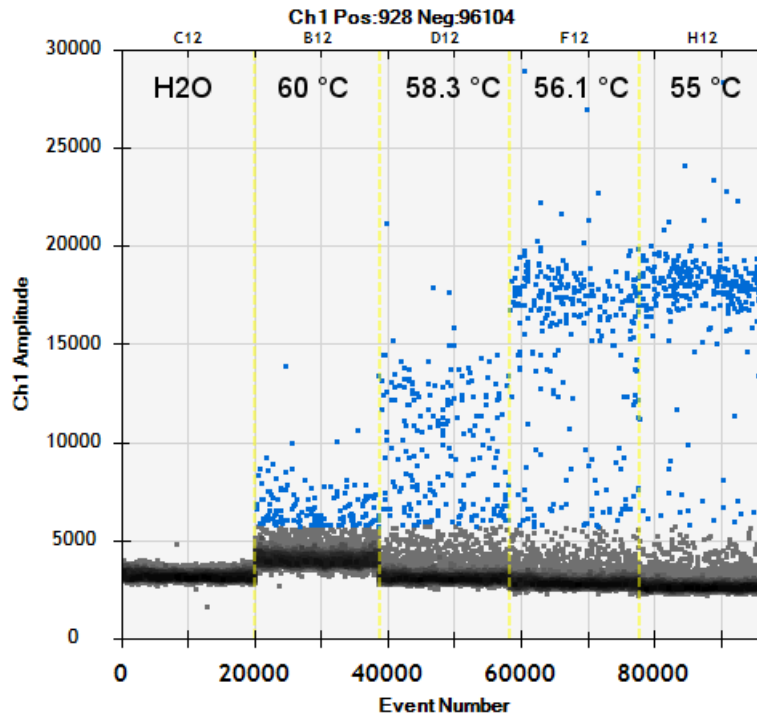


Abbildung 25: ddPCR-Ergebnisse für das zur Analyse verwendete Primerpaar *HIF3A.conv5.for/conv5.rev* bei verschiedenen Temperaturen (von links nach rechts: H₂O, 60 °C, 58,3 °C, 56,1 °C, 55 °C): Darstellung aller Droplets in Abhängigkeit ihrer Fluoreszenzintensität, blaue Droplets werden als positiv gewertet.

Für die Sequenzierung werden den Primer zusätzlich eine Adaptorsequenz (**Abbildung 26**, blau) zum Binden an andere Moleküle während der Probenvorbereitung, eine Schlüsselsequenz (rot), die dem *GS Junior* als Erkennungssequenz dient, sowie sogenannte *Multiplex Identifiers* (MID, gelb bzw. orange) angehängt. Die MID dienen der Identifizierung der einzelnen Proben nach der Sequenzierung. Um zu gewährleisten, dass das komplette Amplikon sequenziert wird, sollte eine Amplikonlänge von 400 bp inklusive Fusionsprimer nicht überschritten werden. Für weitere Informationen wird auf das Handbuch des Herstellers „*GS Junior System, Guidelines for Amplicon Experimental Design*“ (Roche, Juli 2011) verwiesen.²⁴⁴

Forward primer (Primer A):

5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCA **TCAG**-(MID)-{template-specific sequence}-3'

Reverse primer (Primer B):

5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGC **TCAG**-(MID)-{template-specific sequence}-3'

Abbildung 26: Fusionsprimer²⁴⁴: blau: Adaptorsequenz, rot: Erkennungssequenz, gelb/orange: MID, grün: Amplifikationsprimer.

Die Primer wurden von der Firma *Invitrogen* bzw. für die *Droplet Digital PCR* von *IDT-Integrated DNA Technology* (Coralville, USA) im lyophilisierten Zustand bezogen und anschließend zu einer Konzentration von 25 µmol/l bzw. für die *Droplet Digital PCR* von 18 µmol/l mit sterilem Wasser verdünnt. Nach Aliquotierung wurden die Primerlösungen bei -70 °C aufbewahrt.

Eine Übersicht über die genaue Basenabfolge aller verwendeten Primer inklusive der verwendeten MID gibt **Anhang 9.5** bzw. **9.6**.

2.5.3 Pyrosequenzierung am GS Junior

Der von der Firma *Roche* vertriebene *GS Junior* war eines der ersten kommerziell erhältlichen Sequenziergeräte der nächsten Generation (NGS) und arbeitet mittels Pyrosequenzierung. Das Prinzip wurde von dem Amerikaner Jonathan Rothberg entwickelt, dessen Firma *454 Life Science* später von *Roche* aufgekauft wurde. Bei der Pyrosequenzierung wird bei jedem Einbau eines Nukleotids durch die Polymerase in den Matrizenstrang, ein Pyrophosphat (PPi)-Molekül abgespalten. Das freigewordene PPi setzt nachfolgend eine Luciferase-katalysierte Sekundärreaktion in Gang, bei der ein Lumineszenz-Signal entsteht. Vorteile des *GS Juniors* im Vergleich zu anderen Geräten sind die relativ einfache Handhabung sowie die mögliche Sequenzierlänge von bis zu 500 bp und die kurze Laufzeit von zehn Stunden. Generell lässt sich der Gesamtprozess in die Bereiche **DNA-Bibliothek Präparation**, **Emulsions-basierte PCR Amplifikation** (emPCR Amplifikation) und die eigentliche **Sequenzierung** unterteilen.

DNA-Bibliothek Präparation

Am Anfang des Sequenzierungsprozesses steht die Generierung einer Amplikon-Bibliothek, die später sequenziert wird. Dafür wird aus der zu untersuchenden DNA das entsprechende Amplikon mittels PCR-Reaktion generiert. Den Primern werden entsprechende Erkennungssequenzen sowie im Falle

eines Multiplex-Ansatzes entsprechende Erkennungs-MIDs angehängt (siehe Abschnitt 2.5.2). Die PCR-Produkte werden anschließend aufgereinigt und quantifiziert. Die verschiedenen Proben werden mittels 1x TE-Puffer auf eine einheitliche Konzentration von 10^7 Molekülen/ μl verdünnt und zusammen gepoolt. Die Qualität der Amplikon-Bibliothek wird durch erneute PCR mit vorgegebenen Primern und anschließender Elektrophorese überprüft. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Kontrolle mittels *TapeStation* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. Diese ist eine zeitsparende Alternative, da die Amplikon-Bibliothek direkt, ohne vorrausgehende PCR-Reaktion, über eine Mini Elektrophorese aufgetrennt und so auf DNA-Fragmente falscher Länge überprüft werden kann. Falls nötig kann eine weitere Reinigung durchgeführt werden.

Emulsions-basierte PCR Amplifikation

In diesem Arbeitsschritt wird eine wässrige Lösung, die die DNA-Bibliothek sowie sogenannte *Capture Beads* und PCR-Reagenzien enthält mit synthetischem Öl gemixt. Nach Angaben von Roche (*emPCR Amplification Method Manual - Lib-A, Roche, Stand Mai 2012*) wird mit Hilfe des Ultra-Turrax Geräts (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) wird eine Wasser in Öl Emulsion erzeugt, in welcher optimalerweise in jeder Wassermizelle ein DNA-Fragment mit einem *Capture Bead* in einem reaktiven Kompartiment vorliegt. Dabei bindet das DNA-Fragment über die jeweilige Adaptorsequenz der Primer (A/B-Adaptoren) an das komplementäre DNA-Fragment der *Capture Beads*. Durch anschließende PCR im *Thermocycler* wird die am jeweiligen *Bead* gebundene DNA innerhalb einer Mizelle vervielfältigt (**Abbildung 27**).

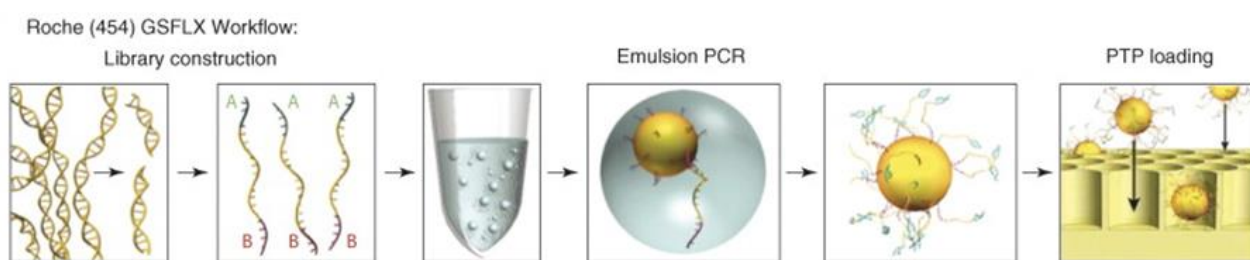


Abbildung 27: Schematische Darstellung und Ablauf der *emPCR*²⁴⁵: Die aufgereinigten DNA-Amplikons werden über eine Adaptorsequenz an *Capture Beads* gebunden und in einer nachfolgenden PCR-Reaktion vervielfältigt.

Anschließend werden die *Beads* gereinigt und *Beads*, an die keine DNA gebunden hat, abgetrennt. Dazu koppelt die an die *Beads* gebundene DNA über sogenannte *Enrichment Primer* an magnetische *Beads*. Mit Hilfe eines *Magnetic Particle Concentrator* erfolgt die Trennung von *Beads* mit und ohne gebundene DNA. *Beads*, an die mehr als ein spezifisches Amplikon gebunden hat, werden während

der Sequenzierung herausgefiltert. Im letzten Arbeitsschritt werden die *Beads* quantifiziert und es wird mit einer Menge von 500.000 *Beads* weiter gearbeitet. Überschüssige *Beads* können bis zu zwei Wochen aufbewahrt und in einer weiteren Sequenzierung analysiert werden.

Sequenzierung

Im letzten Arbeitsschritt werden die *Beads* zusammen mit Enzym- und Kontroll-*Beads* auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen, wobei in jedes *Well* nur ein DNA-*Bead* passt. Die Mikrotiterplatte wird in den *GS Junior* geladen und die Sequenzierung wird gestartet (**Abbildung 28**).

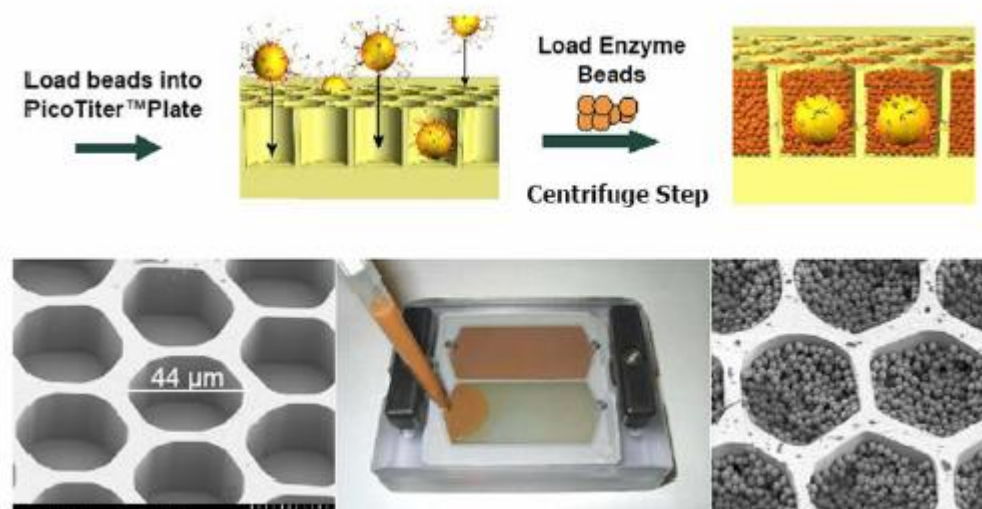


Abbildung 28: *Abbildung der Mikrotiterplatte und schematische Darstellung der Beladung.*²⁴⁵

Dabei erfolgt anhand der vorliegenden Einzelstrang-DNA die Generierung des jeweiligen Doppelstrangs. Dazu wird die Mikrotiterplatte mit den verschiedenen Nukleotiden geflutet, wobei zwischen den verschiedenen Nukleotiden immer wieder Waschschrte erfolgen. Wird ein Nukleotid durch die Polymerase in den DNA-Strang eingebaut, wird PPi frei. Dieses wird unter Vorhandensein von Adenosin-5'-Phosphorsulfat (APS) durch die Sulfurylase wiederum in Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt. Anschließend wandelt die Luciferase unter ATP-Verbrauch Luciferin zu Oxyluciferin um, wobei Licht ausgesendet wird. Die Stärke dieses Lichtsignals ist proportional zum ATP-Verbrauch und somit auch zu der Anzahl der eingebauten Nukleotide. Das Licht wird von einer Kamera detektiert. Die Lichtsignalveränderung eines *Wells* über die Zeit wird als sogenanntes *Flowgram* dargestellt und ergibt die Basenabfolge der Sequenz. Überflüssige Nukleotide werden zum einen durch die Apyrase abgebaut, zum anderen werden sie durch die Waschschrte ausgeflutet.

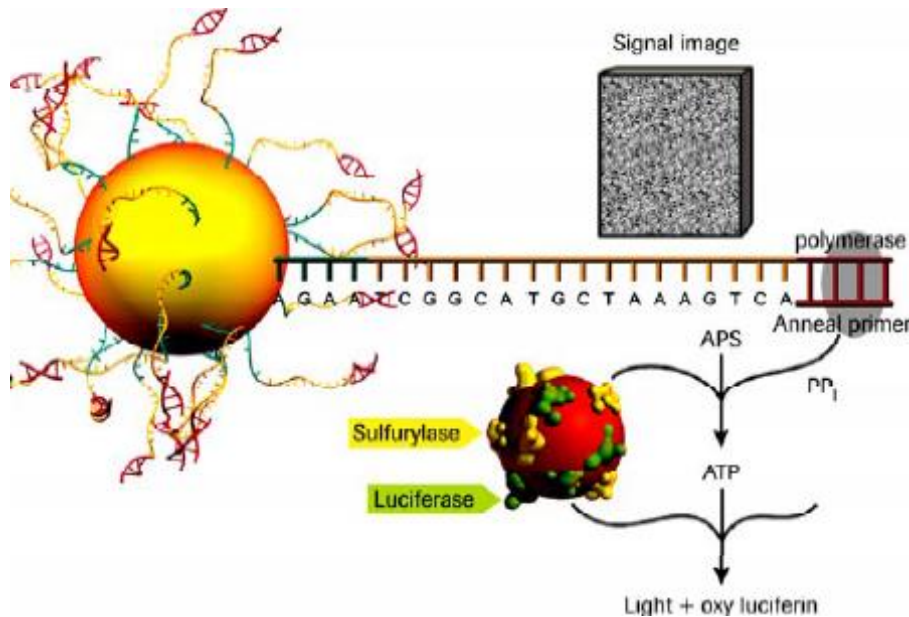


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Sequenzierung²⁴⁵: Die Mikrotiterplatte wird mit den einzelnen Nukleotiden geflutet. Wird ein Nukleotid in den DNA-Strang eingebaut, erfolgt über enzymatische Reaktionen die Emission eines Lichtsignals. Dieses wird detektiert und in eine Basensequenz übersetzt.

Die 454-Technologie wird von *Roche* mittlerweile nicht weiter verfolgt. 2013 kündigte das Unternehmen an, sich aus diesem Sektor zurück zu ziehen und Ende 2016 lief die Unterstützung für die entsprechenden Geräte, den *GS Junior* und den *GS FLX*, aus.

2.5.4 Droplet Digital PCR

Die *Droplet Digital PCR* (ddPCR) ist eine Form der Polymerase-Kettenreaktion. Hierbei dienen kleine Wassertröpfchen, die in Öl als Emulsion vorliegen, als Reaktionsräume. Die Probe wird dabei in bis zu 20.000 Tröpfchen mit einer Größe im Bereich von Nanolitern zerteilt. Die ddPCR dient zur quantitativen Bestimmung einer Ziel-DNA. Vorteile sind der geringe Probeneinsatz, die schnelle und kostengünstige Analyse sowie die hohe Präzision und gute Reproduzierbarkeit. Zudem ist für dieses Verfahren im Gegensatz zur *Real Time PCR* weder eine Kalibrationskurve noch eine Referenzprobe erforderlich.

Das Funktionsprinzip ist wie folgt: In den Wassertröpfchen wird die zu analysierende DNA mittels PCR vervielfältigt. Jede Probe enthält eine *TaqMan*-Sonde (siehe 2.5.5), die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Liegt das entsprechende *Target* in einem Tröpfchen vor, wird von der Sonde

ein Fluoreszenzsignal ausgesendet, welches detektiert wird. Tröpfchen, die ein Fluoreszenzsignal aussenden, werden als positiv gewertet und vom *Droplet Reader* gezählt. Die Auswertung erfolgt mittels *QuantaSoft Software*. Die Software berechnet unter Anwendung der Poisson-Verteilung anhand der Anzahl der positiven und negativen Tröpfchen die Konzentration der Ziel-DNA in Kopien pro μl .

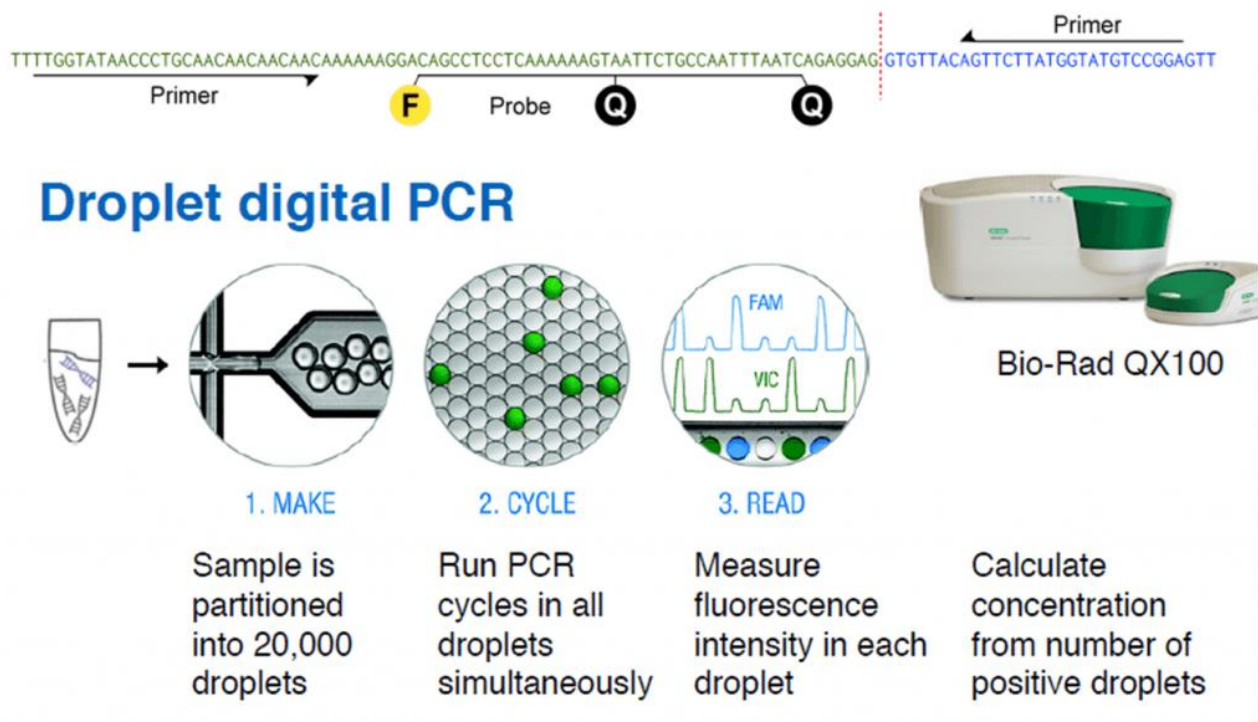


Abbildung 30: Schematische Darstellung und Ablauf der Droplet Digital PCR²⁴⁶: Die DNA-Probe wird in einzelne Tröpfchen zerteilt, die als Reaktionsräume für die PCR dienen. Bindet eine entsprechende Sonde an das PCR-Produkt wird ein Fluoreszenzsignal ausgesendet und vom Droplet Reader detektiert.

2.5.5 Konstruktion der Sonden für die Droplet Digital PCR

Die Sonden für die *Droplet Digital PCR* sind *TaqMan*-Sonden, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff sowie mit einem *Quencher* gekoppelt sind. Liegt die intakte Sonde in Lösung oder gebunden an die Ziel-DNA vor, unterdrückt der *Quencher* das Fluoreszenzsignal des Farbstoffs (**Abbildung 31A**). Lagert sich die Sonde komplementär an die Zielsequenz an (B), wird sie während der PCR durch die Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase hydrolysiert (C). Dadurch wird die Fluoreszenz des Farbstoffs sichtbar und kann detektiert werden (C, D). Die Sonden sollten eine Schmelztemperatur haben, die 6-8 °C über der der Primer liegt.

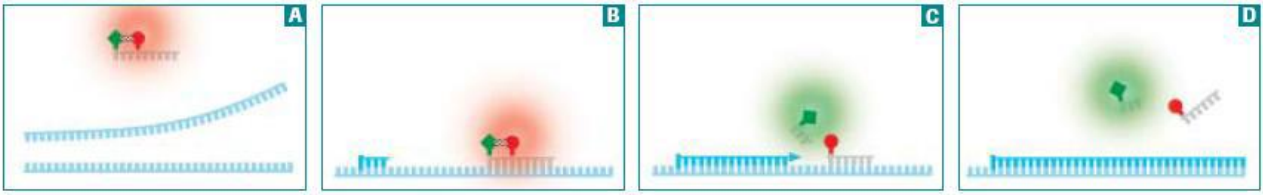


Abbildung 31: Funktionsweise von TaqMan-Sonden²²⁶: An die TaqMan-Sonde ist ein Fluoreszenzfarbstoff und ein Quencher gebunden, der das Fluoreszenzsignal des Farbstoffs unterdrückt. Lagert sich die Sonde an die DNA an, wird sie im Rahmen der Elongation hydrolysiert und das Fluoreszenzsignal wird sichtbar.

Zudem wurden *Locked Nucleic Acids* (LNA) in die Sonden eingebaut. Bei diesen Nukleotiden ist das 2'-O-Atom der Ribose mit dem 4'-C-Atom durch eine Methylenbrücke verbunden. Hierdurch wird das Nukleotid in der idealen Konformation zur Watson-Crick-Basenpaarung fixiert. Durch den Einbau dieser Basen in ein Oligonukleotid wird die Hybridisierung mit der Ziel-DNA beschleunigt, der entstandene Doppelstrang stabilisiert und die Zielspezifität erhöht. Die Schmelztemperatur der Sonden steigt pro eingebautes LNA-Nukleotid um 2-8 °C. Die Schmelzpunktdifferenz zwischen *Target* und Fehlpaarung wird so erhöht. Pro Base wurden drei bis vier LNA-Nukleotide verwendet. Um optimale Ergebnisse zu erhalten, wurde die Position des zu detektierende SNP bzw. des CpGs immer mit einem LNA-Nukleotid besetzt, weitere LNA-Nukleotide sollten in der Nähe eingebaut werden. Die Schmelztemperatur sollte ca. 65 °C, die Länge ca. 12 bp betragen.²⁴⁷ Aufgrund der Bisulfit-Konvertierung und des daraus resultierenden hohen A/T-Anteils der Sequenz sind die für diese Analyse verwendeten Sonden etwas länger.

Die Schmelztemperatur der Sonden wurde mit dem *ExiqonTool* berechnet.²⁴⁸ Die einzelnen Schmelztemperaturen von übereinstimmender Paarung und Fehlpaarung wurden mit dem *Thermodynamic DNA Melting Curve Tool* berechnet.²⁴⁹ Die Differenz sollte idealerweise so groß wie möglich sein.

Die Sonden wurden von der Firma *IDT-Integrated DNA Technology* in lyophilisiertem Zustand bezogen und anschließend zu einer Konzentration von 5 µmol/l mit sterilem Wasser verdünnt. Nach Aliquotierung wurden die Primerlösungen bei -20 °C aufbewahrt.

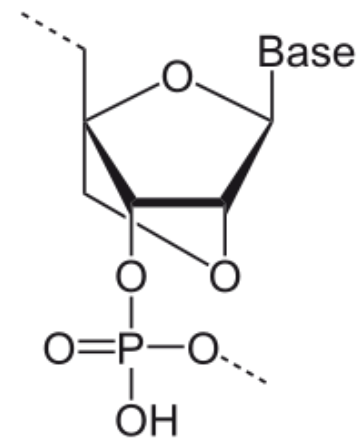


Abbildung 32: Locked Nucleic Acid (LNA)

2.5.6 Durchführung der Methylierungsbestimmung von HIF3A mittels Pyrosequenzierung am GS Junior

Nachfolgend werden die genauen Arbeitsschritte zur Messung der Methylierungslevel aufgeführt:

Zu Beginn erfolgte die Bisulfit-Konvertierung der zu analysierenden DNA. Zunächst wurde dafür der DNA-Gehalt der extrahierten Proben am *Qubit* mit dem *Qubit dsDNA HS Assay Kit* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA) bestimmt. Dazu wurde nach Herstellerangaben eine Stammlösung aus Puffer und Reagenz hergestellt und in einem Verhältnis von 200:1 mit DNA in einem *Qubit assay tube* vermischt. Die Mischung wurde gevortext, zentrifugiert und nach einer Inkubationszeit von mindestens zwei Minuten wurde der DNA-Gehalt im *high sensitivity*-Modus gemessen. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass der DNA-Gehalt in ng/µl angezeigt wurde.

Anschließend wurde die Bisulfit-Konvertierung mit dem *EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit* nach Herstellerangaben am *GeneAmp PCR System 9700 PE* durchgeführt. Es wurden je Reaktion zwischen 200 und 500 ng DNA eingesetzt, maximal wurden jedoch 20 µl Extrakt verwendet. War das Volumen der eingesetzten DNA < 20 µl, wurde entsprechend mit H₂O aufgefüllt. Nach erfolgter Konvertierung wurde der DNA-Gehalt am *NanoDrop* im RNA-Modus gemessen. Je ca. 100 ng der DNA wurden zur Generierung der Amplikon-Datenbank eingesetzt.

Die Effektivität der Konvertierung wurde zum einen durch Sanger-Sequenzierung geprüft (**Abbildung 33**). Dafür wurde das amplifizierte Amplikon zur Analyse an die Firma *GATC* (Berlin, Deutschland) geschickt. An den ehemaligen Cytosin-Positionen wurde kein Cytosin, stattdessen Thymin detektiert (mit Ausnahme der CpG-Stellen).

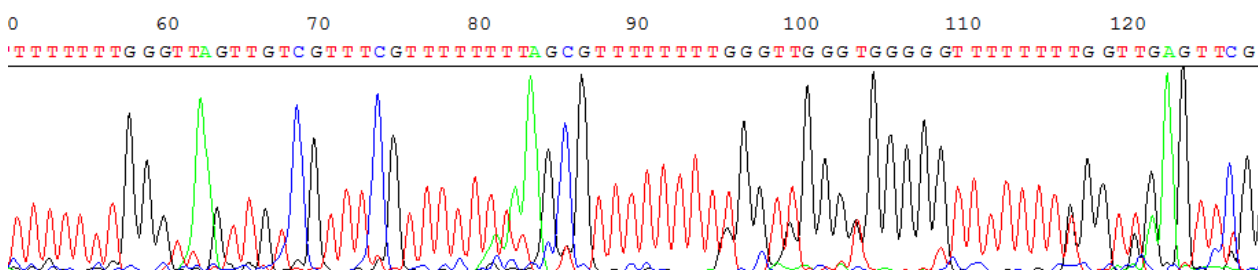
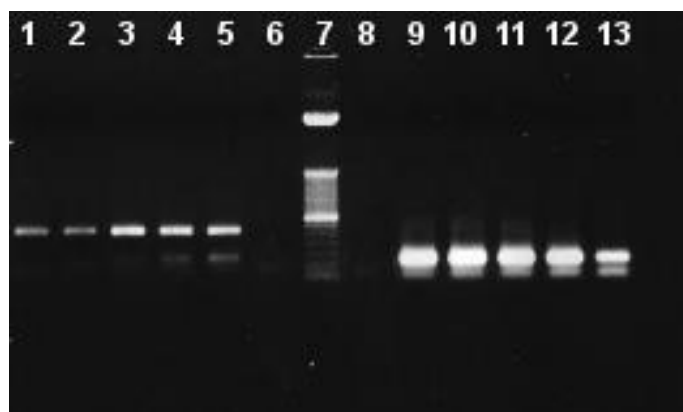


Abbildung 33: Ausschnitt der Sanger-Sequenzierung des HIF3A-Amplikons: Cytosin wurde durch Bisulfit-Konvertierung und anschließender PCR in Thymin umgewandelt, die CpG-Stellen der Ausgangs-DNA waren in diesem Beispiel zu 100 Prozentpunkten methyliert und sind auch nach der Konvertierung noch als Cytosin erhalten.

Des Weiteren wurde eine PCR mit Primern für das entsprechende naive Amplikon durchgeführt. Als *forward* Primer wurde HIF3A.naiv.PF (TGCACACCCCATGTTTCTAA; T_m : 60,0 °C), als *reverse* Primer wurde HIF3A.naiv.PR (CCAGCTAGAGGAAGGGAAGG; T_m : 60,3 °C) verwendet. Das Pipettierschema entspricht **Tabelle 18**, als Hybridisierungstemperatur wurden 60 °C verwendet. Nach anschließender Gelelektrophorese konnte keine DNA-Amplifikation nachgewiesen werden (**Abbildung 34**).



- 1.-5. PCR-Produkt mit Primern für Bisulfit-konvertierte DNA (278 bp)
- 6./8. Leerkontrolle
- 7. Längenmarker (50 bp DNA Ladder, Invitrogen)
- 9.-13. PCR-Produkt mit Primern für naive DNA

Abbildung 34: HIF3A - PCR für die Library Präparation mit Bisulfite-konvertierter DNA und dem Primerpaar HIF3A.conv5 (1-5; PCR-Produkt von 278 bp) und dem Primerpaar für naive DNA HIF3A.naiv (9-13; Negativkontrolle: nur Primer und Primerdimere nachweisbar).

Für die Sequenzierung wurde zum Großteil nach den Arbeitsanweisungen des Herstellers verfahren. Im Folgenden sind daher nur relevante Abweichungen vom Protokoll aufgeführt.

Die Generierung des Amplikons erfolgte am *Thermocycler*. Hierfür wurde der *forward* Primer HIF3A.conv5.for: GTTTTGGGTTTAATAAGGAATTTTATTT und der *reverse* Primer HIF3A.conv5.rev: RATAACAACCAAACCCRAATAC verwendet. Diesen wurden jeweils die Erkennungssequenzen zur Sequenzierung und die entsprechenden MIDs angehängt (siehe **2.5.2**). Laut Herstellervorgabe sind die MIDs 1-14 für die hier verwendete Messung im *Both*-Verfahren geeignet. Da die MIDs 9 und 12 in Experimenten schlechtere Sequenzierungsergebnisse zeigten, wurden diese MIDs für diese Analyse nicht verwendet. Eine Übersicht über die genaue Basenabfolge aller Primer gibt **Anhang 9.5**. Alle weiteren Reagenzien sowie das Temperaturprogramm können **Tabelle 18** entnommen werden. Das Produkt hatte eine Länge von 278 bp und wurde mittels Gelelektrophorese überprüft (**Abbildung 34**).

Tabelle 18: HIF3A Library-Präparation - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denaturierung: 94 °C, 3 min			
Amplifikation: 30x [94 °C, 15 sec; 56 °C, 45 sec; 72 °C, 20 sec]; 72 °C, 8 min;			
Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration*
H ₂ O	29		
Fast Start High Fidelity Reaction Buffer 2 (Roche)	3,75	10x (mit 18 nM MgCl ₂)	1,06x
dNTP (Roche)	0,75	10 mM	212 µM
HIF3A.conv5.for	0,75	25 µM	530 nM
HIF3A.conv5.rev	0,75	25 µM	530 nM
FastStart Hifi Polymerase (Roche)	0,375	5 U/µl	1,875 U
Total	35,375		
DNA	ca. 100 ng		

*bezogen auf ein Gesamtvolumen von 35,375 µl

Anschließend erfolgte die Aufreinigung nach „*Amplicon Library Preparation Method Manual*“ (Roche, Stand Juni 2013), wobei das Verhältnis von AMPure XP Beads, H₂O und PCR-Produkt abgewandelt wurde: Die Amplikon-Datenbank wurde mittels *TapeStation* und *High Sensitivity (HS) D1000 ScreenTape* und -Reagenzien auf kurze Fragmente überprüft. Die Durchführung erfolgte nach dem Arbeitsprotokoll des Herstellers („*Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System Quick Guide*“, Agilent Technologies, 2013). Dafür werden die benötigten Reagenzien vor der Messung für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufbewahrt. 2 µl *High Sensitivity D1000 Sample Buffer* werden mit 2 µl *High Sensitivity D1000 Ladder* bzw. mit 2 µl der DNA Proben gemischt, gevortext und zentrifugiert. Anschließend werden die Proben sowie ein *High Sensitivity D1000 ScreenTape* und Pipettenspitzen in die *TapeStation* geladen und der Lauf gestartet. Pro Lauf können maximal 15 Proben + ein Längenmarker gemessen werden. Die Auswertung erfolgt mit *2200 TapeStation Analysis Software*. Da bei den ersten Durchläufen noch kurze Fragmente (Primer und Primerdimere) sichtbar waren (**Abbildung 35**) wurde eine weitere Aufreinigung der DNA-Bibliothek nach dem „*Technical Bulletin - Short Fragment Removal for the Amplicon Library Preparation Procedure*“ (Roche, Stand Mai 2013) durchgeführt. Dazu wurde das passende Verhältnis von AMPure XP Beads und DNA experimentell bestimmt. Es wurden verschiedene Verhältnisse erprobt und mittels *TapeStation* analysiert

(Abbildung 35). Ein Verhältnis von *AMPure XP Beads* zu DNA von 1:0,8 wurde als Optimum angesehen. Dieses Verhältnis wurde daraufhin für alle DNA-Aufbereitungen übernommen, es wurden somit 48 µl *AMPure XP Beads*, 30 µl H₂O und 30 µl PCR-Produkt für die Aufreinigung eingesetzt.

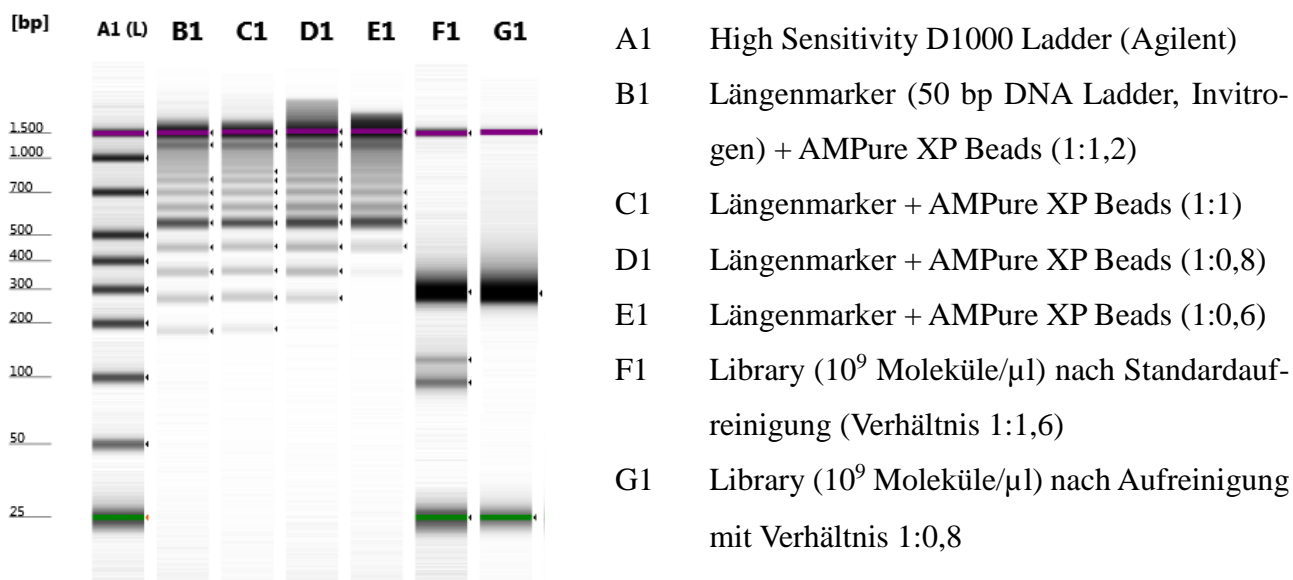


Abbildung 35: DNA-Analyse mittels TapeStation: B1-E1: experimentelle Bestimmung des passenden Verhältnisses von DNA und *AMPure XP Beads*; F1: Amplikon-Bibliothek nach Standardaufreinigung (Verhältnis 1:1,6): Es sind noch kurze DNA-Fragmente in der Probe enthalten; G1: Amplikon Library nach Aufreinigung mit Verhältnis DNA - *AMPure XP Beads* 1:0,8: Die kurzen Fragmente wurden komplett entfernt, die Probe enthält nur noch das gewünschte Amplikon.

Die anschließende Quantifizierung erfolgte am *Qubit* mit dem *Qubit dsDNA HS Assay Kit*. Die Proben wurden entsprechend verdünnt und gepoolt. Die Platten mit dem überschüssigen Probenvolumen der aufgereinigten DNA-Bibliothek sowie der Verdünnung wurden mit einer Folie versiegelt und bei -70 °C gelagert.

Die Herstellung und Durchführung der Emulsions-PCR und die anschließende Aufreinigung erfolgte nach „*emPCR Amplification Method Manual - Lib-A*“ (Roche, Stand Mai 2012). Generell lag die Anzahl der erhaltenen *Beads* nach erfolgter emPCR oberhalb der Grenze von 2.000.000. Zur Reduktion der *Bead*-Anzahl wurde die Amplikon-Bibliothek mit einer Konzentration von 10⁷ Molekülen pro µl auf 10⁵ Moleküle pro µl verdünnt. Davon wurden 15 µl für die emPCR eingesetzt.

Die anschließende Sequenzierung am *GS Junior* erfolgte nach „*Sequencing Method Manual*“ (Roche, Stand Januar 2013). Jede Probe wurde mindestens zweimal vermessen.

Die abschließende Datenanalyse wurde nach Hersteller-Handbuch („*454 Sequencing System Software Manual*“, Software Version 2.5p1, Roche, August 2010) durchgeführt. Die Einschätzung der Qualität der Läufe erfolgte mit der Software *GS Run Browser*. Die Software gibt eine Übersicht über die Qualität der einzelnen *Wells* und verwendet nur *Reads* mit einer vordefinierten Qualität zur weiteren Auswertung. Bei aus Qualitätsmängeln aussortierten *Reads* wird differenziert nach den Filtern „*Dots*“, „*Mixed*“, „*Short Primer*“ und „*Short Quality*“. Hierbei entfernt der *Dots* Filter kurze *Reads* bzw. *Reads* mit einer hohen Anzahl an Fehlpaarungen. Der *Mixed* Filter schließt *Reads* mit zu starken bzw. zu vielen positiven Signalen im Bereich eines *Wells* (z.B. durch Bindung verschiedener DNA-Fragmente an ein *Bead* oder durch Beeinflussung umliegender *Wells*) von der Auswertung aus. Der *Short Primer* Filter entfernt nicht vollständig gelesene *Reads*, der *Short Quality Filter* entfernt *Reads* mit zu hoher Anzahl an *valley flows*. Dies sind Signale, die in dem Grenzbereich zwischen 1-2, 2-3 usw. Nukleotiden, der sogenannten *Borderline Zone*, liegen. Die genaue Anzahl der Nukleotide lässt sich so nicht genau zuordnen. Bei dieser Analyse waren aufgrund der vielen Poly-T- und Poly-A-Sequenzen, die durch die Bisulfit-Konvertierung entstehen, die Lichtsignale sehr ungenau und die Anzahl der *valley flows* somit sehr hoch. Viele *Reads* haben daher die Qualitätskontrolle mit den Standardeinstellungen nicht bestanden. Um dennoch ausreichend viele *Reads* zur Auswertung zu erhalten, wurde die Anzahl an erlaubten *valley flows* von 4 pro 320 bp auf 18 pro 168 bp erhöht.

Zur Validierung wurden bei jedem Lauf auch Standards sequenziert. Hierfür wurde das *Human WGA Methylated & Non-methylated DNA Set* verwendet. Das Kit enthält komplett methylierte und komplett unmethylierte DNA. Diese wurden entsprechend kombiniert, sodass Standard-DNA mit 0, 25, 50, 75, und 100 Prozentpunkten Methylierung entstand.

Zur Auswertung wurde die *GS Amplicon Variant Analyzer Software* verwendet. Die Kodierung der MIDs erfolgte hierbei nach dem *Both*-Verfahren, welches eine gelesene Sequenz aufgrund der Kombination der MIDs des *forward* und *reverse* Primers identifiziert und in die Datenauswertung einbezieht.

2.5.7 Durchführung der Methylierungsbestimmung von HIF3A mittels Droplet Digital PCR

Die Analysen mittels ddPCR und die Auswertung der Daten wurden nach dem Handbuch des Herstellers durchgeführt.²⁵⁰ Es wurde jeweils ein Assay für GpG1, 5 und 7 entwickelt. Alle Messungen wurden durch Ramona Secci durchgeführt. Das genaue Pipettierschema kann **Tabelle 19** entnommen werden. Zur Analyse wurden die Proben der aufgereinigten DNA-Bibliothek mit einer Konzentration von 10^9 Molekülen pro μl verwendet. Diese wurden anschließend auf eine Konzentration von 10^3 Molekülen pro μl weiter verdünnt. Als Primer wurden hier der *forward* Primer HIF3A.conv.for (TGGTTTTGGGTTTAATAAGGAATTT; T_m : 58,2 °C) und der *reverse* Primer HIF3A.conv.rev (ATACAACCAAAACCCRAATACRAA; T_m : 58,0 °C) verwendet. Die verwendeten Sonden sind in **Anhang 9.6** aufgeführt. Die Sonden für das unmethylierte Cytosin sind am 5'-Ende mit Hexachlorfluorescein (HEX), die Sonden für mC sind am 5'-Ende mit Fluorescein gekoppelt. Die Fluoreszenz der Sonden lässt sich somit über die Wellenlänge unterscheiden. Zudem befindet sich an jeder Sonde am 3'-Ende der *Quencher Iowa Black FQ*. Für jede Probe wurden drei verschiedene Reaktionsansätze durchgeführt: Ein Reaktionsansatz für jede CpG-Stelle. Alle Messungen wurden als Duplikate durchgeführt.

Tabelle 19: HIF3A ddPCR - Methodenbeschreibung

Temperaturprogramm			
Denaturierung: 95 °C, 5 min			
Amplifikation: 40x [94 °C, 30 sec; 55 °C, 30 sec; 55 °C, 30 sec]; 98 °C, 10 min;			
Reagenz	Volumen (μl)	Konzentration	Endkonzentration*
H2O	5,0		
ddPCR Supermix (BioRad)	10,0 μl	2x	1x
Enzyme (BfaI)	1,0 μl	5U	5U
Sonde (FAM)	1,0 μl	5 μM	250 nM
Primermix	1,0 μl	18 μM	900 nM
Sonde (HEX)	1,0 μl	5 μM	250 nM
DNA	1,0 μl		
Total	20 μl		

*bezogen auf 20 μl Gesamtvolumen

20 μ l des Reaktionsgemischs und das *Droplet Generator* Öl wurden getrennt in eine *DG8 Droplet Generator* Kassette pipettiert. Eine Kassette bietet Platz für bis zu acht Proben. Diese wurde anschließend in den *QX200 Droplet Generator* gestellt, der daraus Tröpfchen generierte. Anschließend wurden die Proben in eine *96-Well* Platte pipettiert und mit einer Folie versiegelt. Die Proben wurden mittels PCR am *C1000 Touch Thermal Cycler* vervielfältigt und mit dem *QX200 Droplet Reader* analysiert. Aus dem Verhältnis der positiven Tröpfchen je Sonde (methyliert und unmethyliert) lässt sich so die Konzentration der Methylierung an dieser Position berechnen. In einem ersten Schritt wurde der Schwellenwert, der positive von negativen Tröpfchen trennt, zunächst manuell festgelegt (manuelle Auswertung). Vor allem für CpG1 war dies jedoch problematisch, da hier auch nach zahlreichen Optimierungsversuchen keine eindeutige Trennung zwischen positiven und negativen Tröpfchen möglich war. In einem zweiten Schritt wurde der Schwellenwert daher über die Position der negativen Tröpfchen der Leerkontrollen statistisch berechnet und auf die Patientenproben übertragen (automatisierte Auswertung). Eine Gegenüberstellung der jeweiligen Ergebnisse ist in **Anhang 9.7** dargestellt. Zur Kontrolle wurden jeweils bidestilliertes Wasser (ddH₂O) sowie synthetisch hergestellte *genomic blocks* (gBlock) gemessen. Die gBlocks entsprechen der Sequenz des Amplikons nach der Bisulfit-Konvertierung, wobei alle CpG-Stellen als Cytosin bzw. als Thymin dargestellt werden. Sie sollten daher nach der Analyse ein Methylierungslevel von 100 bzw. 0 Prozentpunkten aufweisen. Zudem wurden die für die Sequenzierung am *GS Junior* verwendeten Standards mit 0, 25, 50, 75, und 100 Prozentpunkten Methylierung vermessen.

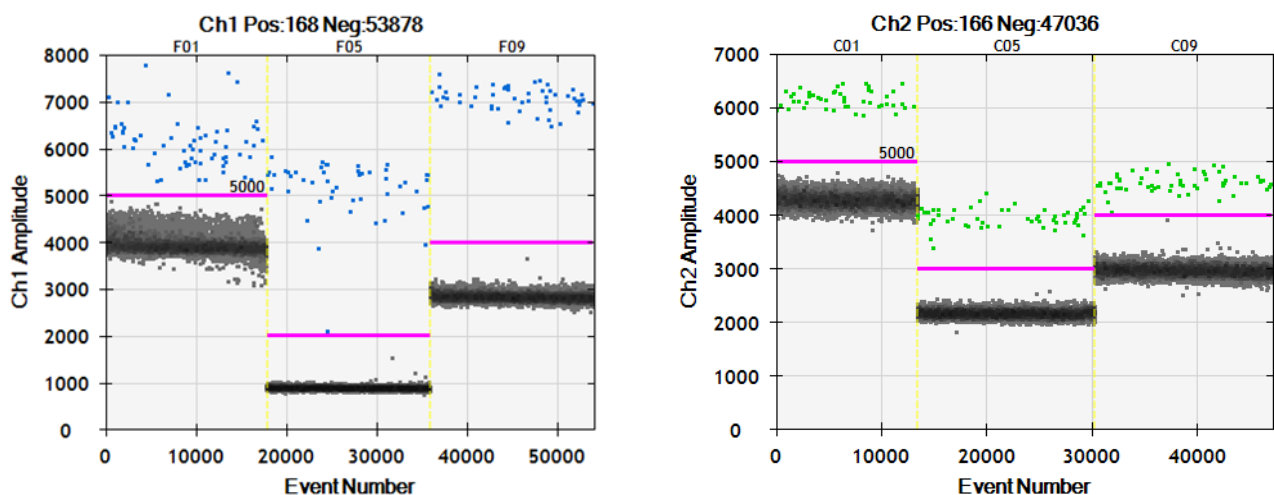


Abbildung 36: HIF3A - ddPCR: 1D-Plot für CpG1 (F01/C01), CpG5 (F05/C05), CpG7 (F09/C09); Dargestellt sind alle Droplets einer Probe in Abhängigkeit von der Fluoreszenzintensität von FAM (Channel 1 / blau, Sonde für Methylcytosin) und HEX (Channel 2 / grün, Sonde für unmethyliertes Cytosin), Droplets oberhalb des Schwellenwertes (pink) werden als positiv gewertet.

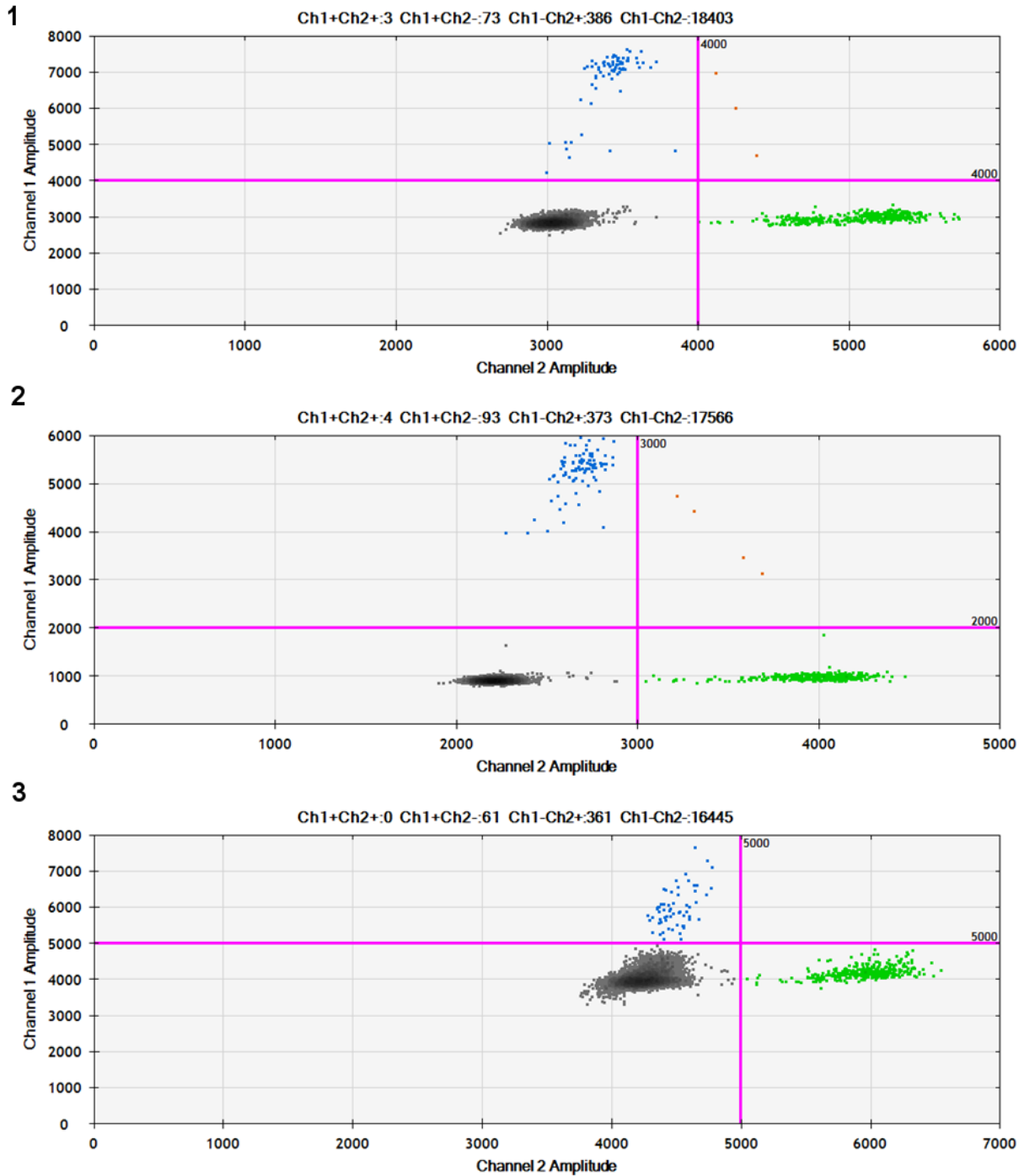


Abbildung 37: HIF3A - Droplet Digital PCR: 2D-Plot für CpG1 (1), CpG5 (2) und CpG7 (3): Dargestellt sind alle Droplets einer Probe in Abhängigkeit von ihrer Fluoreszenzintensität von FAM (methylierte Sonde) und HEX (unmethylierte Sonde), Droplets oberhalb des Schwellenwertes (pink) werden als positiv gewertet; graue Droplets: FAM negativ, HEX negativ; blaue Droplets: FAM positiv, HEX negativ; grüne Droplets: FAM negativ, HEX positiv; orange Droplets: FAM positiv, HEX positiv.

2.5.8 Bestimmung der Stabilität von 5'-Methylcytosin in Blutproben

Um herauszufinden, ob sich das Verhältnis von 5'-mC zu Cytosin bei längerer Lagerung ändert bzw. ob es Stabilitätsunterschiede zwischen methylierter und nicht methylierter DNA gibt, wurden Blutproben von zehn gesunden Probanden genommen und aliquotiert.¹⁶⁶ Eine Probe wurde direkt nach Entnahme extrahiert und sequenziert. Je drei Aliquots wurden bei -70 °C und bei -20 °C gelagert. Je ein weiteres Aliquot wurde im Kühlschrank bei 4-8 °C (KS) und bei Raumtemperatur (RT) gelagert, ein Aliquot lagerte bei -70 °C und wurde einmal wöchentlich bei Raumtemperatur aufgetaut (-70 °C/RT). Die Proben wurden anschließend nach einem (30 Tage), nach drei (90 Tage) und nach zehn Monaten Lagerung analysiert.

Die Messungen erfolgten analog der Messung der Methylierungslevel von HIF3A. Zur Betrachtung der Stabilität von 5'-mC wurden die CpG-Stellen herangezogen, die sich innerhalb des Amplikons, das auch für die Analyse von HIF3A verwendet wurde, befinden. Zunächst wurde die DNA aus je 300 µl Blut mittels *Wizard Genomic DNA Purification Kit* extrahiert. Anschließend erfolgte die Bisulfit-Konvertierung und die Sequenzierung am *GS Junior* (siehe 2.5.6).

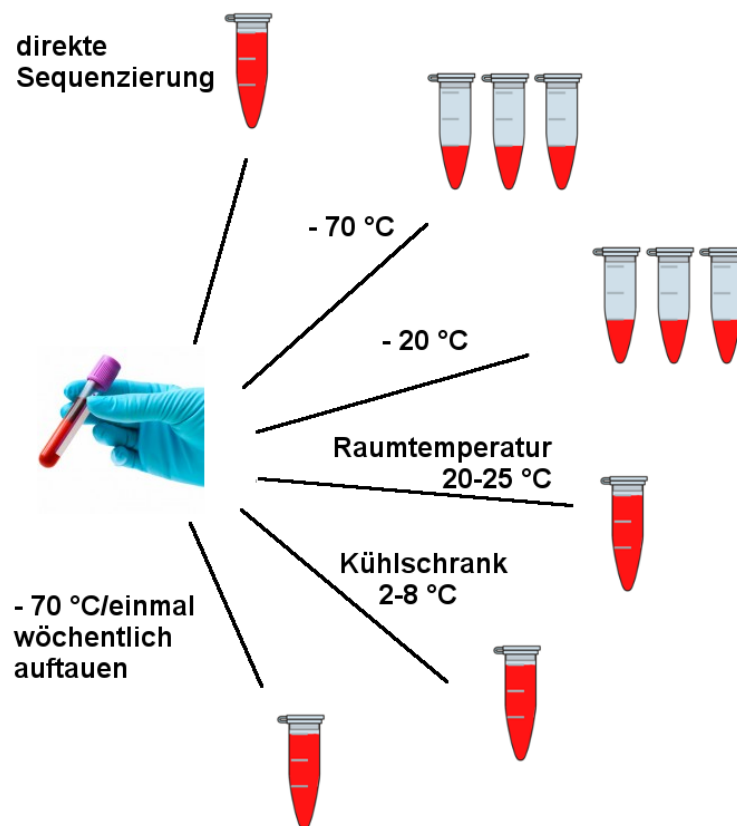


Abbildung 38: Übersicht über die Lagerung der Blutproben im Rahmen der Stabilitätsuntersuchungen.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierungsmethoden

Für die Polymorphismen TSPO rs6971 und rs6973, NDUFS1 rs6435326, rs1801318 und rs1053517 und FTO rs7185735 und rs17817288 wurden jeweils eine neue Methoden am *LightCycler* und zur Validierung eine zweite Methode am *Thermocycler* entwickelt. Alle Ergebnisse der beiden Methoden stimmten miteinander überein (siehe Kapitel 2.4.11). Für rs6973 zeigte eine Probe kein verwertbares Messergebnis. Auch nach erneuter Extraktion der DNA und Wiederholung der Messung konnte kein eindeutiges Messsignal erhalten werden (**Abbildung 39**). Die Tatsache, dass trotz erneuter Extraktion keine Schmelzkurve erhalten werden konnte, lässt auf eine schlechte DNA Qualität der Blutprobe schließen. Aufgrund der langen Lagerzeit sowie häufigem Auftauen und Einfrieren kann es zu Destruktionen der DNA kommen. Diese Probe wurde aus der Analyse ausgeschlossen.

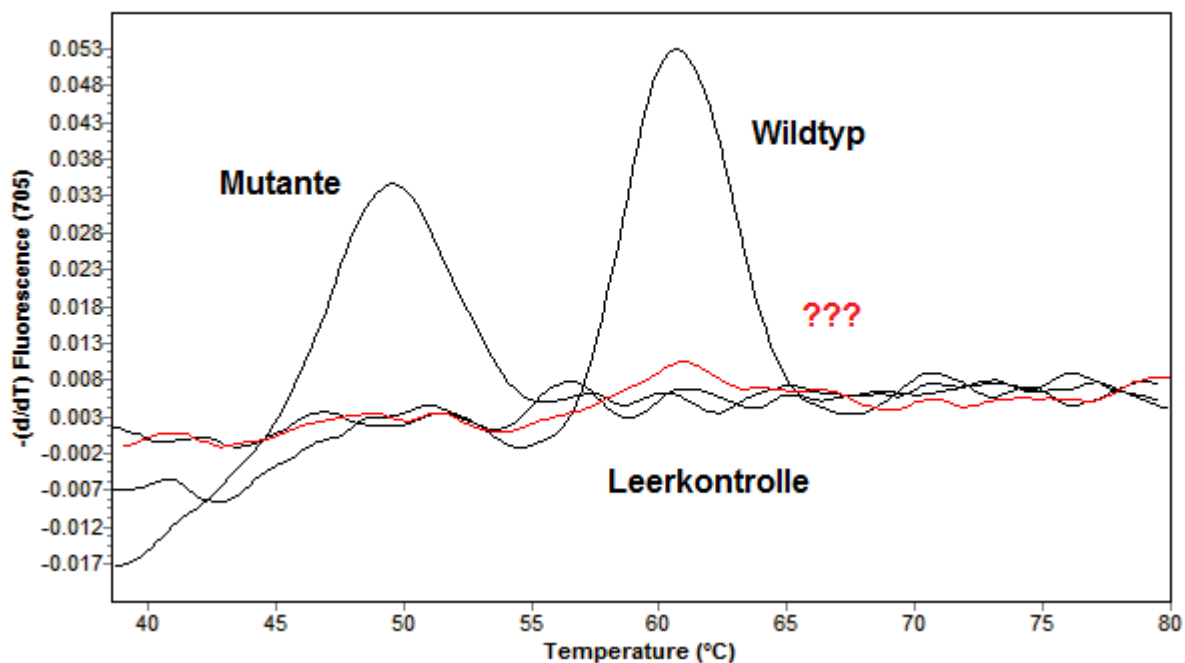


Abbildung 39: Schmelzkurve für TSPO rs6973 J48; auch nach mehrfacher Wiederholung der Analyse konnte keine auswertbare Schmelzkurve erhalten werden; Die Probe wurde aus der Analyse ausgeschlossen.

Bezüglich MC4R rs8087522 wurde eine neue Methode am *LightCycler* entwickelt. Zur Validierung wurden die Messwerte der Pyrosequenzierung, die im Rahmen ihrer Masterarbeit von Ruoyu Sun durchgeführt wurde, verwendet.⁹⁰ Bei der Analyse mittels Sonden-basierter Genotypisierung am *LightCycler* zeigte eine Probe auch bei Wiederholungsmessungen eine nicht eindeutige Verschiebung

der Schmelzkurve (**Abbildung 40**). Dies könnte durch einen seltenen unbekanntem Polymorphismus im Bereich der Sonden erklärbar sein. Da sich die Probe nicht eindeutig zuordnen ließ, wurde sie aus der Auswertung ausgeschlossen. Drei Proben zeigten ein abweichendes Ergebnis von den Sequenzierungsergebnissen. Aufgrund von verschiedene Problemen, die während der Methodenentwicklung am GS Junior sowie bei der Auswertung auftraten (siehe Masterarbeit Ruoyu Sun⁹⁰), sind die Ergebnisse der LightCycler-Messung als die Zuverlässigeren zu bewerten.

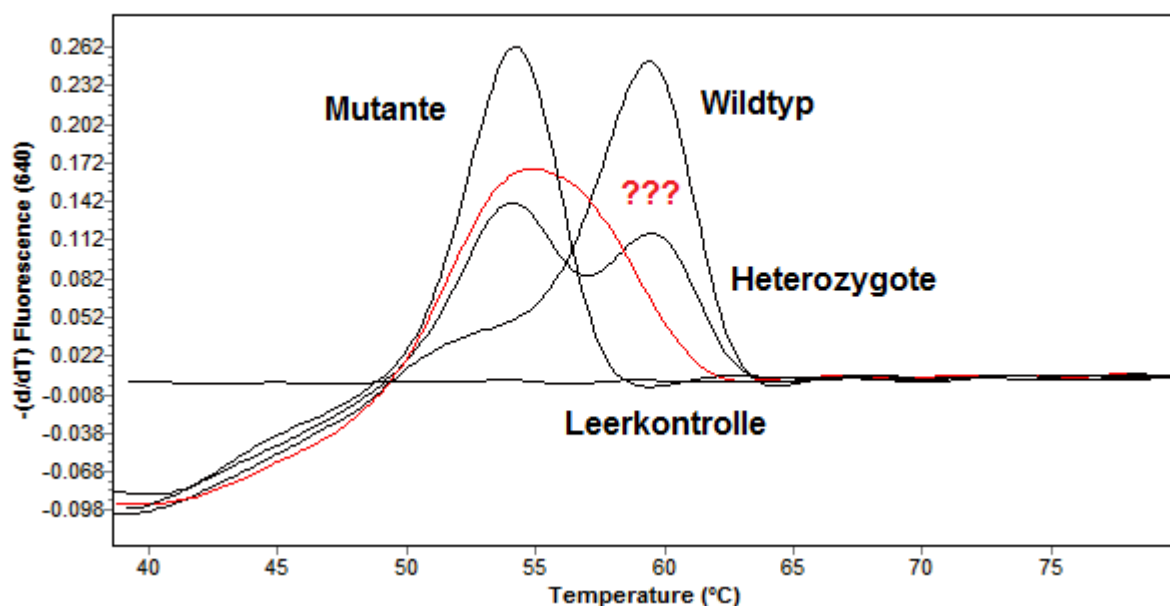


Abbildung 40: Schmelzkurve für MC4R rs8087522 J38; Die Schmelzkurve konnte keinem Genotypen eindeutig zugeordnet werden; Die Probe wurde daher von der Analyse ausgeschlossen.

Für die Detektion der CYP2D6 Polymorphismen in der Alzheimerpopulation wurden etablierte Methoden verwendet. Alle Proben konnten eindeutig zugeordnet werden.

3.2 Methoden zur Methylierungsbestimmung

Zur Bestimmung der Methylierungslevel wurde jeweils eine neue Methode am *GS Junior* und an der *Droplet Digital PCR* entwickelt.

Am *GS Junior* fand eine Sequenzierung des gesamten Amplikons von 208 Basenpaaren (exklusive Primer mit 70 bp) statt. Innerhalb dieses Amplikons wurden alle zehn CpG-Stellen bestimmt. Für insgesamt vier Patienten konnten im Rahmen dieser Analyse aufgrund von zu wenig DNA-Material und daraus resultierend zu wenigen *Reads* keine auswertbaren Ergebnisse generiert werden. Bezüglich CpG1 wurde zudem ein weiterer Patient, bezüglich CpG5 wurden drei weitere Patienten aus denselben Gründen aus der Analyse ausgeschlossen.

Für die Messung mit ddPCR musste pro CpG-Stelle ein eigener *Assay* entwickelt werden (siehe Kapitel 2.5.4). Hierzu wurden nur *Assays* für die drei CpG-Stellen entwickelt, die bereits in der Literatur mit Gewichtszunahme in Verbindung gebracht wurden (CpG 1, 5 und 7).¹⁵⁷ Insgesamt wurden für jede der drei CpG-Stellen 52 Proben gemessen. Dabei wurde jede Probe doppelt gemessen. Es lagen daher 156 Wertepaare vor. Alle Messungen waren erfolgreich und wurden für die Auswertung verwendet.

3.3 Charakterisierung der Antipsychotika-Studienpopulation

3.3.1 Demographische Beschreibung

Insgesamt wurden im Rahmen der Diagnostikstudie von 2002-2009 572 Patientenproben gesammelt. Von insgesamt 474 Patienten sind Daten bezüglich ihrer Gewichtsentwicklung vorhanden. Davon wurden 350 Patienten mit atypischen Antipsychotika behandelt. Diese Patientengruppe wurde im Rahmen dieser Arbeit auf den Einfluss genetischer und epigenetische Marker auf ihre Gewichtszunahme untersucht. 86 Patienten erhielten zwar keine atypischen Antipsychotika, jedoch andere Medikamente, die für ihr Potenzial, Gewichtszunahme als Nebenwirkung auszulösen bekannt sind (trizyklische Antidepressiva, Lithium, Valproinsäure, Mirtazapin, Paroxethin).²⁵¹ Diese Patienten wurden nicht in die Untersuchung aufgenommen. 38 weitere Patienten erhielten weder atypische Neuroleptika, noch andere Medikamente mit bekanntem Effekt auf das Gewicht. Diese Patientengruppe fungierte als Vergleichsgruppe.

Studienpopulation

Von den insgesamt 350 Patienten waren 209 (59,7%) weiblich und 141 (40,3%) männlich. Der Anteil der Raucher betrug 151 (43,1%). Eine positive Familienanamnese bezüglich psychiatrischer Erkrankungen hatten 154 (45,7%) von 337 Patienten, für die diese Information verfügbar war. Zudem zeigten 91 (26,4%) von 345 Patienten mit dem hinterlegten Merkmal eine erste Episode einer psychiatrischen Erkrankung. Von 320 Patienten mit hinterlegter Information sprachen 42 (13,1%) auf die Therapie an (CGI 2-Werte von 1 oder 2 nach vier Wochen).

Des Weiteren wurde eine adjustierte Subpopulation gebildet (n = 178). Diese beinhaltete nur Patienten mit gewichtsbeeinflussenden Antipsychotika aber ohne gewichtsbeeinflussende Komedikation. Zu den Medikamenten, die zu einem Ausschluss aus dieser Gruppe führten, gehörten trizyklische Antidepressiva, Mirtazapin, Lithium, Valproinsäure und Paroxetin sowie die gewichtsneutralen Antipsychotika Ziprasidon und Aripiprazol.⁶⁸ Von diesen 178 Patienten waren 109 (61,2%) weiblich und 69 (38,8%) männlich. Der Anteil der Raucher betrug 85 (47,8%). Eine positive Familienanamnese bezüglich psychiatrischer Erkrankungen hatten 67 (39,2%) von 171 Patienten, für die diese Information verfügbar war. Zudem zeigten 48 (27,7%) von 173 Patienten mit dem hinterlegten Merkmal eine erste Episode einer psychiatrischen Erkrankung. Von 168 Patienten mit hinterlegter Information sprachen 26 (15,5%) auf die Therapie an (CGI 2-Werte von 1 oder 2 nach vier Wochen).

Ein Überblick über die demographischen Daten und den Krankheitszustand der Patienten der untersuchten Population zum Aufnahmezeitpunkt ist in **Tabelle 20** dargestellt.

Tabelle 20: Demographische Beschreibung der Gesamtpopulation (n = 350) und der adjustierten Population (n = 178); SD = Standardabweichung.

Variable	Gesamtpopulation (n = 350)			adjustierte Subpopulation (n = 178)		
	n*	Mittelwert	SD	n*	Mittelwert	SD
Alter	350	41,1	15,0	178	39,4	14,9
Gewicht bei Aufnahme [kg]	350	74,7	16,5	178	74,1	16,2
Größe [cm]	349	171,3	9,0	177	171,4	8,6
BMI bei Aufnahme [kg/m ²]	349	25,4	5,2	177	25,2	5,4
Aufenthaltsdauer	350	71,2	42,0	178	70,8	41,7
PDS-P bei Aufnahme	311	8,7	8,5	159	10,1	8,9
PDS-D bei Aufnahme	311	18,3	10,0	159	16,	9,0
CGI bei Aufnahme	346	6,0	0,88	176	6,0	0,91

*Anzahl der Patienten mit verfügbaren Daten bezüglich dieser Variable

Der durchschnittliche Patient dieser Studienpopulationen ist ca. 40 Jahre alt, der BMI liegt an der Grenze zwischen Normalgewicht und Übergewicht (BMI~25). Der Patient zeigt ausgeprägte paranoide und depressive Symptome. Zudem schätzt der Arzt den Krankheitszustand des Patienten als deutlich krank ein (CGI 6). Zwischen beiden Populationen fallen keine relevanten Unterschiede auf.

Vergleichspopulation

Von den 38 Patienten der Vergleichspopulation waren 23 (60,5%) weiblich und 15 (39,5%) männlich. Der Anteil der Raucher betrug neun (23,7%). Eine positive Familienanamnese bezüglich psychiatrischer Erkrankungen hatten 16 (44,4%) von 36 Patienten, für die diese Information verfügbar war. Zudem zeigten 17 (44,7%) der Patienten eine erste Episode einer psychiatrischen Erkrankung. In dieser Population sprachen sieben (18,4%) Patienten auf die Therapie an. Auch hier gibt **Tabelle 21** einen Überblick über die demographischen Daten und den Krankheitszustand.

Tabelle 21: Demographische Beschreibung der Vergleichspopulation (n = 38).

Variable	n*	Mittelwert	SD
Alter	38	47,0	17,5
Gewicht bei Aufnahme [kg]	38	71,5	17,3
Größe [cm]	38	171,9	9,7
BMI bei Aufnahme [kg/m ²]	38	24,1	5,0
Aufenthaltsdauer	38	58,4	31,9
PDS-P bei Aufnahme	29	3,3	3,2
PDS-D bei Aufnahme	29	17,7	10,2
CGI bei Aufnahme	38	5,5	0,83

*Anzahl der Patienten mit verfügbaren Daten bezüglich dieser Variable

Der Durchschnittspatient der Vergleichspopulation ist mit 47 Jahren etwas älter und ist normalgewichtig (BMI~24). Die paranoiden Symptome sind weniger stark ausgeprägt als in der Studienpopulation (PDS-P 3,3 vs. 8,7) und die stationäre Aufenthaltsdauer ist im Schnitt etwas geringer (58,4 vs. 71,2 Tage).

In **Abbildung 41** ist die prozentuale Verteilung der Diagnosen nach ICD-10 in den einzelnen Populationen dargestellt. Auffällig ist der im Vergleich zu den anderen Populationen hohe Anteil der F3-Diagnosen und geringe Anteil der F2-Diagnosen in der Vergleichspopulation. Hier litten jeweils ca. 30% der Patienten unter depressiven Episoden (F32) und unter rezidivierenden depressiven Episoden (F33). In der adjustierten Subpopulation zeigt sich mit 76,4% ein besonders hoher Anteil an F2-Diagnosen.

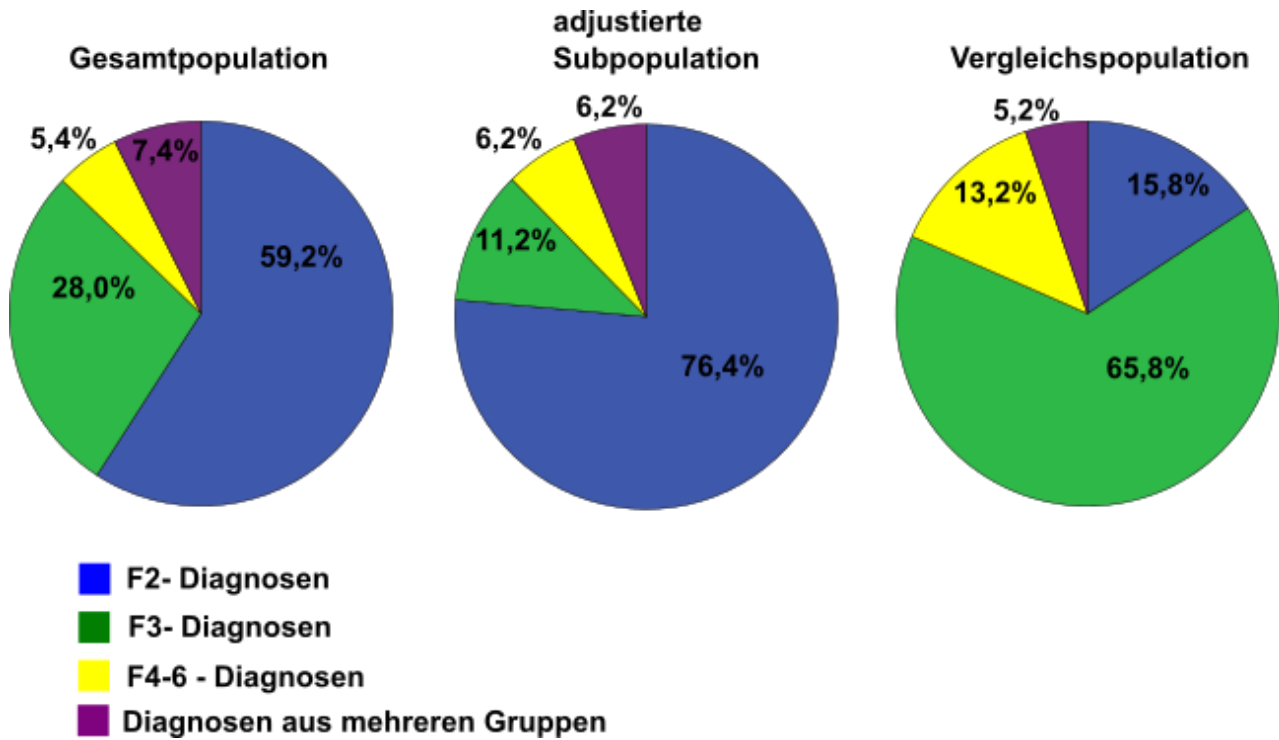


Abbildung 41: Übersicht über die prozentuale Verteilung der ICD-10-Diagnosen in den einzelnen Populationen; F2 = Schizophrenie, schizotype und wahnhafte Störungen; F3 = Affektive Störungen, manische oder depressive Episoden, bipolar affektive Störungen; F4-6 = Neurotische Störungen, Verhaltensauffälligkeiten mit körperlichen Störungen und Faktoren, Persönlichkeits- und Verhaltensstörungen.

3.3.2 Medikation

In **Abbildung 42** ist eine Übersicht über die Verteilung der verschiedenen atypischen Antipsychotika in der Studienpopulation dargestellt.

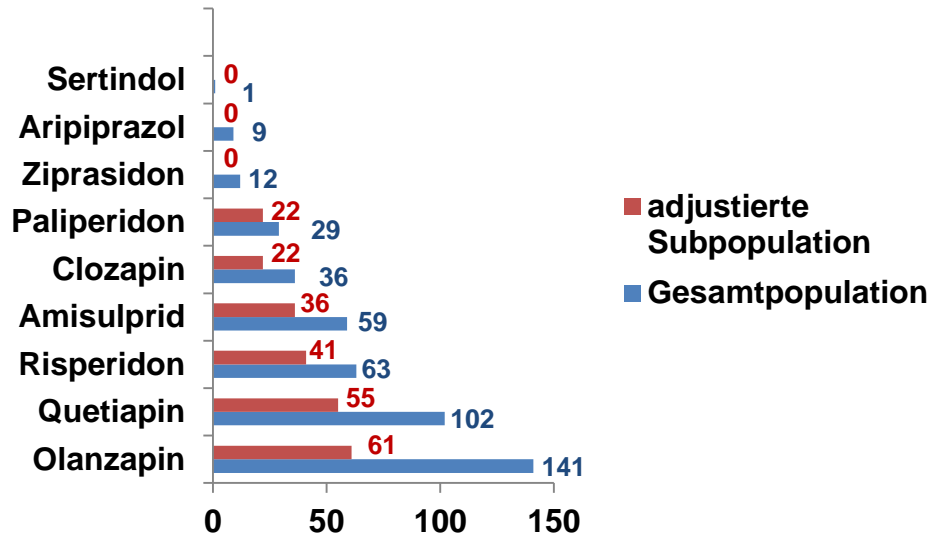


Abbildung 42: Übersicht über die Verteilung der einzelnen atypischen Antipsychotika in den Studienpopulationen.

Das am häufigsten verordnete atypische Antipsychotikum war Olanzapin mit ca. 40% gefolgt von Quetiapin mit ca. 30%. Allgemein lässt sich eine große Diversität in der Medikation erkennen. Die meisten Patienten erhielten nur ein atypisches Antipsychotikum, ein Patient bekam jedoch auch vier verschiedenen Antipsychotika (**Abbildung 43**).

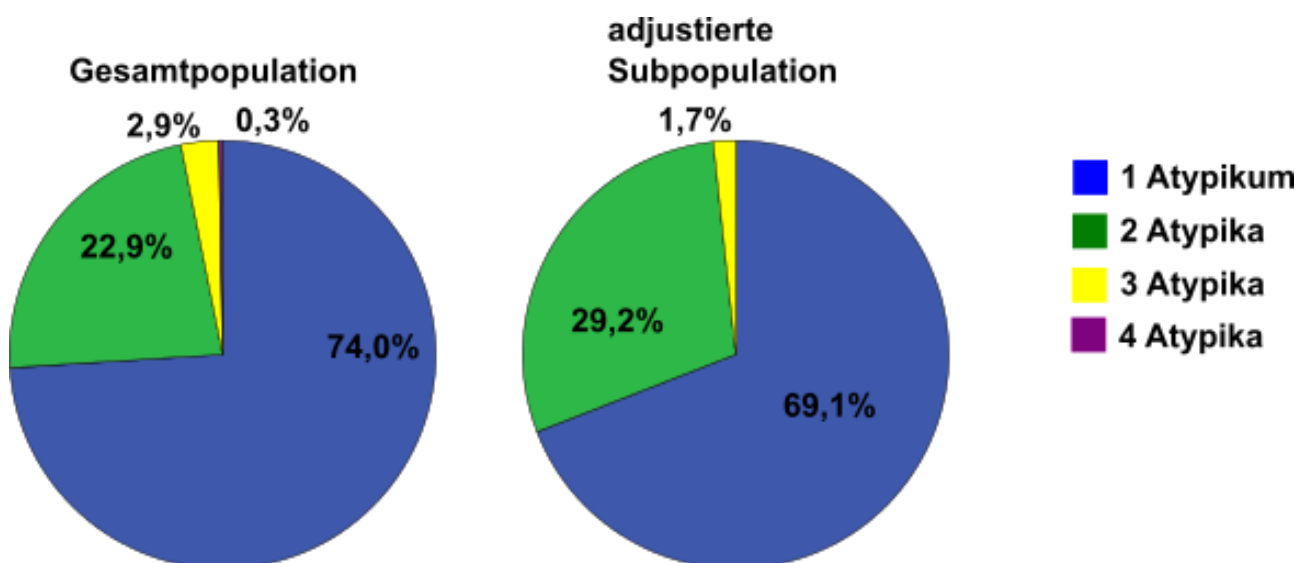


Abbildung 43: Übersicht über die Anzahl der atypischen Antipsychotika in den Studienpopulationen.

Viele der Patienten nahmen zahlreiche weiterer Medikamente ein. Daher ist in der Studienpopulation eine Vielzahl an verschiedenen Komedikationen zu finden. Zur Vereinfachung zeigt **Tabelle 22** eine Übersicht der zur Behandlung der psychischen Störungen relevanten Medikamentengruppen.

Häufigste antipsychotische Komedikationen waren dabei typische Antipsychotika (z.B. Pipamperon, Haloperidol, Perazin) (ca. 30%), selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (Citalopram, Escitalopram, Sertralin) (ca. 30%) und Mirtazapin (ca. 25%). Die Medikation der Vergleichspopulation bestand aus typischen Antipsychotika (34%) sowie Serotonin- (47%) und/oder Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmern (Venlafaxin, Duloxetin (24%) und Reboxetin (8%)). Zudem wurden in 60-70% der Fälle zusätzlich Sedativa (Benzodiazepine, Schlafmittel) verschrieben.

Tabelle 22: Übersicht über die antipsychotische und antidepressive Komedikation in den Studienpopulationen bzw. über die antidepressive Medikation in der Vergleichspopulation.

Medikamentengruppe	n Gesamtpopulation	n adjustierte Subpopulation	n Vergleichspopulation
trizyklische Antidepressiva	27	0	0
typische Antipsychotika	118	51	13
Serotonin-Wiederaufnahmehemmer	111	54	18
Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer	55	13	3
Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer	27	10	9
Sedativa	224	124	22
Antikonvulsiva	55	20	6
Lithium	55	0	0
MAO Hemmer	9	2	0
Mirtazapin	89	0	0

3.3.3 Gewichtsentwicklung der Studienpopulationen

In **Tabelle 23** sind die einzelnen Gewichtsparameter der einzelnen Populationen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sowohl in der Gesamtpopulation als auch in der adjustierten Subpopulation die Patienten nach vier Wochen Therapie mit atypischen Antipsychotika signifikant an Gewicht zunahmen (+1,41 bzw. +1,30 kg). Ein Mittelwertvergleich zwischen dem Ausgangsgewicht bzw. Ausgangs-BMI und dem Gewicht bzw. BMI nach vier Wochen zeigt einen signifikanten Unterschied (T-Test: $p = 0,000$). Im Gegensatz dazu zeigt die Vergleichspopulation ohne atypische Antipsychotika-Medikation ein konstantes Gewicht nach vier Wochen (-0,008 kg; T-Test: $p = 0,984$). Alle Patienten waren über den Beobachtungszeitraum stationär im Klinikum rechts der Isar in Behandlung und hatten somit während dieser Zeit einen vergleichbaren Lebenswandel mit Standard-Klinikkost. Das Ergebnis lässt daher darauf schließen, dass die unterschiedliche Gewichtszunahme auf die Medikation und somit auf die atypischen Antipsychotika zurückzuführen ist.

Tabelle 23: Gewichtsparameter differenziert nach Population (Mittelwert \pm SD).

	Gesamtpopulation	adjustierte Subpopulation	Vergleichspopulation
Ausgangsgewicht [kg]	74,7 \pm 16,5	74,1 \pm 16,2	71,5 \pm 17,3
Gewicht 4 Wochen [kg]	76,1 \pm 19,1	75,4 \pm 16,0	71,5 \pm 16,5
Δ Gewicht 4 Wochen [kg]	1,41 \pm 3,25 $p = 0,000$	1,30 \pm 3,16 $p = 0,000$	-0,008 \pm 2,36 $p = 0,984$
Δ Gewicht 4 Wochen [%]	2,19 \pm 4,63	2,02 \pm 4,70	0,257 \pm 3,33
Ausgangs-BMI [kg/m ²]	25,4 \pm 5,22	25,2 \pm 5,36	24,1 \pm 4,95
BMI 4 Wochen [kg/m ²]	25,9 \pm 4,99	25,7 \pm 5,19	24,1 \pm 4,65
Δ BMI 4 Wochen [kg/m ²]	0,47 \pm 1,09 $p = 0,000$	0,42 \pm 1,05 $p = 0,000$	0,006 \pm 0,78 $p = 0,962$
Δ BMI 4 Wochen [%]	2,17 \pm 4,61	1,97 \pm 4,66	0,257 \pm 3,33

Signifikante p-Werte sind in rot dargestellt.

Tabelle 24 verdeutlicht die Vergleichbarkeit der Gesamt- und der Vergleichspopulation. Ein direkter Vergleich der Gewichtsparameter zeigt, dass beide Populationen sich in Bezug auf das Gewicht bzw. den BMI vor Therapiebeginn nicht signifikant unterscheiden. Allerdings besteht ein signifikanter Unterschied bezüglich der Gewicht- und BMI-Zunahme nach vierwöchiger Therapie.

Tabelle 24: Vergleich der Gewichtsparameter zwischen der Gesamtpopulation und der Vergleichspopulation.

	Gesamtpopulation	Vergleichspopulation	p
Ausgangsgewicht [kg]	74,7 ± 16,5	71,5 ± 17,3	0,287
Gewicht 4 Wochen [kg]	76,1 ± 19,1	71,5 ± 16,5	0,109
Δ Gewicht 4 Wochen [kg]	1,41 ± 3,25	-0,008 ± 2,36	0,001
Δ Gewicht 4 Wochen [%]	2,19 ± 4,63	0,257 ± 3,33	0,002
Ausgangs-BMI [kg/m ²]	25,4 ± 5,22	24,1 ± 4,95	0,129
BMI 4 Wochen [kg/m ²]	25,9 ± 4,99	24,1 ± 4,65	0,031
Δ BMI 4 Wochen [kg/m ²]	0,47 ± 1,09	0,006 ± 0,78	0,002
Δ BMI 4 Wochen [%]	2,17 ± 4,61	0,257 ± 3,33	0,002

Signifikante p-Werte sind in rot dargestellt.

3.3.4 Klinische Einflussfaktoren und Wechselwirkungen

Der Einfluss verschiedener klinischer Faktoren auf die Gewichtszunahme unter Atypika-Therapie ist zahlreich beschrieben.^{62, 70, 252, 253} Diese Einflüsse wurden in dieser Studienpopulation sowohl für die Gesamt- als auch für die adjustierte Subpopulation sehr detailliert von Czerwensky untersucht.⁶⁸ Im Folgenden sollen daher nur die wichtigsten Faktoren kurz wiedergegeben bzw. ergänzt werden:

Geschlecht

Czerwensky konnte mittels T-Test in der Gesamt- und in der adjustierten Subpopulation sowohl für das Ausgangsgewicht ($p < 0,001/0,001$) als auch die absolute Gewichts- ($p = 0,005/0,016$) und BMI-Zunahme ($p = 0,016/0,024$) einen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen feststellen.⁶⁸ Dabei waren Männer signifikant schwerer und nahmen auch mehr an Gewicht und BMI zu als Frauen. Beim absoluten BMI zu Beginn der Studie ($p = 0,336/0,605$) und auch nach vier Wochen ($p = 0,117/0,309$) war kein signifikanter Unterschied zu erkennen. Hier wurde das höhere Gewicht der männlichen Patienten durch die Körpergröße relativiert.

Art der Medikation

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Gewichtszunahme hat, ist die Art der Medikation. So haben einigen Antipsychotika ein höheres Risiko eine Gewichtszunahme auszulösen als andere. Leucht et al. konnten in einer Metaanalyse unter den verschiedenen atypischen Antipsychotika folgende Rangfolge bezüglich ihres Risikos für Gewichtszunahme feststellen:

Olanzapin > Clozapin > Quetiapin, Risperidon > Sertindol > Paliperidon > Amisulprid > Aripiprazol > Ziprasidon²⁵

Auf Grundlage dieser Reihenfolge wurden die Antipsychotika in folgende Gruppen eingeteilt:

- Antipsychotika mit hohem Risiko für Gewichtszunahme: Olanzapin, Clozapin
- Antipsychotika mit mäßigem Risiko für Gewichtszunahme: Quetiapin, Risperidon, Sertindol, Paliperidon
- Antipsychotika mit niedrigem bis gar keinem Risiko für Gewichtszunahme: Amisulprid, Aripiprazol, Ziprasidon

Die Gewichtszunahme ist unter Olanzapin und Clozapin am stärksten ausgeprägt und die Identifizierung genetischer Marker ist für diese Medikation besonders relevant. Bezüglich des Risikofaktors „**Art des Antipsychotikums**“ wurde zwischen Clozapin und Olanzapin (Hochrisiko-Therapie) und den anderen Atypika (Niedrigrisiko-Therapie) unterschieden. Der T-Test konnte in dieser Studienpopulation einen signifikanten Unterschied der Gewichtszunahme in Abhängigkeit von der Medikation identifizieren (Gesamtpopulation: Hochrisiko-Therapie 2,7% vs. Niedrigrisiko-Therapie 1,7%; $p = 0,037$; adjustierte Subpopulation: Hochrisiko-Therapie 2,9% vs. Niedrigrisiko-Therapie 1,3%; $p = 0,023$). Zudem wurden für alle getesteten Polymorphismen die Patienten mit Hochrisiko-Therapie nochmal separat auf eine Genotypen-abhängige Gewichtszunahme getestet.

Ausgangsgewicht/Ausgangs-BMI

Als weitere Einflussfaktoren auf die Gewichtszunahme konnte das Ausgangsgewicht bzw. der Ausgangs-BMI identifiziert werden. Hierbei korrelierte ein niedriges Gewicht/BMI zu Beginn der Studie mit einer höheren Gewichtszunahme nach vier Wochen Antipsychotika-Therapie (für alle Gruppen $p < 0,001$).

Therapieansprechen

Sharma et al. haben in ihrer Studie einen Zusammenhang zwischen Therapieansprechen und dem Auftreten von Nebenwirkungen beschrieben.²⁵⁴ Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Therapieerfolg und der Gewichtszunahme getestet. Als Therapieerfolg wurde ein CGI 2-Wert von 1 oder 2 nach vier Wochen gewertet. Der T-Test zeigte für die Gesamtpopulation einen Trend: Patienten mit Therapieerfolg (n = 42) nahmen im Schnitt 3,67% Gewicht zu, während Patienten ohne Therapieerfolg (n = 278) nur 2,12% zunahmen (p = 0,067). Dieser Effekt erreicht in der adjustierten Subpopulation (n = 26/142) ein signifikantes Niveau (4,61% vs. 1,58%; p = **0,009**).

MC4R

Czerwensky konnte weiterhin den Polymorphismus rs17782313 im MC4R-Gen als möglichen Risikofaktor für eine Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme identifizieren.⁶⁸ Der Polymorphismus befindet sich 180 kb *downstream* des MC4R-Gens und stellt eine Punktmutation von Thymin zu Cytosin dar. Träger des Risikoallels C nahmen nach vier Wochen Atypika-Therapie signifikant mehr Gewicht zu als Träger des Wildtyp-Allels T (Gesamtpopulation: T/T = 1,6% vs. T/C = 2,9% vs. C/C = 3,5%; p = **0,025**; adjustierte Subpopulation: T/T = 1,1% vs. T/C = 3,3% vs. C/C = 5,5%; p = **0,001**). Dieser Polymorphismus wurde daher als Kofaktor in die Analysen dieser Arbeit aufgenommen.

Als weitere mögliche Einflussfaktoren wurden von Czerwensky die Art der Diagnose, der Zustand des Patienten nach PDS und das Alter untersucht. Als einziger signifikanter Zusammenhang konnte eine schwache Korrelation zwischen Alter und absoluter Gewichtszunahme nachgewiesen werden (p = **0,022**).

Um Verzerrungseffekte aufgrund eventueller antipsychotischer Vorbehandlungen auszuschließen, wurde zusätzlich nur die Gruppe der Patienten betrachtet, die zum ersten Mal mit Neuroleptika behandelt wurden (**naive Subpopulation**, n = 91).^{252, 255} Im Vergleich zu Patienten mit antipsychotischer Vormedikation hatte diese Patientengruppe zu Beginn der Studie einen signifikant niedrigeren BMI (24,2 vs. 26,0 kg/m²; p = **0,004**). Zudem waren die Patienten signifikant jünger (37,3 vs. 42,4 Jahre; p = **0,004**). In Bezug auf die Gewichtsveränderung zeigten Patienten dieser Subpopulation einen Trend für eine stärkere Gewichts- (2,9 vs. 1,9%; p = 0,063) und BMI-Zunahme (2,9 vs. 1,8%; p = 0,054).

3.4 Genotypisierungen der Antipsychotika-Population

3.4.1 Exemplarisches Vorgehen

Im folgenden Kapitel werden die statistischen Ergebnisse, der unter **2.4.11** beschriebenen Genotypisierungen aufgeführt.

Die Häufigkeitsverteilung der untersuchten Polymorphismen in der Studienpopulation im Vergleich zu den Häufigkeiten der HapMap-EU Population ist in **Anhang 9.3** dargestellt. Es kann eine vergleichbare Verteilung der untersuchten Polymorphismen festgestellt werden. Zudem befinden sich alle untersuchten Polymorphismen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (**Anhang 9.3**).

Zu Beginn der Auswertung wurde eine ANOVA durchgeführt. Hierbei wurde der Einfluss der jeweiligen Genotypen auf Gewicht und BMI sowie deren Veränderung nach vierwöchiger Medikamenteneinnahme untersucht. Die ANOVA wurde für alle Subpopulationen durchgeführt.

Im **Kapitel 3.3.4** konnte ein Einfluss der klinischen Parameter Alter, Geschlecht, Ausgangsgewicht bzw. -BMI, Therapieansprechen und Art der Medikation auf die Gewichtszunahme nachgewiesen werden. Zudem wurde der MC4R-Polymorphismus rs17782313 von Czerwensky als möglicher Risikofaktor für Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme identifiziert. Es wurde daher auf eine gleichmäßige Verteilung dieser Parameter in den jeweiligen Genotyp-Gruppen geprüft (Chi-Quadrat für Geschlecht, Art der Medikation, Therapieansprechen und rs17782313; ANOVA für Alter und Ausgangsgewicht).

Um den Einfluss der unter **3.3.4** beschriebenen Einflussfaktoren auf die Gewichtszunahme nach vier Wochen zu berücksichtigen und Verzerrungseffekte zu vermeiden, wurde ein adjustiertes ANCOVA-Modell generiert. Dieses beinhaltete als Kofaktoren Alter, Geschlecht, Gewicht zur Aufnahme, Therapieansprechen und den rs17782313 Genotyp. Da es nur einen marginalen Unterschied in der Korrelation von Basisgewicht bzw. BMI und der Gewichtszunahme gab und die Variable „Basisgewicht“ für jeden Patienten zur Verfügung stand, fand diese Variable Anwendung im adjustierten ANCOVA-Modell. Als abhängige Variable wurde die prozentuale Veränderung des Gewichtes verwendet, da sie am häufigsten beschrieben wird und somit eine bessere Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Studien gewährleistet ist.

Zudem wurde in einigen Fällen eine lineare Regression durchgeführt. Dabei wurde ebenfalls die prozentuale Veränderung des Gewichts als abhängige Variable eingesetzt. Als unabhängige Faktoren wurden der jeweilige Genotyp sowie die bereits oben benannten Kofaktoren verwendet. Für die Einberechnung der unabhängigen Faktoren wurde die Einschluss-Methode gewählt.

Da die Gewichtszunahme vor allem bei der Therapie mit Clozapin und Olanzapin von Bedeutung ist wurden in einem weiteren Schritt nur Patienten mit dieser Hochrisiko-Therapie nach oben beschriebenen Muster auf signifikante Zusammenhänge getestet (n = 174). Um zudem Verzerrungseffekte aufgrund eventueller antipsychotischer Vorbehandlungen auszuschließen, wurden die Gruppe der Patienten betrachtet, die zum ersten Mal mit Neuroleptika behandelt wurden (naive Subpopulation, n = 91).

3.4.2 Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf die Gewichtszunahme

3.4.2.1 rs6971 und rs6973 Polymorphismus (TSPO)

Das TSPO-Gen ist auf 22q13.2 lokalisiert und kodiert ein 18 kDa großes Transmembranprotein der äußeren Mitochondrienmembran, das *Translocator Protein* (TSPO). TSPO ist an der Synthese und dem Transport von Steroidhormonen sowie von Porphyrin beteiligt.⁷² Zudem ist es bei Entzündungsprozessen involviert.

TSPO wird mit der Gewichtsregulation im Allgemeinen sowie in Bezug auf die antipsychotische Therapie in Verbindung gebracht.^{78-81, 256} Zudem konnte die Gruppe um Professor Müller einen signifikanten Zusammenhang zwischen den TSPO Polymorphismen rs6971 und rs6973 und der Antipsychotika-induzierten Gewichtszunahme nachweisen.⁸³

Sowohl rs6971 als auch rs6973 befinden sich im Exon 5, dem TSPO-Gen nachgelagert. Rs6971 ist ein nicht-synonymer SNP. Er impliziert einen Basenaustausch von Cytosin zu Thymin und verursacht dadurch einen Austausch der Aminosäure von Alanin zu Threonin im aktiven Zentrum. Rs6973 impliziert einen Basenaustausch von Guanin zu Thymin.

Die Untersuchung der Polymorphismen rs6971 und rs6973 im TSPO-Gen wurden in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Prof Müller des *Department of Psychiatry* an der *University of Toronto*,

Toronto, Kanada durchgeführt. Neben der hier beschriebenen Studienpopulation wurden zwei weitere Population auf einen Zusammenhang der Polymorphismen mit Antipsychotika-induzierter Gewichtszunahme analysiert, die Population der Gruppe von Prof Müller (Toronto-Population) und die *NIMH Research Units on Pediatric Psychopharmacology (RUPP) Autism Network* Population (RUPP-Population). Die Toronto-Population beinhaltet 109 erwachsene Patienten kaukasischer Abstammung mit Schizophrenie aus verschiedenen Studienzentren. Die Patienten wurden für 14 Wochen beobachtet. Die RUPP-Population erfasst 119 Kinder zwischen vier und 17 Jahren mit Autismus. Die Kinder wurden mit Risperidon behandelt und die Entwicklung über acht Wochen erfasst. Für die genaue Charakterisierung dieser Studienpopulationen siehe Pouget et al.²⁵⁷ Für rs6973 war für eine Probe keine auswertbare Genotypisierung möglich (siehe **3.1**).

In den Populationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, Medikation, Therapieansprechen und rs17782313 Genotyp.

Für rs6971 konnte sowohl in der Gesamtpopulation als auch in der adjustierten Population kein signifikanter Zusammenhang mit einer Antipsychotika-induzierten Gewichtszunahme gefunden werden. Alle Genotypen zeigten ein ähnliches Verhalten bezüglich der Gewichtsentwicklung (**Tabelle 25**).

Für rs6973 konnte in der adjustierten Subpopulation ein signifikanter Zusammenhang für das Ausgangsgewicht bzw. den Ausgangs-BMI gefunden werden ($p = \mathbf{0,013/0,006}$; **Tabelle 26**). So zeigten homozygote Träger des mutierten Allels A ein deutlich höheres Gewicht als die anderen Genotypen ($A/A = 87,8 \text{ kg}$, $C/C = 72,7 \text{ kg}$, $C/T = 74,1 \text{ kg}$). Da die Gewichtszunahme bei allen Genotypen ähnlich war, spiegelte sich dieser Effekt ebenfalls beim Gewicht nach vier Wochen wieder. In einem zweiten Schritt wurde getestet, ob dieser Effekt eventuell von einer vorrausgegangenen, längeren Medikamenteneinnahme hervorgerufen wurde oder der Polymorphismus möglicherweise einen Einfluss auf das Gewicht im Allgemeinen hat. Dazu wurde zwischen Patienten, die schon zu Beginn der Studie Antipsychotika genommen hatten, und Patienten, die zum ersten Mal Antipsychotika nahmen (naive Subpopulation), unterschieden. In der Gruppe der chronischen Patienten ($n = 130$) war dieser Effekt nicht nachweisbar ($p = 0,362$). Im Gegensatz dazu verdeutlichte sich der Effekt in der naiven Subpopulation ($n = 48$): homozygote A-Allel-Träger zeigten ein deutlich höheres Ausgangsgewicht ($92,9 \pm 25,7 \text{ kg}$) als homozygote C-Allel-Träger ($71,2 \text{ kg} \pm 14,9 \text{ kg}$) und heterozygote Patienten ($73,1 \pm 14,3 \text{ kg}$) ($p = \mathbf{0,026}$). Ähnlich verhielt es sich mit dem BMI ($A/A = 32,7 \text{ kg/m}^2$,

C/A = 24,8 kg/m², C/C = 22,8 kg/m²; p = **0,001**). Dieser Effekt blieb signifikant nach Berücksichtigung der möglichen Kofaktoren Alter und Geschlecht (lineare Regression: p = **0,024/0,002**). Der Effekt scheint daher unabhängig von der antipsychotischen Medikation zu sein. Die geringe Anzahl der Patienten und besonders der homozygoten A-Allel-Träger (n = 5) begrenzt die statistische Aussagekraft.

Tabelle 25: ANOVA für TSPO rs6971, Mittelwert ± SD.

	Gesamtpopulation n=350				adjustierte Subpopulation n=178			
	C/C n=187	C/T n=130	T/T n=33	p	C/C n=99	C/T n=65	T/T n=14	p
Ausgangsgewicht [kg]	74,9 ± 17,3	74,3 ± 16,5	75,1 ± 11,7	0,943	74,1 ± 18,0	73,6 ± 14,7	76,4 ± 11,2	0,852
Gewicht 4 Wochen [kg]	76,2 ± 16,9	75,9 ± 16,2	76,7 ± 10,6	0,972	75,3 ± 17,7	75,0 ± 14,4	77,2 ± 10,9	0,895
Δ Gewicht [kg]	1,23 ± 3,07	1,62 ± 3,61	1,60 ± 2,79	0,543	1,27 ± 2,90	1,38 ± 3,75	0,88 ± 2,14	0,868
Δ Gewicht [%]	1,96 ± 4,35	2,46 ± 5,14	2,45 ± 4,11	0,593	2,01 ± 4,49	2,15 ± 5,36	1,25 ± 2,91	0,810
	n=349 (C/T=129)				n=177 (C/T=64)			
Ausgangsbmi [kg/m²]	25,7 ± 5,53	25,2 ± 5,04	25,8 ± 4,05	0,530	25,3 ± 5,90	24,9 ± 4,89	26,5 ± 4,32	0,611
Bmi 4 Wochen [kg/m²]	26,1 ± 5,26	25,6 ± 4,92	26,3 ± 5,60	0,595	25,7 ± 5,65	25,3 ± 4,81	26,7 ± 4,12	0,651
Δ Bmi [kg/m²]	0,41 ± 1,04	0,54 ± 1,18	0,54 ± 1,00	0,551	0,41 ± 0,97	0,45 ± 1,23	0,28 ± 0,75	0,790
Δ Bmi [%]	1,96 ± 4,35	2,40 ± 5,11	2,45 ± 4,11	0,655	2,01 ± 4,49	2,01 ± 5,28	1,25 ± 2,91	0,843

Tabelle 26: ANOVA für TSPO rs6973, Mittelwert \pm SD.

	Gesamtpopulation n=349				adjustierte Subpopulation n=178			
	C/C n=208	C/A n=121	A/A n=20	P	C/C n=107	C/A n=60	A/A n=11	P
Ausgangs- gewicht [kg]	74,5 \pm 15,8	74,0 \pm 16,3	81,7 \pm 24,0	0,150	72,7 \pm 14,3	74,1 \pm 16,8	87,8 \pm 25,5	0,013
Gewicht 4 Wochen [kg]	75,9 \pm 15,5	75,3 \pm 15,5	83,1 \pm 23,6	0,127	74,1 \pm 14,4	75,3 \pm 15,9	88,9 \pm 25,8	0,014
Δ Gewicht [kg]	1,44 \pm 3,37	1,36 \pm 3,20	1,49 \pm 2,39	0,971	1,37 \pm 3,20	1,14 \pm 3,34	1,10 \pm 2,04	0,886
Δ Gewicht [%]	2,18 \pm 4,73	2,24 \pm 4,69	2,15 \pm 3,33	0,993	2,08 \pm 4,79	1,99 \pm 4,95	1,27 \pm 2,40	0,864
	n=348 (C/A=120)				n=177 (C/A=59)			
Ausgangs- BMI [kg/m²]	25,4 \pm 4,96	25,3 \pm 5,07	27,2 \pm 8,17	0,28	24,6 \pm 4,60	25,5 \pm 5,54	30,0 \pm 9,37	0,006
BMI 4 Wo- chen [kg/m²]	25,8 \pm 4,77	25,7 \pm 4,75	27,7 \pm 7,97	0,236	25,1 \pm 4,50	25,8 \pm 5,15	30,4 \pm 9,26	0,006
Δ BMI [kg/m²]	0,48 \pm 1,12	0,45 \pm 1,10	0,47 \pm 0,78	0,962	0,45 \pm 1,04	0,35 \pm 1,14	0,33 \pm 0,70	0,810
Δ BMI [%]	2,18 \pm 4,73	2,16 \pm 4,64	2,15 \pm 3,33	0,999	2,08 \pm 4,79	1,84 \pm 4,85	1,27 \pm 2,40	0,841

Signifikante p-Werte sind in rot dargestellt.

Im Zusammenhang mit den beiden Vergleichspopulationen wurden nur Patienten untersucht, die eine Medikation mit mäßigem oder hohem Risiko für Gewichtszunahme bekamen. Die Analyse der entsprechenden Gruppen zeigte kein signifikantes Ergebnis (**Tabelle 27, Tabelle 28**). Auch die lineare Regression in Bezug auf die relative Gewichtszunahme unter Berücksichtigung möglicher anderer Einflussfaktoren (Alter, Geschlecht, Gewicht zur Aufnahme, Therapieansprechen und rs17782313 Genotyp) lieferte keine Signifikanz (rs6971: $p = 0,507/0,589$; rs6973 $p = 0,741/0,564$).

Tabelle 27: ANOVA für TSPO rs6971, Mittelwert \pm SD.

	Population Clozapin + Olanzapin n=174				Population Clozapin + Olanzapin+ Risperidon + Quetiapin n=300			
	C/C n=88	C/T n=63	T/T n=23	p	C/C n=151	C/T n=121	T/T n=28	p
Ausgangs- gewicht [kg]	74,5 $\pm 17,0$	72,7 $\pm 14,1$	73,4 $\pm 11,2$	0,777	74,4 $\pm 16,7$	72,4 $\pm 14,8$	74,0 $\pm 11,8$	0,588
Gewicht 4 Wochen [kg]	76,1 $\pm 16,1$	74,8 $\pm 14,2$	74,9 $\pm 10,1$	0,840	75,6 $\pm 16,0$	74,2 $\pm 14,7$	75,8 $\pm 10,7$	0,718
Δ Gewicht [kg]	1,61 $\pm 3,14$	2,04 $\pm 3,78$	1,45 $\pm 2,89$	0,667	1,22 $\pm 3,03$	1,74 $\pm 3,61$	1,73 $\pm 2,93$	0,402
Δ Gewicht [%]	2,60 $\pm 4,58$	3,02 $\pm 5,48$	2,30 $\pm 4,33$	0,794	2,01 $\pm 4,41$	2,64 $\pm 5,20$	2,66 $\pm 4,34$	0,515
	n=173 (C/T=62)				n=299 (C/T=120)			
Ausgangs- BMI [kg/m²]	25,2 $\pm 5,32$	24,4 $\pm 4,05$	25,4 $\pm 3,94$	0,481	25,6 $\pm 5,52$	24,5 $\pm 4,43$	25,5 $\pm 3,94$	0,191
BMI 4 Wo- chen [kg/m²]	25,8 $\pm 4,96$	25,0 $\pm 4,03$	25,9 $\pm 3,50$	0,544	26,0 $\pm 5,20$	25,1 $\pm 4,37$	26,1 $\pm 3,52$	0,251
Δ BMI [kg/m²]	0,54 $\pm 1,06$	0,65 $\pm 1,22$	0,50 $\pm 1,03$	0,778	0,41 $\pm 1,04$	0,58 $\pm 1,19$	0,59 $\pm 1,04$	0,422
Δ BMI [%]	2,60 $\pm 4,58$	2,89 $\pm 5,43$	2,30 $\pm 4,33$	0,869	2,01 $\pm 4,41$	2,57 $\pm 5,16$	2,66 $\pm 4,34$	0,573

Tabelle 28: ANOVA für TSPO rs6973, Mittelwert ± SD.

	Population Clozapin + Olanzapin n=173				Population Clozapin + Olanzapin + Risperidon + Quetiapin n=299			
	C/C n=108	C/A n=57	A/A n=8	p	C/C n=179	C/A n=105	A/A n=15	p
Ausgangsge- wicht [kg]	73,9 ± 14,3	73,8 ± 16,3	70,9 ± 22,2	0,869	73,8 ± 14,7	72,2 ± 15,3	80,6 ± 24,1	0,141
Gewicht 4 Wochen [kg]	75,7 ± 13,6	75,4 ± 15,8	72,5 ± 22,3	0,840	75,2 ± 14,3	73,8 ± 14,7	82,0 ± 23,6	0,142
Δ Gewicht [kg]	1,81 ± 3,68	1,66 ± 2,85	1,59 ± 1,77	0,954	1,43 ± 3,44	1,60 ± 3,13	1,36 ± 2,20	0,911
Δ Gewicht [%]	2,84 ± 5,36	2,57 ± 4,15	2,36 ± 3,02	0,923	2,22 ± 4,88	2,57 ± 4,70	2,00 ± 3,29	0,809
	n=172 (C/A=56)				n=298 (C/T=104)			
Ausgangs- BMI [kg/m²]	24,8 ± 4,32	25,3 ± 5,25	23,6 ± 6,43	0,617	25,1 ± 4,55	24,9 ± 4,98	27,4 ± 8,84	0,189
BMI 4 Wo- chen [kg/m²]	25,5 ± 4,03	25,8 ± 4,99	24,2 ± 6,42	0,603	25,6 ± 4,33	25,4 ± 4,71	27,8 ± 8,54	0,181
Δ BMI [kg/m²]	0,61 ± 1,22	0,53 ± 0,96	0,52 ± 0,58	0,890	0,48 ± 1,15	0,53 ± 1,08	0,43 ± 0,74	0,915
Δ BMI [%]	2,84 ± 5,36	2,42 ± 4,03	2,36 ± 3,02	0,856	2,22 ± 4,88	2,48 ± 4,65	1,99 ± 3,29	0,874

Im Gegensatz zu unserer Analyse konnte in der RUPP-Population ein signifikanter Effekt gefunden werden. Kindern, die homozygot das C-Allel trugen, zeigten im Lauf der Studie eine signifikant geringere BMI-Zunahme ($p = 0,003$).²⁵⁷ In der Toronto-Population war zumindest ein Trend erkennbar.²⁵⁷ So nahm abhängig von der Anzahl des Risikoallels T das Gewicht um 1,35% bzw. 1,41% zu ($p = 0,07$) (Tabelle 29).

Tabelle 29: Übersicht über die Gewichts- bzw. BMI-Änderung im Verlauf der Studie in Abhängigkeit des rs6971 Genotyps und die Ergebnisse der linearen Regression in den verschiedenen Vergleichspopulationen.

Population	Genotyp	Δ Gewicht [%] \pm SD	p
Toronto-Population (n=109)	C/C (n=54)	3,72 \pm 4,5	0,070
	C/T (n=44)	5,05 \pm 5,6	
	T/T (n=11)	7,10 \pm 6,0	
Toronto-Population, nur Clozapin- und Olanzapin-Medikation (n=78)	C/C (n=41)	3,23 \pm 4,5	0,040
	C/T (n=29)	5,17 \pm 6,3	
	T/T (n=8)	8,09 \pm 6,1	
München-Population (n=300)	C/C (n=151)	2,01 \pm 4,41	0,589
	C/T (n=121)	2,64 \pm 5,20	
	T/T (n=28)	2,66 \pm 4,34	
Population	Genotyp	Δ BMI	p
RUPP-Population (n=119)	C/C	0,55	0,003
	C/T	0,68	
	T/T	0,68	

Signifikante p-Werte sind in rot dargestellt.

Für Patienten, die zum ersten Mal mit Antidepressiva behandelt wurden, konnten ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse gezeigt werden. Lediglich der BMI zu Studienbeginn für rs6973 war für A/A-Homozygote signifikant höher ($p = 0,012$). Dieser Effekt passt mit dem bereits oben beschriebenen Zusammenhang zwischen rs6973 und dem Ausgangsgewicht bzw. -BMI in der adjustierten Subpopulation zusammen.

3.4.2.2 rs8087522 Polymorphismus (MC4R)

Das MC4R-Gen ist auf Chromosom 18q22 lokalisiert und codiert den humanen Melanocortin-4- Rezeptor, einen G-gekoppelten Rezeptor. Dieser spielt im Energiehaushalt und dem Essverhalten des Menschen eine entscheidende Rolle.^{84, 85} Die vielen funktionalen Polymorphismen in diesem Gen werden unter anderem mit Übergewicht in Verbindung gebracht.⁸⁸

In dieser Studienpopulation wurde bereits ein Effekt für rs17782313 und rs489693 auf die Gewichtszunahme unter atypischen Antipsychotika nachgewiesen.^{66, 67, 89} Für rs8087522 konnte Sun einen Zusammenhang in der adjustierten Subpopulation identifizieren.⁹⁰ Dieser sollte im Rahmen dieser Arbeit zum einen durch Genotypisierung der Gesamtpopulation verifiziert werden. Zum anderen sollten die Ergebnisse der Sequenzierung durch eine weitere Methode validiert werden.

Der rs8087522 Polymorphismus befindet sich ca. 500 bp *upstream* des MC4R-Gens und stellt eine Punktmutation des Wildtyp-Allels Cytosin zu Thymin dar.

Bei der Analyse mittels Sonden-basierter Genotypisierung am *LightCycler* konnte eine Probe nicht eindeutig bestimmt werden. Diese wurde in der Auswertung ausgeschlossen (siehe **3.1**). Drei Proben zeigten ein abweichendes Ergebnis zu den Sequenzierungsergebnissen. Aufgrund der geringeren Fehleranfälligkeit der *LightCycler*-Methode sowie der teilweise uneindeutigen Ergebnisse und somit schwierigeren Auswertung der Sequenzierung wurden für die folgende Analyse die Ergebnisse der *LightCycler*-Messung verwendet. Diese weichen daher geringfügig von den Ergebnissen von Sun ab.⁹⁰

In den Populationen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Medikation und Therapieansprechen. T/T-Allel-Träger der Gesamtpopulation zeigten ein signifikant niedrigeres Ausgangsgewicht zu Beginn der Studie ($p = \mathbf{0,027}$) (**Tabelle 31**). Zudem war in der Gesamtpopulation unter den Frauen der Anteil des T/T-Genotyps höher als erwartet, während unter den männlichen Studienteilnehmern der T/T-Genotyp seltener auftrat ($p = \mathbf{0,024}$). Dieser Effekt konnte in der adjustierten Subpopulation jedoch nicht bestätigt werden ($p = 0,159$) und ist wohl zufallsbedingt. Des Weiteren zeigte sich ebenfalls nur in der Gesamtpopulation eine häufige Übereinstimmung zwischen den Wildtyp- und den mutierten Allelen der rs17782313 und rs8087522 Polymorphismen ($p = \mathbf{0,001}$). Patienten, die in Bezug auf rs17782313 Träger des mutierten Allels C waren, zeigten

häufiger als erwartet auch eine Mutation in Bezug auf rs8087522 (T-Allel). Da beide Polymorphismen innerhalb desselben Gens liegen, ist eine gemeinsame Vererbung der jeweiligen Allele plausibel. Die beiden Polymorphismen befinden sich allerdings nicht im *Linkage Disequilibrium* (LD) (**Tabelle 30**). Die hier dargestellten Werte wurden mittels *CubeX-Online-Tool* berechnet.²²³

Tabelle 30: LD-Analyse von rs17782313 und rs8087522 nach ²²³.

L1	L2	D'	r ²	Entfernung
rs17782313	rs8087522	0,233	0,0425	189381

Homozygote Träger des mutierten Allels T hatten im Durchschnitt das niedrigste Gewicht zu Beginn der Studie ($p = \mathbf{0,027/0,110}$). Nach vier Wochen nahmen diese Patienten sowohl in der Gesamtpopulation als auch in der adjustierten Population mehr Gewicht zu als C-Allel-Träger (**Tabelle 31**). Anders als in der Auswertung von Sun, erreichte dieser Effekt in beiden Populationen keine Signifikanz ($p = 0,117/0,053$).⁹⁰ Dies ist auf die veränderte Genotypen-Zuordnung aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Messmethoden zurück zu führen. Lediglich die prozentuale BMI-Änderung in der adjustierten Population zeigte ein signifikantes Ergebnis ($p = \mathbf{0,044}$).

Auch die ANCOVA zeigte keine signifikanten Ergebnisse für die Gewichtszunahme [%] in Abhängigkeit des rs8087522 Genotyps ($p = 0,289/0,176$). Im Gegensatz dazu konnten das Geschlecht, das Ausgangsgewicht sowie rs17782313 als signifikante Kovariate identifiziert werden.

Die Auswertung der Patienten mit Antipsychotika mit hohem Risiko für Gewichtszunahme zeigte ähnliche Ergebnisse wie die Auswertung der Gesamtpopulation und der adjustierten Subpopulation. Patienten mit dem T/T-Genotyp zeigten im Schnitt das niedrigste Ausgangsgewicht zu Beginn der Studie (C/C = $73,6 \pm 15,1$ kg, C/T = $75,7 \pm 15,0$ kg, T/T = $64,2 \pm 14,5$ kg; $p = \mathbf{0,034}$). Nach vier Wochen Therapie nahmen diese Patienten signifikant das meiste Gewicht zu (C/C = $2,6 \pm 4,6\%$, C/T = $2,3 \pm 4,8\%$, T/T = $5,9 \pm 6,0\%$; $p = \mathbf{0,035}$). Nach Adjustierung für andere mögliche Einflussfaktoren konnte jedoch keine Signifikanz für den Genotypen mehr beobachtet werden ($p = 0,162$).

Auch in der Gruppe der naiven Patienten konnten keine signifikanten Effekte des Genotyps nachgewiesen werden.

Tabelle 31: ANOVA für MC4R rs8087522, Mittelwert \pm SD.

	Gesamtpopulation n=349				adjustierte Subpopulation n=177			
	C/C n=176	C/T n=146	T/T n=27	P	C/C n=91	C/T n=70	T/T n=16	P
Ausgangs- gewicht [kg]	73,9 \pm 16,0	76,9 \pm 16,7	68,2 \pm 17,5	0,027	73,2 \pm 15,5	76,6 \pm 16,6	67,7 \pm 17,9	0,110
Gewicht 4 Wochen [kg]	75,3 \pm 15,8	78,1 \pm 16,1	70,5 \pm 17,0	0,053	74,4 \pm 15,4	77,8 \pm 16,5	70,4 \pm 16,7	0,177
Δ Gewicht [kg]	1,46 \pm 3,21	1,19 \pm 3,34	2,31 \pm 3,11	0,251	1,16 \pm 2,67	1,17 \pm 3,66	2,67 \pm 3,33	0,192
Δ Gewicht [%]	2,20 \pm 4,45	1,88 \pm 4,62	3,89 \pm 5,65	0,117	1,74 \pm 1,01	1,77 \pm 5,03	4,74 \pm 6,26	0,053
	n=348 (C/C=175)				n=176 (C/C=90)			
Ausgangs- BMI [kg/m²]	25,1 \pm 4,99	26,0 \pm 5,22	24,1 \pm 6,50	0,116	25,0 \pm 4,93	26,0 \pm 5,77	23,5 \pm 5,82	0,198
BMI 4 Wo- chen [kg/m²]	25,6 \pm 4,84	26,4 \pm 4,90	24,9 \pm 6,33	0,194	25,4 \pm 4,90	26,3 \pm 5,53	24,4 \pm 5,40	0,303
Δ BMI [kg/m²]	0,48 \pm 1,08	0,39 \pm 1,10	0,82 \pm 1,10	0,117	0,38 \pm 0,90	0,36 \pm 1,18	0,94 \pm 1,17	0,121
Δ BMI [%]	2,15 \pm 4,41	1,88 \pm 4,62	3,89 \pm 5,65	0,115	1,64 \pm 3,91	1,77 \pm 5,03	4,74 \pm 6,26	0,044

Signifikante p-Werte sind in rot dargestellt.

3.4.2.3 rs6435326, rs1801318 und rs1053517 Polymorphismus (NDUFS1)

Das NDUFS1-Gen befindet sich auf Chromosom 2 und codiert die NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase 75 kDa Untereinheit 1. Dieses Protein gehört zum Komplex I der Atmungskette auf der inneren Mitochondrienmembran. Es dient dem Elektronentransfer von NADH auf Ubiquinon und schleust somit Elektronen in die Atmungskette ein. Mutationen innerhalb des Gens werden mit einem Funktionsverlusts des Komplex I in Verbindung gebracht. Goncalves et al. konnten zwischen den drei Polymorphismen rs6435326, rs1801318 und rs1053517 und der Antipsychotika-induzierten Gewichtszunahme einen signifikanten Zusammenhang feststellen.⁸³ Der rs6435326 liegt im Intron 13 des NDUFS1-Gen und impliziert einen Basenaustausch von Adenin zu Thymin, rs1053517 liegt in Exon 19 und hat einen Basenaustausch von Cytosin zu Thymin zur Folge. Rs1801318 ist ein synonymer Basenaustausch, er ist in Exon 12 lokalisiert und impliziert einen Basenaustausch von Adenin zu Guanin. Beide Triplets codieren die Aminosäure Arginin.

In der Population zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, Ausgangsgewicht, Medikation und rs17782313 Genotyp und Therapieansprechen.

Sowohl in der Gesamtpopulation als auch in der adjustierten Subpopulation zeigten rs6435326 A/A-Allel-Träger das niedrigste Ausgangsgewicht und die höchste Gewichtszunahme nach vier Wochen. Allerdings erreichten diese Effekte ebenso wie die anderen untersuchten Parameter keine Signifikanz (**Tabelle 32**). Für die anderen beiden Polymorphismen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Rs1801318 A/A-Genotypen sowie rs1053517 T/T-Genotypen nahmen das meiste Gewicht zu. Allerdings erreichte auch hier kein Parameter eine Signifikanz.

Tabelle 32: ANOVA für NDUFS1 rs6435326, Mittelwert \pm SD.

	Gesamtpopulation n=350				adjustierte Subpopulation n=178			
	A/A n=91	A/T n=184	T/T n=75	P	A/A n=40	A/T n=102	T/T n=36	P
Ausgangs- gewicht [kg]	73,9 \pm 15,3	75,0 \pm 17,2	75,0 \pm 16,4	0,866	72,7 \pm 15,7	73,9 \pm 16,0	76,3 \pm 17,8	0,612
Gewicht 4 Wochen [kg]	75,5 \pm 14,4	76,3 \pm 16,8	76,4 \pm 16,1	0,917	74,5 \pm 15,4	74,9 \pm 15,6	77,9 \pm 18,0	0,584
Δ Gewicht [kg]	1,61 \pm 3,31	1,29 \pm 3,33	1,44 \pm 3,01	0,745	1,77 \pm 2,62	1,02 \pm 3,26	1,55 \pm 3,40	0,396
Δ Gewicht [%]	2,62 \pm 4,75	2,03 \pm 4,75	2,08 \pm 4,21	0,596	2,71 \pm 4,30	1,70 \pm 4,87	2,15 \pm 4,66	0,503
	n=349 (A/A=90)				n=177 (A/A=39)			
Ausgangs- BMI [kg/m²]	25,1 \pm 4,91	25,6 \pm 5,55	25,4 \pm 4,78	0,797	24,7 \pm 5,45	25,5 \pm 5,57	25,2 \pm 4,72	0,766
BMI 4 Wo- chen [kg/m²]	25,7 \pm 4,57	26,0 \pm 5,34	25,9 \pm 4,99	0,856	25,3 \pm 5,37	25,8 \pm 5,33	25,8 \pm 4,72	0,862
Δ BMI [kg/m²]	0,53 \pm 1,11	0,44 \pm 1,12	0,47 \pm 1,01	0,800	0,55 \pm 0,84	0,34 \pm 1,10	0,50 \pm 1,09	0,479
Δ BMI [%]	2,52 \pm 4,70	2,03 \pm 4,75	2,08 \pm 4,21	0,696	2,50 \pm 4,13	1,70 \pm 4,87	2,15 \pm 4,66	0,636

Tabelle 33: ANOVA für NDUFS1 rs1801318, Mittelwert \pm SD.

	Gesamtpopulation n=350				adjustierte Subpopulation n=178			
	A/A n=160	A/G n=156	G/G n=34	P	A/A n=85	A/G n=79	G/G n=14	P
Ausgangs- gewicht [kg]	75,2 \pm 16,0	73,8 \pm 17,5	76,7 \pm 14,4	0,566	74,5 \pm 16,1	73,0 \pm 16,6	78,3 \pm 15,6	0,511
Gewicht 4 Wochen [kg]	76,7 \pm 15,5	75,2 \pm 17,1	77,9 \pm 13,6	0,580	76,0 \pm 16,1	74,1 \pm 16,2	79,3 \pm 14,7	0,491
Δ Gewicht [kg]	1,43 \pm 3,33	1,43 \pm 3,18	1,20 \pm 3,34	0,926	1,51 \pm 2,83	1,13 \pm 3,29	0,96 \pm 4,29	0,692
Δ Gewicht [%]	2,21 \pm 4,62	2,25 \pm 4,70	1,84 \pm 4,50	0,893	2,19 \pm 4,16	1,91 \pm 5,07	1,54 \pm 5,88	0,859
	n=349 (A/A=159)				n=177 (A/A=84)			
Ausgangs- BMI [kg/m²]	25,5 \pm 5,22	25,3 \pm 5,37	25,7 \pm 4,66	0,942	25,1 \pm 5,19	25,4 \pm 5,74	25,3 \pm 4,40	0,952
BMI 4 Wo- chen [kg/m²]	25,9 \pm 4,97	25,8 \pm 5,19	26,0 \pm 4,24	0,972	25,6 \pm 5,13	25,8 \pm 5,49	25,6 \pm 4,06	0,975
Δ BMI [kg/m²]	0,46 \pm 1,09	0,50 \pm 10,9	0,38 \pm 1,10	0,850	0,47 \pm 0,90	0,38 \pm 1,14	0,30 \pm 1,34	0,794
Δ BMI [%]	2,15 \pm 4,58	2,25 \pm 4,70	1,84 \pm 4,50	0,892	2,09 \pm 4,06	1,91 \pm 5,07	1,54 \pm 5,88	0,911

Tabelle 34: ANOVA für NDUFS1 rs1053517, Mittelwert \pm SD.

	Gesamtpopulation n=350				adjustierte Subpopulation n=178			
	T/T n=102	T/C n=185	C/C n=63	P	T/T n=46	T/C n=104	C/C n=28	P
Ausgangsgewicht [kg]	74,0 \pm 15,2	74,7 \pm 17,5	76,0 \pm 15,8	0,770	72,6 \pm 15,4	74,1 \pm 17,0	76,6 \pm 15,0	0,605
Gewicht 4 Wochen [kg]	75,7 \pm 14,6	76,0 \pm 17,1	77,3 \pm 15,7	0,812	74,2 \pm 15,4	75,3 \pm 16,7	77,9 \pm 14,8	0,636
Δ Gewicht [kg]	1,60 \pm 3,30	1,34 \pm 3,31	1,31 \pm 3,02	0,779	1,59 \pm 2,72	1,17 \pm 3,25	1,30 \pm 3,56	0,757
Δ Gewicht [%]	2,50 \pm 4,69	2,13 \pm 4,78	1,89 \pm 4,11	0,683	2,39 \pm 4,33	1,89 \pm 4,86	1,89 \pm 4,80	0,826
	n=349 (T/T=101)				n=177 (T/T=45)			
AusgangsbMI [kg/m²]	25,2 \pm 4,82	25,5 \pm 5,64	25,7 \pm 4,59	0,793	24,8 \pm 5,28	25,4 \pm 5,74	25,4 \pm 3,99	0,822
BMI 4 Wochen [kg/m²]	25,7 \pm 4,56	26,0 \pm 5,41	26,1 \pm 4,40	0,846	25,3 \pm 5,25	25,8 \pm 5,52	25,8 \pm 3,82	0,867
Δ BMI [kg/m²]	0,52 \pm 1,10	0,45 \pm 1,12	0,43 \pm 1,01	0,827	0,49 \pm 0,88	0,39 \pm 1,10	0,43 \pm 1,14	0,844
Δ BMI [%]	2,42 \pm 4,63	2,13 \pm 4,78	1,89 \pm 4,11	0,763	2,20 \pm 4,18	1,89 \pm 4,86	1,89 \pm 4,80	0,930

Die Untersuchung der Polymorphismen in Bezug auf das Ausgangsgewicht bzw. die prozentuale Gewichtszunahme in der naiven Subpopulation (Ausgangsgewicht: $0,641 < p < 0,778$; Δ Gewicht %: $0,448 < p < 0,937$), sowie bei den Patienten mit Hochrisiko-Medikation zeigten ebenfalls keine signifikanten Zusammenhänge (Ausgangsgewicht: $0,761 < p < 0,935$; Δ % Gewicht: $0,682 < p < 0,990$).

Zudem wurde analog zu Goncalves et al. die Kombination der in dieser Studie identifizierten Risikoallele getestet. In einem ANOVA-Modell wurde der Einfluss der gesamten Anzahl aller drei Risikoallele (rs6435326: T-Allel, rs1801318: G-Allel, rs1053517: C-Allel) untersucht. Auch hier zeigte sich sowohl für das Ausgangsgewicht als auch für die relative Gewichtszunahme kein signifikantes Ergebnis (**Tabelle 35**).

Tabelle 35: ANOVA für Anzahl der Risikoallele NDUFS1.

Anzahl Risikoallele	Gesamtpopulation n=350		adjustierte Subpopulation n=178	
	mittleres Ausgangsgewicht [kg]	Δ Gewicht [%]	mittleres Ausgangsgewicht [kg]	Δ Gewicht [%]
0	73,9 ± 15,3	2,61 ± 4,75	72,7 ± 15,7	2,71 ± 4,30
1	74,7 ± 13,4	1,05 ± 4,69	72,1 ± 9,02	-2,45 ± 2,46
2	77,4 ± 16,6	2,13 ± 4,45	75,9 ± 15,3	2,47 ± 3,97
3	73,7 ± 18,0	2,03 ± 4,88	73,0 ± 17,9	1,38 ± 5,30
4	75,2 ± 16,9	2,13 ± 4,78	74,5 ± 18,5	2,51 ± 4,42
5	73,7 ± 16,6	2,09 ± 3,71	74,2 ± 13,8	2,38 ± 3,88
6	76,9 ± 14,8	2,09 ± 4,52	78,8 ± 16,1	1,91 ± 5,94
p	0,828	0,967	0,904	0,517

3.4.2.4 rs7185735 und rs17817288 Polymorphismus (FTO)

Das FTO-Gen befindet sich auf Chromosom 16 und kodiert eine Demethylase, die die Transkription anderer Gene beeinflussen kann.^{97, 98} Studien haben festgestellt, dass FTO Einfluss auf die Adipogenese, die Nahrungsaufnahme und den Energiehaushalt hat.^{99, 100} Polymorphismen innerhalb des Gens werden mit Übergewicht und Diabetes in Verbindung gebracht.^{101, 102}

Die Polymorphismen rs7185735 und rs1787288 befinden sich im ersten Intron des FTO-Gens und stellen eine Punktmutation von Adenin zu Guanin bzw. von Guanin zu Adenin dar. Sie wurden in einer GWAS durch Tan et al. als die am stärksten mit dem BMI und Übergewicht assoziierten Polymorphismen identifiziert.¹¹⁴

Die Populationen zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Parameter Alter, Geschlecht, Medikation und rs17782313 Genotyp. Lediglich in Bezug auf das Therapieansprechen war in der Gesamtpopulation eine Tendenz, in der adjustierten Subpopulation ein signifikanter Effekt in Bezug auf rs7185735 erkennbar: Patienten, die auf die Therapie ansprachen, besaßen überdurchschnittlich häufiger das mutierte Allel G ($p = 0,062/0,035$).

rs7185735

In der gesamten Studienpopulation zeigte der rs7185735 einen signifikanten Zusammenhang mit dem mittleren Ausgangsgewicht ($p = 0,036$) bzw. dem Ausgangs-BMI ($p = 0,031$) (**Tabelle 36**).²⁴⁰ Diese Parameter waren für G/G-Allel-Träger am höchsten, während Heterozygote mit dem niedrigsten Gewicht bzw. BMI in die Studie gestartet sind. Das ANCOVA-Modell unter Einbezug von Geschlecht und Alter als Kofaktoren zeigte nur für den Ausgangs-BMI einen signifikanten Zusammenhang mit dem rs7185735 Genotyp (Ausgangsgewicht: $p = 0,071$; Ausgangs-BMI: $p = 0,041$).^{258, 259} In der adjustierten Subpopulation erreichte dieser Effekt nur in Bezug auf den BMI und ohne Berücksichtigung weiterer Kofaktoren Signifikanz (ANOVA: $p = 0,033$; ANCOVA: $p = 0,056$).

Tabelle 36: ANOVA für FTO rs7185735, Mittelwert \pm SD.

	Gesamtpopulation n=350				adjustierte Subpopulation n=178			
	A/A n=120	A/G n=171	G/G n=59	P	A/A n=58	A/G n=90	G/G n=30	P
Ausgangsgewicht [kg]	75,7 \pm 16,7	72,6 \pm 15,6	78,7 \pm 18,2	0,036	75,4 \pm 16,5	71,8 \pm 15,8	78,5 \pm 16,5	0,113
Gewicht 4 Wochen [kg]	76,8 \pm 16,3	74,4 \pm 15,1	79,9 \pm 17,8	0,064	76,0 \pm 16,2	73,6 \pm 15,4	80,0 \pm 16,9	0,153
Δ Gewicht [kg]	1,07 \pm 3,44	1,73 \pm 3,19	1,18 \pm 3,01	0,198	0,49 \pm 3,15	1,73 \pm 3,30	1,55 \pm 2,47	0,059
Δ Gewicht [%]	1,67 \pm 4,67	2,72 \pm 4,78	1,72 \pm 3,98	0,115	0,83 \pm 4,44	2,79 \pm 5,11	2,00 \pm 3,37	0,047
	n=349 (A/G=170)				n=177 (A/G=89)			
Ausgangsbmi [kg/m²]	25,8 \pm 5,13	24,8 \pm 4,91	26,7 \pm 6,00	0,031	25,9 \pm 5,51	24,3 \pm 4,86	26,9 \pm 6,04	0,033
Bmi 4 Wochen [kg/m²]	26,1 \pm 4,92	25,3 \pm 4,66	27,1 \pm 5,83	0,049	26,1 \pm 5,39	24,8 \pm 4,57	27,5 \pm 6,13	0,043
Δ Bmi [kg/m²]	0,36 \pm 1,17	0,57 \pm 1,06	0,40 \pm 0,99	0,233	0,17 \pm 1,09	0,55 \pm 1,07	0,52 \pm 0,82	0,081
Δ Bmi [%]	1,67 \pm 4,67	2,67 \pm 4,75	1,72 \pm 3,98	0,139	0,83 \pm 4,44	2,69 \pm 5,06	2,00 \pm 3,37	0,060

Signifikante p-Werte sind in rot dargestellt.

In Bezug auf die Gewichtszunahme nach vier Wochen war keine Signifikanz erkennbar. Allerdings zeigte sich in der adjustierten Subpopulation ein Trend: Patienten, die das Risikoallel G besaßen, nahmen deutlich mehr an Gewicht zu als A-Allel Heterozygote. Dies wurde noch deutlicher, wenn man nur die Patienten betrachtete, die Clozapin oder Olanzapin einnahmen (**Abbildung 44**).

In einem weiteren Schritt haben wir diese Effekte in Bezug auf die verschiedenen Diagnosen untersucht.²⁴⁰ Die Ergebnisse für die Patienten mit Schizophrenie (F2-Diagnosen) sind in **Tabelle 37** dargestellt. Auch hier zeigte sich analog der Auswertung aller Diagnosen in der Gesamtpopulation ein signifikanter Effekt für das Ausgangsgewicht (p = **0,009**) sowie den Ausgangs-BMI (p = **0,002**). In der adjustierten Subpopulation war dieser Effekt ebenfalls nur für den Ausgangs-BMI signifikant

($p = 0,035$).

Nach vier Wochen war ebenfalls ein Trend zu einer höheren Gewichtszunahme für G-Allel-Träger erkennbar. Dieser erreichte in der adjustierten Subpopulation Signifikanz ($p = 0,050$). Auch hier wurde dieser Effekt für Patienten mit Clozapin- oder Olanzapin-Therapie noch deutlicher (**Abbildung 44**).

In den Gruppen der Patienten mit affektiven Störungen war sowohl in der Gesamtpopulation ($n = 111$) als auch in der adjustierten Subpopulation ($n = 26$) kein signifikanter Effekt in Bezug auf die Gewichtszunahme nach vier Wochen nachweisbar ($0,121 < p < 0,527$).

Tabelle 37: ANOVA für FTO rs7185735 für Patienten mit Schizophrenie, Mittelwert \pm SD.

	Gesamtpopulation n=215				adjustierte Subpopulation n=141			
	A/A n=77	A/G n=104	G/G n=34	p	A/A n=48	A/G n=70	G/G n=23	p
Ausgangsgewicht [kg]	77,9 $\pm 17,7$	72,1 $\pm 15,6$	80,9 $\pm 17,4$	0,009	76,2 $\pm 17,2$	71,5 $\pm 16,1$	78,3 $\pm 17,6$	0,146
Gewicht 4 Wochen [kg]	78,7 $\pm 17,7$	73,8 $\pm 15,0$	82,0 $\pm 17,1$	0,020	76,7 $\pm 16,8$	73,3 $\pm 15,7$	79,8 $\pm 18,0$	0,225
Δ Gewicht [kg]	0,79 $\pm 3,32$	1,71 $\pm 2,89$	1,05 $\pm 2,80$	0,121	0,49 $\pm 3,34$	1,86 $\pm 2,85$	1,51 $\pm 2,60$	0,050
Δ Gewicht [%]	1,19 $\pm 4,52$	2,76 $\pm 4,65$	1,47 $\pm 3,70$	0,052	0,87 $\pm 4,74$	2,99 $\pm 4,75$	1,96 $\pm 3,58$	0,050
	n=215				n=141			
AusgangsbMI [kg/m²]	26,4 $\pm 5,45$	24,4 $\pm 4,67$	27,7 $\pm 6,51$	0,002	26,0 $\pm 5,76$	23,9 $\pm 4,70$	26,7 $\pm 6,30$	0,035
BMI 4 Wochen [kg/m²]	26,7 $\pm 5,35$	25,0 $\pm 4,45$	28,0 $\pm 6,31$	0,004	26,2 $\pm 5,62$	24,5 $\pm 4,49$	27,2 $\pm 6,41$	0,064
Δ BMI [kg/m²]	0,26 $\pm 1,15$	0,58 $\pm 0,99$	0,33 $\pm 0,95$	0,108	0,17 $\pm 1,16$	0,62 $\pm 0,96$	0,51 $\pm 0,84$	0,058
Δ BMI [%]	1,19 $\pm 4,52$	2,76 $\pm 4,65$	1,47 $\pm 3,70$	0,052	0,87 $\pm 4,74$	2,99 $\pm 4,75$	1,96 $\pm 3,58$	0,050

Signifikante p-Werte sind in rot dargestellt.

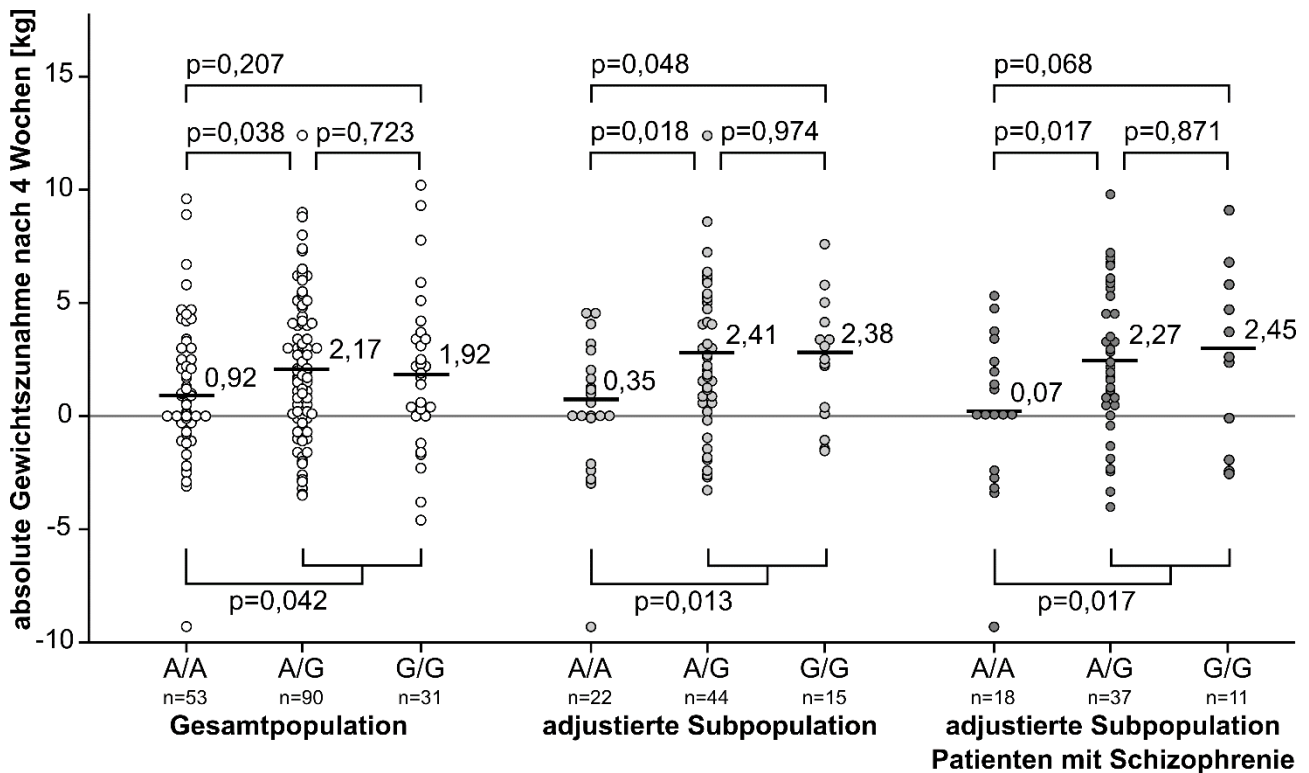


Abbildung 44: Darstellung der absoluten Gewichtszunahme nach vier Wochen Antipsychotika-Therapie in Abhängigkeit des FTO rs7185735 Genotyps für Patienten mit Clozapin- oder Olanzapin-Therapie: Es zeigt sich eine signifikant höhere Gewichtszunahme für G-Allel-Träger.²⁴⁰

Da die mittlere Gewichtszunahme nach vier Wochen in beiden Population zwischen A/G-Genotypen und G/G-Genotypen keinen signifikanten Unterschied zeigte, wurden beide Gruppen für die folgenden Analysen zusammengefasst.²⁴⁰ Die Ergebnisse des T-Tests sind in **Abbildung 45** dargestellt. Dabei zeigten G-Risikoallel-Träger der adjustierten Subpopulation eine signifikant höhere Gewichtszunahme nach vier Wochen antipsychotischer Therapie als A/A-Allel-Träger (2,60 vs. 0,83% Gewichtszunahme, $p = 0,017$). Dieser Effekt zeigte sich noch stärker bei den Patienten unter Clozapin- und Olanzapin-Therapie (3,74 vs. 0,44% Gewichtszunahme, $p = 0,004$). Zur Berücksichtigung weiterer möglicher Einflussfaktoren (Alter, Geschlecht, rs17782313, Ausgangsgewicht und Therapieansprechen) wurde eine ANCOVA durchgeführt. Auch hier war der rs7185735 in beiden Subpopulationen ein signifikanter Faktor für die Gewichtszunahme ($p = 0,038/0,018$).

Im Gegensatz dazu zeigten Patienten, die ein Antipsychotikum mit niedrigem oder mittlerem Risiko für Gewichtszunahme bekommen haben, keine signifikante Genotypen-abhängige Gewichtszunahme (**Abbildung 46**) (T-Test: Gesamtpopulation: $p = 0,777$; adjustierte Subpopulation $p = 0,670$).

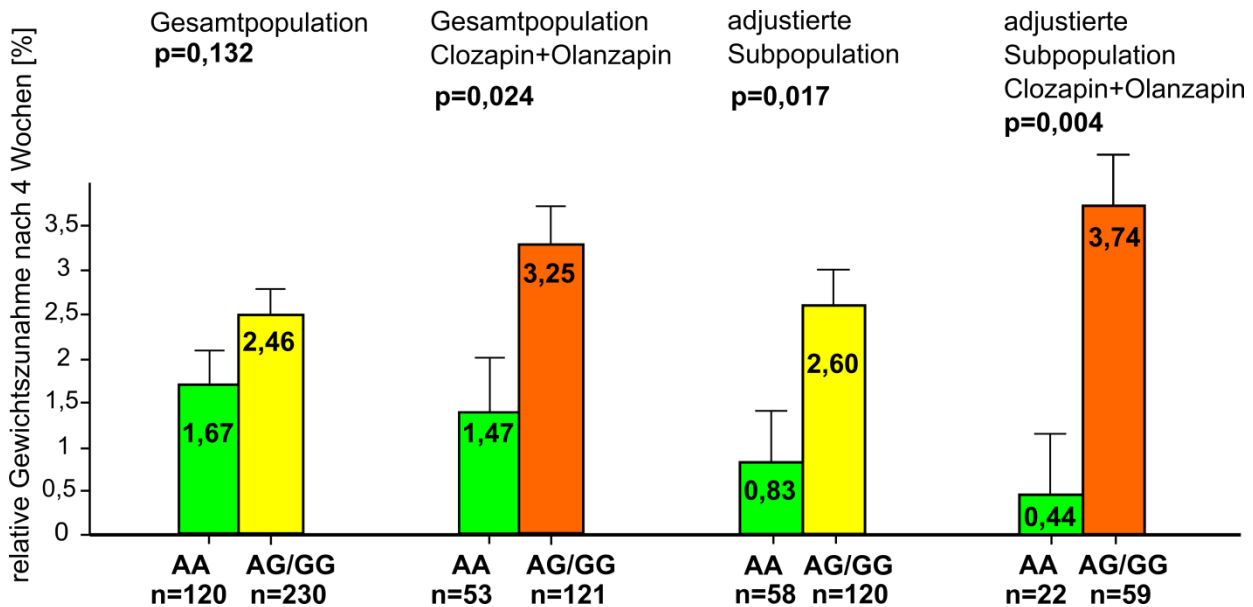


Abbildung 45: Darstellung der relativen Gewichtszunahme in % nach vier Wochen Antipsychotika-Therapie in Abhängigkeit des FTO rs7185735 Genotyps, Patienten mit einem und zwei Risikoallelen G wurden zu einer Gruppe zusammengefasst. Der T-Test zeigt eine signifikant höhere Gewichtszunahme für G-Allele-Träger im Vergleich zu A/A-Allel-Trägern.

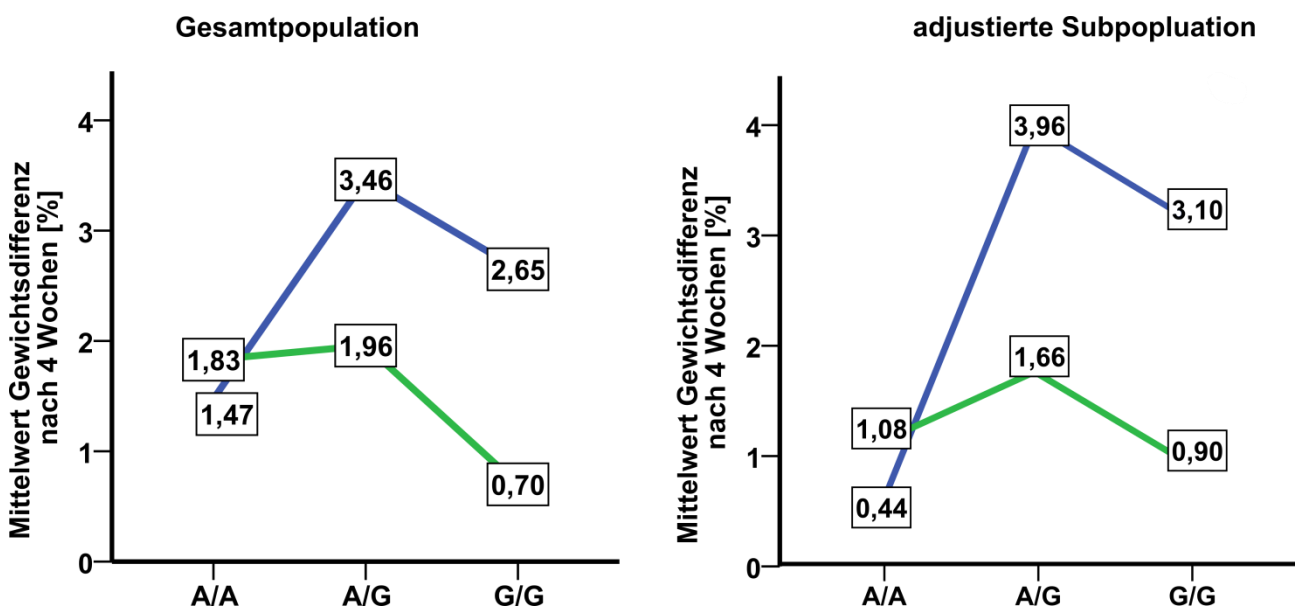


Abbildung 46: Darstellung der Gewichtszunahme in % nach vier Wochen Antipsychotika-Therapie in Abhängigkeit von der Medikation und dem rs7185735 Genotypen: blau: Hochrisikomedikation für Gewichtszunahme als Nebenwirkung (Clozapin + Olanzapin); grün: Medikation mit niedrigem oder mittlerem Risiko (Risperidon, Amisulprid, Quetiapin, Paliperidon). G-Allel-Träger, die Hochrisikomedikation bekamen, nahmen im Laufe der Therapie signifikant an Gewicht zu, für Patienten mit Niedrigrisikotherapie war dieser Effekt nicht erkennbar.

In Bezug auf die Patienten mit Schizophrenie (F2-Diagnosen) zeigte sich in der Gesamtpopulation nach vierwöchiger Therapie ebenfalls eine höhere Gewichtszunahme für G-Risikoallel-Träger als für A/A-Allel-Träger (1,18 vs. 2,44% Gewichtszunahme) (**Abbildung 47**).²⁴⁰ Allerdings war dieser Effekt nicht signifikant ($p = 0,052$). Für Patienten unter Clozapin- oder Olanzapin-Therapie war dieser Effekt deutlicher ausgeprägt ($n = 99$; 0,60 vs. 3,12% Gewichtszunahme; $p = \mathbf{0,013}$). Auch in der adjustierten Subpopulation ($n = 141$) zeigte sich ein signifikanter Einfluss des rs7185735. Während A/A-Allel-Träger im Schnitt 0,87% Gewicht nach vier Wochen zunahm, betrug die Gewichtszunahme für G-Risikoallel-Träger 2,72% ($p = \mathbf{0,027}$). Auch hier war der Effekt für Patienten unter Clozapin- oder Olanzapin-Therapie stärker ausgeprägt ($n = 66$; 0,11 vs. 3,61% Gewichtszunahme; $p = \mathbf{0,008}$). Der Zusammenhang blieb auch nach Berücksichtigung weiterer möglicher Einflussfaktoren (Alter, Geschlecht, rs17782313, Ausgangsgewicht und Therapieansprechen) durch eine ANCOVA signifikant ($\mathbf{0,007} < p < \mathbf{0,036}$).

Für Patienten mit affektiven Störungen (F3-Diagnosen) zeigte sich in beiden Populationen sowohl unter den Patienten mit beliebiger SGA-Medikation ($n = 111/26$) als auch unter den Patienten mit Clozapin- oder Olanzapin-Medikation ($n = 65/11$) kein signifikanter Effekt ($0,219 < p < 0,803$). Allerdings war die Patientenzahl in diesen Subpopulationen zum Teil sehr klein.

F2 Diagnosen

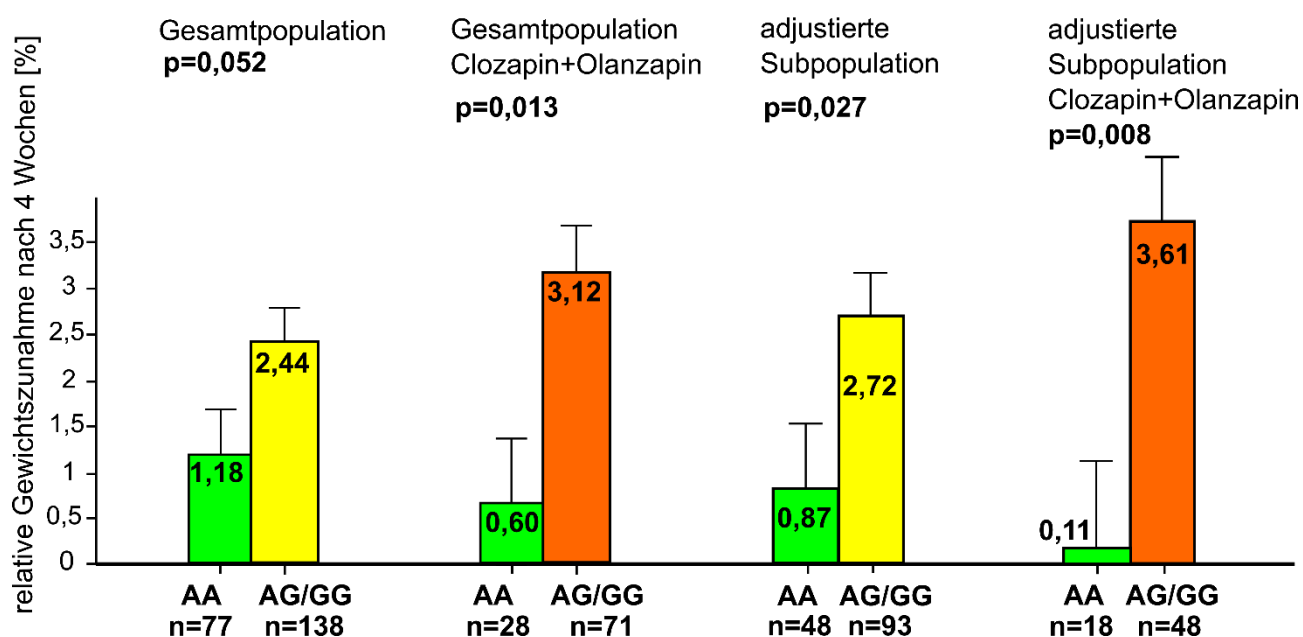


Abbildung 47: Darstellung der relativen Gewichtszunahme in % nach vier Wochen Antipsychotika-Therapie in Abhängigkeit des FTO rs7185735 Genotyps für Patienten mit Schizophrenie (F2-Diagnose), Patienten mit einem und zwei Risikoallelen G wurden zu einer Gruppe zusammengefasst. Der T-Test zeigt eine signifikant höhere Gewichtszunahme für G-Allele-Träger im Vergleich zu A/A-Allele-Trägern.

rs1781788

Für rs1781788 konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Genotyp und Gewicht bzw. Gewichtsdiﬀerenz festgestellt werden. Für Patienten, die das G-Allel trugen, war eine Tendenz für eine höhere Gewichtszunahme erkennbar. Allerdings erreichte diese in der Gesamt- und in der adjustierten Subpopulation keine Signifikanz (**Tabelle 38**). Auch diese Tendenz bestätigte sich in der Gruppe der Patienten, die Clozapin und Olanzapin bekamen. Am stärksten ausgeprägt war hier der Effekt auf den BMI. Homozygote Risikoallel-Träger (G-Allel) nahmen im Durchschnitt nach vier Wochen signifikant mehr Gewicht zu als A-Allel-Träger (3,90% vs. 2,16%; $p = 0,032$). Der gleiche Effekt war in der adjustierten Subpopulation erkennbar (4,53% vs. 2,02%; $p = 0,046$). Die Ergebnisse des T-Tests sind in **Abbildung 48** dargestellt. Nach Berücksichtigung von Alter, Geschlecht, rs17782313, Ausgangs-BMI und Therapieansprechen als weitere mögliche Einflussfaktoren im ANCOVA-Modell zeigte rs17817288 nur bei Patienten der adjustierten Subpopulation mit Clozapin- oder Olanzapin-Therapie einen signifikanten Einfluss ($p = 0,070/0,042$).

In der naiven Subpopulation konnten keine signifikanten Zusammenhänge gefunden werden.

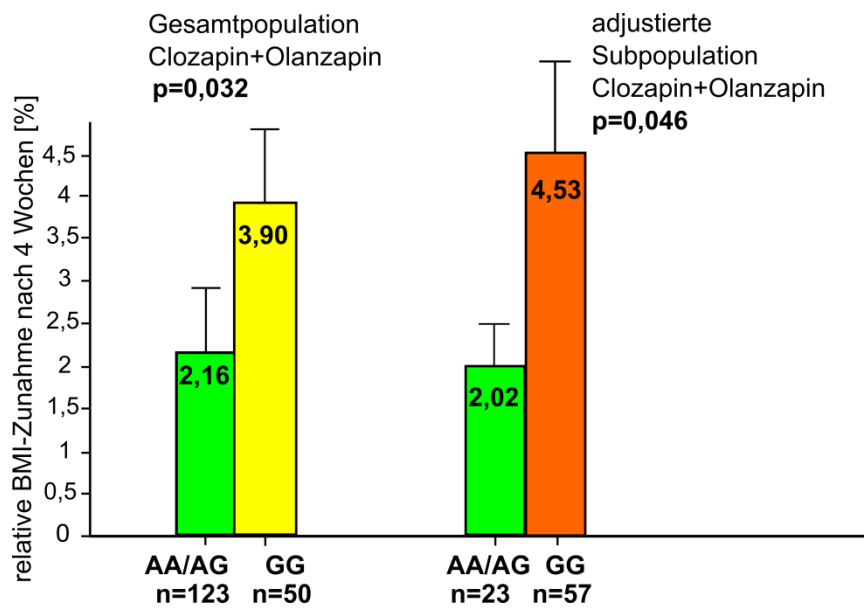


Abbildung 48: Darstellung der BMI-Zunahme in % nach vier Wochen Antipsychotika-Therapie in Abhängigkeit des FTO rs17817288 Genotyps für Patienten mit Olanzapin- und Clozapin-Therapie, Träger des nicht-Risiko-Allels A wurden zusammengefasst. Der T-Test zeigt eine signifikant höhere Gewichtszunahme für G/G-Allel-Träger im Vergleich zu A-Allel-Trägern.

Tabelle 38: ANOVA für rs17817288, Mittelwert \pm SD.

	Gesamtpopulation n=350				adjustierte Subpopulation n=178			
	A/A n=82	A/G n=178	G/G n=90	P	A/A n=43	A/G n=93	G/G n=42	P
Ausgangs- gewicht [kg]	73,6 \pm 13,4	74,6 \pm 17,2	75,9 \pm 17,9	0,643	73,7 \pm 13,3	74,0 \pm 17,5	74,9 \pm 16,4	0,944
Gewicht 4 Wochen [kg]	74,7 \pm 13,2	75,9 \pm 16,7	77,8 \pm 17,2	0,457	74,5 \pm 13,3	75,2 \pm 17,2	76,9 \pm 16,1	0,782
Δ Gewicht [kg]	1,14 \pm 2,96	1,32 \pm 3,40	1,82 \pm 3,22	0,352	0,77 \pm 3,14	1,22 \pm 3,13	2,01 \pm 3,19	0,185
Δ Gewicht [%]	1,75 \pm 4,34	2,09 \pm 4,62	2,80 \pm 4,89	0,306	1,19 \pm 4,58	1,93 \pm 4,43	3,06 \pm 5,28	0,179
	n=349 (A/G=177)				n=177 (A/G=92)			
Ausgangs- BMI [kg/m²]	25,5 \pm 3,99	25,2 \pm 5,46	25,8 \pm 5,74	0,686	25,6 \pm 3,97	24,9 \pm 5,70	25,7 \pm 5,88	0,648
BMI 4 Wo- chen [kg/m²]	25,9 \pm 3,85	25,6 \pm 5,22	26,4 \pm 5,46	0,501	25,9 \pm 3,85	25,3 \pm 5,49	26,4 \pm 5,73	0,508
Δ BMI [kg/m²]	0,40 \pm 10,4	0,43 \pm 1,12	0,61 \pm 1,08	0,335	0,26 \pm 1,11	0,38 \pm 1,00	0,68 \pm 1,06	0,148
Δ BMI [%]	1,75 \pm 4,34	2,04 \pm 4,59	2,80 \pm 4,89	0,289	1,19 \pm 4,58	1,83 \pm 4,35	3,06 \pm 5,28	0,167

3.4.2.5 rs7185735 und rs9939609

Der rs9939609 Polymorphismus wurde bereits von Dr. Fabian Czerwensky in der Arbeitsgruppe von Prof. Steimer analysiert (für genauere Angaben bezüglich der Methoden und der Ergebnisse siehe Czerwensky⁶⁸). Er ist ebenfalls im ersten Intron des FTO-Gens lokalisiert und hat einen Basenaustausch von Thymin nach Adenin zur Folge. Es ist der erste und der am Häufigsten mit Übergewicht in Verbindung gebrachte Polymorphismus.^{101, 105, 106}

Rs7185735 und rs9939609 befinden sich im *Linkage Disequilibrium* (D' : 1.0; r^2 : 0,9654; **Tabelle 39**). Allerdings ist das Linkage Disequilibrium durch ethnische Faktoren beeinflusst und kann daher in verschiedenen Bevölkerungsgruppen variieren.

Tabelle 39: LD-Analyse von rs9939609 und rs7185735 nach Berechnung mittels CubeX-Online-Tool.²²³

L1	L2	D'	r ²	Entfernung
rs9939609	rs7185735	-1,0	0,9654	2124

Die Ergebnisse der Genotypisierung beider Polymorphismen waren daher sehr ähnlich.²⁴⁰ Lediglich ein Patient wurde aufgrund der Anzahl der Risikoallele in eine andere Risikogruppe eingestuft. Dieser Patient war heterozygot für das rs9939609 Risikoallel A, aber homozygot für das nicht-Risikoallel A des rs7185735 (**Tabelle 40**). Dieser Patient war Teil der adjustierten Subpopulation, bekam aber weder Olanzapin noch Clozapin. Die Ergebnisse der Analyse beider Polymorphismen bezogen auf die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme sind daher ebenfalls sehr ähnlich (siehe **Abbildung 49**). Träger des rs9939609 Risikoallels A der adjustierten Subpopulation nahmen signifikant mehr Gewicht zu als T/T-Allel-Träger ($p = \mathbf{0,026}$). Das gleiche gilt für Patienten mit Hochrisiko-Therapie ($p = \mathbf{0,024/0,004}$). Die detaillierte Analyse des rs9939609 in dieser Studienpopulation ist in Czerwensky beschrieben.⁶⁸

Tabelle 40: Genotypenverteilung rs7185735 und rs9939609.

rs7185735	rs9939609		
	A/A	A/T	T/T
A/A	0	1	119
A/G	5	166	0
G/G	59	0	0

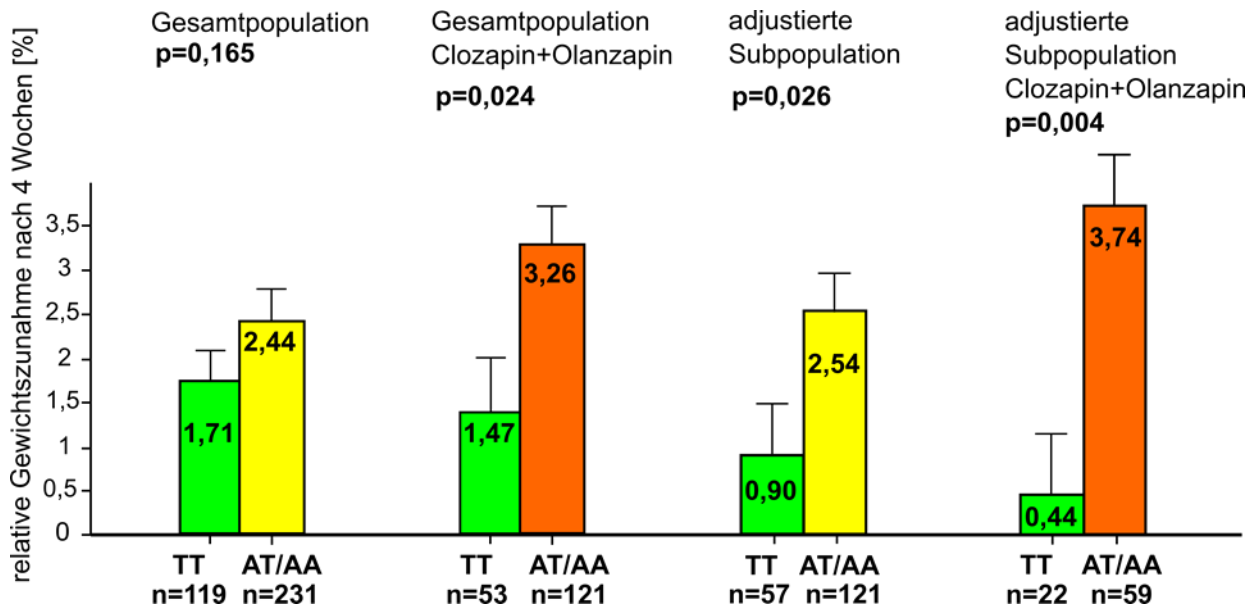


Abbildung 49: Darstellung der Gewichtszunahme in % nach vier Wochen Antipsychotika-Therapie in Abhängigkeit des FTO rs9939609 Genotyps, Patienten mit einem und zwei Risikoallelen A wurden zusammengefasst. Der T-Test zeigt eine signifikant höhere Gewichtszunahme für A-Allel-Träger im Vergleich zu T/T-Allel-Trägern.

3.4.3 kombinierte Auswertung: FTO rs7185735 und MC4R rs17782313

Langfristiges Ziel ist es, eine Empfehlung zu geben, welche Risikogene vor Therapiebeginn genetisch bestimmt werden sollten. Um den Effekt des FTO-Gen auf die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme in Relation zu dem in dieser Population identifizierten Risikofaktor MC4R rs17782313 zu bestimmen, wurden beide Polymorphismen kombiniert.²⁴⁰ Die genaue Analyse von MC4R rs17782313 ist in Czerwensky dargestellt.⁶⁸ Es sollte herausgefunden werden, ob sich die Effekte beider Risikoallele verstärken. Zunächst wurde eine ANOVA der addierten Anzahl der Risikoallele beider Polymorphismen durchgeführt, die Ergebnisse sind in **Abbildung 50** dargestellt. Dabei wurde für MC4R rs17782313 die Anzahl des Risikoallels C verwendet, für FTO rs7185735 wurde nur zwischen nicht Risikoallel-Träger (kein Risikoallel) und Risikoallel-Träger (ein Risikoallel) unterschieden.

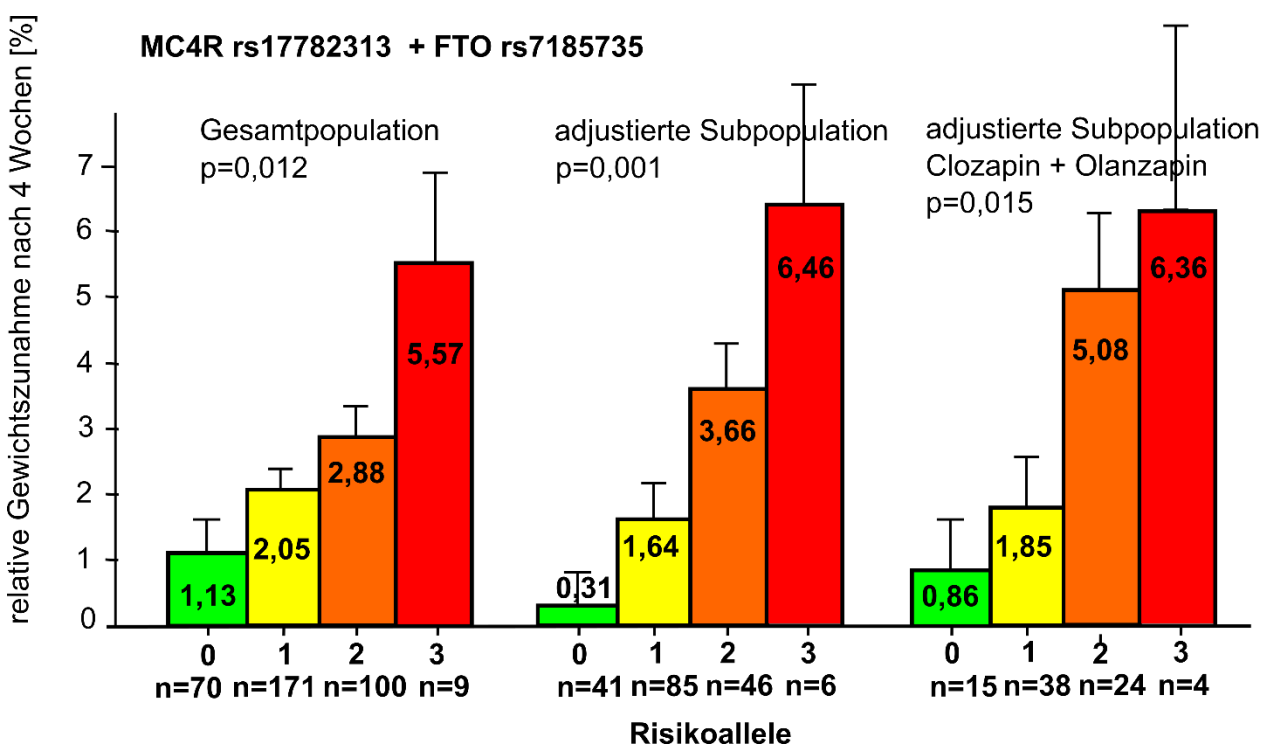


Abbildung 50: Darstellung der Gewichtszunahme in % nach vier Wochen Antipsychotika-Therapie in Abhängigkeit der Anzahl der Risikoallele von MC4R rs17782313 und FTO rs7185735, Für MC4R rs17782313 wurde die Anzahl des Risikoallels C verwendet, für FTO rs7185735 wurde zwischen nicht Risikoallel-Träger (Risikoallel 0) und Risikoallel-Träger (Risikoallel 1) unterschieden. Die ANOVA zeigt einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Anzahl der Risikoallele und der Gewichtszunahme in allen getesteten Populationen. Dabei nimmt die Gewichtszunahme mit steigender Anzahl an Risikoallelen proportional zu.

Es zeigte sich, dass die Effekte sich durchaus verstärken. Patienten, die Träger beider Risikoallele sind, nahmen in allen getesteten Populationen signifikant mehr Gewicht zu ($0,001 < p < 0,015$). Dabei war die Gewichtszunahme proportional zu der Anzahl der Risikoallele. Der kombinierte Einfluss beider Polymorphismen auf die relative Gewichtszunahme nach vier Wochen bleibt auch nach Berücksichtigung der anderen möglichen Risikofaktoren Alter, Geschlecht, Ausgangsgewicht, Art der Medikation und Therapieansprechen in allen Populationen signifikant ($0,001 < p < 0,012$).

Um die jeweiligen Einflüsse der einzelnen Polymorphismen und der anderen Risikofaktoren auf die Gewichtszunahme zu bestimmen, wurde eine lineare Regression durchgeführt. Die relative Gewichtszunahme nach vier Wochen war hierbei abhängiger Faktor; rs17782313, rs7185735, Alter, Geschlecht, Ausgangsgewicht, Art der Therapie und das Therapieansprechen wurden als unabhängige Faktoren mit der Einschluss-Methode in das Modell einbezogen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 41** dargestellt. Hier zeigte sich, dass MC4R rs17782313 in allen Populationen einen signifikanten Einfluss auf die Gewichtszunahme hat. In Bezug auf FTO rs7185735 zeigte sich auch hier eine Abhängigkeit des Einflusses von der Medikation. In der Gesamtpopulation ließ sich kein signifikanter Zusammenhang feststellen. Im Gegensatz dazu erreichte der Einfluss bei Patienten, die Clozapin oder Olanzapin bekamen, ein signifikantes Niveau. Andere signifikante Faktoren waren das Geschlecht, das Ausgangsgewicht sowie das Therapieansprechen.

Aus der Analyse der adjustierten Subpopulation mit Clozapin- oder Olanzapin-Medikation lässt sich ablesen, dass pro rs17782313 Risikoallel die Gewichtszunahme nach vier Wochen um 1,84% höher ist, rs7185735 Risikoallel-Träger haben einen 2,98% höhere Gewichtszunahme (B-Wert). Während der Regressionskoeffizient den direkten Einfluss eines Faktors pro Einheit wiedergibt, zeigt der Beta-Wert den normierten Regressionskoeffizient an. Er ermöglicht somit einen direkten Vergleich der einzelnen Variablen. In Bezug auf die Analyse der adjustierten Subpopulation mit Clozapin- oder Olanzapin-Therapie kann man daher erkennen, dass die beiden Polymorphismen und das Therapieansprechen ähnlich große Einflüsse auf die Gewichtszunahme haben. Insgesamt lassen sich durch dieses Modell 30,8% der Varianz der prozentualen Gewichtszunahme erklären ($R^2 = 0,308$).

Tabelle 41: Lineare Regression in Bezug auf die relative Gewichtszunahme nach vier Wochen. B = Regressionskoeffizient; Beta = standardisierter Regressionskoeffizient; R² = Bestimmtheitsmaß.

	Gesamtpopulation n=350			adjustierte Subpopu- lation n=178			adjustierte Subpopu- lation, Clozapin und Olanzapin n=81		
	B	Beta	p	B	Beta	p	B	Beta	p
Konstante	7,729		0,000	4,509		0,034	5,401		0,094
MC4R rs17782313	1,236	0,156	0,003	2,099	0,256	0,000	1,844	0,225	0,027
FTO rs7185735	0,747	0,075	0,149	1,382	0,135	0,050	2,980	0,250	0,014
Alter	-0,02	-0,07	0,197	-0,00	-0,01	0,910	0,012	0,032	0,752
Geschlecht	2,069	0,214	0,000	2,290	0,234	0,003	1,846	0,175	0,116
Ausgangsgewicht	-0,11	-0,37	0,000	-0,09	-0,32	0,000	-0,13	-0,36	0,001
Art der Medikation	-0,56	-0,06	0,247	-0,58	-0,06	0,374			
Therapieansprechen	1,619	0,116	0,026	3,001	0,228	0,001	3,441	0,247	0,016
R²	0,191			0,271			0,308		

Signifikante p-Werte sind in rot dargestellt.

3.5 Genotypisierung der Alzheimer-Population

3.5.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Insgesamt 48 Patienten wurden in die Alzheimer-Studie aufgenommen. Allerdings wurde von einem Patienten nur eine Serumprobe zur Bestimmung der Arzneimittelspiegel entnommen, sodass für diesen Patienten kein Genotyp bestimmt werden konnte. Alle Patienten erhielten die Diagnose Morbus Alzheimer und wurden mit Donepezil behandelt. 23 Patienten (48%) waren männlich. Das Durchschnittsalter lag bei $72,6 \pm 8,89$ Jahren. Der durchschnittliche Zeitraum zwischen Erst- und Zweituntersuchung betrug $216,8 \pm 70,92$ Tage. Die durchschnittliche Dauer von Beginn der Donepezil-Therapie bis zur Zweituntersuchung betrug $5,7 \pm 2,53$ Monate. Komedikationen, die über CYP2D6 verstoffwechselt werden, waren Citalopram ($n = 5$) und Carvediol ($n = 1$). Citalopram gilt als CYP2D6-Inhibitor.

3.5.2 Ergebnisse der Genotypisierung der Alzheimer-Population

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Bezug auf die Alzheimer-Studie Patienten, die mit Donepezil behandelt wurden, auf die wichtigsten funktionellen Polymorphismen des CYP2D6-Gens getestet ($n = 47$). Den Patienten wurde die entsprechende Gendosis (**Tabelle 42**) sowie anschließend die verschiedenen Stoffwechselltypen von *poor* bis *ultrarapid* Metabolisierer zugeordnet (**Tabelle 43**). Donepezil wird über CYP2D6 verstoffwechselt. Funktionsbeeinflussende Polymorphismen innerhalb dieses Gens können daher einen wesentlichen Einfluss auf die Verfügbarkeit und Wirkung von Donepezil haben.

Tabelle 42 gibt eine Übersicht über die getesteten Polymorphismen, deren zugeordnete Gendosis und die Allelhäufigkeit in der Studienpopulation.²⁰⁴ Auffällig war hier der erhöhte Anteil an CYP2D6*4-Allelen. Die Allelfrequenz betrug in der Studienpopulation mit 25 Allelen 26,6%. Insgesamt trugen 23 Patienten die *4-Mutation auf einem Allel, ein Patient war homozygot für das *4-Allel. In der kaukasischen Bevölkerung Mitteleuropas beträgt die erwartete Allelfrequenz nach HapMap nur ca. 20%.

Tabelle 42: Übersicht über die getesteten Allele des CYP2D6-Gens, deren Gendosis und deren Häufigkeit in der Studienpopulation.

Allel	*1	*3	*4	*5 (Deletion)	*6	*9	*10	*41	Duplikation *1
Gendosis	1	0	0	0	0	0,5	0,5	0,5	2
Anzahl	48	1	25	4	1	1	2	11	1

Tabelle 43: Übersicht über die Verteilung der Gendosen und Stoffwechseltypen in der Studienpopulation in Bezug auf CYP2D6; PM = poor Metabolisierer, EM = extensive Metabolisierer, IM = intermediate Metabolisierer, UM = ultrarapid Metabolisierer.²⁶⁰

N _{gesamt} = 47; Gendosis _M = 1,2 ± 0,58 (0-3)						
Gendosis	0	0,5	1	1,5	2	>2
Anzahl	2	8	19	6	11	1
Stoffwechseltyp	PM	IM	IM	EM	EM	UM

Die mittlere Gendosis ± SD in der Studienpopulation betrug 1,2 ± 0,58. 17 Patienten zeigten eine normale Genaktivität und konnten der Gruppe der *extensive* Metabolisierer zugeordnet werden. 27 Patienten gehörten mit einer verminderten Genaktivität zu den *intermediate* Metabolisierern. Ein Patient zeigte aufgrund einer Duplikation des Wildtyp-Allels eine stark erhöhte Genaktivität. Er erhielt die Gendosis 3 und wurde der Gruppe der *ultrarapid* Metabolisierer zugeordnet. Bei zwei Patienten konnte aufgrund der vorliegenden Genvarianten kein funktionierendes Enzym gebildet werden. Ihnen wurde die Gendosis 0 zugeordnet und sie galten daher als *poor* Metabolisierer.²⁰⁴

In einem weiteren Schritt wurde von Frau Marion Stange der Einfluss der von uns ermittelten CYP2D6-Gendosis auf die Medikamentenspiegel im Serum bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Dissertation von Frau Stange dargestellt.²⁴¹ Zudem wurden weitere mögliche Einflussfaktoren mitberücksichtigt: Geschlecht, Alter, Tageseinnahmedosis, die Einnahme von CYP2D6-Inhibitoren sowie die Zeit bis zur Zweituntersuchung.

Der mögliche Einfluss von Geschlecht und Alter auf die Arzneimitteltherapie wurde bereits erläutert (siehe 3.3.4). Eine zusätzliche Einnahme von CYP2D6-Inhibitoren erniedrigt die Enzymaktivität. Dadurch könnten CYP2D6-Stoffwechselsubstrate langsamer abgebaut werden und die Serumspiegel von z.B. Donepezil somit erhöht sein.^{261, 262} Die Einnahme von Medikamenten, die als CYP2D6-Inhibitoren wirken, wurden daher in die Analyse mitaufgenommen.

Desweiteren wurde im Rahmen der Zweituntersuchung anhand verschiedener kognitiver Tests das Therapieansprechen untersucht. Eine lineare Regression sollte den Einfluss verschiedener Faktoren auf die Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten aufklären.²⁴¹

3.6 Bestimmung der Methylierungslevel

3.6.1 Qualität der Sequenzierläufe

In den ersten Testläufen waren die Qualität der Sequenzierung sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse noch nicht mit einer zufriedenstellenden Präzision gegeben. Daher wurden zu Beginn verschiedene Parameter untersucht. So wurde zum einen die Generierung des Amplikons optimiert. Hierbei wurden verschiedene PCR-Programme, Polymerasen und Primer getestet und die entsprechenden Sequenzierungsergebnisse verglichen. Zudem wurden Anpassungen in Hinblick auf die normalerweise standardisierte Vorbereitung der DNA-Bibliothek sowie die Auswertung der Daten mittels *AVA-Software* vorgenommen. Im Folgenden werden die durchgeführten Optimierungen sowie die Qualität der Sequenzierungen dargestellt:

Bead-Verteilung

Die Verteilung und das Verhältnis von auswertbaren und nicht auswertbaren *Beads* dienen zur ersten Einschätzung des Sequenzierungserfolg. Eine exemplarische *Bead*-Verteilung ist in **Abbildung 51** dargestellt. Die Bilder wurden durch die Kamera des *GS Juniors* aufgenommen. Die Anzahl der *Beads* ohne Erkennungssequenz war vergleichsweise niedrig (**Abbildung 51, links**), was auf eine erfolgreiche Anlagerung der DNA an die *Beads* bzw. eine erfolgreiche Aufreinigung der *Beads* hindeutete. Die Kontroll-*Beads* (**Abbildung 51, Mitte**) sowie die DNA-*Beads* (**Abbildung 51, rechts**) waren gleichmäßig verteilt. Die Anzahl der *Beads*, die nicht erfolgreich gelesen werden konnten bzw. die Qualitätskriterien nicht erfüllten (*failed controle beads/failed library*), war akzeptabel (siehe Abschnitt **Qualitätsfilter**).

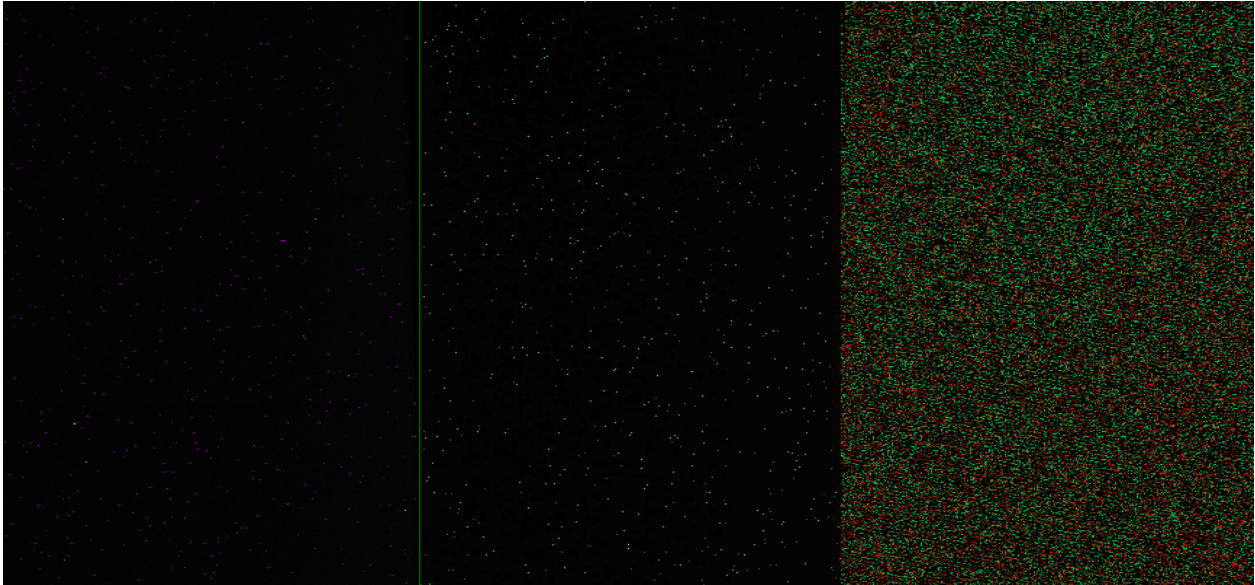


Abbildung 51: Verteilung der Beads eines exemplarischen Laufs (vom 14.07.15); Links: Beads ohne DNA (no key, lila); Mitte: Kontroll-Beads: passed controle Beads (hellgrün), failed controle Beads (orange); Recht: DNA-Bibliothek: passed Filter Library (grün), failed Library (rot).

Read-Länge

Die Amplikonlänge dieses Assays betrug 208 Basenpaare (exklusive Primer [70 bp]) und ist in der Übersicht der *Read*-Längen als Peak deutlich erkennbar. Die ersten Läufe zeigten jedoch noch kurze Fragmente (**Abbildung 52**). Diese waren auch bei der Qualitätskontrolle der DNA-Bibliothek mittels *TapeStation* zu sehen (**2.5.6**). Diese kurzen Fragmente lassen sich in erste Linie auf unspezifische Bildung von Primerdimeren zurückführen. Diese Fragmente waren zu lang, um während der Standardaufreinigung der DNA-Amplikons herausgewaschen oder durch die Standardeinstellung des *Dots* Filters herausgefiltert zu werden. Diese unvollständigen Amplikons verfälschen zum einen die Ergebnisse, da sie keine repräsentative Replikation der Ausgangs-DNA darstellen. Zum anderen werden durch diese kurzen Fragmente *Beads* blockiert, an die somit keine kompletten Amplikons mehr binden können. Es wurde daher wie in **Kapitel 2.5.6** beschrieben eine Anpassung der Bibliothekaufreinigung durchgeführt. Das Verhältnis von *AMPure XP Beads* zu DNA wurde von 1:1,6 auf 1:0,8 abgeändert. Somit wurden diese Fragmente entfernt, bevor die DNA an die *Beads* gekoppelt wurde. Die Auswertung der *Read*-Länge zeigte anschließend nur noch den Peak, der das komplette Amplikon repräsentierte.

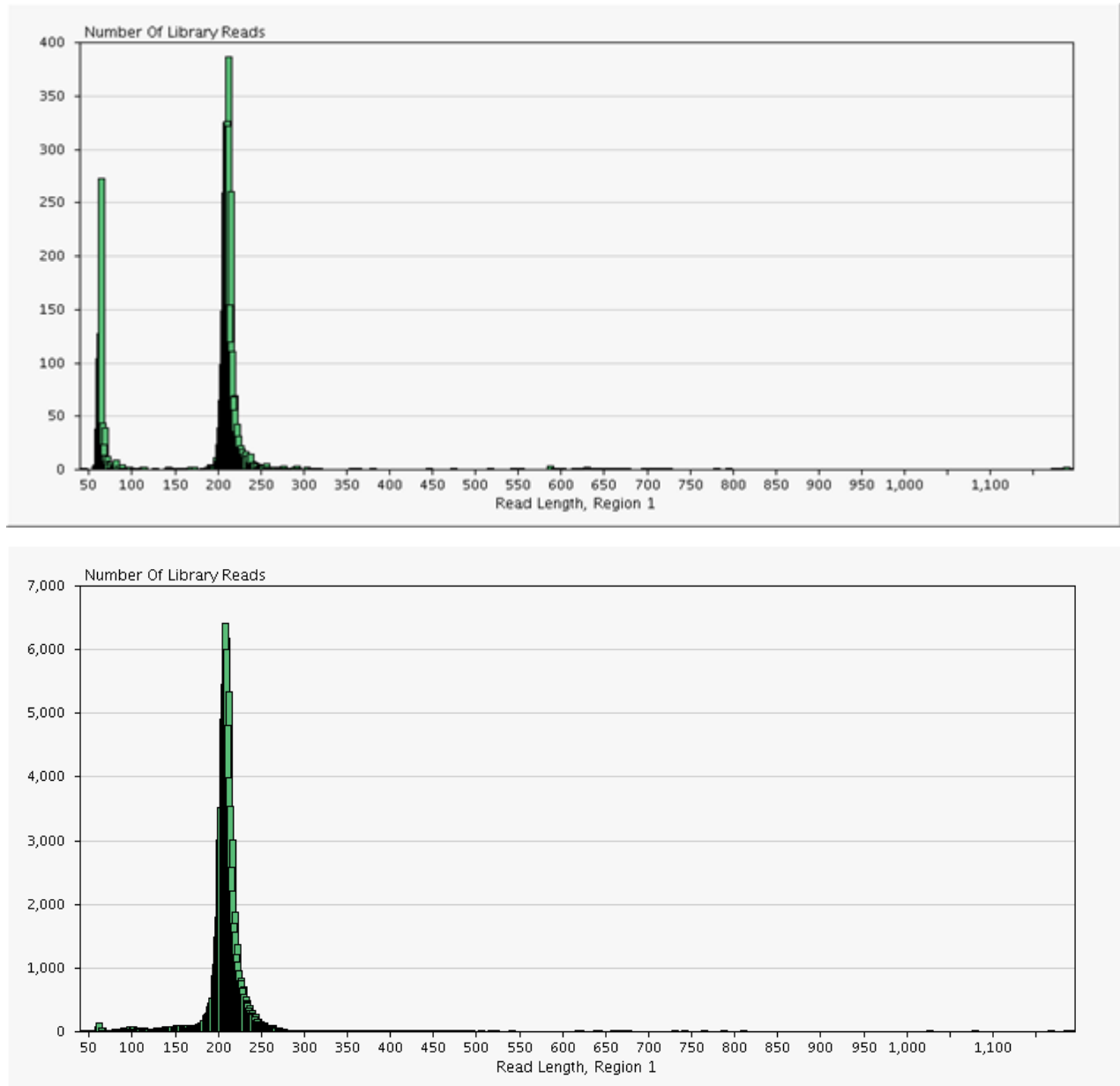


Abbildung 52: Darstellung der Read-Längen exemplarisch für die Läufe vom 25.11.15 (oben, mit Standardaufreinigung) und vom 10.06.16 (unten, mit modifizierter Aufreinigung): Nach Optimierung der Amplikonaufreinigung wurden alle zu kurzen Fragmente aus der DNA-Bibliothek entfernt.

Qualitätsfilter

Verschiedene Parameter der Sequenzierung wurden als Indikatoren für die Beurteilung der Laufqualität durch das Programm *GS Run Browser* definiert und für jeden Lauf berechnet. Über verschiedene Merkmale filterte die Software *Beads* mit schlechter *Read*-Qualität aus, sodass nur *Beads* mit hoher Qualität für die weitere Datenanalyse berücksichtigt wurden:

Der *Dots Filter* entfernt kurze *Reads* bzw. *Reads* mit einer hohen Anzahl an Fehlpaarungen. Der *Mixed Filter* schließt *Reads* mit zu starken bzw. zu vielen positiven Signalen im Bereich eines *Wells* von der Auswertung aus. Der *Short Primer Filter* entfernt nicht vollständig gelesene *Reads* und der *Short Quality Filter* entfernt *Reads* mit zu hoher Anzahl an *valleyflows* (siehe 2.5.6). Einen Überblick über die Qualität der Läufe gibt **Tabelle 44** und **Abbildung 53**.

Tabelle 44: Übersicht über die Anzahl der Beads pro Lauf in Bezug auf die einzelnen Qualitätskriterien. Raw = Gesamtzahl aller Beads; Dots = durch den Dots Filter aussortierte Beads; Mixed = durch den Mixed Filter aussortierte Beads; Short Q = durch den Short Quality Filter aussortierte Beads; Short P = durch den Short Primer Filter aussortierte Beads; Passed = auswertbare, den Qualitätskriterien entsprechende Beads

Lauf Nr.	1	2	3	4	5	6	7
Datum	05.11.15	25.11.15	08.01.16	29.01.16	01.04.16	06.04.16	06.05.16
Raw	323.026	307.763	320.943	315.551	300.155	293.739	261.561
Dot	27.516	23.870	25.872	42.599	9.284	9.234	3.682
Mixed	48.369	33.259	33.834	34.734	42.274	49.573	32.455
Short Q	137.797	99.152	106.058	106.142	96.586	95.521	90.666
Short P	1.028	1.331	437	614	248	233	406
Passed	95.060	139.975	146.147	123.246	143.111	131.535	124.749

Lauf Nr.	8	9	10	11	12	13
Datum	11.05.16	10.06.16	15.06.16	14.07.16	15.07.16	27.10.16
Raw	266.270	288.559	294.281	291.380	285.182	275.272
Dot	3.843	15.645	9.696	7.834	7.566	9.570
Mixed	18.466	42.999	35.456	42.895	45.568	47.205
Short Q	60.858	106.847	93.690	99.250	99.202	82.427
Short P	423	257	274	881	922	745
Passed	172.548	113.463	145.368	133.896	124.155	127.723

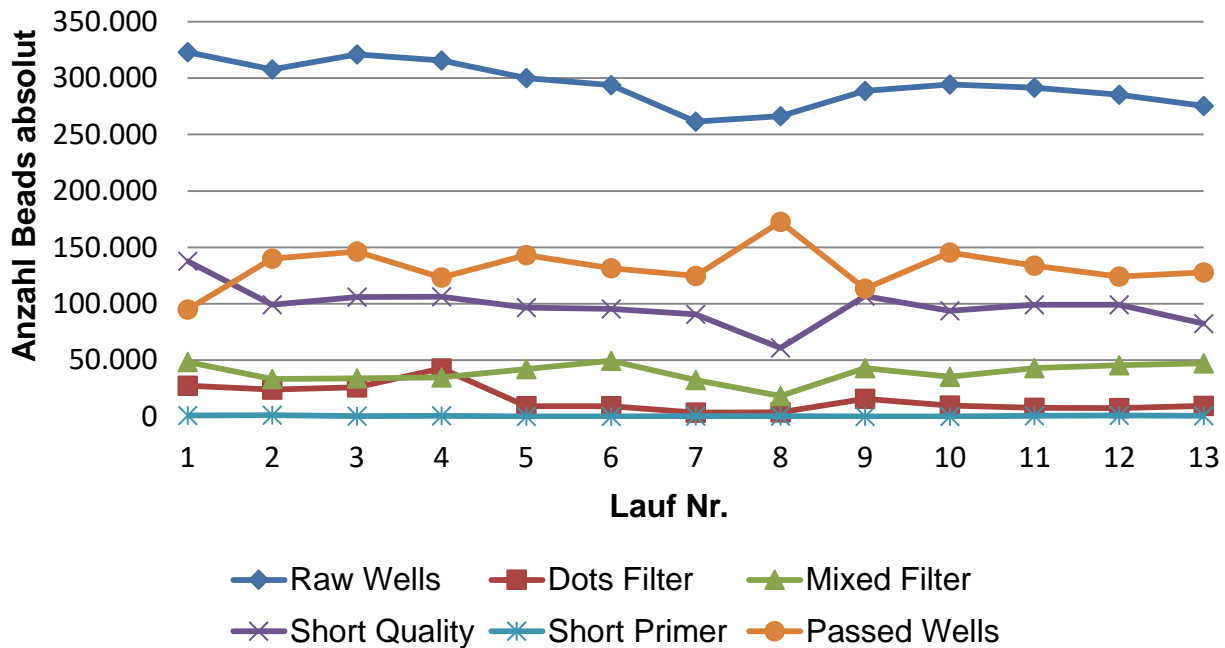


Abbildung 53: Qualitätsmerkmale aller durchgeführten Läufe: Übersicht über die Gesamtzahl der Beads (raw wells), der nicht ausgewerteten Beads differenziert nach nicht bestandenem Qualitätskriterium (Dots, Mixed, Short Quality und Short Primer Filter) sowie auswertbarer Beads (passed wells).

Es ist zu erkennen, dass alle Läufe eine ähnliche Qualität aufweisen. Die durchschnittliche Anzahl der *Beads*, die die Qualitätskriterien erfüllten und ausgewertet konnten, lag bei 132.383 bzw. 46,5%. Aufgrund der vielen Poly-T- und Poly-A-Sequenzen, war der *Short Quality* Filter trotz Anpassung noch das Qualitätskriterium, das die meisten *Beads* ausfilterte (siehe **Kapitel 2.5.6**).

Basen-N-Mere

Die Anzahl der eingebauten Nukleotide wird proportional durch die Signalstärke der freigesetzten Fluoreszenz bestimmt. In den meisten Fällen wird immer nur ein Nukleotid von einer Base eingebaut. Im Fall der Bisulfit-konvertierten DNA kommen allerdings besonders viele Poly-A- und Poly-T-Sequenzen vor. In der Detektion dieser Polysequenzen besitzt der *GS Junior* eine Schwachstelle.²⁶³ Dies ist in **Abbildung 54** dargestellt. Bei Poly-N-Sequenzen nimmt die Genauigkeit der Fluoreszenzsignale deutlich ab. Die genaue Anzahl der eingebauten Nukleotide kann nicht mehr detektiert werden. Die einzelnen Peaks werden immer breiter und verschmelzen ineinander.

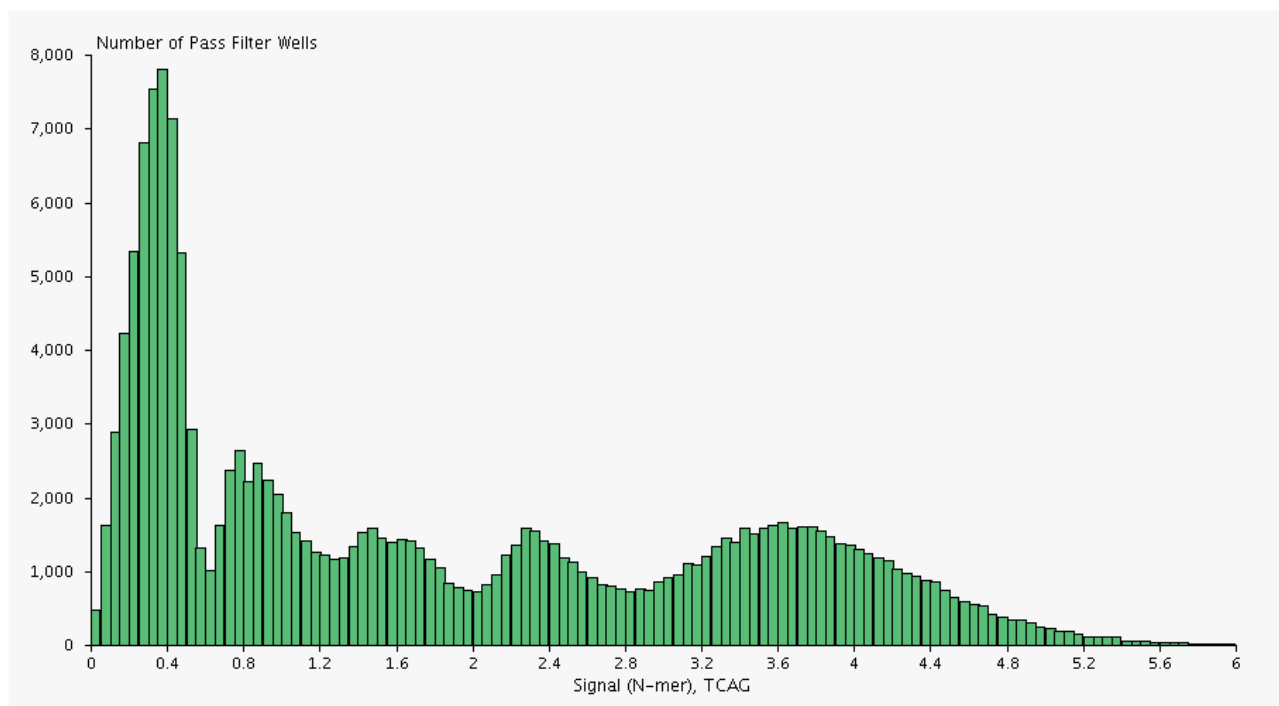


Abbildung 54: Darstellung der Anzahl auswertbarer Beads in Bezug auf die Anzahl eingebauter Nukleotide am Beispiel einer Poly-A-Stelle: mit zunehmender Anzahl eingebauter, homologer Nukleotide wird die Singalstärke immer ungenauer.

Dieses Problem lässt sich bei der Auswertung häufiger beobachten. Da solche Polysequenzen in nativer DNA eher selten auftreten, fällt dieses Problem normalerweise nicht weiter ins Gewicht. Bei Bisulfit-konvertierter DNA stellt es allerdings aufgrund der Häufung von homopolymeren Sequenzen ein großes Problem dar. An diesen Stellen kann die Software oft die genaue Länge der Polymere nicht bestimmen. Es entstehen sogenannte *valley flow*-Signale, die in dem Grenzbereich zwischen 1-2, 2-3 usw. Nukleotiden, der sogenannten *Borderline Zone*, liegen. *Reads* mit zu vielen *valley flows* werden vom *Short Quality* Filter aussortiert. Dadurch war bei den Standardeinstellungen die Anzahl der auswertbaren *Beads* zu gering um eine statistische Auswertung durchzuführen. Die Einstellungen des *Short Quality* Filters wurden daher modifiziert. Die Anzahl erlaubter *valley flows* wurde von vier pro 320 bp auf 18 pro 168 bp erhöht. Den Unterschied zwischen den Filtereinstellungen zeigt **Abbildung 55**. Bei den Standardeinstellungen erfüllten nur 4716 *Beads* die Qualitätskriterien während 233.206 *Beads* allein durch den *Short Quality* Filter aussortiert wurden (1,6% auswertbare *Beads*). Mit modifizierter Einstellung erfüllten nur noch 99.250 dieses Filterkriterium nicht, 133.896 *Beads* konnten erfolgreich ausgewertet werden (46,0% auswertbare *Beads*).

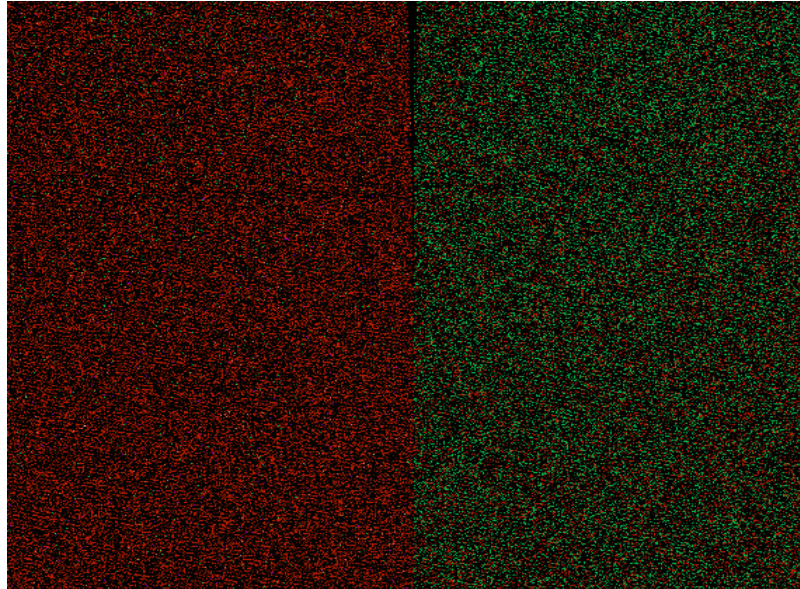


Abbildung 55: Vergleich der Filter passed (grün) und Filter failed Beads (rot) mit den Standardeinstellungen für den Short Quality Filter (links) und den modifizierten Einstellungen (rechts) am Beispiel des Laufs vom 14.07.16: Die Anzahl auswertbarer Reads steigt mit modifizierten Einstellungen erheblich.

Ein weiteres Problem war, dass die hohe Anzahl von Poly-N-Sequenzen zu Lücken in der Sequenz und zu Verschiebungen des Leserasters führte. Dadurch wurden einige CpG-Stellen nicht richtig erkannt. Besonders betroffen hiervon waren CpG3 und 5. Aufgrund der umliegenden Basensequenzen, in denen besonders viele N-mere vorkamen, kam es hier besonders häufig zu Verschiebungen des Leserasters. Bei Betrachtung der einzelnen Reads war sichtbar, dass dadurch teilweise die CpGs nicht richtig erkannt wurden. Dieser Fehler konnte im Rahmen der Auswertung nicht behoben werden. Da für die Auswertung nicht die Absolutwerte sondern nur das Verhältnis der Methylierungslevel zwischen den einzelnen Patientenproben von Bedeutung war, wurde dieser Fehler als systematischer Fehler in der Auswertung akzeptiert.

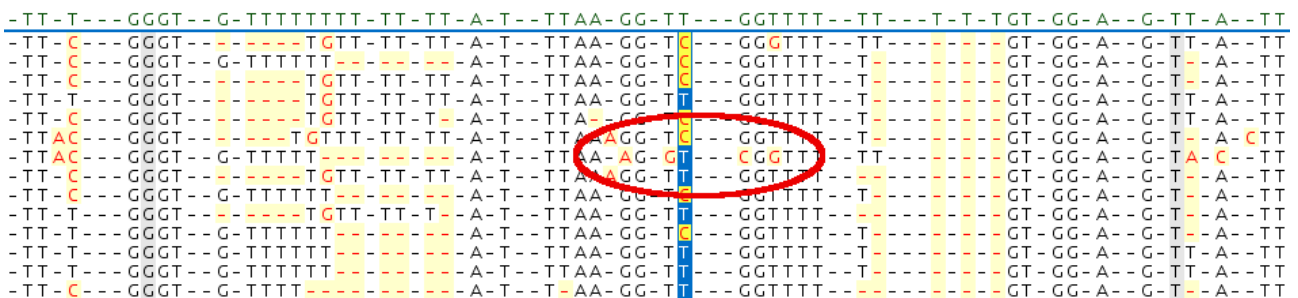


Abbildung 56: Darstellung der einzelnen Reads durch die AVA-Software des GS Junior: Das Leseraster der Sequenz im Bereich um CpG5 wird aufgrund von einem zu viel gelesenen Adenin verschoben, das Cytosin im Bereich von CpG5 wird dadurch nicht erkannt.

Sequenzierungsgenauigkeit - Messung der Standards

In jedem Lauf wurden sogenannte Standards mitgemessen. Diese Standards bestanden aus komplett methylierter und komplett nicht methylierter DNA (*Human WGA Methylated & Non-methylated DNA Set*), die zu Methylierungskonzentrationen von 100, 75, 50, 25 und 0 Prozentpunkten vermischt wurde. Eine Übersicht über die Messungen der Standards bezogen auf alle CpG-Stellen ist in **Abbildung 57** dargestellt. **Abbildung 58** zeigt die Mittelwerte der gemessenen Standards bezogen auf die einzelnen CpG-Stellen.

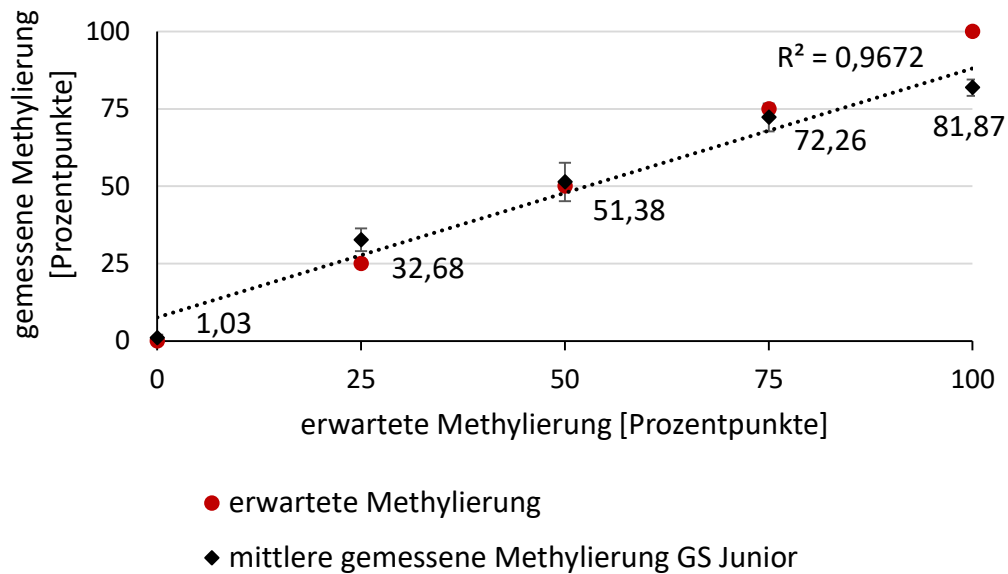


Abbildung 57: Messergebnisse der Standards: Darstellung der Mittelwerte aller gemessenen CpG-Stellen, Standardabweichung und Regressionsgeraden.

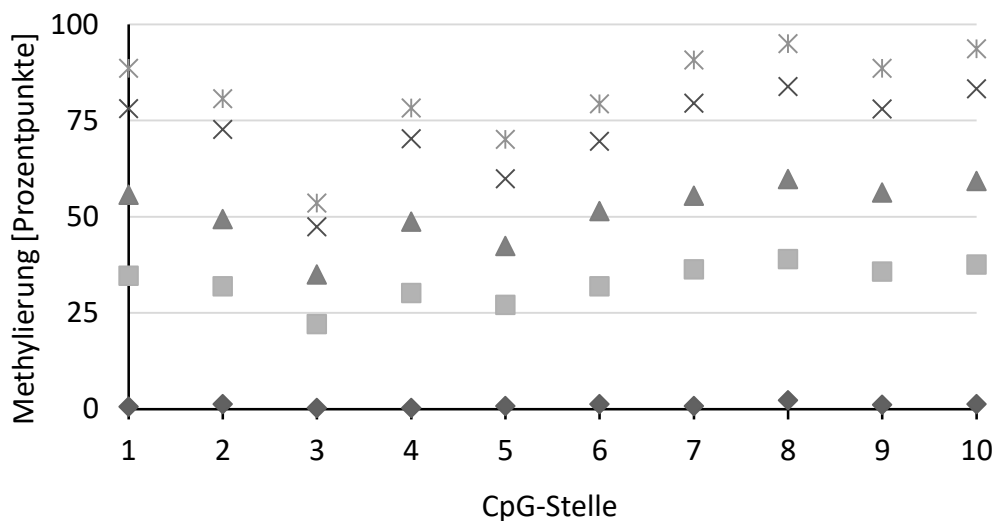


Abbildung 58: Mittlere Messergebnisse der Standards differenziert nach einzelnen CpG-Stellen.

Die Ergebnisse der Standards lagen im unteren prozentualen Bereich über den erwarteten Werten (0, 25, 50 Prozentpunkte), für die zu 75 Prozentpunkten methylierten DNA lagen die gemessenen Wert leicht, bei der komplett methylierten DNA deutlich unter den erwarteten Werten. Die Qualität der einzelnen CpG-Stellen zeigte dabei deutliche Unterschiede. So lagen die Werte von CpG3 und CpG5 immer deutlich unter den erwarteten Werten, während die anderen CpG-Stellen eher eine Tendenz zu erhöhten Werten zeigten.

Des Weiteren wurden auch der gBlock entsprechend verdünnt und sequenziert. Da hier der Schritt der Bisulfit-Konvertierung entfällt, sollte durch den Vergleich mit den Messungen der Standards ersichtlich werden, welcher Fehler durch Konvertierung bzw. durch die Sequenzierung an sich entsteht. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 59** und **Abbildung 60** dargestellt.

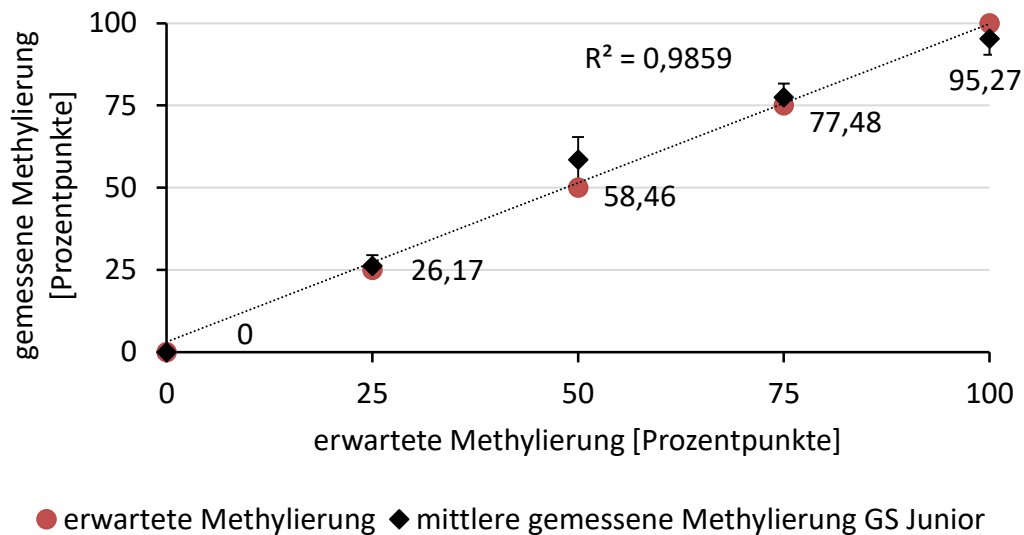


Abbildung 59: Messergebnisse des gBlocks: Darstellung der Mittelwerte aller CpG-Stellen, Standardabweichung und Regressionsgeraden.

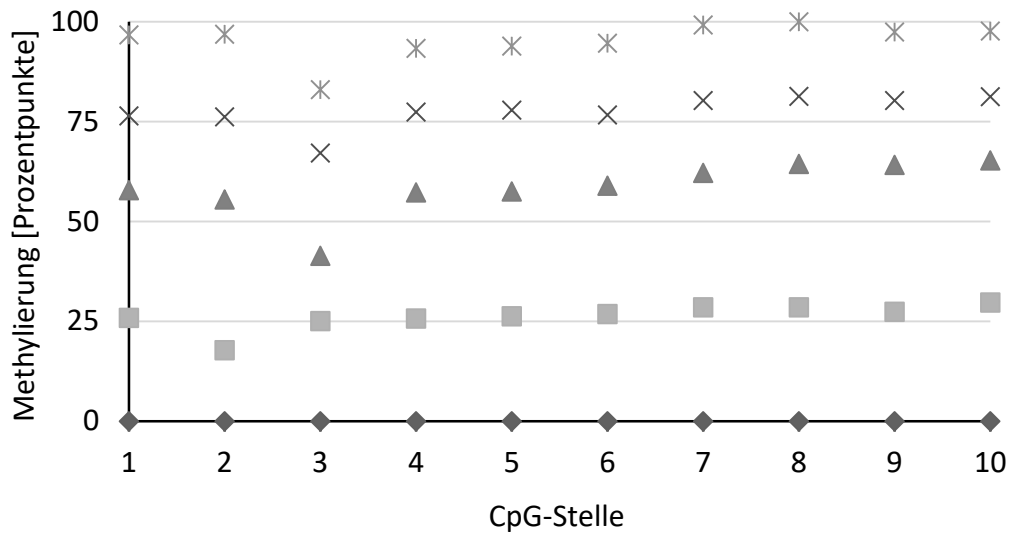


Abbildung 60: Messergebnisse des gBlocks differenziert nach einzelnen CpG-Stellen.

Die Messung des gBlocks zeigte insgesamt etwas genauere und, über alle CpGs differenziert betrachtet, etwas stabilere Werte als die Messung der Standards. Die gemessenen Werte lagen näher an den erwarteten. Zwar war auch hier ein Unterschied zwischen den verschiedenen CpG-Stellen erkennbar, allerdings war dieser deutlich weniger stark ausgeprägt als bei den Standardmessungen. Auch hier zeigte CpG3 auffällig niedrigere Messwerte. Insgesamt wiesen die Werte des gBlocks ein etwas höheres Bestimmtheitsmaß auf ($R^2 = 0,9859$) als die Werte der Standards ($R^2 = 0,9672$). Sie lieferten also einen etwas besseren Zusammenhang zu den tatsächlichen Werten, was aufgrund der weniger Arbeitsschritte und damit geringeren Fehleranfälligkeit nachvollziehbar ist. Allerdings zeugt auch das Bestimmtheitsmaß der Standardmessungen von 0,9672 von einer guten Übereinstimmung des Modells mit den tatsächlichen Werten. Betrachtete man die Mittelwerte aller CpGs waren Standardabweichung und Variationskoeffizient (= relative Standardabweichung [CV]) für die Standards und den gBlock vergleichbar (**Tabelle 45**). Die mittlere Standardabweichung der Standards lag bei $\pm 4,25$ Prozentpunkten. Daraus kann abgeleitet werden, dass 68% der gemessenen Werte $\pm 4,25$ Prozentpunkte und 95% der Messwerte $\pm 8,51$ Prozentpunkte um den Mittelwert liegen. Eine Einschränkung im Vergleich zwischen Standards und gBlock besteht darin, dass für den gBlock nur eine Messung durchgeführt wurde.

Tabelle 45: Mittelwerte und Standardabweichungen der Standards und des gBlocks bezogen auf alle CpG-Stellen und alle Läufe.

Erwarteter Wert [Prozentpunkte]	0	25	50	75	100
Mittlere Methylierung Standards [Prozentpunkte]	1,033	32,675	51,376	72,261	81,865
Standardabweichung [Prozentpunkte]		3,665	6,239	4,486	2,624
Variationskoeffizient [%]		11,2	12,1	6,21	3,21
Mittlere Methylierung gBlock [Prozentpunkte]	0	26,17	58,46	77,48	95,27
Standardabweichung [Prozentpunkte]		3,279	6,927	4,159	4,827
Variationskoeffizient [%]		12,5	11,8	5,37	5,07

Zudem wurden neun verschiedene Patientenproben als zusätzliche Kontrollen bei jedem Lauf mitgemessen. Dies sollte ebenfalls die Vergleichbarkeit der einzelnen Läufe gewährleisten. Die mittlere Standardabweichung dieser Proben bezogen auf alle CpG-Stellen lag über alle Messungen hinweg zwischen 1,61 und 3,23 Prozentpunkte Methylierung. Der Variationskoeffizient betrug zwischen 7,27 und 14,89% ($CV = \frac{SD}{M} \times 100\%$). Die mittlere Standardabweichung bezogen auf alle neun Proben lag bei $\pm 2,44$ Prozentpunkten. Es würden somit 68% der gemessenen Werte $\pm 2,44$ Prozentpunkte und 95% $\pm 4,89$ Prozentpunkte um den Mittelwert streuen. Dies entspricht der in der Literatur angegebenen Präzision von Pyrosequenziererergebnisse von ± 5 Prozentpunkten.²⁶⁴ Wurden die CpG-Stellen differenziert betrachtet, ergaben sich Standardabweichungen zwischen 0,434 und 4,88 Prozentpunkten sowie relative Standardabweichungen von 1,36 bis 42,5%. Auf eine definierte Bestimmungsgrenze wurde im Rahmen der Auswertung bewusst verzichtet. Definiert man aber den niedrigsten Wert mit einem CV von $< 20\%$, einem üblichen Wert in der analytischen Chemie, als möglichen Grenzwert liegt dieser bei 4,9 Prozentpunkten.^{265, 266} Derart niedrige Werte wurden nur im Rahmen von CpG3 und CpG4 gemessen.

Potapova et al. konnten im Rahmen einer Validierung der 454 Technologie nachweisen, dass die Richtigkeit der Messerergebnisse bei zu geringer Mindest-Read-Anzahl nicht gegeben ist. Sie legten im Rahmen ihrer Analyse eine Read-Zahl von 150 Reads pro Probe für eine richtige Quantifizierung fest.²⁶⁷ Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher ebenfalls Proben, die weniger als 150 auswertbare Reads zeigten, von der Analyse ausgeschlossen.

3.6.2 Vergleich GS Junior – Droplet Digital PCR

Um die Messungen der Methylierungslevel am *GS Junior* zu validieren wurde eine zweite Methode an der *Droplet Digital PCR* (ddPCR) entwickelt. Da hier Punktmutationen gemessen werden und somit für jede CpG-Stelle ein eigener *Assay* designt werden muss, wurden hier nur die drei CpG-Stellen vermessen, die in der Literatur bereits mit dem BMI assoziiert worden sind.¹⁵⁷ Insgesamt wurden für jede der drei CpG-Stellen 52 Proben gemessen. Dabei wurde jede Probe doppelt gemessen. Es lagen daher 156 Wertepaare zum Vergleich vor. Eine direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse der Pyrosequenzierung und der ddPCR mit automatisierter und manueller Auswertung sowie die jeweiligen Differenzen sind getrennt nach CpG-Stelle in **Anhang 9.7** dargestellt. Die Standardabweichungen betragen zwischen 0,07 und 28,25 Prozentpunkten für CpG1, zwischen 0,07 und 12,30 Prozentpunkten für CpG5 und zwischen 0,22 und 10,69 Prozentpunkten für CpG7. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 1 und 85% (CpG1), 1 und 88% (CpG5) und 1 und 36% (CpG7). Die folgende Auswertung bezieht sich auf die Ergebnisse aller drei CpG-Stellen zusammen.

Die absoluten Messwerte von CpG5 sind am *GS Junior* aus den in **Kapitel 3.6.1** beschriebenen Gründen prinzipiell zu niedrig. Um dennoch eine Vergleichbarkeit mit der ddPCR zu gewährleisten, wurde anhand der Standards ein Korrekturfaktor berechnet. Dieser ergab sich aus dem Mittel der Quotienten der mittels ddPCR und *GS Junior* gemessenen Werte für die Standards mit 25, 50, 75, und 100 Prozentpunkten Methylierung (**Tabelle 46**). Alle Messwerte der Patientenproben wurden um diesen Faktor korrigiert. In **Anhang 9.7** sind sowohl die tatsächlich gemessen als auch die korrigierten Werte aufgeführt. Für den Methodenvergleich wurden nur die korrigierten Werte verwendet.

Tabelle 46: Berechnung des Korrekturfaktors für CpG5: Die Messwerte für CpG5 des GS Juniors wurden um einen Korrekturfaktor korrigiert, um eine Vergleichbarkeit zwischen GS Junior und ddPCR zu gewährleisten. Der Korrekturfaktor berechnet sich aus dem mittleren Quotienten der Messungen der Standards (Messwert CpG5 ddPCR/Messwert CpG5 GS Junior).

Standards [Prozentpunkte]	Messwert ddPCR [Prozentpunkte]	Messwert GS Junior [Prozentpunkte]	Prozentuale Abweichung
25	28,9	20,68	1,398
50	56,5	41,94	1,348
75	66,2	51,30	1,290
100	86,2	67,98	1,267
	Korrekturfaktor		1,326

Die mittleren Messwerte der Standards für die verschiedenen CpG-Stellen sind in **Abbildung 61** dargestellt. Für die Standardgerade der *GS Junior* Messung wurden nur die Ergebnisse der Proben verwendet, die auch mit der ddPCR gemessen wurden. So sollten Abweichungen, die durch die Vorbehandlung der Proben (Bisulfit-Konvertierung, PCR-Amplifikationen) entstanden sind, ausgeschlossen werden. Hier zeigen sich ähnliche Ergebnisse für alle Messreihen. Auch die Messwerte der ddPCR korrelieren für beide Auswertungsmethoden sehr gut mit den erwarteten Werten ($R^2 = 0,9687/0,9784$). Die mittlere Standardabweichung der automatisierten Auswertung der ddPCR Werte lag bei 2,60 Prozentpunkten, der Variationskoeffizient lag zwischen 0 und 17%. Für die manuelle Auswertung wurden direkt die kombinierten Werte aus der *QuantaSoft Software* ausgelesen, so dass keine Standardabweichung bzw. Variationskoeffizient berechnet wurden. Ähnlich zu den Sequenzierungsergebnissen lagen bei der ddPCR die Messergebnisse für die Werte mit niedriger Methylierung (25 und 50 Prozentpunkte) über den erwarteten Werten.

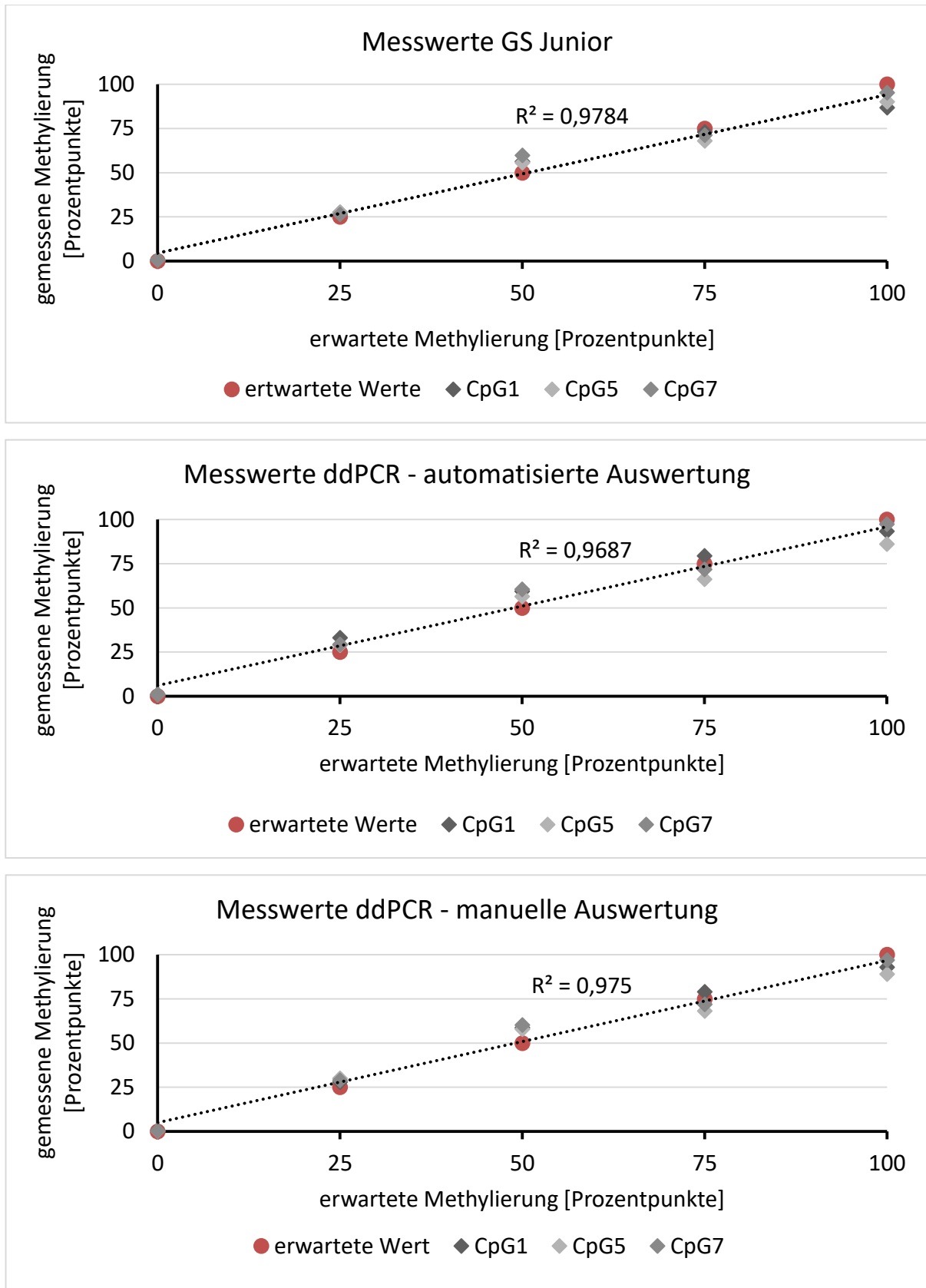


Abbildung 61: Darstellung der Standardmessungen der einzelnen CpG-Stellen getrennt nach Mess- bzw. Auswertungsmethode.

In Bezug auf die Patientenproben zeigte sich eine starke Korrelation zwischen den Messergebnissen des *GS Juniors* und der ddPCR. Für den Vergleich der Messmethoden wurde der Konkordanz-Korrelationskoeffizient berechnet. Dieser gibt die Streuung der Messwerte um die Winkelhalbierende an und berücksichtigt daher eine eventuelle Verzerrung (*Bias*) der Werte. Er ist ein häufig verwendeter Index für den Vergleich von kontinuierlichen Messwerten.²²² In Bezug auf die automatisierte Auswertung ergab sich ein Konkordanz-Korrelationskoeffizient von 0,893 mit einem 95%-Konfidenzintervall von 0,856 - 0,920. Für den Vergleich der manuellen Auswertung der ddPCR und der Pyrosequenzierung betrug der Konkordanz-Korrelationskoeffizient 0,967 (95%-Konfidenzintervall: 0,956 - 0,976). Die Darstellung der Messergebnisse im Punktdiagramm zeigte entsprechend eine enge Streuung um die Winkelhalbierende (**Abbildung 62/Abbildung 63 links**). Zur Analyse der Differenzen der Messwerte der verschiedenen Methoden sowie deren Streuung, wurde ein Bland-Altman-Plot erstellt (**Abbildung 62/Abbildung 63 rechts**).^{220, 221} Dazu wurden die Differenzen der jeweiligen Messwerte gegen die Mittelwerte in einem Punktdiagramm aufgetragen. In dieser Analyse wurden die Werte der Pyrosequenzierung mit den Ergebnissen der ddPCR zum einen mit der automatisierten, zum anderen mit der manuellen Auswertung verglichen. Es wurde der Mittelwert der Differenzen sowie der Mittelwert der Differenzen $\pm 2SD$ (= 95% Konfidenzintervall) eingezeichnet. Je näher die Werte an der Nulllinie liegen, umso ähnlicher sind die Ergebnisse beider Messmethoden.

Sowohl bei der automatisierten als auch bei der manuellen Auswertung waren die mittels ddPCR gemessenen Werte insgesamt etwas höher als die Werte des *GS Juniors* (mittlere Differenz $\pm SD = 2,25 \pm 6,98 / 1,18 \pm 3,83$). Beim Vergleich der automatisierten gegen die manuelle Auswertung zeigte sich, dass die Abweichung zu den Ergebnissen der Pyrosequenzierung bei der manuellen Auswertung geringer ist. Auch die Standardabweichung war niedriger und es waren weniger Ausreißer zu finden. Diese Unterschiede beruhten vor allem auf dem *Assay* für CpG1. Während die Ergebnisse der *Assays* von CpG5 und CpG7 keine Unterschiede hinsichtlich der manuellen und der automatisierten Auswertung zeigten, waren in Bezug auf die automatisierte Auswertung von CpG1 zum Teil starke Ausreißer erkennbar (siehe **Anhang 9.7**, Ausreißer sind hier rot markiert). Diese zeichneten sich jedoch durch eine geringe Anzahl an positiven *Droplets* sowie einer großen Abweichung der Doppelbestimmungen aus. Insgesamt lässt sich sagen, dass bei der ddPCR und automatisierter Auswertung 95% aller gemessenen Werte bis zu +16,21 Prozentpunkte größer bzw. -11,71 Prozentpunkte kleiner waren als der mittels *GS Junior* gemessene Wert. In Bezug auf die manuelle Auswertung waren 95% bis +8,84 Prozentpunkte größer bzw. -6,48 Prozentpunkte kleiner als die Werte der Sequenzierung.

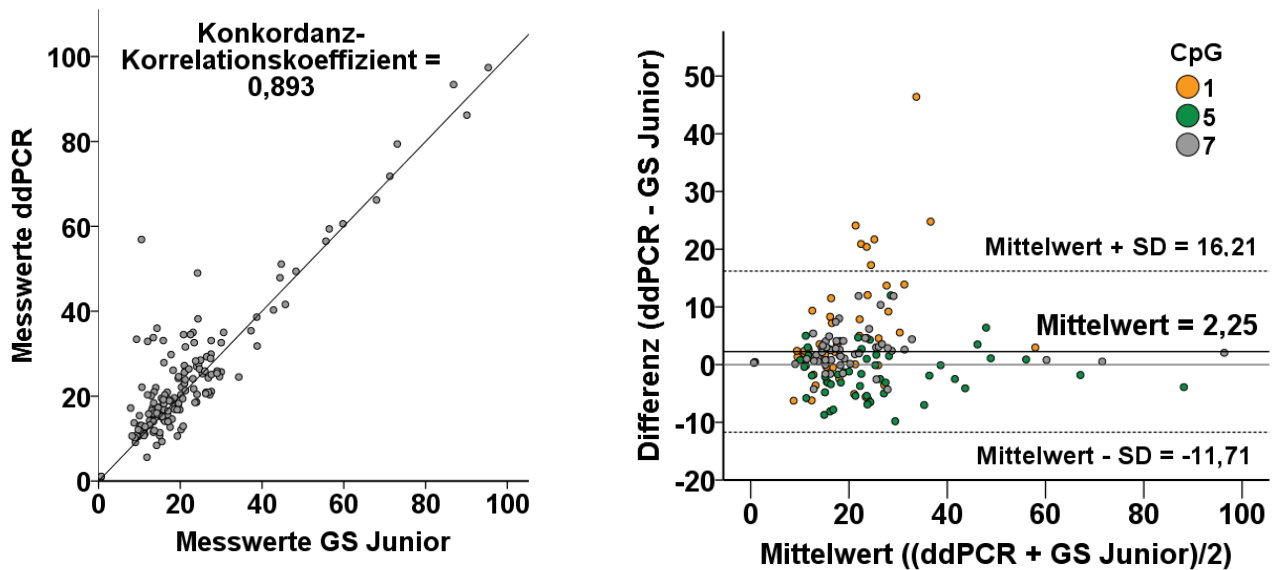


Abbildung 62: links: Auftragung der Messwerte der Pyrosequenzierung am GS Junior gegen die der ddPCR mit automatisierter Auswertung; Die Messwerte zeigen eine enge Streuung um die Winkelhalbierende und somit eine enge Korrelation; rechts: Bland-Altman-Plot: Punktdiagramm der Differenzen der ddPCR-Messwerte mittels automatisierter Auswertung und der GS Junior-Messwerte gegen die entsprechenden Mittelwerte.

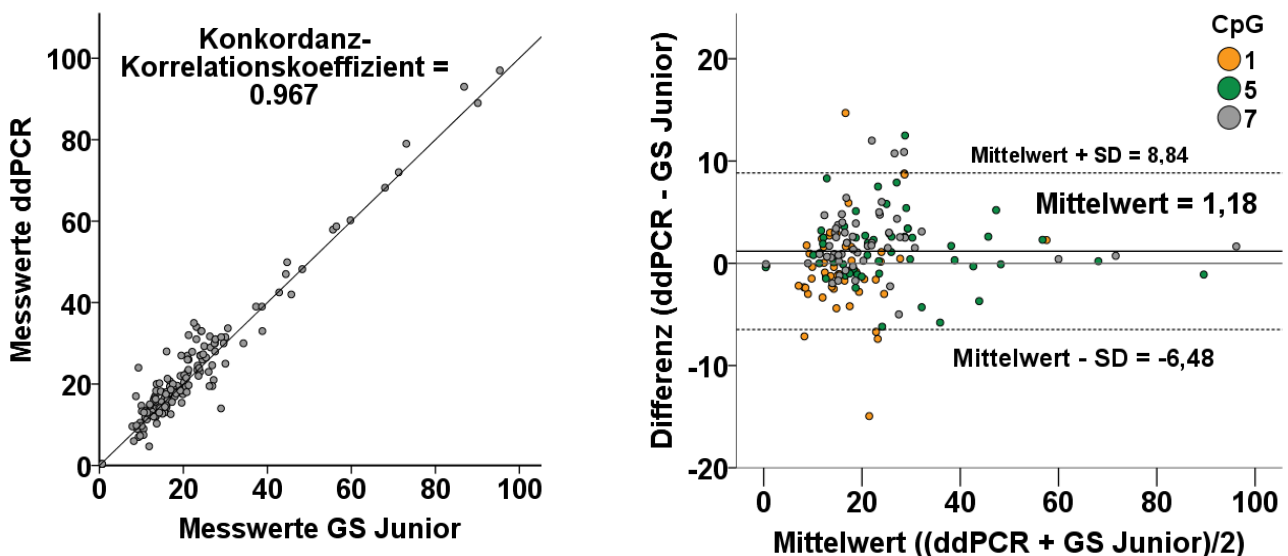


Abbildung 63: links: Auftragung der Messwerte der Pyrosequenzierung am GS Junior gegen die der ddPCR mit manueller Auswertung; Die Messwerte zeigen eine enge Streuung um die Winkelhalbierende und somit eine enge Korrelation; rechts: Bland-Altman-Plot: Punktdiagramm der Differenzen der ddPCR-Messwerte mittels manueller Auswertung und der GS Junior-Messwerte gegen die entsprechenden Mittelwerte.

3.6.3 Methylierung von HIF3A

Eine genomweite Assoziationsstudie konnte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus von drei CpGs im Intron 1 der HIF3A-Gens (cg22891070, cg27146050 und cg16672562) und dem BMI aufdecken.¹⁵⁷ Diese Beobachtung wurde von mehreren nachfolgenden Studien bestätigt.¹⁵⁸⁻¹⁶¹ Diese konnten nachweisen, dass ein höherer Methylierungsstatus an diesen CpG-Stellen mit einem höheren BMI assoziiert ist. Im Rahmen dieser Arbeit haben wir daher den Methylierungsstatus dieser drei sowie sieben weiterer CpG-Stellen, die sich in dem analysierten Amplikon befinden, in Bezug auf die Antipsychotika-vermittelte Gewichtszunahme untersucht (CpG5 = cg22891070, CpG1 = cg27146050 und CpG7 = cg16672562).

Für insgesamt vier Patienten konnten im Rahmen dieser Analyse aufgrund von zu wenig DNA-Material und daraus resultierend zu wenigen *Reads* keine auswertbaren Ergebnisse generiert werden. Davon bekamen zwei Patienten Olanzapin-Therapie und gehörten daher der Gruppe von 174 Patienten mit Hochrisiko-Therapie an, ein weiterer Patient war der naiven Subpopulation zuzuordnen. Bezüglich CpG1 wurde zudem ein weiterer Patient (mit Olanzapin-Therapie), bezüglich CpG5 wurden drei weitere Patienten (davon zwei Patienten mit Olanzapin-Therapie) aus denselben Gründen aus der Analyse ausgeschlossen.

Der relative Methylierungsstatus aller zehn CpG-Stellen korrelierte sehr stark untereinander ($p = 0,000$) (**Abbildung 64**). Er lag bei demselben Patienten entweder bei allen CpG-Stellen in einem verhältnismäßig hohen Bereich oder alle CpGs zeigten niedrige Methylierungslevel. Daher wurden im Folgenden exemplarisch für alle CpG-Stellen die Ergebnisse von CpG1 dargestellt. Diese Stelle zeigte in unserer Untersuchung mit die stärksten Effekte auf das Gewicht. Zudem war CpG1 (cg27146050) die CpG-Stelle, die in der Studie von Dick et al. mit den größten Auswirkungen auf den BMI assoziiert worden war.¹⁵⁷ Neben den Korrelationen untereinander, korrelierte der Methylierungsstatus aller CpG-Stellen mit dem Alter (Pearson-Korrelation: $0,000 < p < 0,003$). So nahm die Methylierung mit zunehmendem Alter ab (**Abbildung 64**).

Weiterhin wurde über die Darstellung einer *Heatmap* versucht, Zusammenhänge zwischen der Methylierung der CpG-Stellen und Parametern, die entweder Einfluss auf die Methylierung oder auch auf die Gewichtszunahme haben könnten, zu finden. Dazu wurden die Proben in Bezug auf ihr relatives Methylierungslevel angeordnet und farblich markiert. Gleichzeitig wurde der jeweilige Status

in Bezug auf FTO- und MC4R-Genotyp, Therapieansprechen, Raucherstatus, Geschlecht, Alter, Vor-medikation mit Antipsychotika, Gewichtszunahme und Sequenzierlauf, in dem die Probe sequenziert wurde, verglichen. Auch hier zeigt sich eine starke Korrelation der einzelnen CpG-Stellen untereinander. Für die anderen Parameter war keine Bildung von Gruppierungen, und somit deutliche Zusammenhänge erkennbar (**Abbildung 65**).

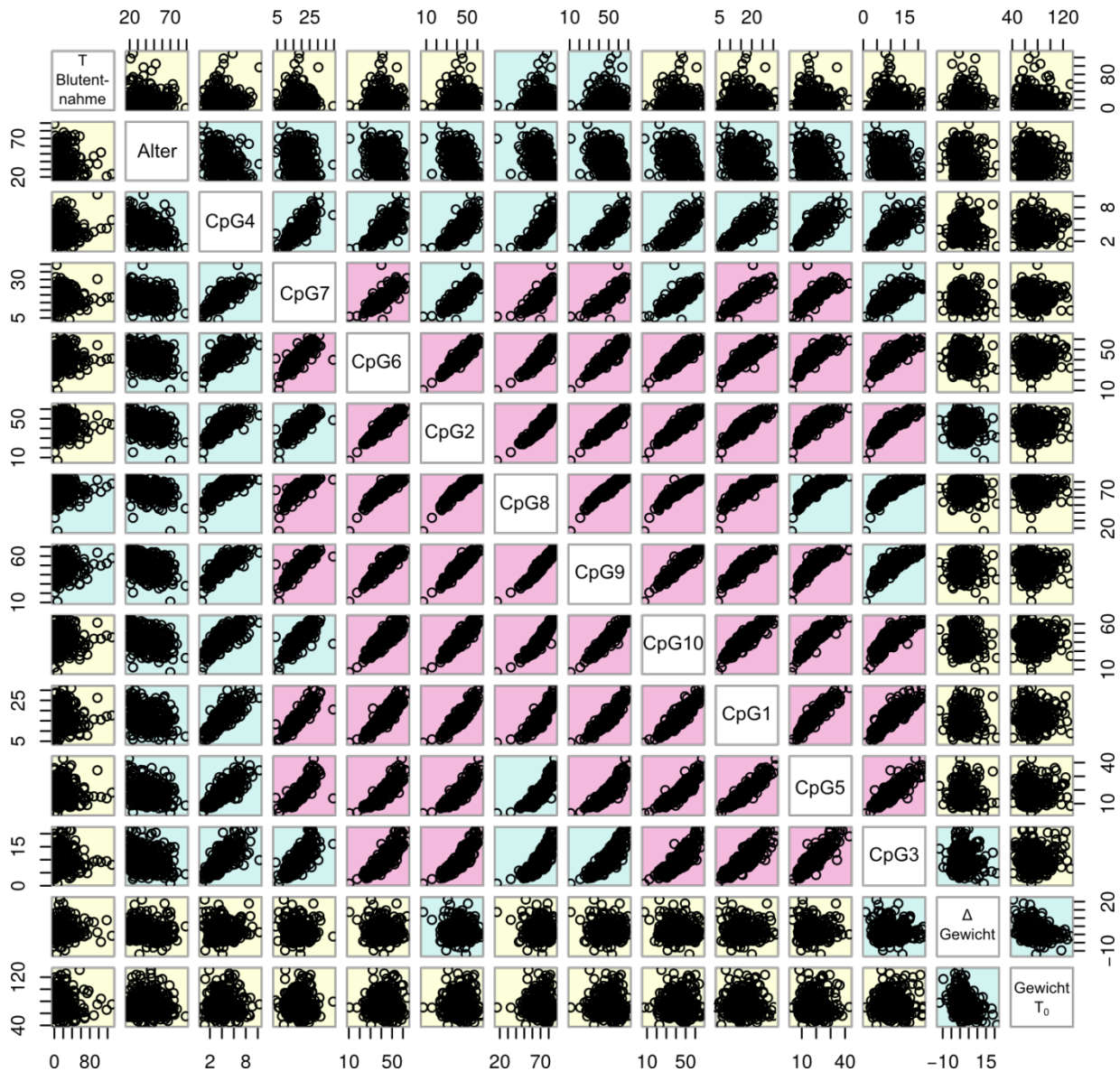


Abbildung 64: Darstellung der Punktdiagramme und Korrelationen der einzelnen CpG-Stellen, des Ausgangsgewichts, der Gewichts-differenz nach vier Wochen Therapie, des Alters und dem Zeitpunkt der Blutentnahme: alle CpG-Stellen außer CpG4 korrelieren sehr stark untereinander (rot), CpG4 und das Alter zeigen eine etwas schwächere Korrelation mit den CpG-Stellen (grün), die anderen Parameter weisen keine Korrelation auf (gelb).



Abbildung 65: Darstellung von Gruppierungen in Bezug auf Methylierung der CpG-Stellen, FTO- und MC4R-Genotyp, Therapieansprechen, Raucherstatus, Geschlecht, Alter, Vormedikation, Gewichtszunahme und Sequenzierlauf in einer Heatmap: Es sind keine Gruppierungen in Zusammenhang mit der Methylierung erkennbar.

Um die Beziehung zwischen Methylierung und Antipsychotika-induzierter Gewichtszunahme genauer zu betrachten, wurde zunächst in der Gesamtpopulation mittels linearer Regression auf Zusammenhänge getestet. Hier wiesen Patienten mit niedrigen Methylierungsleveln zwar eine höhere Gewichts- bzw. BMI-Zunahme auf, allerdings blieben diese Ergebnisse ohne Signifikanz (Δ Gewicht [%]: $0,177 < p < 0,869$; Δ BMI [%]: $0,136 < p < 0,711$). In einem zweiten Schritt wurden nur Patienten mit Hochrisiko-Therapie untersucht. Auch hier konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus und der Antipsychotika-vermittelten Gewichts- ($0,084 < p < 0,442$) bzw. BMI-Zunahme ($0,053 < p < 0,287$) gefunden werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in der adjustierten Subpopulation (Δ Gewicht [%]: $0,350 < p < 0,996$; Δ BMI [%]: $0,497 < p < 0,969$). In Anlehnung an Dick et al. testeten wir weiterhin auf Zusammenhänge für den BMI zu Beginn der Studie mit den Methylierungsleveln. Es konnte ebenfalls keine signifikante Beziehung gefunden werden ($0,369 < p < 1,000$). Dieses Ergebnis bestätigte sich auch in der Gruppe der Patienten, die noch nicht mit Antipsychotika vorbehandelt waren (naive Subpopulation: $n = 91$; $0,205 < p < 0,842$).

Da der Methylierungsstatus mit dem Alter korrelierte, wurde auf einen Zusammenhang innerhalb einzelner Altersgruppen getestet. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang für Patienten ≤ 50 Jahren ($n = 252$). Hier konnte für den Großteil der GpG-Stellen ein signifikanter Zusammenhang mit der relativen Gewichts- und BMI-Zunahme nachgewiesen werden ($0,007 < p < 0,035$). Dieser war am stärksten ausgeprägt für CpG1 ($p = 0,010$) und CpG2 ($p = 0,007$). Für CpG4 ($p = 0,061$), CpG5 ($p = 0,078$) und CpG9 ($p = 0,059$) erreichte dieser Trend kein signifikantes Niveau. Da aufgrund der Messungenauigkeit keine exakte Bestimmung der Methylierungswerte möglich war, sondern diese immer einer gewissen Schwankung unterworfen waren, wurde in einem zweiten Schritt der Methylierungsstatus klassifiziert. Unterteilungen wurden immer in Schritten von 5 Prozentpunkten vorgenommen. Der anschließende Vergleich mittels ANOVA zeigte auch hier einen signifikanten Zusammenhang für die Gewichts- bzw. BMI-Zunahme nach vier Wochen Therapie in Abhängigkeit von den Methylierungswerten (CpG1: $p = 0,014$). Patienten ≤ 50 Jahren mit niedrigen Methylierungsleveln (< 10 Prozentpunkte) wiesen eine höhere Gewichtszunahme auf als Patienten mit mittleren Methylierungsleveln (zwischen 10 und 25 Prozentpunkte). Für Patienten mit sehr hohem Methylierungslevel (> 25 Prozentpunkte) stieg die Gewichtszunahme wieder an (**Abbildung 66, Tabelle 47**). In Bezug auf Patienten, die älter waren als 50, verhielt es sich gegenteilig. Hier nahm die Gewichtszunahme mit höheren Methylierungsleveln zu. Dieser Effekt erreichte jedoch weder bei der linearen Regression

noch beim Mittelwertvergleich mittels ANOVA ein signifikantes Niveau ($p = 0,100/0,310$) (Abbildung 66).

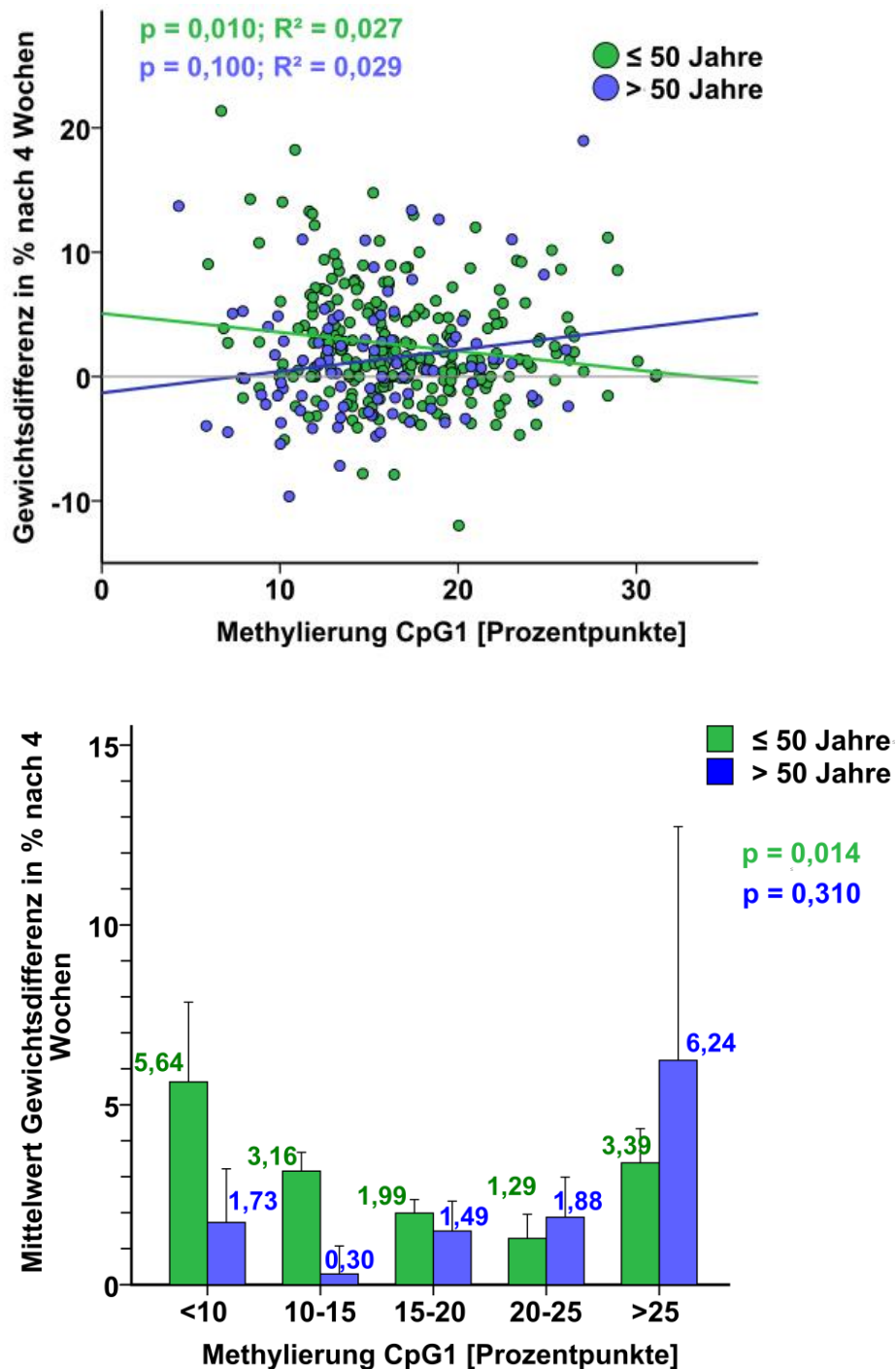


Abbildung 66: Darstellung der prozentualen Gewichtsänderung in Abhängigkeit der Methylierung von CpG1 differenziert nach Alter: Darstellung der Einzelwerte und Analyse mittels linearer Regression (oben). Darstellung der Mittelwerte gruppierter Methylierungslevel und Analyse mittels ANOVA (unten). Patienten bis zu einem Alter von 50 Jahren und niedrigen Methylierungsleveln (< 10 Prozentpunkte) nahmen nach vierwöchiger Therapie signifikant am meisten Gewicht zu.

Tabelle 47: Übersicht über ausgewählte Gewichtsparameter für alle Patienten ≤ 50 Jahren in Abhängigkeit von dem Methylierungsstatus von CpG1: Patienten mit niedrigen Methylierungsleveln (< 10 Prozentpunkte) nahmen nach vierwöchiger Therapie signifikant am meisten Gewicht zu ($p = 0,014$).

Methylierung [Prozentpunkte]	n	Ausgangsgewicht	abs. Gewichtszunahme nach 4 Wochen [kg]	rel. Gewichtszunahme nach 4 Wochen [%]
<10	11	80,2	3,49	5,64
10-15	82	71,1	2,15	3,16
15-20	99	76,0	1,40	1,99
20-25	43	77,4	0,692	1,29
>25	17	71,3	2,36	3,39

Im adjustierten Modell unter Einbezug weiterer potenzieller Einflussfaktoren zeigten nur CpG1, 2, 8 und 10 signifikante Ergebnisse ($0,018 < p < 0,030$). Als weitere Risikofaktoren für die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme konnten das Ausgangsgewicht ($p = 0,000$), das Geschlecht ($p = 0,000$), das Therapieansprechen ($0,022 < p < 0,049$), die Art der Medikation ($0,009 < p < 0,017$) sowie der MC4R-Genotyp ($p = 0,001$) identifiziert werden.

Betrachtete man die Zusammenhänge zwischen Methylierung, Gewichtszunahme und den eben erwähnten weiteren signifikanten Einflussfaktoren im Einzelnen, wurde deutlich, dass die Unterschiede der Gewichtszunahme in Bezug auf den Methylierungsstatus in der Gruppe der Patienten mit Clozapin- oder Olanzapin-Therapie begründet waren. In **Abbildung 67** sind die Ergebnisse der statistischen Auswertung aller Patienten ≤ 50 Jahren differenziert nach Hoch- und Niedrigrisiko-Therapie exemplarisch für CpG1 dargestellt. Für die anderen neun CpG-Stellen waren die Zusammenhänge ähnlich. Patienten mit Hochrisiko-Therapie und sehr niedrigen Methylierungsleveln nahmen besonders viel Gewicht zu. Im Gegensatz dazu verhielt sich die Gewichtszunahme bei Patienten mit einer Medikation mit niedrigerem Risiko für eine Gewichtszunahme als Nebenwirkung unabhängig vom Methylierungsstatus relativ konstant. In Bezug auf die anderen Kofaktoren konnten keine direkten Zusammenhänge mit der Gewichtszunahme unter bestimmten Methylierungsleveln gefunden werden.

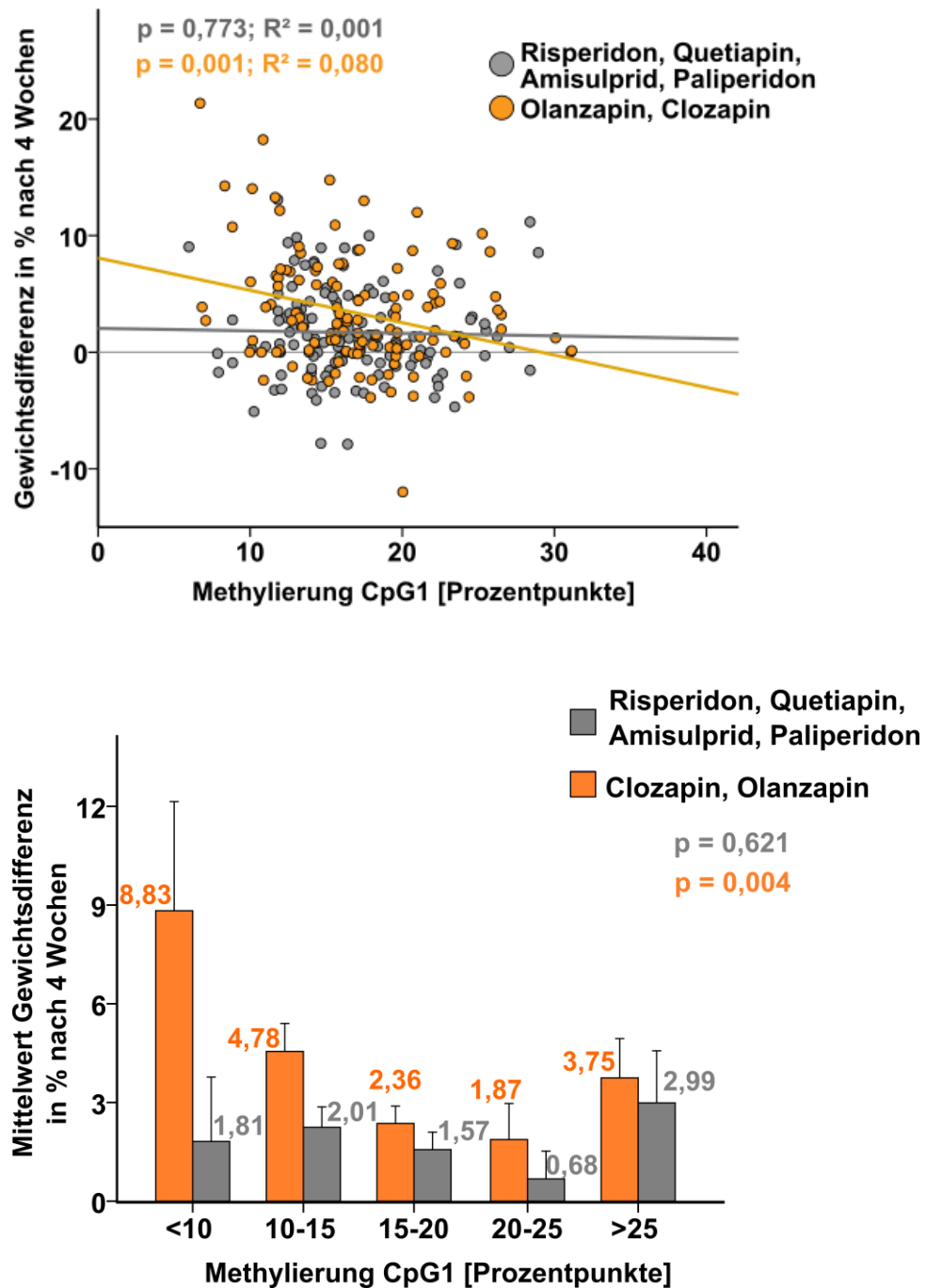


Abbildung 67: Darstellung der prozentualen Gewichtsänderung in Abhängigkeit der Methylierung von CpG1 für alle Patienten ≤ 50 Jahren differenziert nach Medikation: Darstellung der Einzelwerte und Analyse mittels linearer Regression (oben). Darstellung der Mittelwerte gruppierter Methylierungslevel und Analyse mittels ANOVA (unten). Patienten mit Clozapin- oder Olanzapin-Therapie und niedrigen Methylierungsleveln (< 10 Prozentpunkte) nahmen nach vierwöchiger Therapie signifikant am meisten Gewicht zu.

Tabelle 48: Übersicht über ausgewählte Gewichtsparameter für alle Patienten ≤ 50 Jahren mit Clozapin- oder Olanzapin-Therapie in Abhängigkeit von dem Methylierungsstatus von CpG1: Patienten mit niedrigen Methylierungsleveln (< 10 Prozentpunkte) nahmen nach vierwöchiger Therapie signifikant am meisten Gewicht zu ($p = 0,004$).

Methylierung [Prozentpunkte]	n	Ausgangsgewicht	abs. Gewichtszunahme nach 4 Wochen [kg]	rel. Gewichtszunahme nach 4 Wochen [%]
<10	6	69,6	5,35	8,83
10-15	34	70,4	3,30	4,78
15-20	53	75,9	1,60	2,36
20-25	22	73,1	1,15	1,87
>25	9	70,2	2,54	3,75

Des Weiteren wurde getestet, in wie weit der Methylierungsstatus mit dem Zeitpunkt der Blutentnahme zusammenhing. Sollte die Methylierung eine Folge der Gewichtszunahme sein, könnten Patienten, die vor der Blutentnahme schon längere Zeit Medikamente bekommen und schon Gewicht zugenommen hatten, höhere Methylierungslevel aufweisen.

Der Zeitpunkt der Blutentnahme war für 317 der 346 Patienten bekannt. Im Schnitt erfolgte diese 18 Tage nach Therapiebeginn. In die Analyse wurden nur Patienten mit deutlicher Gewichtszunahme aufgenommen. Diese wurde definiert als eine Gewichtszunahme von mindestens 7% des Körpergewichts nach vier Wochen Therapie ($n = 53$).²⁶⁸ Es wurde getestet, ob Patienten, denen Blut zu einem späteren Therapiezeitpunkt abgenommen wurde, höhere Methylierungswerte aufwiesen als Patienten, denen vor oder zu Beginn der Antipsychotika-Therapie Blut abgenommen worden war. Hierbei konnte allerdings keine Korrelation zwischen der Therapiedauer bis zur Blutentnahme und dem Methylierungsstatus nachgewiesen werden (Pearson-Korrelation: $0,242 < p < 0,945$; Spearman-Korrelation: $0,106 < p < 0,226$). **Abbildung 68** zeigt das Streudiagramm der gemessenen Methylierungswerte in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Blutabnahme am Beispiel von CpG1.

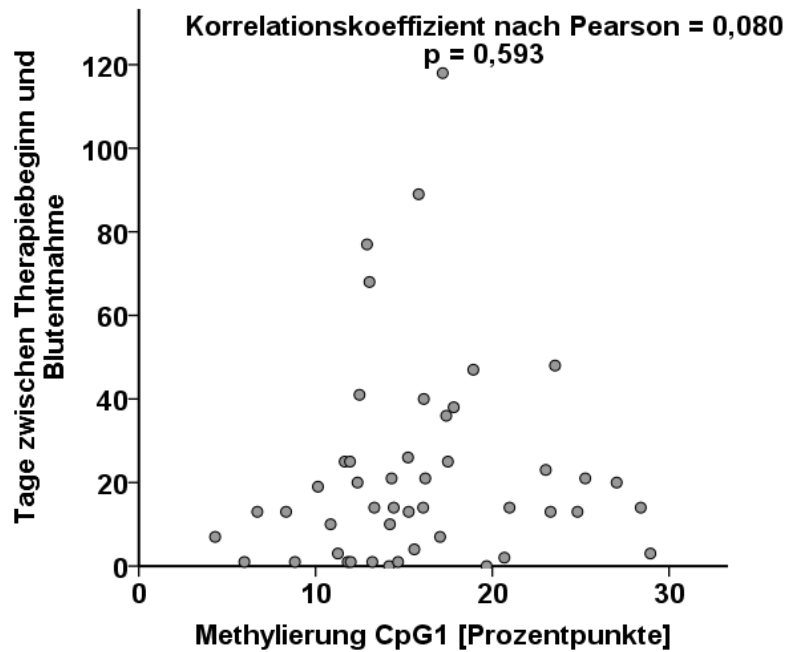


Abbildung 68: Darstellung der Methylierung von CpG1 in Bezug auf den Zeitraum in Tagen zwischen Therapiebeginn und Blutentnahme: Es konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden.

3.6.4 Stabilität von Methylcytosin

Aus der vorliegenden Studienpopulation wurde in Bezug auf eine Patientenprobe die extrahierte DNA, die im Kühlschrank und die bei -70 °C gelagert war, sequenziert und verglichen. Zudem wurden aus bei -70 °C und bei -20 °C eingefrorenen Blutproben DNA neu extrahiert und sequenziert.

Um die direkte Stabilität im Blut zu testen, wurden von zehn Probanden Blutproben entnommen und unter verschiedenen Bedingungen gelagert.¹⁶⁶ Es wurden Aliquots bei -70 °C und bei -20 °C eingefroren. Ein Aliquot wurde bei Raumtemperatur und ein Aliquot bei $2-8\text{ °C}$ im Kühlschrank gelagert. Ein Aliquot wurde ebenfalls bei -70 °C eingefroren und einmal in der Woche aufgetaut. Alle Proben wurden jeweils nach einem, nach drei und nach zehn Monaten extrahiert und sequenziert. Zudem wurde jede Probe direkt nach Blutentnahme sequenziert, um die initiale Methylierung zu bestimmen. Die Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

Vergleichsmessung der Studienpopulation

In Bezug auf die DNA-Extrakte wurden 44 verschiedene Patientenproben untersucht. Die DNA der

Blutproben wurde direkt nach Blutentnahme extrahiert. Eine Probe wurde im Kühlschrank, eine Probe wurde bei -70 °C gelagert. Der Lagerungszeitraum betrug zwischen acht und 15 Jahren. Der Vergleich des Methylierungsstatus der extrahierten DNA, die im Kühlschrank und bei -70 °C im Gefrierschrank gelagert wurden, zeigte insgesamt einen signifikanten Unterschied (T-Test) (**Tabelle 49**). Die gefrorenen Proben wiesen im Mittel niedrigere Methylierungswerte auf ($-0,841$ Prozentpunkte $\pm 3,52$). Bei Betrachtung der einzelnen CpG-Stellen zeigten sich für CpG1, 2, 5, 8 und 10 ebenfalls signifikante Unterschiede.

Tabelle 49: Mittelwertvergleich mittels T-Test für die Methylierung der extrahierten DNA der Patientenproben nach Lagerung im Kühlschrank und bei -70 °C ; KS = Kühlschrank

CpG-Stelle	n	Mittelwert KS	Mittelwert -70 °C	abs Abweichung [Prozentpunkte] \pm SD	rel Abweichung [%] \pm SD	p-Wert (T-Test)
CpG1	42	16,4	15,5	$-0,898 \pm 2,67$	$-3,64 \pm 15,3$	0,035
CpG2	44	40,7	39,1	$-1,56 \pm 4,17$	$-3,43 \pm 10,4$	0,017
CpG3	44	8,31	8,15	$-0,158 \pm 2,13$	$2,86 \pm 30,8$	0,624
CpG4	44	3,91	3,98	$0,077 \pm 1,62$	$15,4 \pm 49,3$	0,754
CpG5	38	18,0	17,0	$-0,975 \pm 2,87$	$-4,70 \pm 15,0$	0,043
CpG6	44	40,5	39,9	$-0,558 \pm 4,28$	$-1,33 \pm 10,6$	0,392
CpG7	44	17,8	17,5	$-0,366 \pm 3,36$	$0,297 \pm 20,8$	0,474
CpG8	44	70,6	69,2	$-1,383 \pm 4,39$	$1,84 \pm 8,58$	0,043
CpG9	44	49,1	48,0	$-1,12 \pm 4,30$	$-1,89 \pm 8,71$	0,091
CpG10	44	44,0	42,5	$-1,49 \pm 3,93$	$3,29 \pm 8,96$	0,016
CpG gesamt	432	31,2	30,3	$-0,841 \pm 3,52$	$0,08 \pm 22,3$	0,000

Signifikante p-Werte sind in rot dargestellt.

Die Ergebnisse des T-Tests ließen darauf schließen, dass sich der Methylierungsstatus der im Kühlschrank gelagerten und der bei -70 °C gefrorenen Proben signifikant voneinander unterscheidet. Allerdings waren die absoluten Unterschiede sehr gering. Die im Kühlschrank gelagerten Proben hatten in der Regel etwas höhere Methylierungslevel als die eingefrorenen Proben. Die durchschnittliche Abweichung für alle CpG-Stellen lag absolut bei $0,841$ Prozentpunkten Methylierung und relativ bei $0,08\%$. Für CpG2 war die Abweichung mit absolut $1,56$ Prozentpunkten und relativ $3,43\%$ am Größten.

Um herauszufinden, ob die Proben beider Lagerungsarten trotz signifikantem T-Test gleich behandelt werden und in die Analyse einfließen konnten, wurde ein Bland-Altman-Plot erstellt.^{220, 221} Die absoluten Differenzen der Messwerte der gleichen Patientenprobe bei Kühlschranks- und -70 °C-Lagerung wurde gegen den jeweiligen Mittelwert in einem Punktdiagramm aufgetragen. Die mittlere Differenz sowie die mittlere Differenz $\pm 2SD$ wurden eingezeichnet. Bei einer hinreichend symmetrischen Verteilung der Differenzen liegen 95% der Punkte innerhalb dieser Übereinstimmungsgrenzen (= 95%-Konfidenzintervall) (**Abbildung 69**).

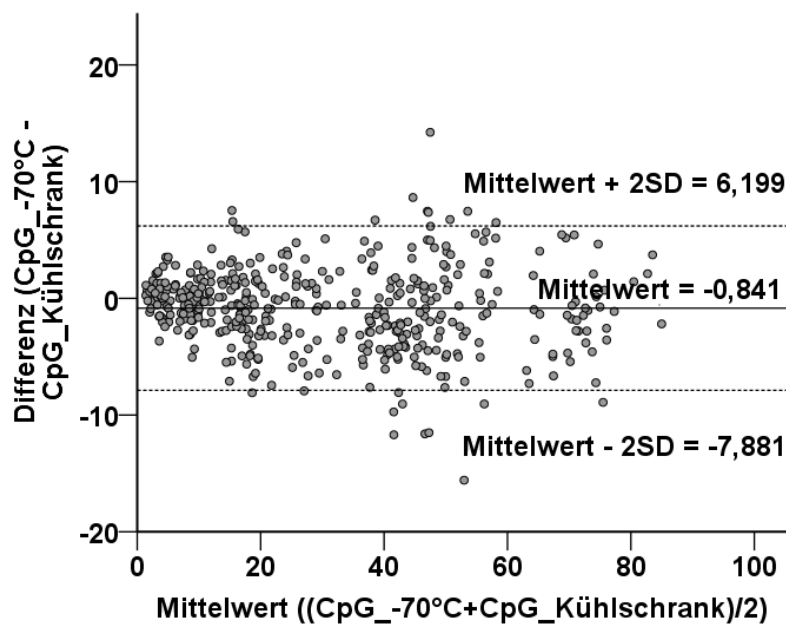


Abbildung 69: Bland-Altman-Plot für alle CpG-Stellen; Vergleich Kühlschranks- und gefrorene Proben: Darstellung der Differenzen der Messwerte einer Probe bei Kühlschranks- und -70 °C-Lagerung gegen deren Mittelwerte: Es zeigt sich eine gleichmäßige Streuung um die Nulllinie.

Es zeigte sich, dass die Mehrheit der Punkte innerhalb dieses Übereinstimmungsbereichs lag. 20 von insgesamt 432 Datenpunkten lagen außerhalb, dies entsprach 4,6%. Zudem war erkennbar, dass sich die Datenpunkte gleichmäßig um den Mittelwert bzw. den Nullwert verteilten. Es war kein *Bias* in Richtung positiven oder negativen Differenzen erkennbar. Die absoluten Differenzen wurden mit zunehmenden Absolutwerten ebenfalls größer. 95% der Messwertdifferenzen streuten in einem Bereich von +6,199 bis -7,881 Prozentpunkten Methylierung. Da diese Abweichungen der absoluten Messwerte zwischen im Kühlschrank und bei -70 °C gelagerten Proben in etwa im Rahmen der Messgenauigkeit von ± 5 Prozentpunkten lagen und kein systematischer Fehler in die eine oder andere Richtung erkennbar war, wurden die Proben als gleichwertig angesehen und für die Analyse verwendet.

In einem weiteren Schritt wurden DNA aus, bei -20 und -70 °C gefrorenen, Blutproben neu extrahiert und mit den gelagerten DNA-Extrakten verglichen. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Die nachextrahierte DNA hatte in der Regel einen höheren Methylierungslevel als die gelagerten DNA-Extrakte. Für alle CpG-Stellen insgesamt betrachtet war dieser Unterschied signifikant ($p = 0,000$) (**Tabelle 50**). Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei getrennter Betrachtung der einzelnen CpG-Stellen: In Bezug auf die bei -70 °C gelagerten Proben zeigten lediglich CpG5 und 8 keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,101/0,289$). Für die bei -20 °C gelagerten Proben war dies für CpG 1, 5, 7 und 8 der Fall ($0,135 < p < 0,297$). Bei gemeinsamer Betrachtung aller eingefrorenen Proben (-20 °C und -70 °C) zeigten alle CpG-Stellen signifikante Unterschiede zu den DNA-Extrakten (die Ergebnisse der T-Tests differenziert nach CpG-Stelle sind hier nicht dargestellt). Insgesamt unterschieden sich die Werte der Blutproben, die bei -70 °C gelagert waren, etwas stärker von der extrahierten DNA als die Proben, die bei -20 °C eingefroren waren. Während der absolute Unterschied der Methylierung im Schnitt weniger als 2 Prozentpunkte betrug, machte dies prozentual einen Unterschied von durchschnittlich 13% aus (**Tabelle 50**).

Tabelle 50: T-Test für die gelagerte extrahierte DNA und die nachextrahierten Blutproben

Lagerung der Blutprobe	n	Mittelwert DNA-Extrakt	Mittelwert Blutproben nachextrahiert	abs Abweichung [Prozentpunkte] ± SD	rel Abweichung [%] ± SD	p-Wert (T-Test)
-70 °C	388	29,63	31,47	1,84 ± 4,89	13,5 ± 32,9	0,000
-20 °C	398	32,11	33,39	1,28 ± 3,43	8,80 ± 28,9	0,000
Gesamt	786	30,88	32,44	1,56 ± 4,22	11,1 ± 31,0	0,000

Signifikante p-Werte sind in rot dargestellt.

Auch hier wurden die entsprechenden Bland-Altman-Plots erstellt (**Abbildung 70**). Es war zu erkennen, dass auch in diesem Fall, die Messwertdifferenzen relativ gleichmäßig um den Mittelwert streuten, allerdings lagen über 5% der Messwerte außerhalb des Übereinstimmungsbereichs. Die Betrachtung der Diagramme ließ auch hier nicht darauf schließen, dass ein *Bias* in Richtung höherer Methylierungswerte der, aus den gelagerten Blutproben nachextrahierten, DNA vorlag. In Bezug auf die Nulllinie ist zwar erkennbar, dass die Mehrheit der Differenzen im positiven Bereich lag, die nachextrahierte DNA somit in den meisten Fällen einen höheren Methylierungswert aufwies. Dies spiegelte sich auch in der mittleren Differenz wieder (1,84 bzw. 1,28 Prozentpunkte). Allerdings streuten einige Messwerte auch erheblich in den negativen Bereich. Die Einschätzung einer systematischen

Änderung ist daher eher schwierig. Nach gemeinsamer Betrachtung der T-Tests und der Bland-Altman-Plots kann daher nur vermutet werden, dass die neu extrahierte DNA generell einen höheren Methylierungsstatus aufweist.

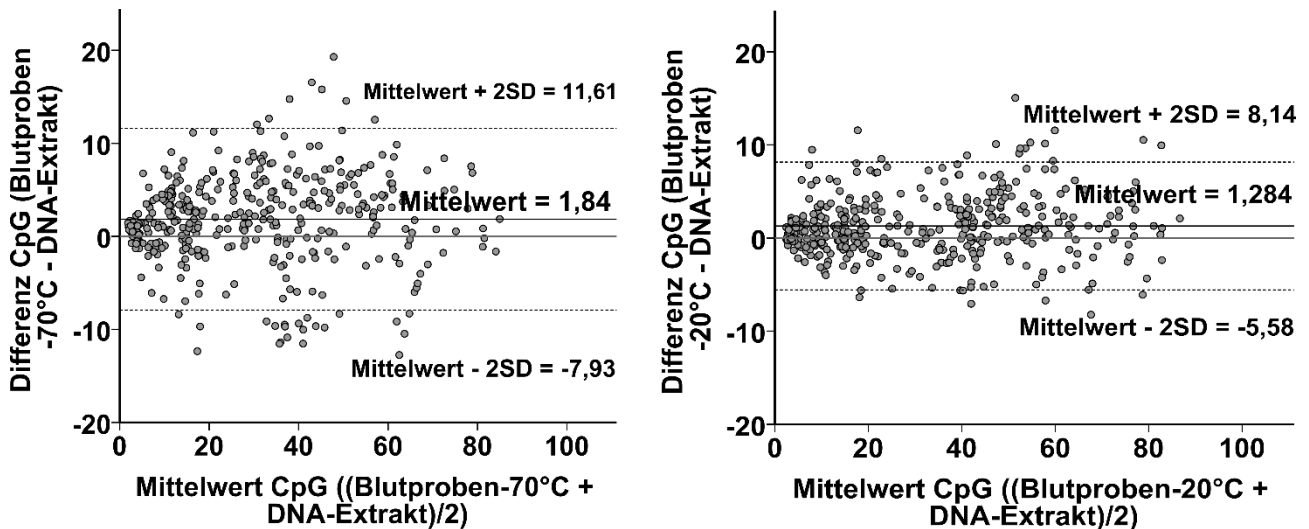


Abbildung 70: Bland-Altman-Plots für den Vergleich zwischen gelagerten DNA-Extrakten und aus gelagerten Blutproben extrahierter DNA (links: -70 °C; rechts: -20 °C): Für beide Lagerungsbedingungen ist eine relativ gleichmäßige Streuung der Messwertdifferenzen um den Mittelwert erkennbar. Insgesamt scheinen die Datenpunkte leicht in den positiven Bereich verschoben zu sein.

Stabilitätsuntersuchung mit frisch entnommenen Blutproben

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde das Blut von zehn freiwilligen Probanden verwendet.¹⁶⁶ Dieses wurde jeweils initial nach Blutabnahme (T_0), sowie nach einem, drei und zehn Monaten Lagerung unter verschiedenen Bedingungen sequenziert. Insgesamt wurden zehn verschiedene CpG-Stellen untersucht. Eine Übersicht über die mittleren Methylierungslevel sowie die mittleren absoluten Änderungen aller CpG-Stellen in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen zeigen **Tabelle 51** sowie **Abbildung 71**. Die Ergebnisse differenziert nach den einzelnen CpG-Stellen können **Anhang 9.8** entnommen werden. Der Mittelwertvergleich mittels T-Test zwischen dem Messwert zum Zeitpunkt T_0 und einem, drei bzw. zehn Monaten zeigte bei der Gesamtheit aller CpGs für alle Lagerungsbedingungen eine signifikante Änderung der Methylierungslevel. Auch bei Betrachtung der einzelnen CpG-Stellen unterschieden sich die Messwerte vor allem nach zehn Monaten signifikant voneinander (**Anhang 9.8**). So war die gemessene Methylierung nach längerer Lagerung signifikant höher. Der höchste Wert wurde, außer bei der Lagerung im Kühlschrank (2-8 °C), nach zehn Monaten Lagerung erreicht. Der Verlauf der Methylierungslevel der bei -20 °C, bei Raumtemperatur und der einmal wöchentlich aufgetauten Proben war nahezu gleich. Hier nahm die Methylierung nach einem und drei

Monaten nur leicht zu, nach zehn Monaten war jedoch ein sehr deutlicher Anstieg erkennbar. Die bei -70 °C gefrorenen Proben zeigten im Vergleich dazu nach einem Monat niedrigere, nach drei und zehn Monaten allerdings etwas höhere Methylierungswerte. Allerdings variierten die mittleren Methylierungslevel der Proben dieser vier Lagerungsbedingungen im Rahmen von 2,3 Prozentpunkten, bei Standardabweichungen von 4,62 bis 5,61 Prozentpunkten. Wir haben den Anstieg der Methylierung für diese Lagerungsbedingungen daher als vergleichbar angesehen. Bei den Proben, die im Kühlschrank gelagert wurden, zeigten die Methylierungslevel im Vergleich zu den anderen Lagerungsbedingungen einen weniger starken Anstieg. Zwar war das Methylierungslevel nach zehn Monaten immer noch deutlich höher als zu Beginn. Allerdings war das Maximum hier schon nach einem Monat erreicht, anschließend nahmen die Methylierungslevel wieder ab.

Abbildung 72 zeigt die Bland-Altman-Plots differenziert nach Lagerbedingungen. Es zeigte sich bei allen Plots nach längerer Lagerung eine Verzerrung in Richtung höherer Methylierungswerte. Dieser war auch für die im Kühlschrank gelagerten Proben zu erkennen. Während der Mittelwert hier auf keine Änderung der Methylierung nach zehn Monaten Lagerung hindeutete, ließ die Betrachtung der einzelnen Messwerte im Bland-Altman-Plot auch hier auf eine systematische Erhöhung der Methylierung schließen. Einzelne Ausreiser in den negativen Bereich waren der Grund, weshalb die mittlere Änderung niedrig war. In Bezug auf alle Lagerungsbedingungen war erkennbar, dass die Differenzen nach einmonatiger Lagerung noch recht gleichmäßig um den Mittelwert streuten (grün), nach drei Monaten Lagerung (gelb) waren schon einige Ausreiser in Richtung höhere Methylierungswerte erkennbar. Nach zehn Monaten (rot) verstärkte sich dieser Effekt deutlich. Für alle Lagerungsbedingungen zeigten sich mit zunehmender Lagerzeit größere Streuungen der Messwert in Bezug zu der Messung zum Zeitpunkt T_0 und daraus resultierend größere 95%-Konfidenzintervalle.

Tabelle 51: Übersicht über die mittleren Methylierungslevel [Prozentpunkte] aller Messzeitpunkte und mittleren absoluten Änderungen aller CpG-Stellen nach einem, drei und zehn Monaten (M) Lagerung in Bezug auf den Zeitpunkt T_0 und in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen sowie p-Werte der T-Tests: Für fast alle Bedingungen zeigten sich signifikant höhere Methylierungslevel mit zunehmender Lagerzeit. Nur die Proben, die für einen Monat bei -70 °C gelagert wurden, zeigten niedrigere Methylierungswerte. Dieser Effekt war jedoch nicht signifikant; RT = Raumtemperatur.¹⁶⁶

Lagerung	T_0	1 M	Dif abs 1 M	p- Wert	3 M	Dif abs 3 M	p- Wert	10 M	Dif abs 10 M	p-Wert
-70 °C	29,5	29,3	-0,179	0,524	33,7	+4,20	<0,001	38,0	+8,52	<0,001
-20 °C	29,5	31,1	+1,61	<0,001	31,1	+1,62	0,001	36,9	+7,40	<0,001
RT	29,5	30,5	+1,01	0,004	30,9	+1,43	0,010	36,8	+7,33	<0,001
$2-8\text{ °C}$	29,5	33,5	+4,03	<0,001	32,9	+3,38	<0,001	31,8	+2,33	0,001
-70 °C/RT	29,5	30,8	+1,32	<0,001	31,1	+1,59	0,002	35,7	+6,22	<0,001

Signifikante p-Werte sind in rot dargestellt.

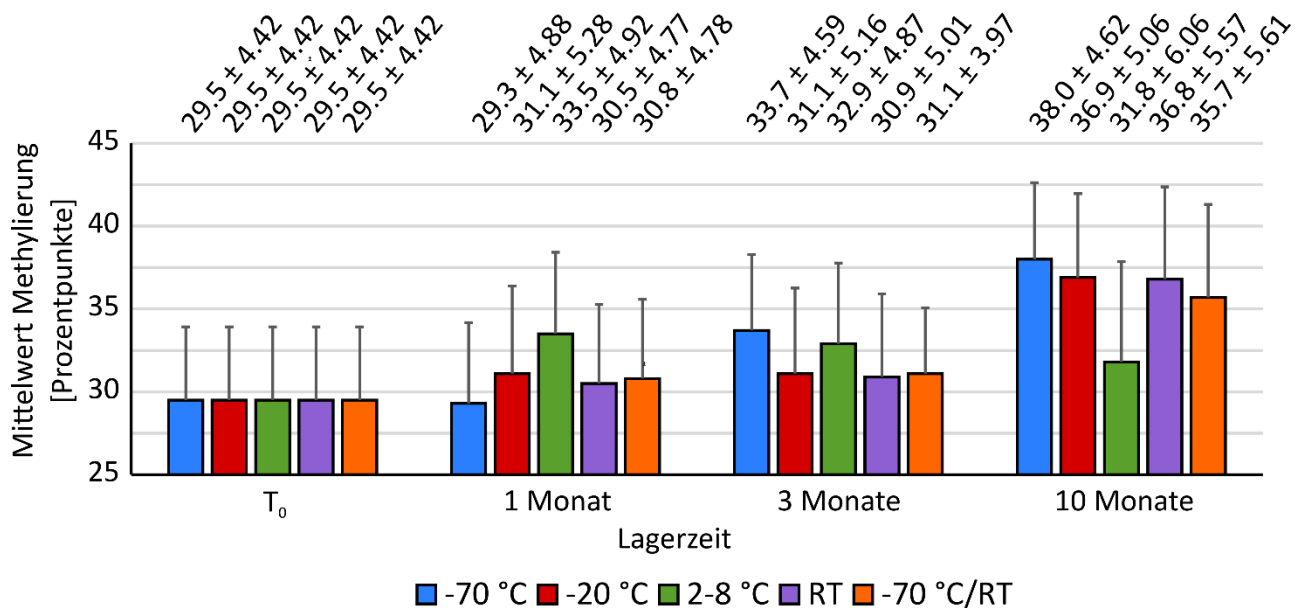


Abbildung 71: Darstellung der mittleren Methylierungslevel aller CpG-Stellen direkt nach Blutabnahme sowie nach einem, drei und zehn Monaten Lagerung in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen: Die Methylierung steigt außer bei Lagerung im Kühlschrank ($2-8\text{ °C}$) mit zunehmender Lagerzeit kontinuierlich an.¹⁶⁶

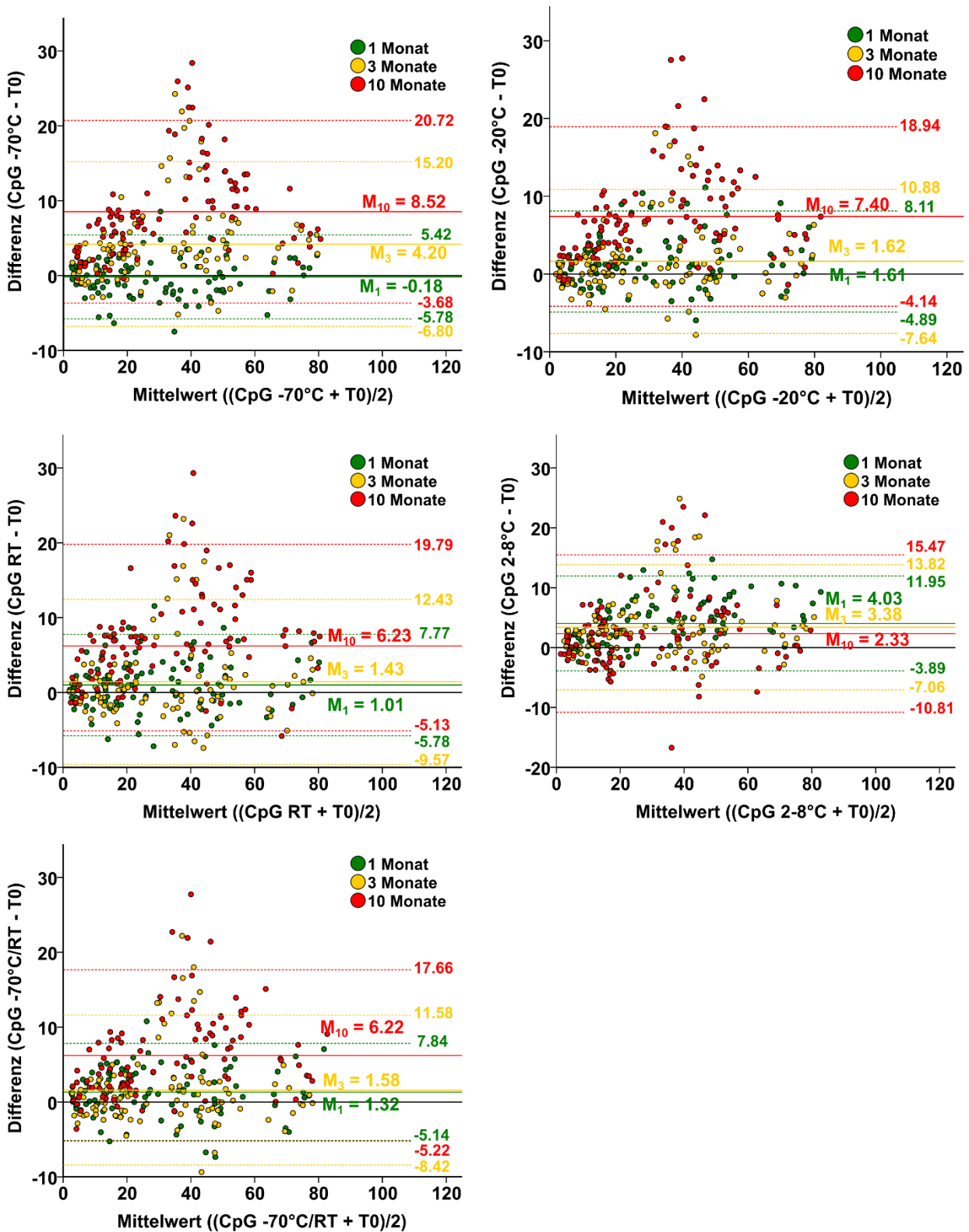


Abbildung 72: Bland-Altman-Plots der Messwerte in Abhängigkeit der verschiedenen Lagerungsbedingungen: Dargestellt sind die Differenzen der Messwerte nach einem (grün), drei (gelb) und zehn Monaten (rot) und dem Zeitpunkt T_0 in Bezug auf die entsprechenden Mittelwerte. Weiterhin sind die jeweiligen Mittelwerte (M) der Differenzen (durchgezogene Linien) und $M \pm 2SD$ (gepunktete Linien) eingezeichnet. $M \pm 2SD$ entspricht dem Übereinstimmungsbereich bzw. 95% Konfidenzintervall.¹⁶⁶

Zudem wurde beobachtet, dass sich die Extraktion der DNA mit zunehmender Lagerzeit schwieriger gestaltete. Oft musste die Zellyse zweimal durchgeführt werden, um eine adäquate Menge Zellkerne zu gewinnen. Besonders nach zehn monatiger Lagerung war es schwer, noch ausreichend DNA für die Bisulfit-Konvertierung und Sequenzierung zu extrahieren. Während nach einmonatiger Lagerung eine einmalige Zellyse ausreichte, musste dieser Schritt nach zehnmonatiger Lagerung bei allen Proben wiederholt werden, um ausreichend DNA zu erhalten. Bei den Proben, die drei Monate lagerten, variierte die Durchführung der Zellyse. Es wurde nach der ersten Zellyse empirisch entschieden, ob eine Wiederholung notwendig war. Die Vergleichbarkeit dieser Proben untereinander war daher nicht mehr gegeben, sodass diese Proben aus der folgenden Auswertung herausgenommen wurden. Einen Überblick über die Entwicklung der DNA-Ausbeuten in Abhängigkeit von den Lagerungsbedingungen und -zeiten gibt **Abbildung 73**.

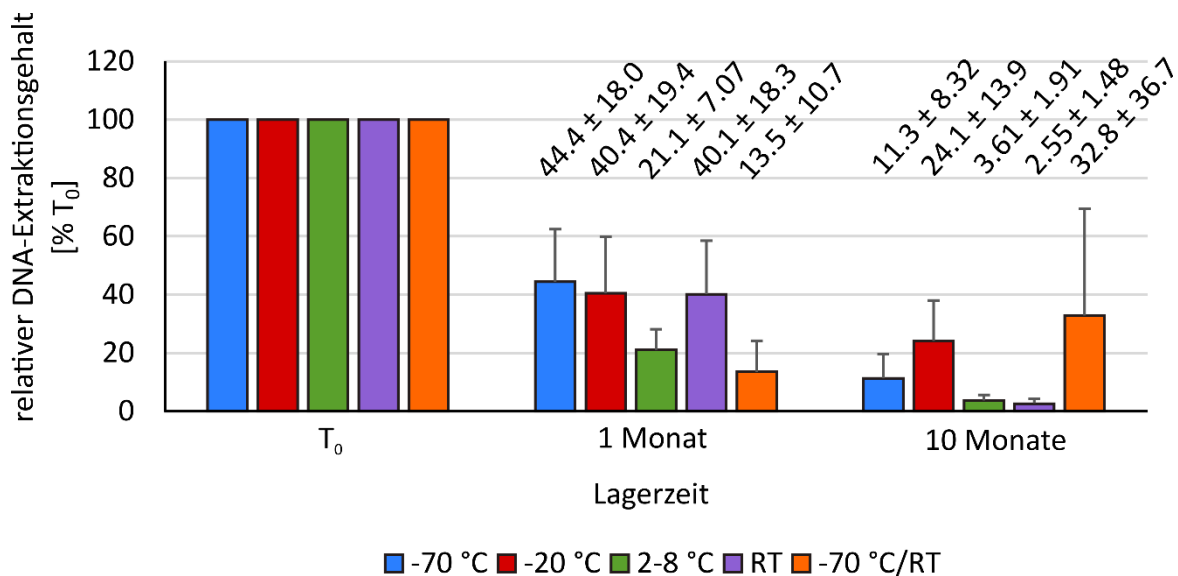


Abbildung 73: relative DNA-Ausbeute nach Extraktion in Bezug auf die Ausbeute zum Zeitpunkt T₀ in Abhängigkeit von Lagerungsbedingung und -zeitraum: Die Ausbeuten nehmen für fast alle Lagerungsbedingungen mit zunehmender Lagerzeit kontinuierlich ab.¹⁶⁶

Die DNA-Ausbeuten nahmen für alle Lagerungsbedingungen mit zunehmender Zeit im Vergleich zum Zeitpunkt T₀ kontinuierlich ab. Lediglich die gefrorenen Proben, die einmal wöchentlich aufgetaut wurden, zeigten nach zehn Monaten höhere Ausbeuten. Allerdings war hier die Standardabweichung mit 36,7% vergleichsweise hoch. Für alle Proben konnte nach zehn monatiger Lagerung nur noch sehr geringe Ausbeuten erhalten werden.¹⁶⁶

Die relativen Extraktionsausbeuten nach zehn Monaten für die bei -70 °C und -20 °C gelagerten Proben sowie die gefrorenen und einmal wöchentlich aufgetauten Proben lagen zwischen 11,3 und 32,8% und unterschieden sich untereinander nicht signifikant ($0,106 < p < 0,556$). Die im Kühlschrank und bei Raumtemperatur gelagerten Proben zeigten im Gegensatz dazu signifikant niedrigere Ausbeuten ($0,002 < p < 0,038$). Diese waren mit 3,61 und 2,55% beispielsweise um rund 70-75% geringer als die Ausbeute der bei -70 °C gelagerten Proben (11,3%). Untereinander können die Ergebnisse der im Kühlschrank und bei Raumtemperatur gelagerten Proben als vergleichbar angesehen werden, der T-Test zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,360$).¹⁶⁶

4 Diskussion

4.1 *Klinische Interaktionen und Wechselwirkungen*

Geschlecht

In der Studienpopulation konnte ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Gewichtszunahme nach vier Wochen Antipsychotika-Therapie nachgewiesen werden ($p = \mathbf{0,005}$). Männer zeigten eine signifikant höhere Gewichtszunahme als Frauen ($2,0 \pm 3,7$ kg vs. $1,0 \pm 2,9$ kg). Die Studienlage zum Geschlecht als klinischen Einflussfaktor ist nicht eindeutig. So vermuten einige Studien eine stärkere Gewichtszunahme für das weibliche Geschlecht, andere Studien konnten keinen eindeutigen Einfluss des Geschlechts auf die Gewichtszunahme identifizieren.^{61, 62, 253, 269} Eine signifikant stärkere Gewichtszunahme für Männer ist in der Literatur nicht beschrieben. Diese heterogene Datenlage deutet darauf hin, dass der Einfluss des Geschlechts in dieser Studienpopulation populationspezifisch zu sein scheint.

Art der Medikation

Die von Leucht et al. vorgenommene Klassifizierung der Antipsychotika in Bezug auf deren Risiko Gewichtszunahme auszulösen wurde in dieser Studienpopulation bestätigt.²⁵ So wurde eine signifikant höhere Gewichtszunahme unter Patienten mit Clozapin- und Olanzapin-Therapie beobachtet als bei Patienten, die ein anderes Atypikum erhielten ($2,7\%$ vs. $1,7\%$; $p = \mathbf{0,037}$). Da die Gewichtszunahme als Nebenwirkung bei diesen Patienten am Bedeutendsten erscheint, wurden der Einfluss der getesteten Marker zusätzlich separat in der Gruppe der Patienten mit Clozapin- und Olanzapin-Therapie überprüft.^{270, 271}

Ausgangsgewicht / Ausgangs-BMI

Der in dieser Studienpopulation stark ausgeprägte Zusammenhang zwischen dem Ausgangsgewicht bzw. dem Ausgangs-BMI und der Gewichtszunahme nach vier Wochen ($p < \mathbf{0,001}$) ist in anderen Studien bereits beschrieben.^{272, 273} So fanden Lee et al. heraus, dass ein niedriger Ausgangs-BMI von < 25 kg/m² mit einem signifikant erhöhten Risiko für Gewichtszunahme besonders zu Therapiebeginn einhergeht.⁶²

Alter

Auch für das Alter konnte ein signifikanter Zusammenhang mit der Gewichtszunahme in der Studienpopulation gefunden werden. So zeigten jüngere Patienten eine höhere Gewichtszunahme unter

Antipsychotika-Therapie ($p = 0,022$). Diese Korrelation war allerdings deutlich schwächer ausgeprägt als die Korrelation der anderen Einflussfaktoren. Auch andere Studien konnten diese Korrelation zwischen jungen Patienten und hoher Gewichtszunahme nachweisen.^{62, 253, 273, 274}

Der genaue Mechanismus wie Alter und Ausgangsgewicht auf die Gewichtszunahme Einfluss nehmen ist noch nicht eindeutig geklärt, allerdings konnten Kinon et al. zeigen, dass Patienten mit einem jungen Alter und niedrigerem Ausgangsgewicht unter Antipsychotika-Therapie einen größeren Appetit entwickelten.⁷⁰ Die große Übereinstimmung der Studienergebnisse lässt zumindest auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Alter, Ausgangsgewicht und Antipsychotika-induzierter Gewichtszunahme schließen.

Therapieansprechen

Zahlreiche Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen Therapieansprechen und dem Auftreten von Gewichtszunahme als Nebenwirkung.^{254, 275} Agid et al. stellten sogar die Hypothese auf, dass die Gewichtszunahme zu Beginn der Psychopharmakotherapie als Marker für die Effizienz verwendet werden kann.²⁷⁶ Während die Gesamtpopulation nur einen Trend in diese Richtung zeigte ($p = 0,067$), war dieser Effekt in der adjustierten Subpopulation signifikant ($p = 0,009$). Dieser Zusammenhang konnte allerdings nur für eine Unterscheidung zwischen Therapieansprechen und Nicht-Therapieansprechen nachgewiesen werden (CGI 2-Werte = 1/2 vs. CGI 2-Werte > 2). In Bezug auf die Differenz der CGI-Werte vor und nach vierwöchiger Therapie war kein signifikanter Zusammenhang nachweisbar. Dieser nur schwache Effekt stimmt überein mit den Ergebnissen von Hermes et al., die im Rahmen der *Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness* (CATIE)-Studie publiziert wurden. Die Autoren konnten zwar einen signifikanten aber nur sehr geringen Effekt nachweisen.²⁷⁷

MC4R

Im Rahmen seiner Doktorarbeit konnte Dr. Fabian Czerwensky den Polymorphismus rs17782313 im MC4R-Gen in dieser Studienpopulation als möglichen Risikofaktor für eine Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme identifizieren.^{66, 68} Der Polymorphismus befindet sich 180 Kilobasen *downstream* des MC4R-Gens und stellt eine Punktmutation von Thymin zu Cytosin dar. Träger des Risikoallels C nahmen nach vier Wochen Atypika-Therapie signifikant mehr Gewicht zu als Träger des Wildtyp-Allels T (Gesamtpopulation: $p = 0,025$; adjustierte Subpopulation: $p = 0,001$). Dieser Polymorphismus wurde daher als Kofaktor in die Analysen dieser Arbeit aufgenommen. Auch der

Polymorphismus MC4R rs489693 war in mehreren Studien mit Antipsychotika-induzierter Gewichtszunahme assoziiert.^{67, 89, 91} Da er jedoch im Vergleich zu rs17782313 in dieser Studienpopulation einen geringeren Zusammenhang aufwies und sich beide Polymorphismen in einem starken LD befinden, wurde im Rahmen der Auswertung nur rs17782313 berücksichtigt.

4.2 pharmakogenetische Einflüsse auf die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme

4.2.1 TSPO

Das TSPO-Gen codiert für das *Translocator Protein*, ein Transmembranprotein der äußeren Mitochondrienmembran. Bislang ist der genaue molekulare Mechanismus noch nicht exakt geklärt, jedoch wird TSPO mit zahlreichen Krankheiten, unter anderem auch mit Schizophrenie, in Verbindung gebracht.²⁷⁸⁻²⁸⁰ Außerdem soll es bei der Gewichtsregulation von Bedeutung sein.^{78, 79}

Im Rahmen einer Kollaboration mit dem Arbeitskreis von Prof. Müller (Department of Psychiatry der University of Toronto) wurden TSPO rs6971 und rs6973 in Bezug auf Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme untersucht. Eine vorrausgegangen Studie, in der 28 verschiedene Mitochondrien-Gene untersucht wurden, konnte hierzu einen Zusammenhang feststellen.⁸³ Weitere Studien bezüglich dieser Fragestellung sind nicht bekannt.

rs6971

In unserer Studienpopulation konnte auch bei den Patienten mit Hochrisiko-Medikation ($p = 0,794$) für rs6971 kein signifikanter Zusammenhang mit dem Gewicht festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu wurde in den anderen, an der Studie teilnehmenden Population, ein signifikanter Effekt gefunden. In der Population aus Toronto zeigten T-Allel-Träger mit Clozapin- oder Olanzapin-Medikation eine signifikante höhere Gewichtszunahme ($C/C = 3,23 \pm 4,5\%$, $C/T = 5,17 \pm 6,3\%$, $T/T = 8,09 \pm 6,1\%$; $p = \mathbf{0,040}$). Auch in der RUPP-Population, in der die Patienten mit Risperidon behandelt wurden, war das T-Allel mit einer höheren BMI-Zunahme assoziiert ($C/C = 0,55$, $C/T = 0,68$, $T/T = 0,68$; $p = \mathbf{0,003}$).

Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Mehrheit unserer Studienpopulation mit Antipsychotika vorbehandelt war, während die Patienten der Vergleichspopulationen zum ersten Mal eine antipsychotische Therapie bekamen. Allerdings konnte in unserer Studienpopulation auch bei den naiven Patienten ($n = 90$; $p = 0,112$) sowie den naiven Patienten mit Clozapin- oder Olanzapin-Behandlung ($n = 53$; $p = 0,124$) ebenfalls kein Zusammenhang gefunden werden. Es scheint demnach, dass es andere Gründe für die abweichenden Studienergebnisse gibt.

Zumindest die RUPP-Population, in der ein stark signifikanter Zusammenhang gefunden wurde, unterscheidet sich stark von den anderen beiden Populationen. Hier wurden autistische Kinder untersucht, die nur mit Risperidon behandelt wurden. Unterschiede zwischen unserer Studienpopulation und der Toronto-Population bestehen vor allem beim Beobachtungszeitraum. Wir haben die Gewichtszunahme nach vier Wochen, die Gruppe aus Toronto nach 14 Wochen analysiert. Ein weiterer Schwachpunkt ist die geringe Patientenzahl der Patienten aus Toronto mit Clozapin- oder Olanzapin-Medikation ($n = 78$). So könnten Unterschiede in der Diagnose bzw. in der Behandlungsdauer, aber auch Schwächen bezüglich der statistischen Aussagekraft mögliche Ursachen für die widersprüchlichen Studienergebnisse sein.

Trotz den verschiedenen Ergebnissen postulieren Pouget et al. einen möglichen Zusammenhang zwischen TSPO rs6971 und Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie.²⁵⁷ Rs6971 ist ein funktionaler Polymorphismus und führt zu einem Austausch der Aminosäure Alanin zu Threonin in der Ligandenbindetasche. Dieser Aminosäureaustausch führt zu einer schlechteren Bindung des Liganden.²⁷⁹ Untersuchungen lassen darauf schließen, dass der Ligand von TSPO die Glucose-Spiegel im Blut senkt und über Gentranskription Mechanismen auslöst, die die Fettbildung reduzieren, die Glucosetoleranz erhöhen und die Gewichtszunahme senken. Eine geringere Bindungsaffinität von TSPO zu seinem Liganden könnte diese Mechanismen möglicherweise beeinträchtigen.

rs6973

Für rs6973 zeigte sich in der adjustierten Subpopulation ein signifikanter Effekt des Genotyps auf das Gewicht und den BMI zu Studienbeginn. So zeigten A/A-Homozygote ein signifikant höheres Ausgangsgewicht sowie einen signifikant höheren Ausgangs-BMI ($87,8 \pm 25,5$ kg / $30,0 \pm 9,37$ kg/m²) als C-Allel-Träger ($C/C = 72,7 \pm 14,3$ kg / $24,6 \pm 4,60$ kg/m², $C/A = 74,1 \pm 16,8$ kg / $25,5 \pm 5,54$ kg/m²) ($p = 0,013/0,006$). Dieser Effekt beruhte in erster Linie auf den Patienten der naiven Subpopulation. Hier zeigte sich ebenfalls ein signifikante Zusammenhang ($p = 0,026/0,001$), während bei Patienten mit antipsychotischer Vormedikation der Effekt nicht zu beobachten war ($p = 0,362$). Diese Beobachtung deutet auf einen Effekt von rs6973 auf das Gewicht im Allgemeinen hin. Ob TSPO eventuell über seine Rolle bei Entzündungsreaktionen Einfluss auf die Gewichtsregulation hat, ist nach bisherigem Kenntnisstand rein spekulativ und bedarf weiterer Untersuchungen.²⁵⁶

In der Toronto-Population wurde weiterhin der Einfluss von TSPO rs6971 und rs6973 auf die Ausprägung der Schizophrenie sowie das Therapieansprechen untersucht. Es wurde kein signifikanter

Zusammenhang gefunden ($0,220 < p < 0,890$). Während rs6973 hierzu noch nicht untersucht wurde, liegen bezüglich rs6971 mehrere Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen vor. Einige Studien konnten signifikante Zusammenhänge beobachten, andere Studien berichten jedoch das Gegenteil.^{82, 281, 282}

Die Polymorphismen rs6971 und rs6973 sind bisher nur wenig untersucht, sodass ihre Rolle vor allem bezüglich der Antipsychotika-induzierten Gewichtszunahme aufgrund der heterogenen Studienergebnisse weiterhin unklar ist.

4.2.2 MC4R

Das MC4R-Gen kodiert den humanen Melanocortin-4-Rezeptor. Er wird im zentralen Nervensystem, vor allem im Gehirn, exprimiert, wo er Einfluss auf das Hungergefühl und den Energieverbrauch hat.^{84, 85} Die Bindung seines Liganden, des α -Melanozyten-stimulierenden Hormons, führt zu erhöhtem Grundumsatz und verminderter Nahrungsaufnahme und somit zu einem Gewichtsverlust.⁸⁶ Viele Polymorphismen innerhalb oder in der Nähe des Gens werden unter anderem mit Übergewicht in Zusammenhang gebracht.⁸⁷ Rs17782313 und rs489693 konnten in dieser Studienpopulation bereits mit Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie assoziiert werden. Die Identifizierung weiterer Marker innerhalb des MC4R-Gen schien daher ein vielversprechender Ansatzpunkt.

rs8087522

Rs8087522 T/T-Allel-Träger zeigten zu Beginn der Studie ein niedrigeres Ausgangsgewicht als A-Allel-Träger ($p = 0,027$). Allerdings war ebenfalls auffällig, dass in der Gruppe der T/T-Genotypen der Frauenanteil überdurchschnittlich hoch war. Das niedrigere Ausgangsgewicht lässt sich daher wohl eher mit dem zufällig erhöhten Frauenanteil als mit dem Genotypen an sich in Verbindung zurückführen. Auch Beckers et al. konnten keinen Zusammenhang zwischen rs8087522 und dem Gewicht feststellen, was unser Ergebnis bestätigt.²⁸³

In Bezug auf die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme konnte im Gegensatz zu der Arbeit von Ruoyu Sun kein signifikanter Zusammenhang gefunden werden.⁹⁰ Ruoyu Sun hat die adjustierte Subpopulation mittels Pyrosequenzierung am *GS Junior* untersucht und konnte über ANOVA einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Genotypen und der prozentualen Gewichtszunahme

(C/C = 1,6%, C/T = 1,9%, T/T = 4,7%; $p = \mathbf{0,044}$) sowie der prozentualen BMI-Zunahme (C/C = 1,5%, C/T = 2,0%, T/T = 4,7%; $p = \mathbf{0,035}$) feststellen. Die Reproduktion am *LightCycler* konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigen. Insgesamt unterschieden sich drei Patienten hinsichtlich ihrer Genotypisierungsergebnisse. Da sich die *LightCycler*-Methode als die zuverlässigere Methode darstellte und sich die Auswertung der *GS Junior*-Daten ohnehin als schwierig und teilweise uneindeutig erwies, wurde für die weitere Auswertung die Ergebnisse der *LightCycler*-Messung verwendet. Daraus ergab sich für den Zusammenhang zwischen Genotyp und prozentualer Gewichtszunahme in der adjustierten Subpopulation ein p-Wert von $p = 0,053$. Nur die prozentuale BMI-Zunahme lieferte hier ebenfalls ein signifikantes Ergebnis ($p = \mathbf{0,044}$). Eine gemeinsame Betrachtung des Genotyps mit anderen klinischen Einflussfaktoren in einem ANCOVA-Modell konnte dies jedoch nicht bestätigen ($p = 0,176$). In der Gesamtpopulation konnte kein Effekt festgestellt werden.

Chowdhury et al. konnten in einer Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen rs8087522 T-Allel-Trägern und der Gewichtszunahme bei 76 Patienten unter Clozapin-Therapie feststellen.⁹¹ So betrug die durchschnittliche prozentuale Gewichtszunahme nach sechs Wochen Clozapin-Gabe bei T-Allel-Trägern 5,38%, während C-Allel homozygote Patienten nur 2,43% ihres Körpergewichts zunahmen ($p = \mathbf{0,027}$). Ein ähnlicher Effekt war auch in unserer Studienpopulation nach Betrachtung der Patienten mit Hochrisiko-Therapie zu sehen. So zeigte die prozentuale Gewichtszunahme in Abhängigkeit vom Genotyp eine Signifikanz von $p = \mathbf{0,035}$. Im Unterschied zu Chowdhury et al. bezog sich der Unterschied jedoch nicht auf T-Allel- und C/C-Träger. In unserer Studienpopulation zeigten C/C- und C/T-Genotypen ähnliche Gewichtszunahme nach vier Wochen (C/C = $2,6 \pm 4,6\%$ und C/T = $2,3 \pm 4,8\%$). Im Gegensatz dazu nahmen T/T-Genotypen im Schnitt $5,9 \pm 6,0\%$ Gewicht zu. Als Einschränkung dieses Ergebnisses lässt sich allerdings sagen, dass T/T-Genotypen bereits mit einem signifikant geringeren Gewicht in die Studie starteten (C/C = $73,6 \pm 15,1$ kg, C/T = $75,7 \pm 15,0$ kg, T/T = $64,2 \pm 14,5$ kg; $p = \mathbf{0,034}$). Die höhere Gewichtszunahme der T-Allel-Homozygoten lässt sich daher wohl eher mit dem niedrigeren Ausgangsgewicht, als mit dem Genotyp erklären. Diese Annahme wird ebenfalls durch die Ergebnis ANCOVA unterstützt. Hier zeigte sich ein signifikanter Effekt des Ausgangsgewichts auf die Gewichtszunahme ($p < \mathbf{0,001}$). Der Genotyp zeigte hingegen keinen signifikanten Einfluss mehr ($p = 0,162$).

Chowdhury et al. erklärten den Effekt des rs8087522 mit einer Beeinflussung der Transkription des MC4R-Gens. Der Polymorphismus befindet sich in der Promotorregion. Chowdhury et al. fanden heraus, dass ein bisher unbekanntes Protein an das T- nicht jedoch an das C-Allel bindet. Dies könnte

zu einer veränderten Genexpression von MC4R beitragen.⁹¹

Die Ergebnisse unsere Studie lassen eher auf eine untergeordnete Rolle des rs8087522 in Bezug auf das Gewicht bzw. die Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie schließen. Zwar zeigte die Studie von Chowdhury et al. ein anderes Ergebnis, allerdings sind diese aufgrund der geringen Patientenzahl von 76 mit Vorsicht zu interpretieren. Für eine genaue Aussage sind weitere Studien in Bezug auf MC4R rs8087522 notwendig.

4.2.3 NDUFS1 rs6435326, rs1053517 und rs1801318

Das NDUFS1-Gen kodiert die NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase 75 kDa Untereinheit 1, ein Protein des Komplex I der Atmungskette auf der inneren Mitochondrienmembran. Sowohl beim Krankheitsbild der Schizophrenie als auch bei Einnahme von Antipsychotika sind Veränderungen innerhalb der Mitochondrien beschrieben worden.^{93, 94, 284-286} Mitochondrien-Gene bieten daher einen weiteren interessanten Ansatz für die Identifizierung genetischer Risikomarker in Bezug auf die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme.

Eine Studie hat 60 Polymorphismen in insgesamt 28 Mitochondrien-Genen auf ihren Einfluss auf Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme untersucht.⁸³ Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass Polymorphismen in Mitochondrien-Genen, die am Energiehaushalt beteiligt sind, Einfluss haben auf die Gewichtszunahme unter Antipsychotika der zweiten Generation. Goncalves et al. konnten einen Effekt des rs6435326 mit der prozentualen Gewichtszunahme nach mindestens sechs Wochen Therapie in einer Studienpopulation mit 164 Patienten europäischer Herkunft nachweisen ($p = 0,0003$). Dabei nahmen T/T-Allel-Träger ($1,1 \pm 4,5\%$) deutlich weniger Gewicht zu als Heterozygote ($3,1 \pm 4,5\%$) und A/A homozygote Patienten ($5,1 \pm 5,1\%$). Zudem konnten sie zeigen, dass eine bestimmte Allelkombination der Polymorphismen rs6435326, rs1053517 und rs1801318 einen schützenden Einfluss auf das Auftreten einer möglichen Gewichtszunahme hat (T-C-G vs. A-T-A; $p = 0,005$).

In unserer Studienpopulation konnten wir diese Ergebnisse nicht reproduzieren. Weder die genannten Polymorphismus noch die Kombination der Risikoallele zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit der Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie ($0,396 < p < 0,911$). Zwar zeigten auch

hier T-Allel-Träger des Polymorphismus rs6435326 eine leicht geringere Gewichtszunahme nach vier Wochen Therapie ($T/T = 2,08 \pm 4,21\%$, $A/T = 2,03 \pm 4,75\%$, $A/A = 2,62 \pm 4,75\%$), dieser Effekt erreichte jedoch keine Signifikanz ($p = 0,596$). Unsere Ergebnisse stimmen damit mit den Ergebnissen einer weiteren Replikationsstudie überein (CATIE-Replikationspopulation).⁸³ Diese konnte im Gegensatz zu uns zwar den gemeinsamen Effekt der kombinierten Allele T-C-G ($p = 0,04$), nicht aber den alleinigen Zusammenhang von rs6435326 mit Gewichtszunahme replizieren ($p = 0,18$).

Aufgrund dieser heterogenen Ergebnisse und der schwachen Studienlage bezüglich NDUFS1-Polymorphismen und Gewichtszunahme unter atypischen Antipsychotika erweist sich eine Beurteilung der Studienergebnisse als schwierig. Polymorphismen des NDUSF1-Gens könnten eine Funktionseinschränkung des Komplex I und der Atmungskette verursachen und somit die Produktion mitochondrialer oxidativer Sauerstoffspezies (ROS) erhöhen.^{287, 288} Diese können den Energiehaushalt indirekt über den Signalweg des Prohormons Proopiomelanocortin (POMC) beeinflussen. Mitochondriale ROS stimulieren POMC produzierende Zellen im Hypothalamus. POMC führt über seine Abbauprodukte zu einer geringeren Nahrungsaufnahme sowie einem erhöhten Energieverbrauch des Körpers.^{289, 290} Insofern scheint ein Einfluss von NDUFS1-Polymorphismen auf die Gewichtszunahme durchaus denkbar. Unsere Ergebnisse lassen jedoch auf das Gegenteil schließen.

4.2.4 FTO

Das FTO-Gen kodiert eine Demethylase, die die Transkription anderer Gene beeinflussen kann.^{97, 98} Die genaue Funktion von FTO ist allerdings noch unklar. Vermutungen legen jedoch nahe, dass FTO die Adipogenese sowie die Nahrungsaufnahme und den Energiehaushalt reguliert.^{99, 100} Mittlerweile zeigten mehrere GWAS-Studien einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen des FTO-Gens und Übergewicht.^{101, 102} Vor allem der rs9939609 Polymorphismus, der im ersten Intron des FTO-Gens lokalisiert ist und einen Basenaustausch von Thymin nach Adenin darstellt, scheint eine Rolle bei der Regulation des Körpergewichts zu spielen.^{101, 105, 106}

In Bezug auf die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme und rs9939609 ist die Studienlage zwiespalten. Einige Studien postulieren einen signifikanten Einfluss des Genotyps, während andere Studien diesen verneinen.¹⁰⁸⁻¹¹³ Fabian Czerwensky konnte im Rahmen seiner Doktorarbeit einen

signifikanten Einfluss von rs9939609 auf die Atypika induzierte Gewichtszunahme in einer Subpopulation chronischer Patienten identifizieren.⁶⁸ Dieser Effekt konnte auch von Reynolds et al. gezeigt werden. Sie beobachteten einen signifikant erhöhten BMI bei A-Allel-Trägern in einer Gruppe von 187 chronisch behandelten schizophrenen Patienten.¹¹⁰

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei weitere Polymorphismen des FTO-Gens, rs7185735 und rs17817288, auf ihren Zusammenhang mit Gewichtszunahme als Folge der Antipsychotika-Therapie untersucht. Sie sind ebenfalls im ersten Intron des FTO-Gens lokalisiert und stellen eine Punktmutation von Adenin zu Guanin bzw. von Guanin zu Adenin dar. Tan et al. identifizierte in einer GWAS diese beiden Polymorphismen als die am stärksten mit BMI und Übergewicht assoziierten Marker.¹¹⁴

rs7185735

In der adjustierten Subpopulation zeigte sich ein schwach signifikanter Effekt für den rs7185735 Polymorphismus auf die prozentuale Gewichtszunahme nach vierwöchiger Therapie.²⁴⁰ Homozygote Träger des Risikoallels G nahmen im Schnitt $2,00 \pm 3,37\%$ Gewicht zu während heterozygote Patienten $2,79 \pm 5,11\%$ und homozygote A-Allel-Träger nur $0,83 \pm 4,44\%$ an Gewicht zulegten ($p = \mathbf{0,047}$). Da ein T-Test keinen signifikanten Unterschied zwischen dem G/G- und dem G/A-Genotyp ($p = 0,974$), jedoch einen signifikanten Unterschied beider Gruppen zu den A/A-Trägern zeigte ($p = \mathbf{0,018/0,048}$), wurden Patienten, die mindestens ein Risikoallel G trugen, zusammengefasst. So zeigten Risikoallelträger der adjustierten Subpopulation eine 3,1-mal höhere Gewichtszunahme als Patienten ohne Risikoallel ($p = \mathbf{0,017}$). Dieser Effekt war noch stärker in der Gruppe der Patienten mit Hochrisiko-Therapie (Clozapin und/oder Olanzapin). Hier war die Gewichtszunahme für Risikoallel-Träger 8,5-mal höher ($3,74\%$ vs. $0,44\%$; $p = \mathbf{0,004}$). Für Patienten, die ein anderes atypisches Antipsychotikum erhielten, konnte kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden ($p = 0,752$).

Des Weiteren deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass dieser Effekt vor allem für Patienten mit Schizophrenie von Bedeutung ist. Im Gegensatz dazu, ließ sich dieser Zusammenhang in der Gruppe der Patienten mit affektiven Störungen nicht nachweisen. Diese Diagnose-abhängigen Effekte sind nicht durch eine größere Anzahl an Patienten mit Clozapin- oder Olanzapin-Therapie unter den schizophrenen Patienten bedingt. Im Gegenteil, der Anteil an Patienten mit dieser Medikation war in der Subpopulation der Patienten mit affektiven Störung sogar höher (59% vs. 46%). Zudem konnten wir auch für Patienten mit affektiven Störungen und Clozapin- oder Olanzapin-Medikation keinen Effekt

des rs7185735 auf die Gewichtszunahme feststellen.

Da rs7185735 und rs9939609 sich in einem starken LD befinden, zeigten beide Polymorphismen ein sehr ähnliches Ergebnis.²⁴⁰ Lediglich ein Patient wurde bei der Analyse von rs9939609 aufgrund seiner Genotypisierungsergebnisse in eine andere Risikogruppe eingestuft. Auch für rs9939609 konnte daher ein signifikanter Effekt des Risikoallels A auf die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme in der adjustierten Subpopulation sowie bei Patienten mit Hochrisiko-Therapie gezeigt werden ($p = 0,026/0,004$).

Die Ergebnisse stützen vorrausgegangene Studien, die einen Einfluss des rs9939609 auf die Gewichtszunahme unter Antipsychotika der zweiten Generation postulieren und deuten auf einen Einfluss beider Polymorphismen auf eine Gewichtszunahme unter Antipsychotika hin.^{108, 110, 113} Nichtsdestotrotz sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren. Zum einen aufgrund einer Reihe von Studien, die diesen Zusammenhang nicht finden konnten. Jassim et al. untersuchten eine Population von 160 deutschen Patienten, Perez-Iglesias et al. beobachteten eine Studienpopulation von 239 zum ersten Mal an Psychosen erkrankter Patienten über einen Zeitraum von einem Jahr.^{111, 112} Beide Studien konnten keinen Einfluss von rs9939609 auf die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme nachweisen. Auch Shing et al. fanden keinen Effekt in einer Population von 218 Patienten mit chronischer Schizophrenie oder schizoaffektiven Störungen, die hauptsächlich mit Clozapin oder Olanzapin behandelt wurden.¹⁰⁹ Zum anderen bestehen große Unterschiede zwischen unserer Studienpopulation und den anderen Studien, die sich für einen Effekt der FTO-Polymorphismen aussprechen. Diaz-Anzaldúa et al. zeigten einen signifikanten Effekt in Patienten Mexikanische Abstammung.¹¹³ Zudem war die Medikation dieser Studienpopulation sehr heterogen. So waren neben Atypika auch viele Patienten mit Lithium und Valproinsäure zu finden. Diese Medikamente zeigen ebenfalls ein hohes Risiko für Gewichtszunahme und Patienten mit dieser Medikation wurden daher von uns in der adjustierten Subpopulation, in der wir den signifikanten Effekt nachweisen konnten, ausgeschlossen. Song et al. führte seine Studie bei Patienten mit chinesischer Abstammung und Risperidon-Therapie durch.¹⁰⁸ In unserer Population zeigte sich der Effekt jedoch in erster Linie bei Patienten mit Clozapin- und Olanzapin- und nicht mit Risperidon-Medikation. Reynold et al. untersuchten sowohl chronisch als auch zum ersten Mal an Schizophrenie erkrankte Patienten. Die Patienten wurden mit verschiedenen Antipsychotika, vor allem Clozapin und Olanzapin, behandelt. In der Gruppe der chronisch Kranken konnten die Autoren eine BMI-Steigerung von 1,6 kg/m² pro A-Allel nachweisen.¹¹⁰

Im Gegensatz dazu, zeigten unsere Ergebnisse in Bezug auf die Anzahl der Risikoallele keine kontinuierliche Gewichtszunahme. Stattdessen verhielt sich die Gewichtszunahme unter hetero- und homozygoten Risikoallel-Trägern ähnliche. Dieser Unterschied kann aus der sehr kleinen Anzahl an homozygoten Risikoallel-Trägern in unserer Studienpopulation resultieren. Diese ist anfälliger für zufällige Schwankungen. Ein weiterer möglicher Grund ist das niedrige Anfangsgewicht der heterozygoten Patienten, da ein niedriger BMI als Risikofaktor für eine höhere Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie gilt.²⁹¹

Des Weiteren zeigte sich für rs7185735 und rs9939609 ein schwach signifikanter Effekt für das Ausgangsgewicht bzw. den Ausgangs-BMI in der Gesamtpopulation (rs7185735 $p = \mathbf{0,036/0,031}$; rs9939609 $p = \mathbf{0,044/0,014}$).²⁴⁰ Unter der Einschränkung, dass es sich bei unserer Studienpopulation nicht um gesunde, sondern psychisch kranke Probanden handelte, bestätigen diese Ergebnisse bereits publizierte GWAS.^{101, 105, 106, 292} Hier konnte ein Effekt von FTO rs9939609 auf das Gewicht nachgewiesen werden.

Dieser gewichtsbeeinflussende Effekt lässt sich vermutlich auf einen Einfluss der Polymorphismen auf die Gentranskription der FTO-Gens, aber auch auf die Transkription von anderen Genen, die mit Übergewicht assoziiert sind, zurückführen.^{100,293} So scheint FTO mit der Promotorregion des *Iroquois-class homeodomain protein IRX3* (IRX3) zu interagieren und Polymorphismen im FTO-Gen zu einer IRX3-Überexpression zu führen. IRX3-Expression wurde in Studien mit *Knockout*-Mäusen mit höherem Körpergewicht in Verbindung gebracht.¹⁰⁷

Zusammenfassend weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass bestimmte Varianten des FTO-Gens nicht nur einen Einfluss auf Übergewicht im Allgemeinen, sondern auch auf die Gewichtszunahme unter Therapie mit Antipsychotika der zweiten Generation haben.²⁴⁰ Bereits ein Risikoallel scheint zu einer höheren Gewichtszunahme zu führen. Da die Studienpopulationen und die Studienplanungen der verschiedenen Studien zu diesem Thema variieren, sind die Studien allerdings nur eingeschränkt vergleichbar. Während alle Patienten unter schizophrenen Störungen litten, unterschieden sich die Studien in der Medikation, dem Beobachtungszeitraum sowie in der demographischen Zusammensetzung der Studienpopulation. Diese methodischen Unterschiede könnten ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Weitere Studien, um die Rolle von FTO in Bezug auf die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme weiter aufzuklären, sind daher wünschenswert.

rs1781788

Für rs1781788 war bei Patienten, die das G-Allel trugen, eine Tendenz für eine höhere Gewichtszunahme erkennbar. Auch diese Tendenz bestätigte sich in der Gruppe der Patienten, die eine Clozapin- oder Olanzapin-Behandlung bekamen ($p = 0,032/0,046$). Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für eine generelle Bedeutung der FTO-Polymorphismen im Rahmen der Gewichtszunahme unter Atypika. Für rs1781788 im speziellen sind keine weiteren Studien in diesem Zusammenhang literaturbekannt. Somit wurde dieser Polymorphismus im Rahmen dieser Arbeit erstmalig mit einer höheren Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie in Verbindung gebracht.

4.2.5 Kombination der Risikoallele von FTO und MC4R

Die Kombination verschiedener Risikoallele soll die Vorhersagekraft in Bezug auf eine Gewichtszunahme unter Atypika-Therapie verbessern und dient dem Ziel definierte Empfehlungen für genetische Tests vor Therapiestart zu geben. Solche Tests sollen zukünftig Hinweise auf die zu erwartende Wirkung und Nebenwirkung der verschiedenen Medikamente liefern. Es wurden daher die Risikoallele von MC4R rs17782313 und FTO rs7185735, der beiden Polymorphismen, die die größten Einflüsse auf die Gewichtszunahme zeigten, in einer gemeinsamen Analyse kombiniert. Als weitere Risikofaktoren waren zudem das Ausgangsgewicht und das Therapieansprechen in allen Populationen signifikant.

Die kombinierte ANOVA zeigte einen additiven Effekt.²⁴⁰ Patienten, die die Risikoallele für beide Polymorphismen trugen nahmen in allen Populationen signifikant mehr Gewicht zu als Patienten ohne Risikoallel ($0,001 < p < 0,015$). Der Effekt war deutlich größer als bei der einzelnen Betrachtung der Polymorphismen. Patienten mit mindestens drei Risikoallelen nahmen ca. 6% ihres Körpergewichts zu, während Patienten ohne Risikoallel maximal 1% Körpergewicht gewannen. Es zeigte sich zudem, dass in der Gesamt- und in der adjustierten Subpopulation der Einfluss von MC4R rs17782313, bei Patienten mit Clozapin- oder Olanzapin-Medikation allerdings den Einfluss des FTO rs7185735 überwog. Dies wurde durch die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse bestätigt. Eine Limitation der Analyse stellt jedoch die geringe Patientenzahl dar, die sich vor allem in der Gruppe der Patienten mit drei Risikoallelen widerspiegelt ($n = 9$).

Andere Studien konnten bereits einen gemeinsamen Einfluss dieser beiden Polymorphismen auf das Gewicht aber auch auf das Risiko für Bluthochdruck und Diabetes Typ 2 zeigen.²⁹⁴⁻²⁹⁷ Hierbei bezogen sich jedoch die meisten Studien auf FTO rs9939609. Unsere Studie bestätigt diesen additiven Effekt und zeigt seine Bedeutung auch im Rahmen der Gewichtszunahme unter Atypika-Therapie. Eine Bestimmung des MC4R rs17782313 und FTO rs7185735 bzw. rs9939609 Genotypen scheint daher durchaus sinnvoll, um eine Aussage über das Risiko für eine Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme vor allem unter Clozapin- und Olanzapin-Therapie zu treffen. Bei Vorliegen der entsprechenden Risikogenvarianten sollte in Zukunft nach Bestätigung durch weitere Studien möglicherweise über eine alternative Antipsychotika-Therapie nachgedacht werden. Auf diese Weise könnte das Risiko eines Therapieabbruches aufgrund einer übermäßigen Gewichtszunahme als Nebenwirkung reduziert werden.

4.3 pharmakogenetische Einflüsse auf die Therapie von Morbus Alzheimer

Im Rahmen der Alzheimer-Studie wurde getestet, inwieweit die Polymorphismen des CYP2D6-Gens Einfluss auf die Donepezilserumspiegel und das Therapieansprechen der Patienten haben. Hierfür wurden insgesamt 47 Patienten, bei denen Alzheimer diagnostiziert wurde und die mit Donepezil behandelt wurden, auf die häufigsten funktionalen Polymorphismen getestet.

Auffallend war hier der erhöhte Anteil von CYP2D6*4-Allelen. Dies kam in unserer Studienpopulation mit einer Häufigkeit von 26,6% vor, in Europa liegt die durchschnittliche Häufigkeit bei ca. 20%. Dieser Fund unterstützt eine Studie von Lu et al.²⁹⁸ Die Autoren konnten in einer Meta-Analyse mit erkrankten und gesunden Probanden unterschiedlicher Herkunft ein signifikant höheres Alzheimer-Risiko für CYP2D6*4-Träger feststellen ($p = 0,026$). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das CYP2D6*4-Allel möglicherweise Einfluss auf die Ausbildung eines Morbus Alzheimer hat. Im Gegensatz dazu konnten Versaldi et al. nur eine CYP2D6*4-Allel Häufigkeit von 7,1% in einer Population italienischer Alzheimer Patienten nachweisen.²⁹⁹ Die Häufigkeit in einer gesunden Vergleichsgruppe lag bei 15,3%. Auch Scordo et al. fanden keinen Zusammenhang zwischen der CYP2D6*4-Allel Häufigkeiten und dem Auftreten von Alzheimer.³⁰⁰ Im Kontext dieser widersprüchlichen Studienergebnisse ist fraglich, ob der in unserer Population gefundene, erhöhte *4-Anteil klinisch begründet oder zufallsbedingt ist. Jedoch deuten alle Studien darauf hin, dass der CYP2D6-Polymorphismen über den Metabolismus von Donepezil das Therapieansprechen der Patienten beeinflussen.

Auch der Einfluss von CYP2D6-Polymorphismen auf die Serumspiegel wurde in zahlreichen Studien belegt.^{206, 207, 299} Zudem beobachteten einige Untersuchungen eine Korrelation der Serumspiegel mit dem Therapieansprechen.^{207, 301} Betrachtet man die Ergebnisse dieser Studien, scheint eine Dosisanpassung von Donepezil auf Basis des CYP2D6-Genotypen sinnvoll. Diese These wurde im Anschluss an unsere Analyse in dieser Studienpopulation weiter untersucht. Mit Hilfe unserer Ergebnisse wurde von Frau Marion Stange im Rahmen ihrer Dissertation der Einfluss der CYP2D6-Gendosis auf die Serumspiegel von Donepezil und das Therapieansprechen analysiert. Für Ergebnisse sowie Diskussion siehe „Einfluss der hepatischen Metabolisierungsgeschwindigkeit auf die Wirksamkeit von Antidementiva“, Marion Stange.²⁴¹ Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Genotypisierung trägt daher zur Aufklärung bei, inwiefern eine Genotypisierung im Vorfeld der Therapie die Medikamentenauswahl und -dosierung positiv beeinflussen kann.

4.4 Bestimmung der Methylierungslevel

4.4.1 Qualität der Sequenzierläufe

Im Rahmen des Methodenaufbaus zur Quantifizierung von Methylgruppen, wurden zahlreiche Anpassungen in Bezug auf die Generierung der DNA-Bibliothek sowie die von *Roche* vorgegebenen Arbeitsanweisungen für die Vorbereitung, Durchführung und Auswertung der Sequenzierung durchgeführt. Insgesamt konnte durch diese Maßnahmen die Qualität der Sequenzierläufe und der Ergebnisse im Laufe der Methodenentwicklung deutlich verbessert werden. Besondere Herausforderung war hierbei die hohe Anzahl an Polysequenzen.²⁶³ Diese können vom *GS Junior* nicht zuverlässig ausgewertet werden und waren im Rahmen dieser Arbeit eine bedeutende Fehlerquelle, die die Qualität der Läufe stark beeinflusst hat.

Unter optimierten Bedingungen zeigte sich eine gute Präzision der Messergebnisse. In Bezug auf die Patientenproben konnte die in der Literatur angegebene Schwankung von ± 5 Prozentpunkten bestätigt werden.²⁶⁴ Allerdings war die Streuung der Standards fast doppelt so hoch (Patientenproben $SD = \pm 2,44$ Prozentpunkte vs. Standards $SD = \pm 4,25$ Prozentpunkte). Dies könnte zum einen an Pipettierfehlern liegen, die beim Erstellen der verschiedenen Konzentrationen erfolgt sein könnten. Zum anderen wären Qualitätsunterschiede der Standard-DNA denkbar. Die unmethylierte DNA stammte aus der Amplifizierung von DNA aus der HCT116 DKO Zelllinie, einer Zelllinie aus menschlichen Kolonkarzinomzellen. Die methylierte DNA wird durch Methylierung des unmethylierten Standards durch M.SssI Methyltransferase gewonnen. Diese methyliert alle Cytosine der CG-Dinukleotide innerhalb eines DNA-Doppelstrangs. Es ist daher möglich, dass die enzymatische Umsetzung nicht zu 100% stattgefunden hat und die Methylierungslevel des methylierten Standards nicht genau 100 Prozentpunkten entsprachen bzw. leichte Unterschiede bei verschiedenen Chargen vorlagen. Das könnte ebenfalls zu Schwankungen innerhalb der einzelnen Standards beigetragen haben. Die Tatsache, dass bei der Messung der gBlocks für 100 Prozentpunkte ein deutlich höherer Wert gemessen wurde, unterstreicht diese Möglichkeit. Da die gBlocks synthetisch hergestellt wurden, und hier bereits für CpGs Cytosin und für alle anderen C in der Sequenz Thymin eingebaut wurde, kann man hier sicher sein, dass die tatsächlichen Werte auch wirklich 100 Prozentpunkten entsprechen.

Eine weitere Fehlerquelle ist die Bisulfit-Konvertierung. Der Vergleich der Messwert der Standards gegenüber denen des gBlocks zeigt für den gBlock eine bessere Korrelation zu den erwarteten Werten ($R^2 = 0,9859$ vs. $0,9672$). Dieser Unterschied lässt auf Abweichung durch die Bisulfit-Konvertierung

schließen. Diese musste bei den Standards, aber nicht beim gBlock durchgeführt werden. Hierbei besteht zum einen die Möglichkeit, dass nicht alle Cytosine konvertiert werden, zum anderen wird die DNA bei der Reaktion Chemikalien und hohen Temperaturen ausgesetzt. Dies schädigt und zerstört die DNA zu einem gewissen Maße.³⁰² Der Hersteller verspricht eine Konvertierungsrate von 99,5%, einen Schutz von mC von 99,5% sowie eine DNA-Rückgewinnung von 80%.³⁰³ Mindestens 20% DNA gehen also während dieser Reaktion verloren. Die Bisulfit-Konvertierung stellt daher einen erheblichen Unsicherheitsfaktor innerhalb der Messmethode dar.

In Bezug auf die Richtigkeit lässt sich sagen, dass die Werte die durch den *GS Junior* gemessen wurden generell etwas zu hoch waren. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Arbeiten überein.^{266, 304, 305} Im Rahmen eines Methodenvergleichs konnten Redshaw et al. für die Pyrosequenzierung am *GS Junior* zwar eine bessere Präzision jedoch auch eine schlechtere Richtigkeit gegenüber anderen Messmethoden feststellen.³⁰⁴ Die von Redshaw et al. gemessenen Werte waren, abgesehen von den Standards für 0 und 100 Prozentpunkte, höher als die erwarteten Werte. Vor allem in niedrigen Messbereichen war der Effekt sehr deutlich. Die zu 10 Prozentpunkten methylierte Probe zeigte beispielsweise Messergebnisse die mehr als das Doppelte betrug. Im Schnitt waren die Werte um 32 Prozentpunkte zu hoch. Die Abweichung zwischen Mehrfachmessungen betrug zwischen 1 und 13 Prozentpunkten.

Erklärt werden könnte dies durch Fehler der Polymerase bei der Amplikongenerierung. So favorisieren einige Polymerasen GC-reiche DNA.³⁰⁶ Shen et al. haben herausgefunden, dass die Hybridisierungstemperatur Einfluss auf die gemessenen Methylierungslevel hat.³⁰⁷ Hohe Temperaturen scheinen vor allem bei niedrigerem Methylierungsstatus erhöhte Messwerte zu begünstigen. Redshaw et al. konnten zudem unterschiedliche Analyseergebnisse in Abhängigkeit der verwendeten MIDs nachweisen.³⁰⁴ MID9 erzielte hierbei besonders schlechte Resultate und wurde daher auch im Rahmen dieser Arbeit nicht für die Analyse verwendet.

Eine weitere Fehlerquelle liegt in der Auswertung der *AVA-Software*. Lange Poly-T-Sequenzen sind anfälliger für *valley flows* und werden durch den *Short Quality* Filter eher aussortiert. Daraus resultiert ebenfalls ein zu hoher Methylierungswert. Zudem verfälschen Alignment-Fehler der *AVA-Software* die Ergebnisse. Nicht auswertbare Signale, die zu Lücken in der Basensequenz oder Verschiebung des Leserasters führen, werden in die Auswertung miteinbezogen. *Reads* mit 100%iger Übereinstimmung und somit mit Methylierungswerte von 100 Prozentpunkten können dadurch nie erreicht

werden. Aufgrund der Sequenz waren solche Alignment-Fehler vor allem bei CpG3 und 5 stark ausgeprägt. Die theoretische Quantifizierungsgrenze lag bei 4,9 Prozentpunkten. Derart niedrige Werte wurden nur in Bezug auf CpG3 und 4 gemessen. Die Ergebnisse dieser CpG-Stellen wurden im Rahmen dieser Arbeit zwar ausgewertet, sollten allerdings vorsichtig interpretiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bisulfitsequenzierung im Allgemeinen im Vergleich zu anderen Messmethoden (z.B. digitale oder quantitative PCR) bessere und reproduzierbarere Werte liefert und daher mittlerweile die Methode der Wahl darstellt. Im Rahmen dieser Analyse konnte nach zahlreichen Optimierungen eine mit der Literatur vergleichbare Qualität der Sequenzierläufe erreicht werden. Allerdings ist die Pyrosequenzierung aufgrund ihrer Schwäche bei Polystrukturen nicht die beste Sequenziermethode in Bezug auf epigenetische Fragestellungen. Andere Sequenziertechniken, wie das Halbleiterverfahren von Ion Torrent oder die *sequencing-by-synthesis*-Methode von Illumina zeigen diese Nachteile nicht.³⁰⁸

Der Methodenaufbau ist zudem sehr aufwendig und die Durchführung eines einzelnen Laufes ist sehr zeitintensiv und teuer. Veränderungen einzelner Parameter führen oft zu großen Abweichungen in den Ergebnissen. Zudem lassen sich Einstellungen der Software in Bezug auf die Auswertung und Qualitätseinstellungen nicht einfach ändern sondern benötigen die Anwendung weiterer Filter. Funktioniert eine Methode lassen sich jedoch viele Proben gleichzeitig vermessen. Ein weiterer Vorteil ist die verhältnismäßig lange *Read*-Länge von über 500 Basenpaaren. Bei bestehender Methode ist der *GS Junior* daher durchaus eine gute Option, für die Forschung vor allem im Bereich der Epigenetik scheint dieses Gerät jedoch eher ungeeignet.

Trotz dieser Einschränkungen ist es im Rahmen dieser Arbeit durch die in **Kapitel 3.6.1** beschriebenen Optimierungen gelungen, eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der Methylierung des ausgewählten Amplikons des HIF3A-Gens am *GS Junior* zu entwickeln. So wurden die Aufbereitung der DNA-Bibliothek und die Auswertung mittels *AVA Software* angepasst. Die Zeit und Temperatur der Bisulfit-Konvertierung wurde möglichst gering und somit DNA schonend gewählt, um eine DNA-Degradation zu vermeiden. Zudem wurden verschiedene PCR-Parameter, unter anderem mehrere Polymerasen zur Generierung des Amplikons, getestet. Aufgrund dieser Anpassungen weist die Methode eine gute Präzision und Reproduzierbarkeit auf. Systematische Fehler in Bezug auf die Richtigkeit wurden im Rahmen dieser Arbeit akzeptiert, da nur ein Vergleich der Methylierungslevel

relativ zueinander vorgenommen wurde. Die Absolutwerte waren daher von untergeordneter Bedeutung.

4.4.2 Vergleich GS Junior – Droplet Digital PCR

Bei der *Droplet Digital* PCR wird die Ziel-DNA durch die Generierung von kleinen Tröpfchen in viele einzelne, parallele Reaktionsansätze aufgeteilt, in denen die einzelnen DNA-Molekül millionenfach vervielfältigt werden. Farbstoff-markierte Sonden dienen der Detektion sequenzspezifischer Ziele. Die Fluoreszenzsignale der einzelnen Reaktionsansätze werden anschließend gezählt und statistisch ausgewertet. Mit der ddPCR bietet sich somit ein sehr sensitiver Ansatz zur absoluten Quantifizierung und zum Nachweis seltener Allele.

Nach vorangegangener Bisulfit-Konvertierung können auf diese Art und Weise auch Methylgruppen an CpG-Dinukleotiden quantifiziert werden. Der Hersteller *BioRad* konnte im Rahmen einer Analyse von Methylgruppen im *Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein N-Gen* eine hohe Sensitivität und Präzision für die ddPCR nachweisen.³⁰⁹ Diese guten Ergebnisse wurden in weiteren Studie durch Yu et al. und Wiencke et al. bestätigt.^{310, 311} Die Autoren konnten im Vergleich zu anderen Fluoreszenz-basierenden PCR-Methoden ebenfalls eine bessere Präzision und niedrigere Bestimmungsgrenze für die ddPCR feststellen. So war der Variationskoeffizient in der Studie von Wiencke et al. für die ddPCR mit 3,5% nahezu 7-mal niedrigere als der Variationskoeffizient der quantitativen PCR (qPCR)-Methode (25%). Diese Ergebnisse lassen auf hohe Messgenauigkeit der ddPCR schließen. Andere Studien zeigen jedoch gegenteilige Ergebnisse in Bezug auf die digitale PCR. In einem direkten Methodenvergleich konnten Redshaw et al. für die ddPCR eine schlechtere Präzision feststellen als für die qPCR. Die präzisesten Ergebnisse lieferte in dieser Studie allerdings die Pyrosequenzierung am *GS Junior*.³⁰⁴

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Messergebnisse der Pyrosequenzierung am *GS Junior* mit den Ergebnissen der ddPCR verglichen und validiert werden. Da sich die Auswertung vor allem in Bezug auf den *Assay* für CpG1 als schwierig herausstellte, wurde neben der manuellen Auswertung (manuelle Festlegung des Schwellenwerts zur Trennung von positiven und negativen Tröpfchen) versucht, die Auswertung zu automatisieren. Dazu wurde der Schwellenwert über die Position der negativen Tröpfchen der Leerkontrollen statistisch berechnet und auf die restlichen Proben übertragen. Somit

sollten Fehlerquellen aufgrund von subjektiven Einschätzungen vermieden werden. Im Folgenden wird daher der Vergleich mit beiden Auswertmethoden diskutiert.

Die Messungen der Standards zeigten insgesamt eine gute Übereinstimmung mit den erwarteten Werten sowie eine gute Vergleichbarkeit der verschiedenen Messmethoden. Auch Standardabweichung (ddPCR: 2,60 Prozentpunkte vs. GS Junior: 4,25 Prozentpunkte) und Variationskoeffizient (ddPCR: 0-17% vs. GS Junior: 3,2-12,1%) lagen in ähnlichen Bereichen. Die automatisierte und manuelle Auswertung unterschieden sich nicht stark voneinander ($R^2 = 0,9687$ vs. $0,975$). Auffällig war, dass die Messwerte der ddPCR vor allem im unteren Bereich (25 und 50 Prozentpunkte), in ähnlichem Maß wie die Werte der Sequenzierung, über den erwarteten Werten lagen. Dies unterstützt die Hypothese, dass die erhöhten Werte bereits aus der Generierung der DNA-Bibliothek resultierten. Wie bereits erwähnt, könnten eine Favorisierung GC-reicher Regionen durch die Polymerase oder Einflüsse der Hybridisierungstemperatur mögliche Gründe gewesen sein. Werte von 100 Prozentpunkten wurden bei der ddPCR ebenfalls nicht erreicht, wobei die Abweichungen hier geringer waren als bei der Sequenzierung (siehe **Kapitel 3.6.2**). Unvollständig methylierte Standards, Fehler bei der Bisulfit-Konvertierung sowie falsch positive Messsignale für die unmethylierte Sonde sind wahrscheinliche Ursachen.

Die Messergebnisse der Patientenproben zeigten innerhalb der Zweifachmessung zum Teil sehr hohe Abweichungen. Dies spiegelte sich vor allem im *Assay* für CpG1 wieder, dessen Konstruktion und Auswertung am problematischsten war. Hier ließen sich besonders häufig große Abweichungen zwischen beiden Messungen derselben Probe beobachten. Der direkte Vergleich zwischen der automatisierten und der manuellen Auswertung zeigte zudem, dass dieses Problem besonders bei der automatisierten Auswertung zum Tragen kam. Zudem waren hier zum Teil sehr große Abweichungen zu den Sequenzierungsergebnissen feststellbar. Auffällig war jedoch, dass die stark abweichenden Messwerte sich oft durch eine geringe Anzahl positiver Tröpfchen sowie einer großen Abweichung der Doppelbestimmungen auszeichneten und somit die Richtigkeit der Messwerte ohnehin fraglich erschien (siehe **Anhang 9.7**). Die Werte der manuellen Auswertung korrelierten hingegen besser mit den Sequenzierungsergebnissen. Während die Ergebnisse der *Assays* von CpG5 und CpG7 keine Unterschiede hinsichtlich der manuellen und der automatisierten Auswertung zeigten, wurde bei dem *Assay* für CpG1 deutlich, dass die automatisierte Auswertung gegenüber der manuellen bei schwierigeren *Assays* fehleranfälliger zu sein scheint. Negative Tröpfchen wurden hier oft als positiv bewertet, woraus

sich höhere Methylierungswerte für die automatisierte Auswertung im Vergleich zu den anderen Methoden ergaben. Obwohl die automatisierte Auswertung extra aufgrund der schwierigen Auswertung des *Assays* für CpG1 entwickelt worden war, scheint diese Methode für diesen *Assay* daher weniger geeignet.

In der Gegenüberstellung mit den Sequenziererergebnissen ergab sich daher eine deutlich größere Streuung und Standardabweichung der Messwertdifferenzen für die automatisierte im Vergleich zur manuellen Auswertung (SD = 6,98 vs. 3,83) (**Abbildung 62** und **Abbildung 63**). Der Bland-Altman-*Plot* zeigte für beide Auswertungen eine gleichmäßige Streuung der Messwertdifferenzen um deren Mittelwert. Dieser war mit + 1,18 bzw. + 2,25 Prozentpunkten relativ nah am Nullwert. Ein *Bias* oder ein systematischer Fehler konnte daher nicht festgestellt werden. Es kann daher nicht gesagt werden, dass eine der beiden Methoden generell höhere oder niedrigere Ergebnisse lieferte.

Eine Einschränkung besteht darin, dass bei der ddPCR die Anzahl positiver Tröpfchen oft sehr gering war. Hieraus ergaben sich oft hohe Abweichungen zwischen den Messwerten. In Bezug auf die Anzahl an positiven Tröpfchen ist durchaus noch Optimierungspotenzial vorhanden, z.B. durch Erhöhung der DNA-Konzentration. Eine größere Anzahl auswertbarer Tröpfchen sollte die Genauigkeit der Ergebnisse erhöhen. Im Rahmen dieser Auswertung wurden keine Proben aufgrund von wenigen positiven Tröpfchen oder großen Standardabweichungen ausgeschlossen, woraus sich zum Teil erhebliche Abweichungen im Vergleich der Messmethoden ergaben.

Insgesamt zeigte sich bei den Messungen der Standards eine gute Vergleichbarkeit der verschiedenen Messmethoden, der Vergleich der Patientenproben zeigte etwas stärkere Abweichungen. Allerdings scheint die Größenordnung vor allem in Bezug auf die manuelle Auswertung akzeptabel. Zudem zeigten die Messungen am *GS Junior* ebenfalls eine Messgenauigkeit von ca. ± 5 Prozentpunkten. Beide Methoden scheinen daher durchaus vergleichbare Ergebnisse zu liefern. Die großen Qualitätsunterschiede zwischen den Messungen der Standards und der Patientenproben könnten auf die unterschiedliche DNA-Qualität zurück zu führen sein. Die Patientenproben waren zum Teil über zehn Jahre alt und wurden mehrfach eingefroren und aufgetaut. Wurden die Blutproben neu extrahiert, konnte oft nur noch wenig DNA gewonnen werden. Diese schlechte Qualität der Ausgangs-DNA kann die Analyseergebnisse negativ beeinflussen und zuverlässige Messungen behindern.³¹²

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ddPCR eine deutlich einfachere Handhabung bietet als die Sequenzierung am *GS Junior*. Die Probenvorbereitung ist weniger aufwendig und schneller. Zudem ist die Methode kostengünstiger. Die Präzision ist mit der Präzision der Sequenzierung am *GS Junior* vergleichbar, sodass die Methode eine gute Alternative bzw. Validierung zu der Pyrosequenzierung darstellt. Nachteil ist jedoch, dass pro *Assay* nur einzelne CpG-Stellen betrachtet werden können. Es muss daher ein spezielles Untersuchungsziel bekannt sein. Die Analyse größerer Genabschnitte oder EWAS ist mit der ddPCR kaum umsetzbar.

4.4.3 Methylierung von HIF3A

Methylierungen sind reversible und vererbare Variationen der DNA. Sie tragen zur Regulation der Gentranskription bei. Genetische aber auch äußere Faktoren können Auswirkungen auf die DNA-Methylierung haben. Somit verbindet die Epigenetik den Einfluss von genetischen und umweltbedingten Einflüssen auf den Phänotyp. Genomweite Assoziationsstudien haben mittlerweile über 30 verschiedene Polymorphismen mit dem BMI in kausale Verbindung gebracht. Jedoch können durch diese genetischen Faktoren lediglich 1-5% der Variationen des BMI erklärt werden.¹⁵⁷ Die Epigenetik bietet Forschern einen neuen Ansatz zur Erklärung von Übergewicht, die die Genetik bisher nicht beantworten konnte.

In einer genomweiten Assoziationsstudie fanden Dick et al. einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus der drei CpGs cg22891070, cg27146050 und cg16672562 im Intron 1 des HIF3A-Gens.¹⁵⁷ Diese Beobachtung konnte von mehreren nachfolgenden Studien bestätigt werden.¹⁵⁸⁻¹⁶¹ Alle diese Studien zeigten, dass ein höherer Methylierungsstatus an diesen CpGs mit einem höheren BMI assoziiert ist. Zwar vermutet man mittlerweile, dass die Methylierung eine Folge des erhöhten BMI ist, allerdings ist die genaue Kausalität nach wie vor nicht bewiesen.^{157, 159} In dieser Arbeit haben wir die Methylierung an insgesamt zehn CpG-Stellen im Intron 1 des HIF3A-Gens in Bezug auf die Antipsychotika-vermittelte Gewichtszunahme untersucht. Sollte doch das Methylierungsmuster das Gewicht beeinflussen, stellt sich die Frage, ob dieser Einfluss auch Auswirkungen auf die Gewichtsentwicklung unter antipsychotischer Therapie hat. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob Patienten die mehr an Gewicht zunehmen, höhere Methylierungslevel aufweisen.

Die Methylierungswerte aller zehn CpG-Stellen korrelierten stark miteinander ($p < 0,001$). Zudem bestand ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus und dem Alter. Die durchschnittliche Methylierung aller CpGs nahm mit zunehmendem Alter ab ($0,000 < p < 0,003$). Eine Korrelation der Methylierung mit dem Alter wurde bereits für zahlreiche Gene bewiesen. Man geht mittlerweile davon aus, dass epigenetische Veränderungen auch Einfluss auf den Alterungsprozess ausüben.^{313, 314}

In Bezug auf den BMI zu Beginn der Studie zeigte sich in unserer Untersuchung keine Abhängigkeit mit dem Methylierungsstatus. Um Effekte durch vorhergehende, antipsychotische Therapien auszuschließen, wurde auch die Gruppe nicht vorbehandelter Patienten getestet. Auch in dieser Subpopulation konnten wir die Ergebnisse von Dick et al. nicht verifizieren. Allerdings handelte es sich bei unserer Studienpopulation nicht um Probanden aus der Allgemeinbevölkerung sondern Patienten mit psychotischen Erkrankungen. Dieser Unterschied schränkt die Vergleichbarkeit beider Studien ein. Zusätzlich war unsere Studienpopulation mit $n = 91$ in Bezug auf die naive Subpopulation relativ klein.

Weiterhin konnten wir sowohl in der Gesamtpopulation als auch in der adjustierten Subpopulation keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus und der Gewichtszunahme feststellen. Aufgrund der Altersabhängigkeit des Methylierungsstatus testeten wir auf Zusammenhänge in verschiedenen Altersklassen. Hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang bei jüngeren Patienten (≤ 50 Jahren) für sieben der zehn getesteten CpGs ($0,007 < p < 0,035$). Patienten mit niedrigen Methylierungsleveln nahmen signifikant mehr Gewicht zu. Für CpG 4, 5 und 9 war ein Trend in diese Richtung erkennbar ($0,059 < p < 0,078$). Dieser Zusammenhang war auch nach Einbezug weiterer Kofaktoren signifikant (Ausgangsgewicht, Geschlecht, Therapieansprechen, die Art der Medikation sowie MC4R-Genotyp). Bei einzelner Betrachtung dieser Kofaktoren zeigte sich, dass dieses Ergebnis in erster Linie auf Patienten mit Clozapin- oder Olanzapin-Therapie zurückzuführen war. Patienten mit dieser Medikation nahmen in Abhängigkeit der Methylierung signifikant mehr Gewicht zu, während bei Patienten mit Medikationen, die niedrigere Risiken für eine Gewichtszunahme als Nebenwirkung haben, die Gewichtszunahme unabhängig vom Methylierungsstatus war. Dieser Effekt war jedoch nur in der Population der ≤ 50 Jährigen erkennbar. Bei älteren Patienten zeigte sich eher ein gegenteiliger Einfluss, der jedoch keine Signifikanz erreichte.

Ob dieser von uns gefundene Effekt jedoch kausal ist, konnte nicht nachgewiesen werden. Zudem ist,

wie bereits erwähnt, bei einem möglichen Zusammenhang zwischen Methylierung und Gewichtszunahme noch nicht bewiesen, welcher Parameter welchen bedingt.^{157, 159} Alle Annahmen zu dieser Kausalität beruhen nur auf Vermutung. Die lineare Regression zeigte, dass sehr viele andere Faktoren, wie z.B. das Ausgangsgewicht, das Geschlecht oder das Therapieansprechen (siehe **Kapitel 3.6.3**), Einfluss auf die Gewichtszunahme ausüben. Im Vergleich dazu, scheint der Methylierungsstatus eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Zudem würden die Ergebnisse nach eine Korrektur für multiples Testen keine Signifikanz mehr aufweisen. Der Kofaktor Alter, der in unserer Studie einen entscheidenden Einfluss auf den signifikanten Zusammenhang zwischen Gewichtszunahme und Methylierung hatte, spielte in anderen Publikationen eine untergeordnete Rolle. Zwar wurde auch hier das Alter als Kofaktor in die Analyse eingeschlossen, der signifikante Zusammenhang zwischen BMI und Methylierung konnte aber unabhängig vom Alter der Probanden in verschiedenen Studienpopulationen nachgewiesen werden. In den von Dick et al. untersuchten Studienpopulationen betrug das Durchschnittsalter zwischen 43,8 und 60,9 Jahren.¹⁵⁷ In weiteren Studien wurden Patienten zwischen 32 und 83 bzw. 47 und 70 Jahren untersucht.^{160, 161} Eine Beeinflussung der Gewichtszunahme durch die HIF3A-Methylierung scheint daher möglich, ist aber vermutlich maximal ein untergeordneter Faktor.

Eine andere Hypothese ist, dass die Methylierung durch den BMI beeinflusst wird. Diese wird von den meisten Autoren als die plausibelste Ursächlichkeit angenommen.^{157, 159} Um diese Annahme zu untersuchen, haben wir Patienten unserer Studienpopulation mit stark ausgeprägter, Antipsychotika-induzierter Gewichtszunahme auf Zusammenhänge zwischen dem Zeitpunkt der Blutentnahme und dem Methylierungsstatus untersucht. Die Annahme war, dass Patienten, bei denen die Blutentnahme zu einem späteren Therapiezeitpunkt erfolgte und die zu diesem Zeitpunkt schon mehr Gewicht zugenommen hatten, höhere Methylierungswerte aufwiesen. Auch hier konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang nachweisen. Einschränkung war jedoch die geringe Patientenzahl ($n = 53$), die die oben beschriebenen Kriterien erfüllten und in die Analyse aufgenommen wurden. Hieraus resultierte eine geringere statistische Aussagekraft. Der Blutentnahmezeitpunkt konnte oft nur grob rekonstruiert werden, da hierzu genaue Dokumentationen fehlten. Zudem war weder die genaue Gewichtszunahme seit Therapiebeginn bis zum Zeitpunkt der Blutentnahme bekannt, noch erlaubte die Gewichtsänderung eine Einordnung der Patienten in Bezug auf deren BMI. Ein direkter Vergleich der Methylierungswerte zweier Blutproben, entnommen an zwei definierten Zeitpunkten und genauer Dokumentation der Gewichtsentwicklung in diesem Zeitraum ist für eine exakte Überprüfung der Hypothese notwendig.

Zusammenfassend lässt unserer Studie keine Annahme auf eine Kausalität zwischen HIF3A-Methylierung und der Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie zu. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Methylierung der untersuchten CpG-Stellen im HIF3A-Gen keinen bzw. einen untergeordneten Effekt auf die Antipsychotika-vermittelte Gewichtszunahme ausübt. Die Hypothese, dass die erhöhte Methylierung eine Folge des höheren BMI ist, spricht ebenfalls für diese Annahme. Demnach wäre der Methylierungsstatus kein geeigneter Marker, um eine Gewichtszunahme vorauszusagen, sondern würde erst aus der Gewichtszunahme resultieren. Nach unserem Kenntnisstand ist dies jedoch die erste Studie die einen Zusammenhang zwischen Methylierung von HIF3A und der Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie überprüft hat. Weitere Studien sind daher sinnvoll und wünschenswert. Zudem muss in Zukunft noch genauer geklärt werden, welche Rollen das HIF3A-Gen und dessen Methylierung bei der Regulation des Körpergewichts spielen. Studien haben gezeigt, dass HIF3A einen Einfluss auf die Zellantwort auf Glucose und Insulin ausübt und die Adipozytendifferenzierung beschleunigt.^{155, 156} Allerdings ist die HIF3A-Untereinheit bislang wenig untersucht und die molekularbiologischen Zusammenhänge sind kaum geklärt.

Eine weitere Einschränkung unserer Studie ist die Messungenauigkeit der Methode. Diese weist eine Schwankung von ca. ± 5 Prozentpunkten auf, was bei geringen Unterschieden in der Methylierung erhebliche Auswirkung auf die Ergebnisse haben kann. Durch Gruppierung der Proben im Abstand von 5 Prozentpunkten Methylierung wurde versucht, dies zu relativieren. Allerdings besteht hierbei die Gefahr, Proben in die falschen Gruppen einzusortieren. Zudem wurde im Rahmen unserer Studie nicht zwischen verschiedenen Zellsubtypen unterschieden, sondern das EDTA-Blut als Gesamtes verwendet. Aufgrund von unterschiedlichen Methylierungsleveln der einzelnen Zellsubtypen und unterschiedlicher Zusammensetzung dieser Zelltypen innerhalb der Blutproben, könnten die Ergebnisse verfälscht worden sein. Dick et al. konnten zwar weder einen Einfluss der Zusammensetzung der einzelnen Blutzellen auf den BMI noch auf die Methylierungslevel nachweisen, allerdings kann dieser auch nicht komplett ausgeschlossen werden.¹⁵⁷ Bei unserer Studie handelte es sich um eine retrospektive Studie. Die Durchführung eines Blutbildes war zum Zeitpunkt der Probensammlung nicht vorgesehen. Mittlerweile waren die Blutproben bereits über mehrere Jahre eingefroren, was eine nachträgliche Bestimmung der Zellzusammensetzung unmöglich machte.

Des Weiteren ist die Studie vor dem Hintergrund der Ergebnisse unserer Untersuchungen der Stabilität von Methylcytosin in Blutproben nach Lagerung (siehe **Kapitel 3.6.4** und **4.4.4**) als kritisch zu betrachten. Sollten sich die Methylierungslevel über einen längeren Lagerungszeitraum signifikant

verändern, hätte dies aufgrund der unterschiedlich langen Lagerung der Patientenproben erheblichen Einfluss auf unsere Ergebnisse. Zur Minimierung dieses Risikos wurde für die Analyse nur die direkt nach Probenentnahme extrahierte DNA verwendet. Eine Veränderung des Verhältnisses von Cytosin und Methylcytosin innerhalb der gelagerten DNA-Extrakte ist zwar unwahrscheinlicher, kann aber trotzdem nicht ausgeschlossen werden.

4.4.4 Stabilität von Methylcytosin

Die Proben der Studienpopulation für die oben beschriebenen Untersuchungen wurden zwischen acht und 15 Jahren unter verschiedenen Bedingungen gelagert. Dabei lagerten das EDTA-Blut zum Teil bei -20 °C (J-Proben) zum Teil bei -70 °C (B-, T-, S-Proben), die extrahierte DNA lagerte im Kühlschrank oder bei -70 °C. Für die Genotypisierung waren die Lagerungsbedingungen nicht von Bedeutung. In Bezug auf die Quantifizierung der Methylierung stellte sich jedoch die Frage, inwieweit Abbauprozesse während der Lagerung Einfluss auf die Methylierungslevel haben. Sowohl eine aktive Demethylierung als auch eine Zersetzung der DNA, wobei methylierte und unmethylierte Stellen eine unterschiedliche Stabilität aufweisen, wäre denkbar. Diese Einflüsse würden die Ergebnisse der Methylierungsbestimmung verfälschen (siehe **Kapitel 4.4.3**).

Mehrere Untersuchungen berichten von schlechteren DNA-Ausbeuten bei der Extraktion nach längerer Lagerung von EDTA-Blutproben.³¹⁵⁻³¹⁷ Die schlechteren Ausbeuten schienen allerdings nicht mit einer schlechteren DNA-Qualität zusammen zu hängen. So war die DNA trotzdem noch für viele molekularbiologische Untersuchungen verwendbar und lieferte verlässliche Testergebnisse.^{316, 318} Im Gegensatz dazu beobachteten Malentacchi et al. mittels Elektrophorese und PCR Veränderungen der DNA nach nur ein paar Tagen Lagerung des Blutes bei 4 °C.¹⁶³ Auch Palmirotta et al. folgerten aus ihren Untersuchungen, dass die Lagerung Einfluss auf molekularbiologische Testergebnisse hat.³¹⁹ Bezüglich der Lagerungsstabilität von 5'-Methylcytosin in EDTA-Blutproben waren zu Beginn unserer Untersuchungen jedoch keine Daten veröffentlicht. Viele epigenetische Studien geben keine Auskunft bezüglich der Lagerung bzw. „Frische“ ihrer Blutproben. Wir haben daher Blutproben von zehn Freiwilligen für bis zu zehn Monate unter verschiedenen Bedingungen gelagert und den Methylierungsstatus analysiert.¹⁶⁶ Zudem wurden die DNA der Patientenproben der Studienpopulation verglichen. Diese wurden entweder in bereits extrahierter Form oder als EDTA-Blut gefroren oder im Kühlschrank gelagert.

Patientenproben

In Bezug auf die Patientenproben konnten wir keine eindeutigen Unterschiede bezüglich der Lagerung feststellen. Der Vergleich der bei -70 °C und im Kühlschrank gelagerten DNA-Extrakte zeigte im Mittelwertvergleich zwar signifikante Unterschiede, allerdings ließ der *Bland-Altman-Plot* auf keine systematische Veränderung schließen. Die Differenzen der Messwerte der bei -70 °C und im Kühlschrank gelagerten Proben zeigte eine gleichmäßige Streuung um den Mittelwert bzw. den Nullpunkt. Die Abweichungen lagen im Rahmen der Messmethodenabweichung. Die Proben wurden daher als gleichwertig angesehen und für die Analyse in Bezug auf die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme verwendet.

Die aus den gelagerten EDTA-Blutproben extrahierte DNA zeigte im Mittel im Vergleich zu den DNA-Extrakten höhere Methylierungswerte. Diese Abweichung war mit durchschnittlich 1,56 Prozentpunkten sehr gering, sodass über eine systematische Änderung nur spekuliert werden kann. Allerdings war zu beobachten, dass die Standardabweichung und die Streuung der Messwertdifferenzen größer waren als bei dem Vergleich der verschiedenen DNA-Extrakte ($SD = 4,22$ vs. $3,52$). Dies könnte auf eine schlechtere DNA-Qualität zurückzuführen sein. Die Ergebnisse ließen allerdings keinen eindeutigen Rückschluss auf eine veränderte Methylierung der Blutproben in Bezug auf die gelagerten DNA-Extrakte zu. Um das Risiko von lagerungsbedingten Verfälschungen der Methylierungswerte zu minimieren, wurden die Messwerte der gelagerten Blutproben nicht in die Analyse zur Antipsychotika-vermittelten Gewichtszunahme einbezogen (siehe **Kapitel 4.4.3**).

Stabilitätsuntersuchung mit frisch entnommenen Blutproben

Im Rahmen dieser Versuchsreihe konnten wir vorhergehende Studien in Bezug auf schlechtere DNA-Ausbeuten aus EDTA-Blut nach längerer Lagerung bestätigen.³¹⁵⁻³¹⁷ 2016 wurde eine ähnliche Studie zu unserer veröffentlicht.¹⁶⁷ Bulla et al. testeten Methylierungswerte und Extraktionsausbeuten von EDTA-Blut nach Lagerung von bis zu einem Jahr unter verschiedenen Bedingungen. Auch diese Studie konnten abnehmende DNA-Ausbeuten nach Extraktion in Abhängigkeit der Lagerungsdauer nachweisen. Die Ausbeuten waren dabei unabhängig von der Extraktionsmethode. Während bei unserer Untersuchung die durchschnittlichen Ausbeuten nach zehn Monaten für alle Lagerungsbedingungen weniger als 30% im Verhältnis zur den direkt nach Blutabnahme extrahierten Proben betragen, stellten Bulla et al. deutliche Unterschiede in den verschiedenen Lagerungsbedingungen fest. Blut bei Raumtemperatur zeigte hier die größten Verluste. Hier lagen die Ausbeuten nach 14 Tagen bereits nur noch bei 30%. Proben, die gekühlt oder gefroren aufbewahrt wurden, zeigten deutliche

höhere Ausbeuten. So betrug der DNA-Gehalt der bei -80 °C gefrorenen Proben nach einem Jahr immer noch über 70%. Deutlich bessere Ausbeuten konnte durch Zusatz von DNA-Stabilisierern (DNAgard) vor Einfrieren (> 85%) bzw. direkt vor Extraktion (> 90%) erreicht werden. Die Autoren gaben daher die Empfehlung wenn möglich dem EDTA-Blut Stabilisierer zuzusetzen und bei -80 °C zu lagern.

Unsere Ergebnisse der Quantifizierung von mC deuteten darauf hin, dass die Methylierungslevel der Blutproben mit längerer Lagerung ansteigen.¹⁶⁶ Bei allen Lagerungsbedingungen war ein signifikanter Anstieg der Methylierung nach zehnmonatiger Lagerung messbar. Dieser Anstieg ging einher mit geringeren DNA-Ausbeuten bei der DNA-Extraktion. Es wäre daher denkbar, dass methylierte DNA eine höhere Stabilität aufweist als unmethylierte DNA und somit während der Lagerung und dem Extraktionsvorgang im Verhältnis weniger zersetzt wird. Diese Hypothese wird unterstützt durch eine Untersuchung von Thalhammer et al.³²⁰ Die Autoren untersuchten die Schmelzpunkte und somit die Stabilität von DNA-Doppelsträngen. Sie fanden heraus, dass methylierte DNA einen höheren Schmelzpunkt aufweist als unmethylierte. Daraus folgerten sie, dass 5'-Methylcytosin die DNA-Struktur stabilisiert. Allerdings widerspricht diese Hypothese anderen Studien, die eine größere Anfälligkeit von methyliertem Cytosin in Bezug auf eine hydrolytische Deaminierung als von unmethyliertem Cytosin berichten.^{321, 322} Eine weitere Erklärung wären Änderungen des Anteils unterschiedlicher Subtypen von Leukozyten im Laufe der Lagerung aufgrund unterschiedlicher Zersetzungsraten der Zelltypen in Blut.^{164, 165} Da unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche Methylierungslevel aufweisen, könnten sich durch geänderte Zellverhältnisse auch die Methylierungswerte ändern. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden die Konzentrationen der Zelltypen in den Blutproben nicht bestimmt.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Bulla et al. keine signifikante Veränderung der DNA-Methylierung und -Qualität nachweisen. Gelelektrophorese und *long-range* PCR-Ergebnisse ließen auf keine deutliche Zersetzung der DNA schließen. Im Rahmen der mC-Bestimmungen lagen die absoluten Abweichungen bei < 1 Prozentpunkt. Allerdings gab es im Vergleich zu unseren Untersuchungen einige methodische Unterschiede. Zum einem betrachteten die Autoren keine einzelnen CpG-Stellen sondern den Methylierungsstatus gesamter Gene. Sie verwendeten hierfür den *Epitect Methyl II PCR Array „Human stress and Toxicity“* von Qiagen. Dieser basiert auf methylsensitivem und methylabhängigem enzymatischem Verdau von 22 ausgewählten Genen und anschließender Quantifizierung mittels qPCR. Diese Methode zeigte in verschiedenen Methodenvergleichen eine

schlechtere Präzision und Genauigkeit als die Pyrosequenzierung und auch als die *Droplet Digital PCR*.^{266, 304, 311} Eine weitere Einschränkung der Studie von Bulla et al. besteht in die Tatsache, dass die Autoren für die untersuchten Gene jeweils Werte von ca. 100 oder ca. 0 Prozentpunkten Methylierung nachweisen konnten. Geht man von der Hypothese aus, dass die unmethylierte DNA instabiler ist und somit schneller zersetzt wird bzw. den Extraktionsvorgang nicht übersteht, wäre dies bei Ausgangswerten von 0 und 100 Prozentpunkten nicht ersichtlich.

Auch andere Studien in Sperma und Plazentagewebe postulieren keinen Einfluss der Lagerung auf die Methylierung.^{168, 169} Allerdings konnten Vilahur et al. abhängig von der Messmethode größere Schwankungen der Ergebnisse mit zunehmender Lagerzeit feststellen, was die Autoren auf Zersetzungsprozesse der DNA zurückführten.¹⁶⁹ Eine Einschränkung beider Studien sind die kurzen Lagerzeiten von 72 bzw. 24 Stunden. In unserer Studie zeigten sich die deutlich veränderten mC-Level erst nach zehnmonatiger Lagerung bzw. bei deutlich schlechteren DNA-Extraktionsausbeuten. Zudem sind andere Gewebearten, vor allem Sperma, weniger anfällig für lagerungsbedingte Schwankungen in Bezug auf die Zusammensetzung verschiedener Zelltypen als Blut. Dies könnte ein weiterer Grund sein, weshalb diese Studien keine Veränderung in der Methylierung feststellen konnten.

Zusammenfassend beruht unsere Hypothese auf der Annahme, dass die von uns nachgewiesenen veränderten Methylierungswerte nach Lagerung aus unterschiedlicher Stabilität der methylierten und unmethylierten DNA resultieren. Dies könnte auch ein Grund für die geringeren DNA-Ausbeuten bei der Extraktion der Blutproben sein. Eine weitere Erklärung wäre, dass sich unterschiedliche Zelltypen während der Lagerung unterschiedlich schnell zersetzen. Dadurch würde der Anteil einzelner Zelltypen im Blut über die Zeit schwanken. Extrahierte DNA scheint hingegen bei Temperaturen von -70 °C bis 37 °C über mehrere Jahre stabil zu sein und zeigt eine deutlich geringere Zersetzung.³²³ Darauf deutet auch der Vergleich der eingefrorenen und im Kühlschrank gelagerten DNA-Extrakte der Patientenproben hin, die ähnliche Methylierungswerte lieferten. In Blutproben scheint hingegen ein stärkerer Fragmentierungsprozess der DNA stattzufinden. So wird DNA beispielsweise beim Einfrieren durch entstehende Eiskristalle oder durch Scherkräfte bei der Extraktion und Aufreinigung mechanisch zerstört.^{324, 325} Während der Lagerung bei Raumtemperatur wären enzymatische Ursachen denkbar. Zudem ist zeitlich lange gelagerte DNA eventuell anfälliger für chemische Einflüsse während der DNA-Extraktion. Verschiedene DNA-Extraktionsmethoden könnten somit ebenfalls die DNA-Qualität und auch die Methylierungslevel beeinflussen.¹⁶³ Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Stabilitätsunterschiede für alle getesteten Lagerungsbedingungen von Bedeutung sind.

Während die Ergebnisse der frisch entnommenen Blutproben auf eine Erhöhung der Methylierungswerte als Folge längerer Lagerung von EDTA-Blut hinwiesen, zeigte sich im Vergleich der Patientenproben kein eindeutiger Unterschied. Der Bland-Altman-Plot ließ eher auf eine größere Streuung als auf eine systematische Veränderung schließen. Über mögliche Gründe lässt sich spekulieren. Eventuell haben Zersetzungsprozesse der extrahierten DNA eine Bedeutung, sodass sich auch hier veränderte Methylierungswerte über lange Lagerzeiten zeigen. Methylierungsanalysen von extrahierten und anschließend gelagerten Proben wäre eine Möglichkeit, um bezüglich dieser Fragestellung Sicherheit zu gewinnen. Allgemein zeigten sowohl die Blutproben der Studienpopulation als auch das frisch entnommene EDTA-Blut mit längerer Lagerzeit für alle Lagerbedingungen größere Standardabweichungen und Streuungen. Dies lässt ebenfalls auf Zersetzungsprozesse und somit schlechtere DNA-Qualität der länger gelagerten Blutproben schließen. Zudem deutet die stärkere Streuung darauf hin, dass die Zersetzung vermutlich nicht linear verläuft, sondern durch viele Faktoren individuell beeinflusst wird.

Eine Einschränkung unserer Untersuchung sind die Messungenauigkeiten der Messmethode. Diese liegen bei ca. ± 5 Prozentpunkten. Kleinere Unterschiede lassen daher keinen Rückschluss auf einen kausalen Zusammenhang zu. Zudem wurde nicht in verschiedene Zellsubtypen differenziert. Auch dies könnte zu Verfälschungen geführt haben. Epigenetische Studien aus EDTA-Blut sollten daher den Anteil einzelner Zelltypen bestimmen und als Kofaktor in ihre Analyse aufnehmen. In Bezug auf die Stabilität von Methylcytosin wären zudem weitere Analysen mit isolierten weißen Blutkörperchen aber auch mit extrahierter DNA interessant. Eine weitere Einschränkung der Studie ist, dass nur zehn einzelne CpG-Stellen innerhalb eines Gens untersucht wurden. Die Untersuchung impliziert, dass Änderungen des Methylierungsstatus in Abhängigkeit von der Lagerung möglich sind. Jedoch ist durchaus denkbar, dass andere Genloci sich anders verhalten.

Gewisse Instabilitäten und Verluste von DNA müssen vermutlich immer einkalkuliert werden. Sollte wirklich ein Stabilitätsunterschied in methylierter und unmethylierter DNA bestehen, worauf unsere Untersuchungen hindeuten, kann dies für epigenetische Analysen starke Einschränkungen bedeuten. Oft ist eine direkte Analyse von Probenmaterial aus zeitlichen oder logistischen Gründen nicht möglich. Epigenetische Studien könnten allerdings durch lange Lagerzeiten oder Transporte der Proben verfälscht werden und sollten für zuverlässige Studienergebnisse daher zeitnah durchgeführt werden. Sollte dies nicht möglich sein, scheint eine frühzeitige DNA-Extraktion oder eine Lagerung von EDTA-Blut unter Zusatz von DNA-Stabilisierern bei -80 °C sinnvoll.¹⁶⁷

5 Zusammenfassung

Psychische Erkrankungen haben in der heutigen Gesellschaft eine zunehmende Bedeutung. Mittlerweile zählen sie in Deutschland zu den häufigsten Ursachen für Arbeitsunfähigkeit und Frührente. Des Weiteren nehmen die Krankenhausaufenthalte aufgrund psychischer Erkrankungen zu, sodass die Kosten für das Gesundheitssystem unaufhörlich steigen.¹⁷⁰ Laut statistischem Bundesamt beliefen sich in Deutschland 2008 allein die direkten Kosten auf ca. 28,7 Mrd. Euro und waren damit hinter den Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems und des Verdauungstrakts der dritthöchste Posten im Gesundheitssystem.³²⁶ Experten gehen weiterhin von einer stetigen Steigerung aus. Schizophrenie und Psychosen gehören dabei mit einer Prävalenz von 1% nach der Depression zu den häufigsten Fällen psychischer Erkrankungen.¹⁵

Eine allgemeingültige Antipsychotika-Therapie gibt es derzeit nicht. Vielmehr stehen zahlreiche Medikamente zur Verfügung, die sich jedoch durch sehr individuelle Wirkungs- und Nebenwirkungsprofile auszeichnen.²⁵ Das unterschiedliche Ansprechen psychiatrischer Patienten auf die Therapie mit Psychopharmaka bedingt eine hohe Anzahl an Therapieabbrüchen und Medikationswechselln.^{52, 54, 327} Ein Großteil der individuellen Unterschiede lässt sich dabei möglicherweise auf pharmakogenetische und epigenetische Faktoren zurückführen. Die Identifizierung solcher Marker stellt daher ein vielversprechendes Mittel dar, um die beste Therapie für jeden individuellen Patienten zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Studie konzentrierten wir uns auf die Gewichtszunahme, eine schwerwiegende Nebenwirkung mit hoher klinischer Relevanz und Häufigkeit in der Therapie von psychisch Erkrankten. Eine deutliche Gewichtszunahme führt zu zusätzlichen somatischen und psychischen Problemen, die eine Depression noch verstärken können. Nicht selten resultiert daraus eine *Non-Compliance* und somit ein Ausbleiben des Therapieerfolgs.⁶⁰ Des Weiteren kann eine Gewichtszunahme ernsthafte Folgeerkrankungen verursachen, z.B. Diabetes oder Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems. All dies sind Faktoren, die dazu beitragen, dass schizophrene Patienten eine um 20% geringere Lebenserwartung aufweisen.^{59, 328} Durch molekularbiologische Untersuchungen können Patienten mit bestimmten Risikogen-Varianten aber möglicherweise schon vor Therapiebeginn frühzeitig erkannt werden. Dieses Vorgehen würde die Effektivität einer derzeit langwierigen und schwierigen Behandlung wesentlich verbessern und zusätzlich die Krankheitskosten senken.¹⁷³

Ein Ziel dieser Arbeit war daher die Identifikation und Untersuchung potenzieller Risikomarker, die eine Gewichtszunahme als Nebenwirkung der antipsychotischen Therapie beeinflussen. Es sollte geprüft werden, ob durch Genscreening die Gewichtsentwicklung prognostiziert und so eine Empfehlung für eine sinnvolle psychiatrische Arzneimitteltherapie gegeben werden kann.

Zu dieser Fragestellung wurden Blutproben eines bereits vorliegenden Patientenkollektivs des Klinikums rechts der Isar herangezogen. Dieses umfasste eine sehr heterogene Studienpopulation mit verschiedenen antipsychotischen Therapien und Komedikationen. Einerseits ließ sich somit der spezifische Einfluss einzelner Antipsychotika nur schwer bestimmen. Auf der anderen Seite bildete dieses Kollektiv allerdings den Klinikalltag realistisch ab und erhöhte damit die klinische Relevanz der identifizierten Marker. Insgesamt wurden acht verschiedenen Polymorphismen sowie das Methylierungsmuster des HIF3A-Gens untersucht. Vorangegangene Studien hatten diese Marker bereits mit Übergewicht im Allgemeinen oder mit Antipsychotika induzierter Gewichtszunahme in Verbindung gebracht. Es wurden jeweils neue Methoden zu deren Bestimmung auf Basis von Polymerase-Kettenreaktion und Pyrosequenzierung entwickelt.

Als vielversprechend stellte sich im Rahmen dieser Untersuchung das FTO-Gen heraus. Varianten dieses Gens wurden bereits von einigen GWAS mit Übergewicht assoziiert.^{101, 102, 105, 106} In Bezug auf die Antipsychotika-vermittelte Gewichtszunahme ist die Studienlage widersprüchlich.¹⁰⁸⁻¹¹³ Wir konnten einen signifikanten Zusammenhang der Risikoallele der Polymorphismen rs9939609 und rs7185735 mit der Gewichtszunahme nach vier Wochen Therapie mit atypischen Antipsychotika finden. Dieser war besonders stark ausgeprägt bei Patienten, die mit Olanzapin oder Clozapin behandelt wurden. Beide Medikamente sind für diese Nebenwirkung bekannt. Eine kombinierte Betrachtung mit dem MC4R rs17782313 Polymorphismus, einer Genvariante, die in dieser Studienpopulation bereits durch Dr. Fabian Czerwensky als Risikofaktor identifiziert wurde, zeigte einen additiven Effekt.⁶⁶ Patienten mit mindestens drei Risikoallelen nahmen ca. 6% ihres Körpergewichts zu, während bei Patienten ohne Risikoallel dieser Wert maximal 1% betrug (**0,001** < p < **0,015**). Für die anderen untersuchten Polymorphismen sowie den Methylierungsstatus von HIF3A konnte in dieser Studienpopulation kein signifikanter Einfluss auf die Gewichtsentwicklung festgestellt werden.

Interessante Erkenntnisse lieferten die Experimente in Bezug auf die Stabilität der Methylierung in Blutproben. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass methylierte DNA stabiler ist als unmethylierte.

Unsere Analyse ergab höhere Methylierungswerte für das HIF3A-Gen nach einem Lagerungszeitraum von zehn Monaten unabhängig von den Lagerungsbedingungen. Zwar widersprechen diese Ergebnisse anderen bisher veröffentlichten Studien über die Lagerstabilität von mC, allerdings sind sie aufgrund von methodischen Unterschieden sowie Unterschieden in Bezug auf Lagerung und Probenmaterial nur bedingt mit unserer Studie vergleichbar.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ So ist unsere Studie die erste, die die Stabilität von mC in Blutproben mittels Sequenzierung untersuchte. Um die Zuverlässigkeit von, immer bedeutender werdenden, epigenetischen Studien sicher zu stellen, sind weitere Untersuchungen in diese Richtung notwendig.

Ein weiterer Gesichtspunkt dieser Arbeit lag auf der Alzheimer-Therapie mit Donepezil. Hier sollte überprüft werden, ob eine individualisierte Dosierung auf Grundlage genetischer Faktoren gegenüber der zurzeit üblichen Standarddosierung Vorteile für das Therapieansprechen bringt. Donepezil wird über das CYP-Enzym CYP2D6 verstoffwechselt. Es wurde daher auf die häufigsten Genvarianten von CYP2D6, die zu einer veränderten Enzymaktivität führen, getestet. Mithilfe unserer Ergebnisse konnte die Arbeitsgruppe von Prof. Grimmer der Technischen Universität weitere Untersuchungen im Hinblick auf diese Fragestellung durchführen. Es wurden Serumspiegel sowie das Therapieansprechen bestimmt und diese mit dem CYP2D6-Genotypen in Zusammenhang gebracht.

Zusammenfassend konnten mit den Genvarianten des FTO-Gens zwei vielversprechende Polymorphismen in Bezug auf die Antipsychotika-induzierte Gewichtszunahme vor allem unter Clozapin- und Olanzapin-Therapie identifiziert werden. Der Effekt konnte in einer heterogenen Population mit unterschiedlicher Komedikation nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die Ergebnisse für den klinischen Alltag bedeutsam sein könnten. Neben den genetischen Faktoren wurden jedoch auch andere klinische Faktoren, wie Ausgangsgewicht, Geschlecht und Therapieansprechen, als signifikante Einflussgrößen identifiziert.

Zudem wurde erheblich zu der Fragestellung, ob genetische Untersuchungen auch im Rahmen der Donepezil-Therapie von Morbus Alzheimer klinisch relevant sein könnten, beigetragen. In Bezug auf die weiteren epigenetischen Untersuchungen zeigen die Ergebnisse der Stabilitätstests von methylierter und unmethylierter DNA, wie wichtig es ist, die Versuchsparameter epigenetischer Analysen genauer zu untersuchen, zu validieren und zu optimieren. Nur so können verlässliche Studienresultate gewährleistet werden.

Mit dieser Studie wurde somit ein weiterer Beitrag zur individualisierten Arzneimitteltherapie geleistet. Da es sich bei den statistischen Modellen um starke Vereinfachungen handelt, sind zukünftig weitere Studien in größeren Patientenkollektiven zur Bestätigung der Ergebnisse dieser Arbeit notwendig.

Genetische und epigenetische Tests werden aufgrund der Weiterentwicklung molekularbiologischer Methoden und den sich daraus ergebenden neuen Erkenntnissen immer populärer. Auch im Rahmen der Antipsychotika-Therapie gewinnen sie immer mehr an Bedeutung. So sind bereits erste kommerzielle genetische Tests auch für die Therapie psychischer Erkrankungen verfügbar, deren Anwendung sich auf die Therapie positiv auswirken kann.^{57, 329-331} Um einen breiteren Einsatz zu erzielen, braucht es jedoch klare Vorgaben, welche Tests wann durchzuführen sind und wie auf die Ergebnisse zu reagieren ist.^{49, 56, 57} Weitere Studien, eine besserer Aufklärung der verordnenden Ärzte und eine größere Akzeptanz sowie eine Kostenübernahme durch die Krankenkassen sind notwendig, um das Potenzial, das pharmakogenetische Untersuchungen bieten, besser auszuschöpfen und optimale Arzneimitteltherapien zu ermöglichen.^{45, 51}

6 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABC	<i>ATP binding cassette</i>
ALS (PCR)	Allel-spezifische (PCR)
α -MSH	α -Melanozyten-stimulierendes Hormon
ANCOVA	Kovarianzanalyse (<i>Analysis of Covariance</i>)
ANOVA	Varianzanalyse (<i>Analysis of Variance</i>)
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Adenosin-5'-Phosphorsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AVA	<i>Amplicon Variant Analyzer</i>
B	Regressionskoeffizient
Beta	standardisierter Regressionskoeffizient
BLAST	<i>Basic Local Alignment Tool</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
bp	Basenpaare
BRAC	Brustkrebsgen 1 (<i>BReast CAncer 1</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CATIE-Studie	<i>Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness</i> -Studie
CGI-Skala	<i>Clinical Global Impressions</i> -Skala (Skala für Klinischen Gesamteindruck)
CGI-I	<i>Clinical Global Impression of Improvement</i> (Skala der Verbesserung)
CGI-S	<i>Clinical Global Impression of Severity</i> (Skala der Symptomschwere)
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CV	Variationskoeffizient / relative Standardabweichung
CYP	Cytochrom P450
D	Dopamin
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
ddPCR	<i>Droplet Digital PCR</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase

DOTES	<i>Dosage Record and Treatment Emergent Symptom</i>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EM	<i>extensive</i> Metabolisierer
emPCR	emulsions-basierte PCR
EPMS	extrapyramidale motorische Störungen
EWAS	epigenomweite Assoziationsstudie
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FTO	<i>Fat mass and obesity associated</i>
G	Guanin
gBlock	<i>genomic block</i>
GWAS	genomweite Assoziationsstudien
H	Histamin
HIF	<i>hypoxia inducible transcription factor</i>
HIF3A	<i>hypoxia inducible factor 3 alpha</i>
HS	<i>high sensitivity</i>
5-HT	Serotonin (5-Hydroxytryptamin)
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium
ICD	Internationale Klassifikation der Krankheiten (<i>International Classification of Diseases</i>)
IM	<i>intermediate</i> Metabolisierer
Kb	Kilobasen
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
KS	Kühlschrank
LC	<i>LightCycler</i>
LD	<i>Linkage Disequilibrium</i>
LNA	<i>Locked Nucleic Acids</i>
M	Monat
<i>M</i>	Mittelwert
mACh	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
mC	Methylcytosin
MC4R	Melanocortin-4-Rezeptor

Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MID	<i>Multiplex Identifiers</i>
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
NADH	oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NDUFS1	NADH-Ubiquinon Oxidoreduktase 75 kDa Untereinheit 1
NGS	Sequenziertechnologie der nächsten Generation (<i>Next Generation Sequencing</i>)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NV	Normalverteilung
p	Signifikanzwert
PBR	peripherer Benzodiazepin-Rezeptor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-S	Paranoid-Depressivitäts-Skala
PET	Positronenemissionstomographie
PM	<i>poor</i> Metabolisierer
POMC	Proopiomelanocortin
PPi	Pyrophosphat
R ²	Bestimmtheitsmaß
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
ROS	oxidative Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
qPCR	quantitative PCR
SAM	S-Adenosylmethionin
SD	Standardabweichung
SGA	Antipsychotika der zweiten Generation (<i>second generation antipsychotics</i>)
SNP	Einzelbasenaustausch (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SOP	<i>Standard Operating Procedures</i>
T	Thymin
TBE-(Puffer)	TRIS-Borat-EDTA-(Puffer)
T _m	Schmelztemperatur
T _m NN	Schmelzpunkt bestimmt mittels <i>nearest-neighbor</i> Methode
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSPO	<i>Translocator Protein</i>

U	Uracil
UM	<i>ultrarapid</i> Metabolisierer
UV	ultraviolett

7 Literaturverzeichnis

1. Schreier A, Wolke D, Thomas K, et al. Prospective study of peer victimization in childhood and psychotic symptoms in a nonclinical population at age 12 years. *Arch Gen Psychiatry*. 2009;66(5):527-36.
2. Rujescu D. Suche nach Risikogenen bei Schizophrenie. *Nervenarzt*. 2017;1-4.
3. Mostafavi Abdolmaleky H. Horizons of Psychiatric Genetics and Epigenetics: Where Are We and Where Are We Heading? *Iranian Journal of Psychiatry and Behavioral Sciences*. 2014;8(3):1-10.
4. Geddes JR, Verdoux H, Takei N, et al. Schizophrenia and complications of pregnancy and labor: an individual patient data meta-analysis. *Schizophr Bull*. 1999;25(3):413-23.
5. Cardno AG, Marshall E, Coid B, et al. Heritability estimates for psychotic disorders: The maudslay twin psychosis series. *Arch Gen Psychiatry*. 1999;56(2):162-8.
6. Budde M, Forstner AJ, Adorjan K, et al. Genetische Grundlagen der bipolaren Störung. *Nervenarzt*. 2017;1-5.
7. Wigman JT, van Winkel R, Jacobs N, et al. A twin study of genetic and environmental determinants of abnormal persistence of psychotic experiences in young adulthood. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2011;156B(5):546-52.
8. Cardno AG, Owen MJ. Genetic Relationships Between Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Schizoaffective Disorder. *Schizophr Bull*. 2014;40(3):504-15.
9. The Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study C. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet*. 2011;43(10):969-76.
10. Kanazawa T, Ikeda M, Glatt SJ, et al. Genome-wide association study of atypical psychosis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2013;162B(7):679-86.
11. Beckmann H, Franzek E. The genetic heterogeneity of "schizophrenia". *World J Biol Psychiatry*. 2000;1(1):35-41.
12. Ripke S, O'Dushlaine C, Chambert K, et al. Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. *Nat Genet*. 2013;45(10):1150-9.
13. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, et al. Mutschler Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. 2012.
14. van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet*. 2009;374(9690):635-45.
15. Freedman R. Schizophrenia. *N Engl J Med*. 2003;349(18):1738-49.
16. Murray RM, Lappin J, Di Forti M. Schizophrenia: from developmental deviance to dopamine dysregulation. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2008;18 Suppl 3:129-34.
17. Wittchen HU, Jacobi F, Klose M, et al. Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Depressive Erkrankungen: Robert Koch Institut, Berlin; 2010.
18. Baghai TC, Eser D, Möller H-J. Effects of different antidepressant treatments on the core of depression. *Dialogues Clin Neurosci*. 2008;10(3):309-20.
19. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, et al. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban & Fischer. 2008.
20. Deutsches Institut für medizinische Dokumentation und Information. <https://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10-gm/kodesuche/onlinefassungen/htmlgm2017/>. 23.09.2016.
21. Wright BM, Eiland EH, 3rd, Lorenz R. Augmentation with atypical antipsychotics for depression: a review of evidence-based support from the medical literature. *Pharmacotherapy*. 2013;33(3):344-59.
22. Stachnik JM, Nunn-Thompson C. Use of Atypical Antipsychotics in the Treatment of Autistic Disorder. *Annals of Pharmacotherapy*. 2007;41(4):626-34.
23. Maher AR, Theodore G. Summary of the comparative effectiveness review on off-label use of

- atypical antipsychotics. *J Manag Care Pharm.* 2012;18(5 Suppl B):1-20.
24. Holsboer F, Gründer G, Benkert O. *Handbuch der Psychopharmakotherapie.* Springer Medizin Verlag. 2008.
 25. Leucht S, Cipriani A, Spineli L, et al. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet.* 2013;382(9896):951-62.
 26. Machleidt W, Bauer M, Lamprecht F, et al. *Psychiatrie, Psychosomatik und Psychotherapie.* Georg Thieme Verlag. 2004.
 27. Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, et al. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry.* 2005;10(1):79-104.
 28. Buselmaier W, Tariverdian G. *Humangenetik: Springer Medizin Verlag; 2007.*
 29. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12(10):683-91.
 30. Kirchheiner J, Seeringer A, Brockmöller J. Stand der Pharmakogenetik in der klinischen Arzneimitteltherapie. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 2006;49(10):995-1003.
 31. Steinberg MH. Sick cell anemia, the first molecular disease: overview of molecular etiology, pathophysiology, and therapeutic approaches. *ScientificWorldJournal.* 2008;8:1295-324.
 32. Walsh MF, Nathanson KL, Couch FJ, et al. *Novel Biomarkers in the Continuum of Breast Cancer.* Springer International Publishing. 2016.
 33. Fursa OO, Kozlovskii VL. Pharmacogenetic aspects of the activity of cytochromes P450 in the metabolism of antipsychotics. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 2014;114(4):111-22.
 34. Niemeijer MN, van den Berg ME, Deckers JW, et al. ABCB1 gene variants, digoxin and risk of sudden cardiac death in a general population. *Heart.* 2015;101(24):1973-9.
 35. Brinkmann U, Roots I, Eichelbaum M. Pharmacogenetics of the human drug-transporter gene MDR1: impact of polymorphisms on pharmacotherapy. *Drug Discovery Today.* 2001;6(16):835-9.
 36. Ibrahim EM, Zekri JM, Bin Sadiq BM. Cetuximab-based therapy for metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of the effect of K-ras mutations. *International Journal of Colorectal Disease.* 2010;25(6):713-21.
 37. Freeman DJ, Juan T, Reiner M, et al. Association of K-ras mutational status and clinical outcomes in patients with metastatic colorectal cancer receiving panitumumab alone. *Clin Colorectal Cancer.* 2008;7(3):184-90.
 38. Brower JV, Robins HI. Erlotinib for the treatment of brain metastases in non-small cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2016;17(7):1013-21.
 39. Shin J, Kayser SR, Langae TY. Pharmacogenetics: from discovery to patient care. *American Journal of Health-System Pharmacy.* 2009;66(7):625-37.
 40. Ivanov M, Kacevska M, Ingelman-Sundberg M. Epigenomics and interindividual differences in drug response. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(6):727-36.
 41. Ivanov M, Kacevska M, Ingelman-Sundberg M. Epigenomics and Interindividual Differences in Drug Response. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2012;92(6):727-36.
 42. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature.* 2007;447(7143):396-8.
 43. Kalow W, Staron N. On distribution and inheritance of atypical forms of human serum cholinesterase, as indicated by dibucaine numbers. *Can J Biochem Physiol.* 1957;35(12):1305-20.
 44. Evans DAP, Manley KA, McKusick VA. Genetic Control of Isoniazid Metabolism in Man. *British Medical Journal.* 1960;2(5197):485-91.
 45. Ma Q, Lu AYH. Pharmacogenetics, Pharmacogenomics, and Individualized Medicine. *Pharmacological Reviews.* 2011;63(2):437-59.

46. Viedma-Rodriguez R, Baiza-Gutman L, Salamanca-Gomez F, et al. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review). *Oncol Rep.* 2014;32(1):3-15.
47. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, et al. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 1996;14(3):737-44.
48. Food and Drug Administration. Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labeling. <https://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>. 22.02.2016.
49. Stingl JC, Brockmöller J. Personalisierte Pharmakotherapie. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 2013;56(11):1509-21.
50. Xu Q, Wu X, Xiong Y, et al. Pharmacogenomics can improve antipsychotic treatment in schizophrenia. *Frontiers of Medicine.* 2013;7(2):180-90.
51. Steimer W. Pharmacogenetics and psychoactive drug therapy: ready for the patient? *Ther Drug Monit.* 2010;32(4):381-6.
52. Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, et al. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med.* 2005;353(12):1209-23.
53. Nnadi CU, Malhotra AK. Individualizing Antipsychotic Drug Therapy in Schizophrenia: The Promise of Pharmacogenetics. *Curr Psychiatry Rep.* 2007;9(4):313-8.
54. Gilmer TP, Dolder CR, Lacro JP, et al. Adherence to Treatment With Antipsychotic Medication and Health Care Costs Among Medicaid Beneficiaries With Schizophrenia. *American Journal of Psychiatry.* 2004;161(4):692-9.
55. Preskorn SH, Burke MJ, Fast GA. Therapeutic drug monitoring. Principles and practice. *Psychiatr Clin North Am.* 1993;16(3):611-45.
56. Drozda K, Müller DJ, Bishop JR. Pharmacogenomic Testing for Neuropsychiatric Drugs: Current Status of Drug Labeling, Guidelines for Using Genetic Information, and Test Options. *Pharmacotherapy.* 2014;34(2):166-84.
57. Pouget JG, Shams TA, Tiwari AK, et al. Pharmacogenetics and outcome with antipsychotic drugs. *Dialogues Clin Neurosci.* 2014;16(4):555-66.
58. Wetterling T. Bodyweight gain with atypical antipsychotics. A comparative review. *Drug Saf.* 2001;24(1):59-73.
59. Kurzthaler I, Fleischhacker WW. The clinical implications of weight gain in schizophrenia. *J Clin Psychiatry.* 2001;62 Suppl 7:32-7.
60. Weiden PJ, Mackell JA, McDonnell DD. Obesity as a risk factor for antipsychotic noncompliance. *Schizophr Res.* 2004;66(1):51-7.
61. Gates ML, Wilkins T, Ferguson E, et al. Gender and race disparities in weight gain among offenders prescribed antidepressant and antipsychotic medications. *Health & Justice.* 2016;4(1):6.
62. Lee SY, Park MH, Patkar AA, et al. A retrospective comparison of BMI changes and the potential risk factors among schizophrenic inpatients treated with aripiprazole, olanzapine, quetiapine or risperidone. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2011;35(2):490-6.
63. Theisen FM, Gebhardt S, Haberhausen M, et al. Clozapine-induced weight gain: a study in monozygotic twins and same-sex sib pairs. *Psychiatr Genet.* 2005;15(4):285-9.
64. Wehmeier PM, Gebhardt S, Schmidtke J, et al. Clozapine: weight gain in a pair of monozygotic twins concordant for schizophrenia and mild mental retardation. *Psychiatry Res.* 2005;133(2-3):273-6.
65. Lett TA, Wallace TJ, Chowdhury NI, et al. Pharmacogenetics of antipsychotic-induced weight gain: review and clinical implications. *Mol Psychiatry.* 2012;17(3):242-66.
66. Czerwensky F, Leucht S, Steimer W. Association of the common MC4R rs17782313

- polymorphism with antipsychotic-related weight gain. *J Clin Psychopharmacol.* 2013;33(1):74-9.
67. Czerwensky F, Leucht S, Steimer W. MC4R rs489693: a clinical risk factor for second generation antipsychotic-related weight gain? *Int J Neuropsychopharmacol.* 2013;16(9):2103-9.
68. Czerwensky F. Identifizierung und Verwendung pharmakogenetischer Marker zur Individualisierung der Antipsychotika-Therapie. Doctor Thesis TU München. 2014.
69. Krawczak M. Genomweite Assoziationsstudien (GWAS). In: Lenk C, Duttge G, Fangerau H. *Handbuch Ethik und Recht der Forschung am Menschen.* Springer. 2014. p. 39-42.
70. Kinon BJ, Kaiser CJ, Ahmed S, et al. Association between early and rapid weight gain and change in weight over one year of olanzapine therapy in patients with schizophrenia and related disorders. *J Clin Psychopharmacol.* 2005;25(3):255-8.
71. Vandenberghe F, Gholam-Rezaee M, Saigi-Morgui N, et al. Importance of early weight changes to predict long-term weight gain during psychotropic drug treatment. *J Clin Psychiatry.* 2015;76(11):e1417-23.
72. Li F, Liu J, Liu N, et al. Translocator Protein 18 kDa (TSPO): An Old Protein with New Functions? *Biochemistry.* 2016;55(20):2821-31.
73. Rupprecht R, Rammes G, Eser D, et al. Translocator protein (18 kD) as target for anxiolytics without benzodiazepine-like side effects. *Science.* 2009;325(5939):490-3.
74. Daugherty DJ, Selvaraj V, Chechneva OV, et al. A TSPO ligand is protective in a mouse model of multiple sclerosis. *EMBO Mol Med.* 2013;5(6):891-903.
75. Wang M, Wang X, Zhao L, et al. Macrogliia-microglia interactions via TSPO signaling regulates microglial activation in the mouse retina. *J Neurosci.* 2014;34(10):3793-806.
76. Chen MK, Guilarte TR. Translocator protein 18 kDa (TSPO): molecular sensor of brain injury and repair. *Pharmacol Ther.* 2008;118(1):1-17.
77. Setiawan E, Wilson AA, Mizrahi R, et al. Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes. *JAMA Psychiatry.* 2015;72(3):268-75.
78. Giannaccini G, Betti L, Palego L, et al. Serotonin transporter (SERT) and translocator protein (TSPO) expression in the obese *ob/ob* mouse. *BMC Neurosci.* 2011;12:18.
79. Gut P, Baeza-Raja B, Andersson O, et al. Whole-organism screening for gluconeogenesis identifies activators of fasting metabolism. *Nat Chem Biol.* 2013;9(2):97-104.
80. Danovich L, Veenman L, Leschiner S, et al. The influence of clozapine treatment and other antipsychotics on the 18 kDa translocator protein, formerly named the peripheral-type benzodiazepine receptor, and steroid production. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2008;18(1):24-33.
81. Martin A, Boisgard R, Kassiou M, et al. Reduced PBR/TSPO expression after minocycline treatment in a rat model of focal cerebral ischemia: a PET study using [(18)F]DPA-714. *Mol Imaging Biol.* 2011;13(1):10-5.
82. Colasanti A, Owen DR, Grozeva D, et al. Bipolar Disorder is associated with the rs6971 polymorphism in the gene encoding 18 kDa Translocator Protein (TSPO). *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(11):2826-9.
83. Goncalves VF, Zai CC, Tiwari AK, et al. A hypothesis-driven association study of 28 nuclear-encoded mitochondrial genes with antipsychotic-induced weight gain in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39(6):1347-54.
84. Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet.* 2005;6(3):221-34.
85. Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, et al. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol.*

- 1994;8(10):1298-308.
86. Horvath TL. The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat Neurosci.* 2005;8(5):561-5.
 87. Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, et al. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet.* 1998;20(2):113-4.
 88. Loos RJ, Lindgren CM, Li S, et al. Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet.* 2008;40(6):768-75.
 89. Malhotra AK, Correll CU, Chowdhury NI, et al. Association between common variants near the melanocortin 4 receptor gene and severe antipsychotic drug-induced weight gain. *Arch Gen Psychiatry.* 2012;69(9):904-12.
 90. Sun R. Assoziation zwischen MC4R-Polymorphismen und SGA-induzierter Gewichtszunahme. Master Thesis TU München. 2014.
 91. Chowdhury NI, Tiwari AK, Souza RP, et al. Genetic association study between antipsychotic-induced weight gain and the melanocortin-4 receptor gene. *Pharmacogenomics J.* 2013;13(3):272-9.
 92. Balijepalli S, Kenchappa RS, Boyd MR, et al. Protein thiol oxidation by haloperidol results in inhibition of mitochondrial complex I in brain regions: comparison with atypical antipsychotics. *Neurochem Int.* 2001;38(5):425-35.
 93. Walss-Bass C, Weintraub ST, Hatch J, et al. Clozapine causes oxidation of proteins involved in energy metabolism: a possible mechanism for antipsychotic-induced metabolic alterations. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008;11(8):1097-104.
 94. Baig MR, Navaira E, Escamilla MA, et al. Clozapine treatment causes oxidation of proteins involved in energy metabolism in lymphoblastoid cells: a possible mechanism for antipsychotic-induced metabolic alterations. *J Psychiatr Pract.* 2010;16(5):325-33.
 95. Reinke A, Martins MR, Lima MS, et al. Haloperidol and clozapine, but not olanzapine, induces oxidative stress in rat brain. *Neurosci Lett.* 2004;372(1-2):157-60.
 96. Graham KA, Perkins DO, Edwards LJ, et al. Effect of olanzapine on body composition and energy expenditure in adults with first-episode psychosis. *Am J Psychiatry.* 2005;162(1):118-23.
 97. Gerken T, Girard CA, Tung YC, et al. The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science.* 2007;318(5855):1469-72.
 98. Sanchez-Pulido L, Andrade-Navarro MA. The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem.* 2007;8:23.
 99. Berulava T, Ziehe M, Klein-Hitpass L, et al. FTO levels affect RNA modification and the transcriptome. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(3):317-23.
 100. Gulati P, Yeo GSH. The biology of FTO: from nucleic acid demethylase to amino acid sensor. *Diabetologia.* 2013;56(10):2113-21.
 101. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, et al. A Common Variant in the FTO Gene Is Associated with Body Mass Index and Predisposes to Childhood and Adult Obesity. *Science.* 2007;316(5826):889-94.
 102. Phani NM, Vohra M, Rajesh S, et al. Implications of critical PPAR γ 2, ADIPOQ and FTO gene polymorphisms in type 2 diabetes and obesity-mediated susceptibility to type 2 diabetes in an Indian population. *Molecular Genetics and Genomics.* 2016;291(1):193-204.
 103. Fischer J, Koch L, Emmerling C, et al. Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature.* 2009;458(7240):894-8.
 104. Church C, Moir L, McMurray F, et al. Overexpression of Fto leads to increased food intake and results in obesity. *Nat Genet.* 2010;42(12):1086-92.
 105. Quan LL, Wang H, Tian Y, et al. Association of fat-mass and obesity-associated gene FTO

- rs9939609 polymorphism with the risk of obesity among children and adolescents: a meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19(4):614-23.
106. Xi B, Cheng H, Shen Y, et al. Study of 11 BMI-associated loci identified in GWAS for associations with central obesity in the Chinese children. *PLoS One*. 2013;8(2):e56472.
107. Smemo S, Tena JJ, Kim K-H, et al. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature*. 2014;507(7492):371-5.
108. Song X, Pang L, Feng Y, et al. Fat-mass and obesity-associated gene polymorphisms and weight gain after risperidone treatment in first episode schizophrenia. *Behav Brain Funct*. 2014;10(1):35.
109. Shing EC, Tiwari AK, Brandl EJ, et al. Fat mass- and obesity-associated (FTO) gene and antipsychotic-induced weight gain: an association study. *Neuropsychobiology*. 2014;69(1):59-63.
110. Reynolds GP, Yevtushenko OO, Gordon S, et al. The obesity risk gene FTO influences body mass in chronic schizophrenia but not initial antipsychotic drug-induced weight gain in first-episode patients. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2013;16(6):1421-5.
111. Perez-Iglesias R, Mata I, Amado JA, et al. Effect of FTO, SH2B1, LEP, and LEPR polymorphisms on weight gain associated with antipsychotic treatment. *J Clin Psychopharmacol*. 2010;30(6):661-6.
112. Jassim G, Fernø J, Theisen FM, et al. Association Study of Energy Homeostasis Genes and Antipsychotic-Induced Weight Gain in Patients with Schizophrenia. *Pharmacopsychiatry*. 2011;44(01):15-20.
113. Díaz-Anzaldúa A, Ocampo-Mendoza Y, Hernández-Lagunas JO, et al. Differences in body mass index according to fat mass- and obesity-associated (FTO) genotype in Mexican patients with bipolar disorder. *Bipolar Disorders*. 2015;17(6):662-9.
114. Tan LJ, Zhu H, He H, et al. Replication of 6 obesity genes in a meta-analysis of genome-wide association studies from diverse ancestries. *PLoS One*. 2014;9(5):e96149.
115. Welsch U, Deller T. *Sobotta Lehrbuch Histologie*. Elsevier GmbH. 2010.
116. Holliday R. Mechanisms for the control of gene activity during development. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1990;65(4):431-71.
117. Egger G, Liang G, Aparicio A, et al. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63.
118. Rando OJ, Verstrepen KJ. Timescales of genetic and epigenetic inheritance. *Cell*. 2007;128(4):655-68.
119. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*. 2009;10(5):295-304.
120. Bartke T, Vermeulen M, Xhemalce B, et al. Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell*. 2010;143(3):470-84.
121. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(30):10604-9.
122. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, et al. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biology*. 2014;15(2):R24.
123. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology*. 2013;14(10):R115.
124. Hannum G, Guinney J, Zhao L, et al. Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol Cell*. 2013;49(2):359-67.
125. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013;14(3):204-20.
126. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1057-68.

127. Bonasio R, Tu S, Reinberg D. Molecular signals of epigenetic states. *Science*. 2010;330(6004):612-6.
128. Petronis A, Paterson AD, Kennedy JL. Schizophrenia: an epigenetic puzzle? *Schizophr Bull*. 1999;25(4):639-55.
129. Smith SEP, Li J, Garbett K, et al. Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. *J Neurosci*. 2007;27(40):10695-702.
130. Lee SA, Huang KC. Epigenetic profiling of human brain differential DNA methylation networks in schizophrenia. *BMC Medical Genomics*. 2016;9(Suppl 3):68.
131. Brown AS. The environment and susceptibility to schizophrenia. *Prog Neurobiol*. 2011;93(1):23-58.
132. Xu X, Su S, Barnes VA, et al. A genome-wide methylation study on obesity: differential variability and differential methylation. *Epigenetics*. 2013;8(5):522-33.
133. Wang X, Zhu H, Snieder H, et al. Obesity related methylation changes in DNA of peripheral blood leukocytes. *BMC Med*. 2010;8:87.
134. Almén MS, Nilsson EK, Jacobsson JA, et al. Genome-wide analysis reveals DNA methylation markers that vary with both age and obesity. *Gene*. 2014;548(1):61-7.
135. Huypens P, Sass S, Wu M, et al. Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance. *Nat Genet*. 2016;48(5):497-9.
136. Johnson TB, Coghill RD. Researches on pyrimidines. C111. The discovery of 5-methylcytosine in tuberculinic acid, the nucleic acid of the tubercle bacillus1. *J Am Chem Soc*. 1925;47(11):2838-44.
137. Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*. 2001;293(5532):1068-70.
138. Law JA, Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet*. 2010;11(3):204-20.
139. Wyatt GR. Occurrence of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Nature*. 1950;166(4214):237-8.
140. Jeltsch A. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem*. 2002;3(4):274-93.
141. Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. *Chembiochem*. 2011;12(2):206-22.
142. Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, et al. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol*. 2002;22(2):480-91.
143. Okano M, Bell DW, Haber DA, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-57.
144. Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. 2013;502(7472):472-9.
145. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012;13(7):484-92.
146. Griffith JS, Mahler HR. DNA ticketing theory of memory. *Nature*. 1969;223(5206):580-2.
147. Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975;187(4173):226-32.
148. Riggs AD. X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet*. 1975;14(1):9-25.
149. Kuroda A, Rauch TA, Todorov I, et al. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS One*. 2009;4(9):e6953.
150. Thomson JP, Skene PJ, Selfridge J, et al. CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature*. 2010;464(7291):1082-6.
151. Pasanen A, Heikkilä M, Rautavuoma K, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α is subject to extensive alternative splicing in human tissues and cancer cells and is regulated by HIF-1 but

- not HIF-2. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(7):1189-200.
152. Greer SN, Metcalf JL, Wang Y, et al. The updated biology of hypoxia-inducible factor. *EMBO J.* 2012;31(11):2448-60.
153. Shin MK, Drager LF, Yao Q, et al. Metabolic consequences of high-fat diet are attenuated by suppression of HIF-1alpha. *PLoS One.* 2012;7(10):e46562.
154. Jiang C, Qu A, Matsubara T, et al. Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice. *Diabetes.* 2011;60(10):2484-95.
155. Heidbreder M, Qadri F, Jöhren O, et al. Non-hypoxic induction of HIF-3alpha by 2-deoxy-D-glucose and insulin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;352(2):437-43.
156. Hatanaka M, Shimba S, Sakaue M, et al. Hypoxia-inducible factor-3alpha functions as an accelerator of 3T3-L1 adipose differentiation. *Biol Pharm Bull.* 2009;32(7):1166-72.
157. Dick KJ, Nelson CP, Tsaprouni L, et al. DNA methylation and body-mass index: a genome-wide analysis. *Lancet.* 2014;383(9933):1990-8.
158. Wang S, Song J, Yang Y, et al. HIF3A DNA Methylation Is Associated with Childhood Obesity and ALT. *PLoS One.* 2015;10(12):e0145944.
159. Pan H, Lin X, Wu Y, et al. HIF3A association with adiposity: the story begins before birth. *Epigenomics.* 2015;7(6):937-50.
160. Main AM, Gillberg L, Jacobsen AL, et al. DNA methylation and gene expression of HIF3A: cross-tissue validation and associations with BMI and insulin resistance. *Clin Epigenetics.* 2016;8:89.
161. Demerath EW, Guan W, Grove ML, et al. Epigenome-wide association study (EWAS) of BMI, BMI change and waist circumference in African American adults identifies multiple replicated loci. *Hum Mol Genet.* 2015;24(15):4464-79.
162. Huang T, Zheng Y, Qi Q, et al. DNA Methylation Variants at HIF3A Locus, B-Vitamin Intake, and Long-term Weight Change: Gene-Diet Interactions in Two U.S. Cohorts. *Diabetes.* 2015;64(9):3146-54.
163. Malentacchi F, Ciniselli CM, Pazzagli M, et al. Influence of pre-analytical procedures on genomic DNA integrity in blood samples: The SPIDIA experience. *Clinica Chimica Acta.* 2015;440:205-10.
164. Zini G. Stability of complete blood count parameters with storage: toward defined specifications for different diagnostic applications. *Int J Lab Hematol.* 2014;36(2):111-3.
165. Vogelaar SA, Posthuma D, Boomsma D, et al. Blood sample stability at room temperature for counting red and white blood cells and platelets. *Vascular Pharmacology.* 2002;39(3):123-5.
166. Schröder C, Steimer W. gDNA extraction yield and methylation status of blood samples are affected by long-term storage conditions. *PLoS One.* 2018;13(2):e0192414.
167. Bulla A, De Witt B, Ammerlaan W, et al. Blood DNA Yield but Not Integrity or Methylation Is Impacted After Long-Term Storage. *Biopreserv Biobank.* 2016;14(1):29-38.
168. de Oliveira RA, Scarlet D, Ille N, et al. Cooled-storage of equine semen does not induce major changes in sperm DNA methylation. *Theriogenology.* 2017;89:289-94.
169. Vilahur N, Baccarelli AA, Bustamante M, et al. Storage conditions and stability of global DNA methylation in placental tissue. *Epigenomics.* 2013;5(3):341-8.
170. Dak Gesundheit. Psychoreport 2015. https://www.dak.de/dak/download/Charts_zum_DAK-Psychoreport-1718868.pdf. 2015.
171. Busch MA, Maske UE, Ryl L, et al. Prävalenz von depressiver Symptomatik und diagnostizierter Depression bei Erwachsenen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 2013;56(5):733-9.
172. Sun SX, Liu GG, Christensen DB, et al. Review and analysis of hospitalization costs associated with antipsychotic nonadherence in the treatment of schizophrenia in the United States. *Current*

- Medical Research and Opinion. 2007;23(10):2305-12.
173. Brandl EJ, Kennedy JL, Müller DJ. Pharmacogenetics of Antipsychotics. *Can J Psychiatry*. 2014;59(2):76-88.
174. Wiseman FK, Al-Janabi T, Hardy J, et al. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nature reviews Neuroscience*. 2015;16(9):564-74.
175. Ringman JM, Goate A, Masters CL, et al. Genetic Heterogeneity in Alzheimer Disease and Implications for Treatment Strategies. *Current Neurology and Neuroscience Reports*. 2014;14(11):499.
176. Naj AC, Jun G, Reitz C, et al. Age-at-Onset in Late Onset Alzheimer Disease is Modified by Multiple Genetic Loci. *JAMA Neurol*. 2014;71(11):1394-404.
177. Rasool M, Malik A, Qazi AM, et al. Current view from Alzheimer disease to type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2014;13(3):533-42.
178. Li J, Cesari M, Liu F, et al. Effects of Diabetes Mellitus on Cognitive Decline in Patients with Alzheimer Disease: A Systematic Review. *Canadian Journal of Diabetes*. 2017;41(1):114-9.
179. Kehoe PG, Wilcock GK. Is inhibition of the renin-angiotensin system a new treatment option for Alzheimer's disease? *The Lancet Neurology*. 2007;6(4):373-8.
180. Crisby M, Carlson LA, Winblad B. Statins in the prevention and treatment of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2002;16(3):131-6.
181. Kusne Y, Wolf AB, Townley K, et al. Visual system manifestations of Alzheimer's disease. *Acta Ophthalmol*. 2016.
182. Kumar A, Singh A, Ekavali. A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*. 2015;67(2):195-203.
183. Deuschl G, Maier W, et al. S3-Leitlinie Demenzen. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. www.dgn.org/leitlinien (14.02.17). 2016.
184. Bickel H. Informationsblatt 1 - Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. Deutsche Alzheimer Gesellschaft. 2016.
185. Sugimoto H, Iimura Y, Yamanishi Y, et al. Synthesis and structure-activity relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-oxoindan-2-yl)methyl]piperidine hydrochloride and related compounds. *J Med Chem*. 1995;38(24):4821-9.
186. Eisai GmbH / Pfizer Pharma PFE GmbH. Fachinformation Aricept. 2017.
187. Gonzalez FJ. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci*. 1992;13(9):346-52.
188. Nebert DW. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet*. 1997;60(2):265-71.
189. Bertilsson L, Dahl ML, Dalen P, et al. Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol*. 2002;53(2):111-22.
190. Noetzli M, Eap CB. Pharmacodynamic, Pharmacokinetic and Pharmacogenetic Aspects of Drugs Used in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Clinical Pharmacokinetics*. 2013;52(4):225-41.
191. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol*. 1993;12(1):1-51.
192. Kimura S, Umeno M, Skoda RC, et al. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet*. 1989;45(6):889-904.
193. Heim MH, Meyer UA. Evolution of a highly polymorphic human cytochrome P450 gene cluster: CYP2D6. *Genomics*. 1992;14(1):49-58.

194. Gough AC, Smith CA, Howell SM, et al. Localization of the CYP2D gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. *Genomics*. 1993;15(2):430-2.
195. Eichelbaum M, Baur MP, Dengler HJ, et al. Chromosomal assignment of human cytochrome P-450 (debrisoquine/sparteine type) to chromosome 22. *Br J Clin Pharmacol*. 1987;23(4):455-8.
196. Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Nebert DW. Homepage of the Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee. <http://www.cypalleles.ki.se/>. 2016.
197. Daly AK, Brockmoller J, Broly F, et al. Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics*. 1996;6(3):193-201.
198. Meyer UA, Zanger UM. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1997;37:269-96.
199. Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, et al. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*. 1997;60(2):284-95.
200. Raimundo S, Toscano C, Klein K, et al. A novel intronic mutation, 2988G>A, with high predictivity for impaired function of cytochrome P450 2D6 in white subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2004;76(2):128-38.
201. Raimundo S, Fischer J, Eichelbaum M, et al. Elucidation of the genetic basis of the common 'intermediate metabolizer' phenotype for drug oxidation by CYP2D6. *Pharmacogenetics*. 2000;10(7):577-81.
202. Nguyen DL, Staeker J, Laika B, et al. TaqMan real-time PCR quantification strategy of CYP2D6 gene copy number for the LightCycler 2.0. *Clinica Chimica Acta*. 2009;403(1-2):207-11.
203. Müller B, Zöpf K, Bachofer J, et al. Optimized Strategy for Rapid Cytochrome P450 2D6 Genotyping by Real-Time Long PCR. *Clinical Chemistry*. 2003;49(10):1624-31.
204. Steimer W, Zöpf K, von Amelunxen S, et al. Allele-Specific Change of Concentration and Functional Gene Dose for the Prediction of Steady-State Serum Concentrations of Amitriptyline and Nortriptyline in CYP2C19 and CYP2D6 Extensive and Intermediate Metabolizers. *Clinical Chemistry*. 2004;50(9):1623-33.
205. Noetzli M, Guidi M, Ebbing K, et al. Population pharmacokinetic approach to evaluate the effect of CYP2D6, CYP3A, ABCB1, POR and NR1I2 genotypes on donepezil clearance. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;78(1):135-44.
206. Seripa D, Bizzarro A, Pilotto A, et al. Role of cytochrome P4502D6 functional polymorphisms in the efficacy of donepezil in patients with Alzheimer's disease. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(4):225-30.
207. Lu J, Wan L, Zhong Y, et al. Stereoselective metabolism of donepezil and steady-state plasma concentrations of S-donepezil based on CYP2D6 polymorphisms in the therapeutic responses of Han Chinese patients with Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2015;129(3):188-95.
208. Cacabelos R. Donepezil in Alzheimer's disease: From conventional trials to pharmacogenetics. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. 2007;3(3):303-33.
209. Zerssen D. Paranoid-Depressivitäts-Skala Selbstbeurteilungs-Skala (PD-S/D-S). *Collegium Internationale Psychiatriae Scalarum (Hrsg), Internationale Skalen für Psychiatrie*. Beltz Test GmbH. 1996.
210. Busner J, Targum SD. The Clinical Global Impressions Scale: Applying a Research Tool in Clinical Practice. *Psychiatry (Edgmont)*. 2007;4(7):28-37.
211. Garvey CA, Gross D, Freeman L. Assessing psychotropic medication side effects among children. A reliability study. *J Child Adolesc Psychiatr Ment Health Nurs*. 1991;4(4):127-31.

212. Witte B, Harrer G, Kaptan T, et al. Treatment of depressive symptoms with a high concentration hypericum preparation. A multicenter placebo-controlled double-blind study. *Fortschr Med.* 1995;113(28):404-8. Behandlung depressiver Verstimmungen mit einem hochkonzentrierten Hypericumpräparat.
213. Agid O, Siu CO, Potkin SG, et al. Meta-regression analysis of placebo response in antipsychotic trials, 1970-2010. *Am J Psychiatry.* 2013;170(11):1335-44.
214. Rogers SL, Cooper NM, Sukovaty R, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of donepezil HCl following multiple oral doses. *Br J Clin Pharmacol.* 1998;46 Suppl 1:7-12.
215. Riederer P, Laux G, Pödlinger W. *Neuro-Psychopharmaka - Ein Therapie-Handbuch: Band 5: Parkinsonmittel und Antidementiva.* Springer-Verlag. 2013.
216. Bender R, Lange S, Ziegler A. Multiple testing. *Dtsch Med Wochenschr.* 2007;132:e26-9. Multiples Testen.
217. Bender R, Ziegler A, Lange S. Analysis of variance. *Dtsch Med Wochenschr.* 2007;132:e57-60. Varianzanalyse.
218. Bender R, Ziegler A, Lange S. Multiple regression. *Dtsch Med Wochenschr.* 2007;132:e30-2. Multiple Regression.
219. Lange S, Bender R. Linear regression and correlation. *Dtsch Med Wochenschr.* 2007;132:e9-11. Lineare Regression und Korrelation.
220. Grouven U, Bender R, Ziegler A, et al. Comparing methods of measurement. *Dtsch Med Wochenschr.* 2007;132:e69-73. Vergleich von Messmethoden.
221. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986;1(8476):307-10.
222. Lin LI. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics.* 1989;45(1):255-68.
223. Gaunt TR, Rodriguez S, Day IN. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool 'CubeX'. *BMC Bioinformatics.* 2007;8:428.
224. Rodriguez S, Gaunt TR, Day IN. Hardy-Weinberg equilibrium testing of biological ascertainment for Mendelian randomization studies. *Am J Epidemiol.* 2009;169(4):505-14.
225. Roche Diagnostics GmbH. Roche Applied Science, LightCycler® 2.0 Instrument Operator's Manual Software Version 4.05. 2005.
226. Roche Diagnostics GmbH. Roche Applied Science, Roche LightCycler Manual - The LightCycler System. 2007.
227. Bernard PS, Reiser A, Pritham GH. Mutation Detection by Fluorescent Hybridization Probe Melting Curves. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara KI. *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications.* Springer. 2001. p. 11-9.
228. Wikipedia. <https://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion>. 30.01.2017.
229. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(13):3688-91.
230. Bui M, Liu Z. Simple allele-discriminating PCR for cost-effective and rapid genotyping and mapping. *Plant Methods.* 2009;5:1.
231. Wangkumhang P, Chaichoompu K, Ngamphiw C, et al. WASP: a Web-based Allele-Specific PCR assay designing tool for detecting SNPs and mutations. *BMC Genomics.* 2007;8:275.
232. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(1):308-11.
233. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(Web Server issue):W71-4.
234. Whitehead Institute for Biomedical Research. <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plusAbout.cgi>.

235. Gene Link. <http://www.genelink.com/tools/gl-downloads.asp>.
236. Boratyn GM, Camacho C, Cooper PS, et al. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue):W29-33.
237. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:134.
238. Altshuler ML. PCR Troubleshooting: The Essential Guide. Caister Academic Press. 2006.
239. Roche Diagnostics GmbH. Roche Applied Science, Technical Note No. LC 19/2004, Color Compensation. 2004.
240. Schröder C, Czerwensky F, Leucht S, et al. Fat Mass and Obesity-Related Gene Variants rs9939609 and rs7185735 are Associated with Second-Generation Antipsychotic-Induced Weight Gain. *Pharmacopsychiatry.* 2018.
241. Stange M. Einfluss der hepatischen Metabolisierungsgeschwindigkeit auf die Wirksamkeit von Antidementiva. Doctor Thesis TU München. noch nicht veröffentlicht.
242. Wikipedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Combined_bisulfite_restriction_analysis. 30.01.2017.
243. Active Motif. <https://www.activemotif.com/catalog/1182/ffpe-bisulfite-conversion-kit>. 30.01.2016.
244. Roche Diagnostics GmbH. 454 Sequencing System Guidelines for Amplicon Experimental Design. 2011.
245. 454 Life Sciences Corporation. How Is Genome Sequencing Done. 2015.
246. Winter C. Droplet Digital PCR to Measure Tumor Load. *labcritics.com*. 2016.
247. Exiqon. Locked Nucleic Acid (LNA™) Custom Oligonucleotides for RNA and DNA Research. 2009.
248. Exiqon. <https://www.exiqon.com/ls/Pages/ExiqonTMPredictionTool.aspx>.
249. Biophysics. <http://biophysics.idtdna.com/>.
250. Bio-Rad Laboratories GmbH. QX200™ Droplet Reader and QuantaSoft™ Software Instruction Manual 2014.
251. Drieling T, Biedermann NC, Scharer LO, et al. Psychotropic drug-induced change of weight: a review. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 2007;75(2):65-80. Gewichtsveränderungen unter Therapie mit Psychopharmaka.
252. Strassnig M, Miewald J, Keshavan M, et al. Weight gain in newly diagnosed first-episode psychosis patients and healthy comparisons: one-year analysis. *Schizophr Res.* 2007;93(1-3):90-8.
253. Gebhardt S, Haberhausen M, Heinzl-Gutenbrunner M, et al. Antipsychotic-induced body weight gain: predictors and a systematic categorization of the long-term weight course. *J Psychiatr Res.* 2009;43(6):620-6.
254. Sharma E, Rao NP, Venkatasubramanian G. Association between antipsychotic-induced metabolic side-effects and clinical improvement: a review on the Evidence for "metabolic threshold". *Asian J Psychiatr.* 2014;8:12-21.
255. Correll CU, Lencz T, Malhotra AK. Antipsychotic drugs and obesity. *Trends Mol Med.* 2011;17(2):97-107.
256. Thaler JP, Guyenet SJ, Dorfman MD, et al. Hypothalamic inflammation: marker or mechanism of obesity pathogenesis? *Diabetes.* 2013;62(8):2629-34.
257. Pouget JG, Goncalves VF, Nurmi EL, et al. Investigation of TSPO variants in schizophrenia and antipsychotic treatment outcomes. *Pharmacogenomics.* 2015;16(1):5-22.
258. Reas DL, Nygard JF, Svensson E, et al. Changes in body mass index by age, gender, and socioeconomic status among a cohort of Norwegian men and women (1990-2001). *BMC Public Health.* 2007;7:269.
259. Jackson AS, Stanforth PR, Gagnon J, et al. The effect of sex, age and race on estimating percentage body fat from body mass index: The Heritage Family Study. *Int J Obes Relat Metab*

- Disord. 2002;26(6):789-96.
260. Steimer W, Zöpf K, von Amelunxen S, et al. Amitriptyline or Not, That Is the Question: Pharmacogenetic Testing of CYP2D6 and CYP2C19 Identifies Patients with Low or High Risk for Side Effects in Amitriptyline Therapy. *Clinical Chemistry*. 2005;51(2):376-85.
261. Carrier L. Donepezil and paroxetine: possible drug interaction. *J Am Geriatr Soc*. 1999;47(8):1037.
262. Gressier F, Verstuyft C, Hardy P, et al. Response to CYP2D6 substrate antidepressants is predicted by a CYP2D6 composite phenotype based on genotype and comedications with CYP2D6 inhibitors. *Journal of Neural Transmission*. 2015;122(1):35-42.
263. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotech*. 2008;26(10):1135-45.
264. Tost J, Gut IG. DNA methylation analysis by pyrosequencing. *Nat Protocols*. 2007;2(9):2265-75.
265. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>. 2001.
266. Quillien V, Lavenu A, Karayan-Tapon L, et al. Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, methylight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients. *Cancer*. 2012;118(17):4201-11.
267. Potapova A, Albat C, Hasemeier B, et al. Systematic cross-validation of 454 sequencing and pyrosequencing for the exact quantification of DNA methylation patterns with single CpG resolution. *BMC Biotechnology*. 2011;11(1):6.
268. Haddad P. Weight change with atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Journal of Psychopharmacology*. 2005;19(6 Suppl):16-27.
269. Coccurello R, Moles A. Potential mechanisms of atypical antipsychotic-induced metabolic derangement: clues for understanding obesity and novel drug design. *Pharmacol Ther*. 2010;127(3):210-51.
270. Taylor DM, McAskill R. Atypical antipsychotics and weight gain - a systematic review. *Acta Psychiatr Scand*. 2000;101(6):416-32.
271. Sussman N. Review of atypical antipsychotics and weight gain. *J Clin Psychiatry*. 2001;62(Suppl 23):5-12.
272. Saddichha S, Ameen S, Akhtar S. Predictors of antipsychotic-induced weight gain in first-episode psychosis: conclusions from a randomized, double-blind, controlled prospective study of olanzapine, risperidone, and haloperidol. *J Clin Psychopharmacol*. 2008;28(1):27-31.
273. Wetterling T, Mussigbrodt HE. Weight gain: side effect of atypical neuroleptics? *J Clin Psychopharmacol*. 1999;19(4):316-21.
274. Mankoski R, Stockton G, Manos G, et al. Aripiprazole Treatment of Irritability Associated with Autistic Disorder and the Relationship Between Prior Antipsychotic Exposure, Adverse Events, and Weight Change. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology*. 2013;23(8):572-6.
275. Ascher-Svanum H, Stensland M, Zhao Z, et al. Acute weight gain, gender, and therapeutic response to antipsychotics in the treatment of patients with schizophrenia. *BMC Psychiatry*. 2005;5:3.
276. Agid O, Siu CO, Pappadopulos E, et al. Early prediction of clinical and functional outcome in schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2013;23(8):842-51.
277. Hermes E, Nasrallah H, Davis V, et al. The association between weight change and symptom reduction in the CATIE schizophrenia trial. *Schizophr Res*. 2011;128(1-3):166-70.
278. Sainz J, Mata I, Barrera J, et al. Inflammatory and immune response genes have significantly altered expression in schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2013;18(10):1056-7.
279. Kreisl WC, Jenko KJ, Hines CS, et al. A genetic polymorphism for translocator protein 18 kDa affects both in vitro and in vivo radioligand binding in human brain to this putative biomarker

- of neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(1):53-8.
280. Doorduyn J, de Vries EF, Willemsen AT, et al. Neuroinflammation in schizophrenia-related psychosis: a PET study. *J Nucl Med.* 2009;50(11):1801-7.
281. Kurumaji A, Nomoto H, Yoshikawa T, et al. An association study between two missense variations of the benzodiazepine receptor (peripheral) gene and schizophrenia in a Japanese sample. *J Neural Transm (Vienna).* 2000;107(4):491-500.
282. Fallin MD, Lasseter VK, Avramopoulos D, et al. Bipolar I disorder and schizophrenia: a 440-single-nucleotide polymorphism screen of 64 candidate genes among Ashkenazi Jewish case-parent trios. *Am J Hum Genet.* 2005;77(6):918-36.
283. Beckers S, Zegers D, de Freitas F, et al. Association study of MC4R with complex obesity and replication of the rs17782313 association signal. *Mol Genet Metab.* 2011;103(1):71-5.
284. Akarsu S, Torun D, Bolu A, et al. Mitochondrial complex I and III gene mRNA levels in schizophrenia, and their relationship with clinical features. *Journal of Molecular Psychiatry.* 2014;2(1):6.
285. Li X, Zhang W, Tang J, et al. Do nuclear-encoded core subunits of mitochondrial complex I confer genetic susceptibility to schizophrenia in Han Chinese populations? *Sci Rep.* 2015;5:11076.
286. Zhu Y, Wang Z, Ni J, et al. Genetic variant in NDUFS1 gene is associated with schizophrenia and negative symptoms in Han Chinese. *J Hum Genet.* 2015;60(1):11-6.
287. Hoefs SJ, Skjeldal OH, Rodenburg RJ, et al. Novel mutations in the NDUFS1 gene cause low residual activities in human complex I deficiencies. *Mol Genet Metab.* 2010;100(3):251-6.
288. Iuso A, Scacco S, Piccoli C, et al. Dysfunctions of cellular oxidative metabolism in patients with mutations in the NDUFS1 and NDUFS4 genes of complex I. *J Biol Chem.* 2006;281(15):10374-80.
289. Jordan SD, Konner AC, Bruning JC. Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(19):3255-73.
290. Horvath TL, Andrews ZB, Diano S. Fuel utilization by hypothalamic neurons: roles for ROS. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(2):78-87.
291. Kloiber S, Domschke K, Ising M, et al. Clinical Risk Factors for Weight Gain During Psychopharmacologic Treatment of Depression: Results From 2 Large German Observational Studies. *J Clin Psychiatry.* 2015;76(6):E802-E8.
292. Scuteri A, Sanna S, Chen WM, et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet.* 2007;3(7):e115.
293. Landgraf K, Scholz M, Kovacs P, et al. FTO Obesity Risk Variants Are Linked to Adipocyte IRX3 Expression and BMI of Children - Relevance of FTO Variants to Defend Body Weight in Lean Children? *PLoS One.* 2016;11(8):e0161739.
294. Lazopoulou N, Gkioka E, Ntalla I, et al. The combined effect of MC4R and FTO risk alleles on childhood obesity in Greece. *Hormones (Athens).* 2015;14(1):126-33.
295. Huang W, Sun Y, Sun J. Combined effects of FTO rs9939609 and MC4R rs17782313 on obesity and BMI in Chinese Han populations. *Endocrine.* 2011;39(1):69-74.
296. García-Solís P, Reyes-Bastidas M, Flores K, et al. Fat mass obesity-associated (FTO) (rs9939609) and melanocortin 4 receptor (MC4R) (rs17782313) SNP are positively associated with obesity and blood pressure in Mexican school-aged children. *British Journal of Nutrition.* 2016;116(10):1834-40.
297. Cauchi S, Stutzmann F, Cavalcanti-Proença C, et al. Combined effects of MC4R and FTO common genetic variants on obesity in European general populations. *J Mol Med.* 2009;87(5):537-46.
298. Lu Y, Qin X, Li S, et al. Quantitative assessment of CYP2D6 polymorphisms and risk of Alzheimer's disease: A meta-analysis. *J Neurol Sci.* 2014;343(1-2):15-22.

299. Varsaldi F, Miglio G, Scordo MG, et al. Impact of the CYP2D6 polymorphism on steady-state plasma concentrations and clinical outcome of donepezil in Alzheimer's disease patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2006;62(9):721-6.
300. Scordo MG, Dahl M-L, Spina E, et al. No association between CYP2D6 polymorphism and Alzheimer's disease in an Italian population. *Pharmacological Research*. 2006;53(2):162-5.
301. Yang YH, Chen CH, Chou MC, et al. Concentration of donepezil to the cognitive response in Alzheimer disease. *J Clin Psychopharmacol*. 2013;33(3):351-5.
302. Tanaka K, Okamoto A. Degradation of DNA by bisulfite treatment. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007;17(7):1912-5.
303. Zymo Research Corporation. Instruction Manual EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit. <http://www.zymoresearch.com/downloads/dl/file/id/490/d5030i.pdf>. 23.02.2016.
304. Redshaw N, Huggett JF, Taylor MS, et al. Quantification of epigenetic biomarkers: an evaluation of established and emerging methods for DNA methylation analysis. *BMC Genomics*. 2014;15(1):1174.
305. Masser DR, Berg AS, Freeman WM. Focused, high accuracy 5-methylcytosine quantitation with base resolution by benchtop next-generation sequencing. *Epigenetics Chromatin*. 2013;6(1):33.
306. Dabney J, Meyer M. Length and GC-biases during sequencing library amplification: a comparison of various polymerase-buffer systems with ancient and modern DNA sequencing libraries. *Biotechniques*. 2012;52(2):87-94.
307. Shen L, Guo Y, Chen X, et al. Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis. *Biotechniques*. 2007;42(1):48-58.
308. Liu L, Li Y, Li S, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012;2012:251364.
309. Litterst C, Marrs S, Shelton D, et al. Droplet Digital™ PCR: Detection of DNA Methylation. Digital Biology Center, Bio-Rad Laboratories, Inc. 2014.
310. Yu M, Carter KT, Makar KW, et al. MethyLight droplet digital PCR for detection and absolute quantification of infrequently methylated alleles. *Epigenetics*. 2015;10(9):803-9.
311. Wiencke JK, Bracci PM, Hsuang G, et al. A comparison of DNA methylation specific droplet digital PCR (ddPCR) and real time qPCR with flow cytometry in characterizing human T cells in peripheral blood. *Epigenetics*. 2014;9(10):1360-5.
312. Bio-Rad Laboratories. Droplet Digital™ PCR Applications Guide. http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf. 24.02.2016.
313. Benton MC, Sutherland HG, Macartney-Coxson D, et al. Methylome-wide association study of whole blood DNA in the Norfolk Island isolate identifies robust loci associated with age. *Aging (Albany NY)*. 2017;9(3):753-68.
314. Bacalini MG, Friso S, Olivieri F, et al. Present and future of anti-ageing epigenetic diets. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2014;136–137:101-15.
315. Ross KS, Haites NE, Kelly KF. Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity. *J Med Genet*. 1990;27(9):569-70.
316. Nederhand RJ, Droog S, Kluft C, et al. Logistics and quality control for DNA sampling in large multicenter studies. *J Thromb Haemost*. 2003;1(5):987-91.
317. Cushwa WT, Medrano JF. Effects of blood storage time and temperature on DNA yield and quality. *Biotechniques*. 1993;14(2):204-7.
318. Udtha M, Flores R, Sanner J, et al. The protection and stabilization of whole blood at room temperature. *Biopreserv Biobank*. 2014;12(5):332-6.
319. Palmirotta R, Ludovici G, De Marchis ML, et al. Preanalytical Procedures for DNA Studies: The Experience of the Interinstitutional Multidisciplinary BioBank (BioBIM). *Biopreserv Biobank*. 2011;9(1):35-45.

320. Thalhammer A, Hansen AS, El-Sagheer AH, et al. Hydroxylation of methylated CpG dinucleotides reverses stabilisation of DNA duplexes by cytosine 5-methylation. *Chem Commun (Camb)*. 2011;47(18):5325-7.
321. Shen JC, Rideout WM, 3rd, Jones PA. The rate of hydrolytic deamination of 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(6):972-6.
322. Briggs AW, Stenzel U, Meyer M, et al. Removal of deaminated cytosines and detection of in vivo methylation in ancient DNA. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(6):e87.
323. Madisen L, Hoar DI, Holroyd CD, et al. The effects of storage of blood and isolated DNA on the integrity of DNA. *Am J Med Genet*. 1987;27(2):379-90.
324. Shao W, Khin S, Kopp WC. Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. *Biopreserv Biobank*. 2012;10(1):4-11.
325. Levinthal C, Davison PF. Degradation of deoxyribonucleic acid under hydrodynamic shearing forces. *J Mol Biol*. 1961;3(5):674-83.
326. statistisches Bundesamt. Herz-Kreislauf-Erkrankungen verursachen die höchsten Krankheitskosten.
<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Krankheitskosten/Aktuell.html;jsessionid=C72BBA73400C0D6FB70E9A6CFEA0DC9C.cae3>.
327. Hugenholtz GW, Heerdink ER, Meijer WE, et al. Reasons for switching between antipsychotics in daily clinical practice. *Pharmacopsychiatry*. 2005;38(3):122-4.
328. Newcomer JW. Metabolic considerations in the use of antipsychotic medications: a review of recent evidence. *J Clin Psychiatry*. 2007;68 Suppl 1:20-7.
329. Hall-Flavin DK, Winner JG, Allen JD, et al. Using a pharmacogenomic algorithm to guide the treatment of depression. *Transl Psychiatry*. 2012;2(10):e172.
330. Fields ES, Lorenz RA, Winner JG. Use of combinatorial pharmacogenomic testing in two cases from community psychiatry. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 2016;9:79-84.
331. Dunbar L, Butler R, Wheeler A, et al. Clinician experiences of employing the AmpliChip® CYP450 test in routine psychiatric practice. *Journal of Psychopharmacology*. 2009;26(3):390-7.

8 Publikationen

- Pouget JG, Goncalves VF, Nurmi EL, P. Laughlin C, Mallya KS, McCracken JT, Aman MG, McDougle CJ, Scahill L, Misener VL, Tiwari AK, Zai CC, Brandl EJ, Felsky D, Leung AQ, Lieberman JA, Meltzer HY, Potkin SG, Niedling C, Steimer W, Leucht S, Knight J, Muller DJ, Kennedy JL. Investigation of TSPO variants in schizophrenia and antipsychotic treatment outcomes. *Pharmacogenomics*. 2015;16(1):5-22.
- Schröder C, Czerwensky F, Leucht S, Steimer W. Fat Mass and Obesity-Related Gene Variants rs9939609 and rs7185735 are Associated with Second-Generation Antipsychotic-Induced Weight Gain. *Pharmacopsychiatry*. 2018.
- Schröder C, Steimer W. gDNA extraction yield and methylation status of blood samples are affected by long-term storage conditions. *PLoS One*. 2018;13(2)

9 Anhänge

9.1 Übersicht über die verwendeten Reagenzien, Geräte und Software

Übersicht über die verwendeten Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Agarose PeqGold Universal	PeqLab-Biotechnologie GmbH
Aqua DeltaSelect Spüllösung (steril)	Delta Select GmbH
Bovine Serum Albumine (für PCR) 20 mg/ml	Roche Diagnostics GmbH
ddPCR supermix for probes	Bio-Rad Laboratories GmbH
DNA-Leiter Invitrogen (50 bp – 1 kb)	Invitrogen GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	PeqLab-Biotechnologie GmbH
dNTP-Mix	PeqLab-Biotechnologie GmbH
dNTP-Mix	Roche Diagnostics GmbH
Droplet generator oil	Bio-Rad Laboratories GmbH
Ethanol	Merck KGaA
Ethidiumbromid, 1 %-ig (wässrige Lösung)	Merck KGaA
EZ DNA Methylation-Lightning™ Kit	ZymoResearch
FastStart High Fidelity PCR System (Polymerase, Reaction Buffer, MgCl ₂ , DMSO)	Roche Diagnostics GmbH
Gel-Ladepuffer 6x Konzentrat, Typ1	Sigma-Aldrich
GS Junior Titanium emPCR Kit	Roche Diagnostics GmbH
GS Junior Titanium PicoTiterPlate Kit	Roche Diagnostics GmbH
GS Junior Titanium Sequencing Kit	Roche Diagnostics GmbH
GS Junior Maintenance Wash Kit	Roche Diagnostics GmbH
High Sensitivity D1000 Screen Tape	Agilent Technologies
High Sensitivity D1000 Reagents	Agilent Technologies
Human WGA Methylated & Non-methylated DNA Set	ZymoResearch
Hybridisierungssonden	TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH
Isopropanol	Sigma-Aldrich
LightCycler-DNA Master HybProbe	Roche Diagnostics GmbH
LightCycler-FastStart DNA Master HybProbe	Roche Diagnostics GmbH

Metaphoragarose	Cambrex
MgCl ₂ (25mM)	Roche Diagnostics GmbH
Mineralöl	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH
Nuclease-Free Water	Qiagen
Primer	Invitrogen GmbH
Primer	IDT-Integrated DNA Technology
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit	Invitrogen GmbH
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher scientific
Restriktionsendonukleasen + Puffer	New England BioLabs GmbH
TaqMan-Sonden	IDT-Integrated DNA Technology, München
Taq DNA Polymerase	Qbiogene (Vertrieb: MP Biomedicals)
TBE-Puffer 10x UltraPure™	Invitrogen GmbH
TE-Puffer 10x	Thermo Fisher Scientific
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega GmbH

Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH
Circomix-Vortexer	B. Braun
Dynal Magnetic Particle Concentrator-E	Life Technologies
GeneAmp PCR System 9700 PE	Applied Biosystems
GS Junior 454 Sequencing	Roche Diagnostics GmbH
LightCycler 2.0	Roche Diagnostics GmbH
LightCycler-Karussellzentrifuge	Roche Diagnostics GmbH
Mupid-2 Mini Gel Migration Through	Cosmo Bio Co, LTD
NanoDrop 2000C Spektrophotometer	PegLab-Biotechnologie GmbH
Photoprint OO-IP-010.SD	LTF Labortechnik
PX1 plate sealer	Bio-Rad Laboratories GmbH
SpeedCycler2	Analytik Jena AG
Qubit 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher scientific
QX200 Droplet Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH
QX200 Droplet Generator	Bio-Rad Laboratories GmbH
Rollenschüttler	Greiner Labortechnik
Rotary Mixer	Cenco Instrumenten
2200 TapeStation Instrument	Agilent Technologies
Thermal Printer DPU-414	Seiko Instruments GmbH
Thermoblock UNITEKTM-HBS 130	PeqLab-Biotechnologie GmbH
Ultra Turrax Tube Dispenser	IKA
Video Copy Processor P91	Mitsubishi Digital Electronics
Waage 1702 MP 8	Sartorius AG
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf

Übersicht über die verwendeten Software

Software	Hersteller
AVA-Software	Roche Diagnostics GmbH
BLAST	National Center for Biotechnology Information
CubeX (LD-Calculator)	www.oege.org/software/cubex
Excel	Microsoft Corporation
Exiqon Tool	https://www.exiqon.com/ls/Pages/ExiqonTMPredictionTool.aspx
GS Amplicon Variant Analyzer 3.0	Roche Diagnostics GmbH
GS Junior Sequencer 3.0	Roche Diagnostics GmbH
GS Run Browser 3.0	Roche Diagnostics GmbH
HapMap Database	hapmap.ncbi.nlm.nih.gov
HWE-Calculator	http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml
LightCycler® Software 3.5 und 4.05	Roche
MethPrimer 2.0	http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi
NCBI Variation Database (dbSNP)	www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP , National Center for Biotechnology Information
NEBcutter	New England Biolabs Inc.
Oligo Analyzer 1.5	Gene Link
Primer 3 Plus Software	Whitehead Institute for Biomedical Research
QuantaSoft Software	Bio-Rad Laboratories GmbH
R	The R Foundation
SPSS Statistics 21	IBM
2200 TapeStation Analysis Software	Agilent Technologies
Thermodynamic DNA Melting Curve Tool	http://biophysics.idtdna.com/
WASP Tool	http://bioinfo.biotec.or.th/WASP

9.2 Selbst- und Fremdbeurteilungsskalen

9.2.1 Paranoid-Depressivitäts-Skala

Prüfungsnummer 1 2 3 4 5 6 7 8 9	Testcode 1 2 3 4 5 6 7 8 9	Patient/Proband laufende Nr. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50	Prüfstag Nr. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50	Nr. der Messung 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50	Prüfstelle 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50	Prüfer-Nr. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50	CIPS											
Code des Patienten/ Probanden								Initialen des Probanden (Patienten)										
Datum Tag Monat Jahr Tageszeit Stunde Medikation								Unterschrift des Untersuchers										
PD-S																		
<p>Anleitung Lesen Sie bitte die folgenden Sätze. Entscheiden Sie bei jeder Feststellung, ob sie für Sie zutrifft oder nicht. Machen Sie ein Kreuz in eines der vier Kästchen rechts entsprechend der Stärke Ihrer Zustimmung bzw. Ablehnung. Füllen Sie den Bogen sorgfältig und möglichst schnell selbständig aus. Lassen Sie keinen Satz aus!</p>																		
Bitte, hier anfangen (1.–13.)		trifft ausgesprochen zu		trifft überwiegend zu		trifft etwas zu		trifft gar nicht zu	hier fortsetzen (14.–26.)		trifft ausgesprochen zu		trifft überwiegend zu		trifft etwas zu		trifft gar nicht zu	
1. Ich habe die Anweisung verstanden		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	14. Ich fühle mich niedergeschlagen und schwermütig		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Ich bin bereit, jede Frage so wahrheitsgetreu wie möglich zu beantworten		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	15. Man will mich geistig vernichten		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Ich habe Freude an den verschiedensten Spielen und Freizeitbeschäftigungen		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	16. Ich kann das, was ich lese, nicht mehr so gut verstehen wie früher		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
4. Kritik verletzt mich stärker als früher		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	17. Am liebsten würde ich mir das Leben nehmen		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
5. In letzter Zeit bin ich sehr ängstlich und schreckhaft		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	18. Ich war schon mal so aufgeregt, daß ich nur schwer einschlafen konnte		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6. Ich war hin und wieder erkältet		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	19. An manchen Tagen kann ich mich schlechter konzentrieren als gewöhnlich		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7. Ich werde gegen meinen Willen von anderen Menschen beeinflusst		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	20. Ich werde dauernd von anderen beobachtet oder kontrolliert		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
8. Ich weine leicht		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	21. Morgens fühle ich mich besonders schlecht		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
9. Ich hatte schon mal das Gefühl, den Weltuntergang zu erleben		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	22. Ich leide unter fremdartigen Veränderungen am oder im Körper		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
10. Gelegentlich fühle ich mich müde		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	23. Es gibt Leute, die meine Gedanken und Ideen zu stehlen versuchen		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
11. Ich werde von anderen zu Unrecht für krank gehalten		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	24. Ich habe zu anderen Menschen keine innere Beziehung mehr		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
12. Manchmal kommen mir Körperbewegungen wie von selbst		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	25. Zu allen meinen Handlungen und Gedanken werden Bemerkungen gemacht		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
13. Ich habe Angst, den Verstand zu verlieren		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	26. Ich habe manchmal im Leben Angst gehabt		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

PD-S

Seite 2

Bitte hier anfangen (27.–35.)	trifft ausgesprochen zu	trifft überwiegend zu	trifft etwas zu	trifft gar nicht zu	hier fortsetzen (36.–43.)	trifft ausgesprochen zu	trifft überwiegend zu	trifft etwas zu	trifft gar nicht zu
27. Man ist neidisch auf mein Wissen, meine Entdeckungen und besonderen Erfahrungen	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	36. Ich bin jetzt viel weniger am Liebesleben interessiert	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
28. Ich habe eigenartige Erlebnisse wie Eingebungen, Visionen und dergleichen	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	37. Wenn ich einen Gedanken denke, wird er auch schon von anderen gewußt	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
29. Hin und wieder bin ich schlecht gelaunt	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	38. Für manche Dinge muß ich eigene, neue Worte bilden, die andere Leute zunächst nicht verstehen	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
30. Man trachtet mir nach dem Leben	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	39. Oft fühle ich mich einfach miserabel	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
31. Ich fühle, daß ich nahe daran bin zusammenzubrechen	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	40. Ich habe schon mal vor lauter Aufregung Herzklopfen bekommen	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
32. Ich habe das Gefühl, mit elektrischen Strömen, Strahlen oder Hypnose beeinflußt zu werden	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	41. Ich komme beim besten Willen nicht mit den kleinsten Gedankenschritten voran	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
33. Ich habe mir schon mal den Magen verdorben	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	42. Ich habe keine Gefühle mehr	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
34. Ich habe ständig Angst, daß ich etwas Falsches sagen oder tun könnte	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	43. Ich glaube, daß ich jede Frage wahrheitsgetreu beantwortet habe	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
35. Manchmal fühle ich eine übermenschliche und überströmende Kraft in mir	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>					
Bitte prüfen Sie, ob Sie alle Feststellungen beantwortet haben!									
Score P	Score D	Score Kv							
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>							

9.2.2 Clinical-Global- Impressions-Skala

Prüfungsnummer 1 2 3 4 5	Testcode 6 7 8 9	Patient/Proband laufende Nr. 10 11 12 13	Prüftag Nr. 14 15 16	Nr. der Messung 17 18	Prüf- stelle 19 20	Prüfer-Nr. 21 22
Code des Patienten/Probanden 23 24 25 26	Datum Tag: 27 28 Monat: 29 30 Jahr: 31 32	Tageszeit Stunde: 33 34 Medikation: 35	Initialen des Probanden (Patienten)			
Unterschrift des Untersuchers						

CIPS
Collegium Internationale Psychiatriae Salarum

CGI
Clinical Global Impressions

Anleitung
Beurteilen Sie den Schweregrad der Krankheit und die Zustandsänderung beim Patienten. Bitte kreuzen Sie bei den Fragen jeweils nur eine, d.h. die am ehesten zutreffende Ziffer an! Ermitteln Sie weiterhin den Wirksamkeits-Index. Seine zweiziffrige Codenummer kennzeichnen Sie bitte durch zwei Kreuze in den entsprechenden Kästchen. Es ist nur eine Codenummer anzukreuzen! Bitte machen Sie alle oben genannten Angaben!

<p>1. Schweregrad der Krankheit Ziehen Sie Ihren gesamten Erfahrungsschatz an dieser Art von Kranken in Betracht, und geben Sie an, wie hoch Sie den jetzigen Grad der seelischen Erkrankung des Patienten einschätzen.</p>	<p>2. Gesamtbeurteilung der Zustandsänderung Bitte vergleichen Sie den jetzigen Zustand des Patienten mit dem zu Beginn der Studie, und geben Sie an, inwieweit sich das Krankheitsbild des Patienten geändert hat. Beurteilen Sie dabei die Zustandsänderung insgesamt, also nicht nur das Ergebnis der Medikamentenbehandlung. Diese Frage muß bei Erstbewertungen ausgeklammert werden, indem man die Rubrik 1 (= „nicht beurteilbar“) ankreuzt.</p>
Nicht beurteilbar 1	Nicht beurteilbar 1
Patient ist überhaupt nicht krank 2	Zustand ist sehr viel besser 2
Patient ist ein Grenzfall psychiatrischer Erkrankung 3	Zustand ist viel besser 3
Patient ist nur leicht krank 4	Zustand ist nur wenig besser 4
Patient ist mäßig krank 5	Zustand ist unverändert 5
Patient ist deutlich krank 6	Zustand ist etwas schlechter 6
Patient ist schwer krank 7	Zustand ist viel schlechter 7
Patient gehört zu den extrem schwer Kranken 8	Zustand ist sehr viel schlechter 8

3. Wirksamkeits-Index
Bitte beurteilen Sie das Verhältnis von therapeutischem Effekt und auftretenden Nebenwirkungen nur auf der Grundlage des Medikamenten-Effekts! Suchen Sie die zutreffende Kombination von therapeutischem Effekt (Zeilen) und Nebenwirkungen (Spalten) auf, und kreuzen Sie den in diesem Feld stehenden zweiziffrigen Code an. Bei Erstbewertungen entfällt diese Beurteilung, und man kreuzt entsprechend die Rubrik „nicht beurteilbar“ an.

Beispiel
Der therapeutische Effekt wird als „mäßig“ beurteilt, und zu den Nebenwirkungen wird festgestellt, daß sie den Patienten nicht wesentlich beeinträchtigen.
Es ist anzukreuzen.

THERAPEUTISCHE WIRKSAMKEIT (gewünschte Arzneiwirkungen)	THERAPIE-RISIKEN (unerwünschte Arzneiwirkungen)			
	Keine	Beeinträchti- gen den Pa- tienten nicht wesentlich	Beeinträchti- gen den Pa- tienten wesentlich	Überwiegt die thera- peutische Wirksamkeit
Sehr gut – Umfassende Besserung. Vollständige oder fast vollständige Remission aller Symptome	2 1	2 2	2 3	2 4
Mäßig – Deutliche Besserung. Teilweise Remission der Symptome	3 1	3 2	3 3	3 4
Gering – Leichte Besserung. Eine weitere Behandlung des Patienten ist dennoch nötig	4 1	4 2	4 3	4 4
Unverändert oder schlechter	5 1	5 2	5 3	5 4
Nicht beurteilbar 1 1				

Bitte prüfen Sie, ob Sie alle erforderlichen Angaben gemacht bzw. die jeweiligen Ziffern zutreffend angekreuzt haben!

9.2.3 Dosage Record and Treatment Emergent Symptom

Pharmakogenetische Untersuchung bei psychiatrischen Patienten - DOTES

Betr.NN-4Wo.....

Hat die Patientin/ der Patient während der Therapie unter einer/mehrerer der folgenden Nebenwirkungen gelitten, und war dies evtl. der Grund, eine Medikamentenumstellung vorzunehmen?

		gering mäßig stark	ggf. Zusammenhang zu welchem Medikament?	ggf. Absetzgrund?
a. Verhalten	Toxischer Verwirrheitszustand	①②③		
	Erregung/ Agitation	①②③		
	Depressive Stimmung	①②③		
	Gesteigerte mot. Aktivität	①②③		
	Verminderte mot. Aktivität	①②③		
	Schlaflosigkeit	①②③		
	Schläfrigkeit, Somnolenz, Dösigkeit	①②③		
b. Neurologisch	Rigor	①②③		
	Tremor	①②③		
	Dystonische Symptome	①②③		
	Akathisie	①②③		
	Spätdyskinesien	①②③		
c. Vegetativ	Mundtrockenheit	①②③		
	Behinderte Nasenatmung	①②③		
	Verschwommenes Sehen	①②③		
	Obstipation	①②③		
	Vermehrter Speichelfluß	①②③		
	Schwitzen	①②③		
	Übelkeit/ Erbrechen	①②③		
	Diarrhoe	①②③		
d. Kardiovaskulär	Hypotonie	①②③		
	Ohnmacht/ Schwindelgefühl	①②③		
	Tachykardie	①②③		
	Hypertonie	①②③		
	Abnormes EKG	①②③		
e. Andere	Dermatologische Symptome	①②③		
	Gewichtszunahme	①②③		
	Gewichtsverlust	①②③		
	Anorexie/ Appetitverlust	①②③		
	Kopfschmerzen	①②③		
f. Sonstige	①②③		

Wie **beeinträchtigt** sind die Begleitsymptome bei diesem Pat. verglichen mit denen anderer Pat.?

- | | | | |
|-------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------------|
| gar nicht | <input type="radio"/> | | |
| sehr wenig | <input type="radio"/> | nicht beurteilbar | <input type="radio"/> |
| mäßig | <input type="radio"/> | | |
| deutlich | <input type="radio"/> | | |

9.3 Häufigkeiten der untersuchten Polymorphismen

Gen	Polymorphismus	HapMap_CEU [%]			Studienpopulation [%]			HWE
TSPO	rs6971	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	X ² =2,17
		51,3	39,0	9,7	53,4	37,1	9,4	p=0,141
TSPO	rs6973	G/G	G/T	T/T	G/G	G/T	T/T	X ² =0,19
		50,0	41,0	9,0	59,6	34,7	5,7	p=0,663
MC4R	rs8087522	C/C	C/T	T/T	C/C	C/T	T/T	X ² =0,19
		41,6	53,1	5,3	50,4	41,8	7,7	p=0,663
Ndufs1	rs6435326	A/A	A/T	T/T	A/A	A/T	T/T	X ² =1,01
		23,3	55,0	21,7	26,0	52,6	21,4	p=0,315
Ndufs1	rs1801318	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	X ² =0,20
		47,2	46,3	6,5	45,7	44,6	9,7	p=0,655
Ndufs1	rs1053517	T/T	T/C	C/C	T/T	T/C	C/C	X ² =1,74
		36,7	48,3	15,0	29,1	52,9	18,0	p=0,187
FTO	rs7185735	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	X ² =0,02
		23,3	65,0	11,7	34,3	48,9	16,9	p=0,888
FTO	rs17817288	A/A	A/G	G/G	A/A	A/G	G/G	X ² =0,11
		17,0	54,2	28,8	23,4	50,9	25,7	p=0,740
FTO	rs9939609	A/A	A/T	T/T	A/A	A/T	T/T	X ² =0,16
		11,8	66,1	22,0	18,3	47,7	34	p=0,689

9.4 Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden für die Genotypenbestimmung

Gen	Polymorphismus	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	bp	Amplikonlänge	T _M (°C)*
FTO	rs7185735	FTOrs735 F3	ATGCCCAACCTCTATCTCCA	20	212 bp	59.5
		FTOrs735 R3	TGTCTGAATGGGAAAATACAGTG	23		59.0
		FTOrs735 Sen2	LCRed640-AGGTAAC TACCC C CATGATACTAAAGAC-Phosphat	28		62.9
		FTOr735 Anc2	AAGGTCTCCCTACCCCGC-Fluorescein	19		67.0
	rs17817288	FTOrs288 F1	CTGGCTTTTGAGCTTCTTCAG	21	203 bp	59.4
		FTOrs288 R1	CCTATGACACGCTTCCAACA	20		59.7
		FTOrs288 Sen2	LCRed705-ATTCCAGCAGCTA CTCATTTATTTTC-Phosphat	27		63.1
		FTOrs288 Anc2	CACAGTTCTGAGTAACAAGTGTCGTCCA-Fluorescein	28	240 bp	68.6
		FTOrs288 PF-V	GGAGAAAGTTGGGAAGGTC	19		58.5
		FTOrs288 PR5-V	TCCAATTATTCCAGCAGCTCT	21		56.0
		FTOrs288 PR6-V	TCCAATTATTCCAGCAGCTCC	21		56.5
Ndufs1	rs6435326	Ndufs1_rs6435326 PF1	TTGGGGAAAAGCAAACAAT	20	237 bp	59.4
		Ndufs1_rs6435326 PR1	CATGCAGTTTTTATTTGCCAGA	22		60.1
		Ndufs6435326 Sen	AACTCCTTTTGTAATAAAGA AAGATTT-Fluorescein	27	229 bp	57.7
		Ndufs6435326 Anc	LCRed610-GAAGTTAAAAGTGCAATTCTTTCAGG-Phosphat	26		62.6
		Ndufs1_rs6435326 PF1_V	GGAATAACTCCTTTTGTAATAAAGA A	26		57.6
		Ndufs1_rs6435326 PF2_V	GGAATAACTCCTTTTGTAATAAAGAT	26		56.7
		Ndufs1_rs6435326 PR_V	ACCACCCCAAACAGGTAT	19		59.0

	rs1801318	Ndufs1_rs1801318 PF Ndufs1_rs1801318 PR Ndufs1801318 Sen3 Ndufs1801318 Anc3	GGTGTGGAAGAGGCAGATGT AGACTCCGTCCCACCAAAA CACTGTTTAATGCTAG AATTCGA-Fluorescein LCRed640-GAGGTTGGTAATAGTATTTATTCAAGGTTT-Phosphat	20 19 23 30	243 bp	60.1 60.5 58.8 61.4
	rs1053517	Ndufs1_rs1053517 PF Ndufs1_rs1053517 PR Ndufs1053517 Sen Ndufs1053517 Anc	GCCCAGTCTAGGATGTCGTT CTTGAACTCCTGGCCTCAAC ATGT CACAATATCTTTAAAAACAGCAGG-Fluorescein LCRed705-CAGTGGCTCACACCTGTAAGCC-Phosphat	20 20 28 22	163 bp	59.2 59.8 63.6 66.5
MC4R	rs8087522	MC4R_rs8087522PF MC4R_rs8087522PR MC4Rrs8087522Anc MC4Rrs8087522Sen	AACCCCTTTTGAACCCATTC TCTGCTTTTGGCTAGGATACTG LCRed640-CCACTACTGGCTGGGTTCTTAATAAA-Phosphat TCTCTGTTTTTCAGGTATTTTAACTGA- Fluorescein	20 23 26 27	190 bp	62.2 61.9 64.5 60.7
TSPO	rs6971	TSPO rs6971_73F TSPO rs6971_73R TSPO rs6971 Sen TSPO rs6971 Anc	TGCAGAAAGCACAGGACACT GATCTCCTGCTGGTCAGTGG LCRed640-AGTTGAGTGTGGTTCG CGAAGG- Phosphat CCATGGTTGTCCCGCCATACGCA-Fluorescein	20 20 21 23	367 bp	59,6 60,8 63,8 69,6
	rs6973	TSPO rs6973V F2 TSPO rs6973V R TSPO rs6973 Sen TSPO rs6973 Anc	CAGAAAGCACAGGACACTGC CACTGGGCCTGCTAGTCTGT GGGC ACCTCTGAAGCTC-Fluorescein LCRed705-TGACCCCTGGGCCAAGGC- Phosphat	20 20 18 18	104 bp	59,6 60,5 64,5 69,4

* Die Schmelztemperatur [T_M] der Primer wurde mittels Primer3Plus Tool^{233, 234}, die Schmelztemperatur der Sonden mittels Oligoanalyzer 1.5 und der nearest-neighbor Methode (T_M NN) gemessen²³⁵, die Mutationsstellen sind rot markiert.

9.5 Übersicht über die verwendeten Primer für die Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	bp	Amplikonlänge [#]	T _M (°C)*			
HIF3A.conv5.for1	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGAGTGC GTTTTGGGTTTAATAAGGAATTTTATTT	28	278 bp	60,0			
HIF3A.conv5.for2	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACGCTCGACAGTTTGGGTTTAATAAGGAATTTTATTT						
HIF3A.conv5.for3	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGACGCACTCGTTTGGGTTTAATAAGGAATTTTATTT						
HIF3A.conv5.for4	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCACTGTAGGTTTGGGTTTAATAAGGAATTTTATTT						
HIF3A.conv5.for5	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCAGACACGGTTTGGGTTTAATAAGGAATTTTATTT						
HIF3A.conv5.for6	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATATCGCGAGGTTTGGGTTTAATAAGGAATTTTATTT						
HIF3A.conv5.for7	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTGTCTCTAGTTTGGGTTTAATAAGGAATTTTATTT						
HIF3A.conv5.for8	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCGCGTGTCTGTTTGGGTTTAATAAGGAATTTTATTT						
HIF3A.conv5.for10	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCTATGCGGTTTGGGTTTAATAAGGAATTTTATTT						
HIF3A.conv5.for11	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATACGTCTGTTTGGGTTTAATAAGGAATTTTATTT						
HIF3A.conv5.for13	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCATAGTAGTGTTTGGGTTTAATAAGGAATTTTATTT						
HIF3A.conv5.for14	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGAGAGATACGTTTGGGTTTAATAAGGAATTTTATTT						
HIF3A.conv5.rev1	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGAGTGC TRATAACAACCAAAACCCRAATAC				22		60,0
HIF3A.conv5.rev2	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACGCTCGACARATAACAACCAAAACCCRAATAC						
HIF3A.conv5.rev3	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGACGCACTCRATAACAACCAAAACCCRAATAC						
HIF3A.conv5.rev4	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCACTGTAGRATAACAACCAAAACCCRAATAC						
HIF3A.conv5.rev5	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCAGACACGRATAACAACCAAAACCCRAATAC						
HIF3A.conv5.rev6	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATATCGCGAGRATAACAACCAAAACCCRAATAC						
HIF3A.conv5.rev7	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGTGTCTCTARATAACAACCAAAACCCRAATAC						
HIF3A.conv5.rev8	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCGCGTGTCTRATAACAACCAAAACCCRAATAC						
HIF3A.conv5.rev10	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTATGCGRATAACAACCAAAACCCRAATAC						
HIF3A.conv5.rev11	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATACGTCTRATAACAACCAAAACCCRAATAC						
HIF3A.conv5.rev13	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCATAGTAGTRATAACAACCAAAACCCRAATAC						
HIF3A.conv5.rev14	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGAGAGATACRATAACAACCAAAACCCRAATAC						

*Die Schmelztemperatur der Primer wurde mittels Primer3Plus Tool^{233, 234} ermittelt und bezieht sich wie die Basenlänge nur auf die Primer ohne MIDs und Adaptoren;

[#]Angegeben ist die Amplikongröße inklusive MIDs und Adaptoren; blau: Adaptorsequenz, rot: Erkennungssequenz, orange: MIDs; R=A/G

9.6 Übersicht über die verwendeten Primer und Sonden für die ddPCR

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	bp	Amplikon-Länge [#]	T _M (°C)*
HIF3A.conv.for	TGGTTTTGGGTTTAATAAGGAATTT	25	209 bp	58,2
HIF3A.conv.rev	ATACAACCAAAACCCRAATACRAA	24		58,0

*Die Schmelztemperatur der Primer wurde mittels Primer3Plus Tool ermittelt^{233, 234}; R=A/G

CpG	Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	bp	T _M (°C) Paarung*	T _M (°C) Fehlpaarung*
CpG1	HIF3A.CpG1.meth	FAM-AAA+C+GACA ACTAACC+CA-Iowa Black FQ	17	65,8	54,3
	HIF3A.CpG1-3.unm	HEX-AAA+C+AA+CAA+CTAACCCA-Iowa Black FQ	17	67,2	58,4
CpG5	HIF3A.CpG2.meth	FAM-AG+GT+C+GGTTTTTTTT+TG-Iowa Black FQ	17	64,2	53,2
	HIF3A.CpG2.unm	HEX-AGG+T+T+GGTTTTTTTT+TG-Iowa Black FQ	17	62,3	52,9
CpG7	HIF3A.CpG3.meth	FAM-TAAATA+CRCA+C+G+AC-Iowa Black FQ	14	63,8	48,3
	HIF3A.CpG3.unm	HEX-TAAA+TA+CR+CA+C+A+AC-Iowa Black FQ	14	64,8	54,9

*Die Schmelztemperatur wurde mittels Thermodynamic DNA Melting Curve Tool berechnet²⁴⁹, Mutationsstellen sind rot gekennzeichnet, die LNA-Basen sind mit einem + gekennzeichnet.

9.7 Messdaten ddPCR

Tabelle 52: Vergleich gemessene Methylierungslevel [Prozentpunkte] Droplet Digital PCR und Pyrosequenzierung am GS Junior CpGI; Ausreißer sind in rot dargestellt.

Probe	Pos Drop met	Pos Drop unmet	Met auto	M Met auto	SD	CV	M Met man	M Met GS Junior
B1	11	33	25,07	25,9	1,11	0,04	23,0	26
B1	17	47	26,64					
B110	15	89	14,36	15,6	1,77	0,11	14,1	14,465
B110	11	54	16,87					
B119	7	7	50,12	49,0	1,52	0,03	33	24,215
B119	12	13	47,97					
B1-2	17	100	13,51	18,5	7,02	0,38	22	23,6
B1-2	26	83	23,44					
B126	4	25	13,77	56,9	60,98	1,07	9	10,5
B126	4	0	100,00					
B136	4	36	9,97	17,2	10,21	0,59	9,6	7,85
B136	11	34	24,41					
B139	13	39	24,91	32,9	11,25	0,34	14,7	12
B139	27	39	40,82					
B15	13	59	18,06	25,4	10,38	0,41	14	28,95
B15	33	68	32,74					
B15-2	13	66	16,48	16,6	0,14	0,01	16	13
B15-2	10	50	16,67					
B157	8	36	18,33	18,2	0,24	0,01	18	16
B157	11	51	17,99					
B15-KS	42	31	57,73	38,2	27,65	0,72	33	24,32
B15-KS	19	83	18,63					
B161	23	57	28,70	29,8	1,59	0,05	18	17,75
B161	15	34	30,95					
B163	20	79	19,89	15,9	5,68	0,36	12,0	13,3

B163	11	82	11,86					
B20	50	320	13,56	13,1	0,71	0,05	7,5	10,5
B20	35	254	12,56					
B3	10	63	12,62	9,3	4,67	0,50	13,0	15,5
B3	4	57	6,01					
B32	87	247	26,51	36,0	13,35	0,37	20,2	14,3
B32	50	84	45,40					
B3-2	1	16	5,64	10,8	7,24	0,67	7,0	9,35
B3-2	3	15	15,88					
B37	53	185	21,97	15,8	8,70	0,55	12,3	12,25
B37	61	557	9,65					
B3-KS	24	140	12,49	11,4	1,53	0,13	12,7	15
B3-KS	18	149	10,33					
B43	65	407	13,49	11,9	2,28	0,19	9,7	10,05
B43	62	532	10,27					
B47	5	48	9,42	12,8	4,80	0,37	13	11,4
B47	6	31	16,20					
B51	72	156	31,45	32,6	1,65	0,05	24,5	23,4
B51	77	150	33,78					
B57	24	76	23,92	26,1	3,12	0,12	17,7	18,25
B57	23	58	28,34					
B58	17	52	24,58	33,1	12,03	0,36	14,8	15,85
B58	20	28	41,58					
B66	41	197	16,25	16,5	0,30	0,02	18,6	17
B66	21	102	16,67					
B81	47	237	16,48	16,8	0,38	0,02	18,4	19,25
B81	67	275	17,02					
B98	20	37	35,01	33,8	1,70	0,05	16,3	13,4
B98	17	35	32,60					
J111	18	116	13,42	14,0	0,80	0,06	12,6	17
J111	15	88	14,56					
J111-KS	15	112	11,80	11,9	0,10	0,01	10,3	13,65

J111- KS	14	103	11,94					
J117	55	187	22,69	20,9	2,56	0,12	19,5	26,9
J117	38	161	19,07					
J117-2	81	323	19,98	20,6	0,94	0,05	19,5	26,2
J117-2	83	305	21,32					
Std0	3	193	1,53	1,1	0,60	0,54	0,4	0,65
Std0	2	288	0,69					
Std100	67	6	91,83	93,4	2,20	0,02	93	86,85
Std100	93	5	94,93					
Std25	6	12	33,68	33,1	0,76	0,02	28	27,55
Std25	28	58	32,61					
Std50	150	93	61,90	59,4	3,58	0,06	58,7	56,43
Std50	157	120	56,84					
Std75	84	19	81,65	79,4	3,18	0,04	79	73,09
Std75	104	31	77,15					
T125	21	89	19,41	24,6	7,33	0,30	15,4	19,6
T125	34	82	29,78					
T126	23	70	25,35	34,5	12,88	0,37	18	20,8
T126	15	22	43,57					
T131	54	201	21,56	21,3	0,42	0,02	19,7	21,25
T131	68	263	20,97					
T132	36	135	21,20	18,9	3,28	0,17	15,6	17,3
T132	24	126	16,56					
T140	31	264	10,77	12,1	1,94	0,16	7,3	9,7
T140	34	226	13,51					
T19	23	124	15,32	20,1	6,75	0,34	12,0	12,9
T19	52	155	24,86					
T42	15	66	18,88	16,0	4,04	0,25	13	14,25
T42	10	67	13,17					
T45	41	107	28,16	28,3	0,17	0,01	23,9	23,75
T45	42	108	28,40					
T48	9	112	7,56	5,6	2,76	0,49	4,7	11,85

T48	4	107	3,65					
T58	64	359	15,23	15,2	0,07	0,00	14,4	15,6
T58	62	351	15,13					
T67	22	112	16,70	19,2	3,60	0,19	17,5	15,85
T67	30	110	21,80					
T9	34	30	53,35	33,4	28,25	0,85	24	9,3
T9	13	84	13,41					
T98-2	13	175	6,90	10,2	4,61	0,45	9,8	8,85
T98-2	30	193	13,42					
T98-KS	5	93	5,10	10,6	7,79	0,73	6	8,2
T98-KS	19	99	16,11					
T98- neu	21	77	21,49	20,3	1,62	0,08	15	12
T98- neu	14	59	19,19					
T9-KS	9	29	23,73	22,1	2,28	0,10	13	10,6
T9-KS	9	35	20,50		1,11	0,04		

Tabelle 53: Vergleich gemessene Methylierungslevel [Prozentpunkte] Droplet Digital PCR und Pyrosequenzierung am GS Junior CpG5; Ausreißer sind in rot dargestellt.

Probe	Pos Drop met	Pos Drop unmet	Met auto	M Met auto	SD	CV	M Met man	M Met GS Ju- nior	M Met GS Junior kor
B1	34	45	42,85	41,6	1,74	0,04	42	34,5	45,7
B1	35	51	40,38						
B110	74	162	30,39	26,4	5,64	0,21	27,9	16,67	22,1
B110	51	158	22,41						
B119	27	46	30,87	35,4	6,37	0,18	39	28,115	37,3
B119	34	49	39,88						
B1-2	40	58	40,08	38,6	2,11	0,05	39,0	29,19	38,7
B1-2	40	67	37,10						
B126	16	64	16,51	14,1	3,45	0,24	16	13	17,2
B126	11	76	11,64						
B136	10	106	8,08	11,1	4,26	0,38	11,9	8,25	10,9
B136	16	90	14,11						
B139	28	129	15,83	17,3	2,12	0,12	18,2	11	14,6
B139	37	147	18,83						
B15	36	44	43,66	47,9	5,95	0,12	47	33,5	44,4
B15	40	36	52,07						
B15-2	23	39	35,92	34,5	2,02	0,06	35	17	22,5
B15-2	27	49	33,06						
B157	20	49	21,39	24,1	3,85	0,16	31	17,4	23,1
B157	7	13	26,83						
B15- KS	36	59	37,31	31,8	7,77	0,24	33	29,25	38,8
B15- KS	29	81	26,32						
B161	28	51	23,00	21,1	2,71	0,13	31	20,8	27,6
B161	18	50	19,17						
B163	18	52	25,56	24,2	1,88	0,08	27,0	14,7	19,5
B163	23	59	22,91						

B20	36	288	10,84	11,5	0,90	0,08	11,9	10,1	13,4
B20	44	304	12,12						
B3	10	48	16,10	16,9	1,20	0,07	18,0	14	18,6
B3	12	50	17,80						
B32	81	284	21,90	23,9	2,81	0,12	23,5	16	21,2
B32	79	224	25,88						
B3-2	2	10	12,62	13,7	1,57	0,11	17,0	6,54	8,7
B3-2	3	16	14,84						
B37	296	920	21,53	21,7	0,23	0,01	23,5	17,55	23,3
B37	270	870	21,86						
B3-KS	22	112	15,59	16,8	1,72	0,10	17,5	15	19,9
B3-KS	33	139	18,02						
B43	134	773	13,24	14,1	1,19	0,08	16,1	12,25	16,2
B43	159	708	14,92						
B47	26	90	4,00	10,6	9,27	0,88	22	14,55	19,3
B47	22	75	17,11						
B51	151	195	38,48	40,3	2,63	0,07	42,5	32,3	42,8
B51	165	212	42,21						
B57	62	126	12,16	20,9	12,3 0	0,59	31,7	19,8	26,3
B57	55	124	29,55						
B58	37	110	19,79	20,4	0,88	0,04	27	18,2	24,1
B58	41	109	21,03						
B66	79	187	28,43	25,3	4,41	0,17	26,5	19,15	25,4
B66	60	208	22,19						
B81	75	216	25,14	26,4	1,83	0,07	27,3	18,65	24,7
B81	79	195	27,74						
B98	40	119	17,09	12,1	7,00	0,58	22,2	15,25	20,2
B98	40	157	7,19						
J111	22	82	20,19	18,3	2,70	0,15	18,5	14,75	19,6
J111	26	132	16,37						
J111- KS	37	130	22,06	19,4	3,75	0,19	19,3	15,5	20,6

J111- KS	32	158	16,76						
J117	115	144	44,21	49,4	7,37	0,15	48,2	36,4	48,3
J117	140	116	54,64						
J117-2	288	265	52,00	51,1	1,25	0,02	49,9	33,7	44,7
J117-2	305	279	50,23						
Std0	3	278	0,96	1,0	0,02	0,02	0,21	0,48	0,6
Std0	4	331	0,99						
Std100	152	20	87,22	86,2	1,50	0,02	89	67,98	90,1
Std100	106	17	85,09						
Std25	39	78	32,38	28,9	4,91	0,17	30	20,68	27,4
Std25	33	95	25,44						
Std50	175	138	55,20	56,5	1,89	0,03	57,9	41,94	55,6
Std50	177	124	57,88						
Std75	114	53	66,13	66,2	0,07	0,00	68,2	51,3	68,0
Std75	117	59	66,22						
T125	35	86	22,99	24,5	2,13	0,09	30	25,9	34,3
T125	35	65	26,00						
T126	19	57	18,18	25,1	9,78	0,39	31	20,8	27,6
T126	34	58	32,00						
T131	127	268	26,71	25,9	1,10	0,04	31,5	21,85	29,0
T131	112	238	25,15						
T132	9	46	13,72	18,6	6,89	0,37	23,0	18,1	24,0
T132	37	118	23,46						
T140	31	251	10,76	10,5	0,37	0,03	10,5	7,35	9,7
T140	38	325	10,24						
T19	34	123	20,77	20,3	0,69	0,03	21,3	12,2	16,2
T19	38	145	19,79						
T42	17	60	20,32	14,6	8,08	0,55	17	13,6	18,0
T42	12	87	8,89						
T45	38	97	24,07	24,6	0,76	0,03	30	22,35	29,6
T45	55	114	25,15						
T48	23	114	7,54	8,4	1,21	0,14	14,3	10,7	14,2

T48	11	93	9,25						
T58	99	383	13,52	12,7	1,18	0,09	20	13,2	17,5
T58	99	405	11,86						
T67	37	117	14,85	12,9	2,72	0,21	21,5	15,6	20,7
T67	29	126	11,00						
T9	17	105	13,47	12,5	1,44	0,12	13,4	8,2	10,9
T9	15	113	11,44						
T98-2	24	197	10,73	11,1	0,48	0,04	11,3	8,5	11,3
T98-2	31	237	11,41						
T98- KS	22	134	14,03	13,1	1,38	0,11	13,3	7,6	10,1
T98- KS	18	128	12,09						
T98- neu	17	86	16,37	20,3	5,54	0,27	21	20,5	27,2
T98- neu	27	82	24,21						
T9-KS	2	37	4,01	10,7	9,47	0,88	13	8,4	11,1
B1	34	45	42,85	41,6	1,74	0,04	42	34,5	45,7

Tabelle 54: Vergleich gemessene Methylierungslevel [Prozentpunkte] Droplet Digital PCR und Pyrosequenzierung am GS Junior CpG7; Ausreißer sind in rot dargestellt.

Probe	Pos Drop met	Pos Drop unmet	Met auto	M Met auto	SD	CV	M Met man	M Met GS Junior
B1	30	50	37,49	29,9	10,69	0,36	30	27,5
B1	15	52	22,37					
B110	41	157	20,72	19,6	1,55	0,08	19,6	18,545
B110	34	149	18,53					
B119	22	61	26,57	27,0	0,68	0,02	27	24
B119	22	58	27,53					
B1-2	28	41	40,57	35,0	7,85	0,22	34,0	23,12
B1-2	23	55	29,47					
B126	14	81	14,74	15,9	1,59	0,10	16	13
B126	17	83	16,99					
B136	15	68	18,09	17,3	1,13	0,07	17	13,25
B136	15	76	16,49					
B139	9	60	13,01	15,4	3,41	0,22	16,3	17
B139	33	152	17,82					
B15	25	63	28,42	25,7	3,87	0,15	25	30
B15	19	64	22,94					
B15-2	13	60	17,93	22,0	5,68	0,26	18	14
B15-2	7	20	25,97					
B157	9	41	18,00	18,2	0,25	0,01	18	18,3
B157	11	49	18,35					
B15-KS	32	88	26,69	27,6	1,34	0,05	26	24,5
B15-KS	30	75	28,59					
B161	19	71	20,75	23,0	3,23	0,14	23	21
B161	21	62	25,32					
B163	21	99	17,47	17,5			18	15
B20	44	365	10,68	11,9	1,71	0,14	11,8	10,9
B20	46	303	13,10					
B3	16	47	25,39	27,9	3,50	0,13	28,0	16

B3	17	39	30,34					
B32	62	271	18,54	19,5	1,40	0,07	16,3	15,4
B32	57	220	20,51					
B3-2	0	9	0,00	10,7	15,16	1,41	13,0	14,95
B3-2	3	11	21,43					
B37	196	797	19,54	20,9	1,87	0,09	20,7	16,8
B37	233	806	22,19					
B3-KS	35	146	19,29	18,0	1,89	0,10	17,8	19,5
B3-KS	28	140	16,63					
B43	132	740	14,99	14,2	1,15	0,08	14,2	12,5
B43	106	680	13,37					
B47	18	92	16,37	15,6	1,13	0,07	16	13,45
B47	13	75	14,77					
B51	117	284	29,10	28,5	0,88	0,03	29,3	24,95
B51	120	283	27,86					
B57	47	101	31,80	27,2	6,44	0,24	27	21
B57	32	109	22,69					
B58	28	90	23,71	22,1	2,24	0,10	22	20,3
B58	24	93	20,54					
B66	47	222	17,41	19,0	2,25	0,12	18,9	17,55
B66	45	173	20,58					
B81	43	95	31,07	25,9	7,27	0,28	26,0	21,25
B81	28	106	20,79					
B98	23	114	16,47	15,2	1,75	0,11	15,4	15,2
B98	19	117	14,00					
J111	18	113	13,76	16,8	4,26	0,25	14,8	16
J111	13	53	19,79					
J111- KS	30	138	17,92	18,4	0,68	0,04	18,3	13,5
J111- KS	40	172	18,88					
J117	89	188	32,09	32,6	0,69	0,02	31,5	30
J117	89	180	33,07					

J117-2	177	330	34,84	35,0	0,23	0,01	33,7	30,6
J117-2	178	329	35,17					
Std0	1	246	0,40	0,8	0,60	0,73	0,4	0,49
Std0	3	235	1,25					
Std100	136	4	97,16	97,4	0,29	0,00	97	95,35
Std100	120	3	97,57					
Std25	25	53	32,03	29,3	3,80	0,13	29	26,44
Std25	24	66	26,65					
Std50	157	117	57,33	60,6	4,63	0,08	60,2	59,79
Std50	164	93	63,87					
Std75	83	38	68,64	71,8	4,45	0,06	72	71,27
Std75	113	38	74,94					
T125	27	80	25,28	25,6	0,41	0,02	26	21
T125	26	75	25,86					
T126	29	56	34,19	31,6	3,62	0,11	32	21,25
T126	31	75	29,07					
T131	78	288	21,27	23,0	2,49	0,11	22,8	21,05
T131	81	246	24,79					
T132	27	106	20,26	20,3	0,11	0,01	20,4	20,15
T132	27	105	20,42					
T140	41	216	15,88	16,9	1,38	0,08	14,8	13,9
T140	48	220	17,84					
T19	33	140	19,04	19,4	0,48	0,02	19,4	16,8
T19	32	130	19,72					
T42	13	79	14,16	14,0	0,22	0,02	14	13,45
T42	12	75	13,84					
T45	44	125	26,11	24,3	2,49	0,10	24,6	26,85
T45	37	123	22,58					
T48	18	123	12,76	13,2	0,63	0,05	13,2	12,55
T48	15	95	13,64					
T58	66	374	14,90	15,6	0,92	0,06	15,6	14,8
T58	76	391	16,21					
T67	22	110	16,75	16,3	0,61	0,04	16,4	13

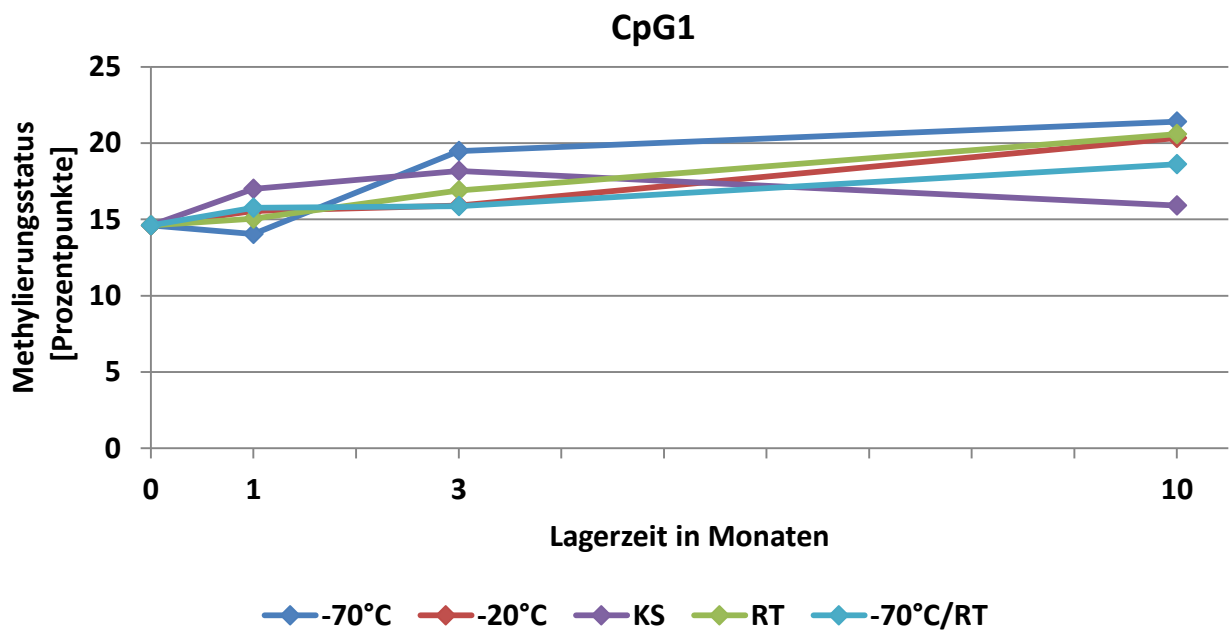
T67	22	117	15,88					
T9	33	114	22,45	18,7	5,23	0,28	17,9	15,9
T9	17	96	15,04					
T98-2	22	212	9,42	9,1	0,48	0,05	9	9
T98-2	21	219	8,75					
T98-KS	22	128	14,69	15,4	0,96	0,06	14,7	10
T98-KS	22	115	16,05					
T98- neu	19	101	15,92	14,4	2,16	0,15	14,3	16
T98- neu	14	95	12,86					
T9-KS	9	32	22,11	21,0	1,56	0,07	20	13,6
T9-KS	8	33	19,91					
B1	30	50	37,49	29,9	10,69	0,36	30	27,5

9.8 Stabilitätsreihe für einzelne CpG-Stellen

CpG1

Lagerzeit	T ₀	1 Monat			
Lagerbed.	M	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	14,61 ± 3,8	14,03 ± 4,1	-0,57 ± 2,9	-3,29 ± 19,8	0,639
-20 °C	14,61 ± 3,8	15,56 ± 3,7	0,95 ± 2,2	8,71 ± 17,8	0,205
KS	14,61 ± 3,8	16,99 ± 3,2	2,38 ± 2,6	19,5 ± 21,4	0,019
RT	14,61 ± 3,8	15,06 ± 2,9	0,44 ± 3,4	7,69 ± 27,2	0,690
-70 °C/RT	14,61 ± 3,8	15,76 ± 3,5	1,15 ± 3,2	11,6 ± 25,2	0,290

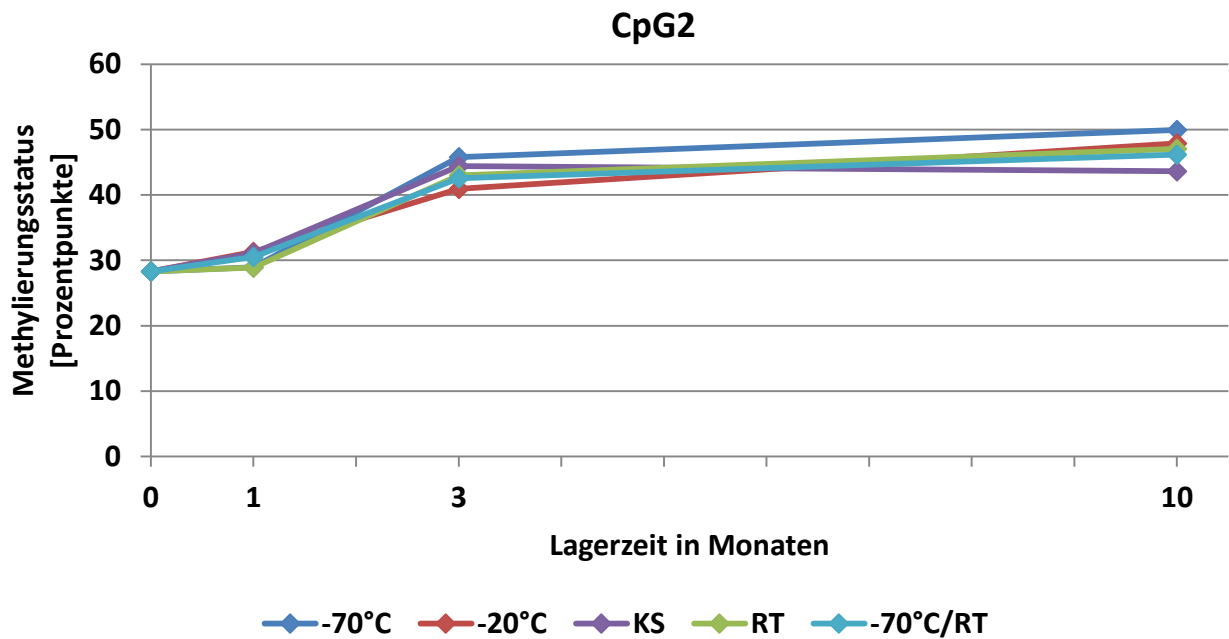
Lagerzeit	3 Monate				10 Monate			
Lagerbed.	M	Dif abs	Dif %	p	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	19,48 ± 3,6	4,86 ± 3,3	38,6 ± 34,8	0,016	21,41 ± 3,6	6,80 ± 2,1	51,0 ± 25,1	0,000
-20 °C	15,91 ± 3,8	0,95 ± 2,2	11,5 ± 23,0	0,682	20,33 ± 4,6	5,71 ± 2,4	41,4 ± 19,9	0,000
KS	18,17 ± 4,5	3,56 ± 2,5	26,7 ± 21,3	0,002	15,90 ± 6,1	1,29 ± 4,6	8,70 ± 33,2	0,397
RT	16,90 ± 4,0	2,29 ± 3,4	19,2 ± 28,5	0,063	20,59 ± 5,0	5,98 ± 4,8	45,7 ± 38,2	0,003
-70 °C/ RT	15,86 ± 3,2	1,25 ± 2,1	10,9 ± 16,1	0,091	18,61 ± 3,8	4,00 ± 3,5	31,8 ± 31,1	0,005



CpG2

Lagerzeit	T ₀	1 Monat			
Lagerbed.	M	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	28,32 ± 4,4	28,95 ± 4,7	0,63 ± 4,1	2,94 ± 15,4	0,638
-20 °C	28,32 ± 4,4	31,27 ± 4,2	2,94 ± 3,8	11,6 ± 15,7	0,035
KS	28,32 ± 4,4	31,09 ± 5,1	2,76 ± 3,7	10,2 ± 13,8	0,041
RT	28,32 ± 4,4	28,87 ± 5,3	0,55 ± 5,3	3,18 ± 21,0	0,752
-70 °C/RT	28,32 ± 4,4	30,50 ± 4,4	2,17 ± 3,0	8,39 ± 11,4	0,046

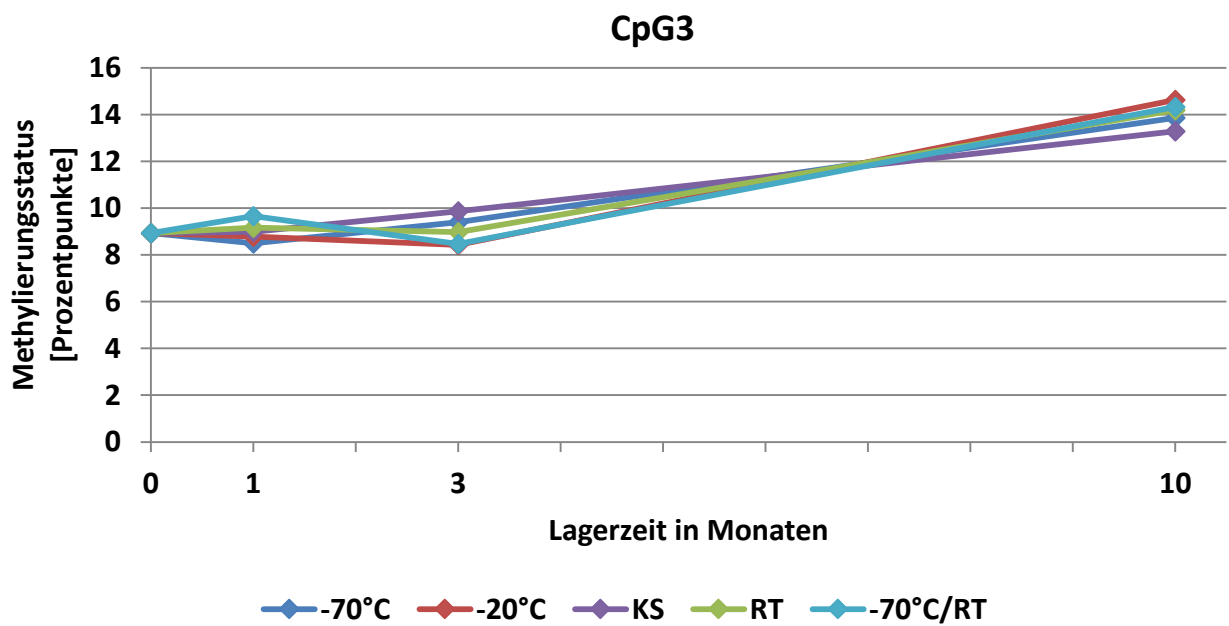
Lagerzeit	3 Monate				10 Monate			
Lagerbed.	M	Dif abs	Dif %	p	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	45,81 ± 4,8	17,5 ± 4,0	63,7 ± 20,4	0,000	49,93 ± 4,2	21,6 ± 4,0	78,8 ± 2,4	0,000
-20 °C	40,91 ± 6,4	12,6 ± 4,5	45,4 ± 18,6	0,000	47,88 ± 6,1	19,6 ± 5,5	71,2 ± 25,6	0,000
KS	44,39 ± 6,5	16,1 ± 4,7	57,9 ± 19,4	0,000	43,64 ± 8,5	15,3 ± 7,9	55,7 ± 28,9	0,000
RT	42,97 ± 6,8	14,6 ± 5,3	52,9 ± 22,2	0,000	47,04 ± 6,0	18,7 ± 5,8	68,4 ± 26,5	0,000
-70 °C/ RT	42,56 ± 6,4	14,2 ± 3,9	50,9 ± 15,0	0,000	46,17 ± 6,5	17,8 ± 5,4	64,6 ± 23,3	0,000



CpG3

Lagerzeit	T ₀	1 Monat			
Lagerbed.	M	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	8,94 ± 2,7	8,50 ± 2,4	-0,44 ± 2,5	0,69 ± 26,4	0,589
-20 °C	8,94 ± 2,7	8,78 ± 2,3	-0,16 ± 2,0	2,46 ± 25,1	0,813
KS	8,94 ± 2,7	8,99 ± 2,3	0,05 ± 1,6	4,19 ± 22,1	0,924
RT	8,94 ± 2,7	9,17 ± 1,9	0,23 ± 2,9	12,2 ± 44,8	0,808
-70 °C/RT	8,94 ± 2,7	9,66 ± 2,7	0,72 ± 2,8	13,9 ± 32,2	0,430

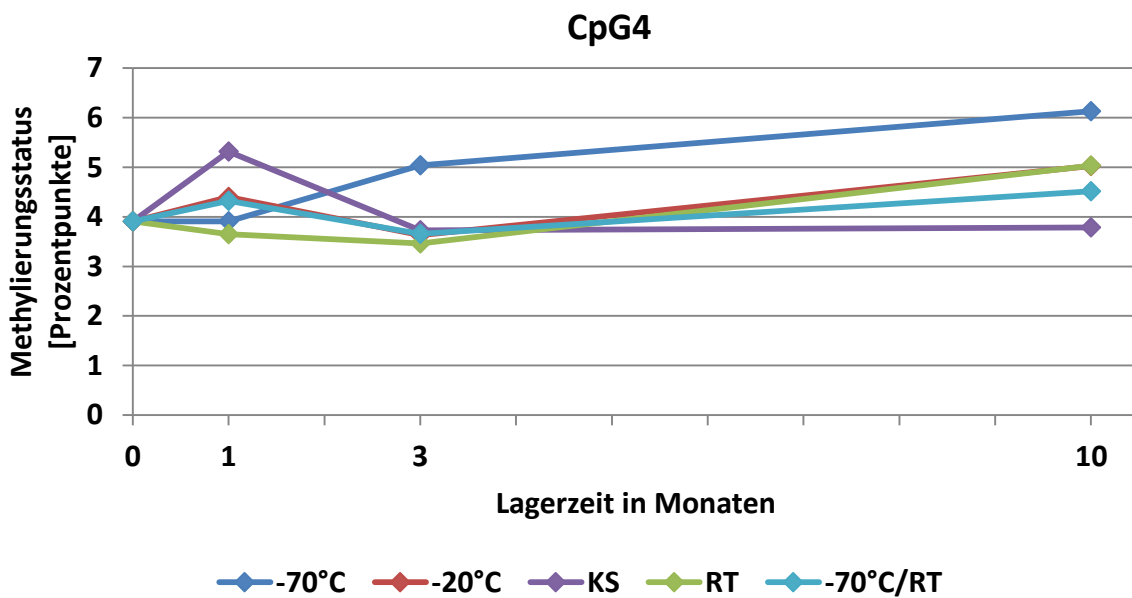
Lagerzeit	3 Monate				10 Monate			
Lagerbed.	M	Dif abs	Dif %	p	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	9,40 ± 2,4	0,46 ± 2,5	11,4 ± 35,5	0,570	13,86 ± 3,8	4,92 ± 2,9	61,7 ± 43,7	0,000
-20 °C	8,42 ± 2,8	-0,51 ± 2,1	-3,06 ± 26,0	0,470	14,63 ± 4,8	5,69 ± 3,2	69,0 ± 43,4	0,000
KS	9,86 ± 2,8	0,92 ± 2,3	14,8 ± 28,8	0,233	13,28 ± 3,4	4,34 ± 2,5	55,2 ± 44,4	0,000
RT	8,97 ± 2,7	0,03 ± 2,5	5,40 ± 36,4	0,970	14,19 ± 3,4	5,25 ± 3,1	68,6 ± 51,7	0,000
-70 °C/ RT	8,46 ± 2,0	-0,47 ± 1,7	-1,33 ± 23,4	0,409	14,32 ± 4,7	5,38 ± 3,0	64,1 ± 41,3	0,000



CpG4

Lagerzeit	T ₀	1 Monat			
Lagerbed.	M	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	3,90 ± 1,4	3,91 ± 0,8	0,005 ± 1,0	8,7 ± 32,3	0,988
-20 °C	3,90 ± 1,4	4,40 ± 1,6	0,49 ± 1,1	18,9 ± 35,4	0,201
KS	3,90 ± 1,4	5,32 ± 1,6	1,41 ± 1,2	46,0 ± 47,8	0,005
RT	3,90 ± 1,4	3,65 ± 1,2	-0,26 ± 1,4	1,60 ± 38,8	0,567
-70 °C/RT	3,90 ± 1,4	4,32 ± 1,8	0,42 ± 1,2	14,7 ± 29,3	0,285

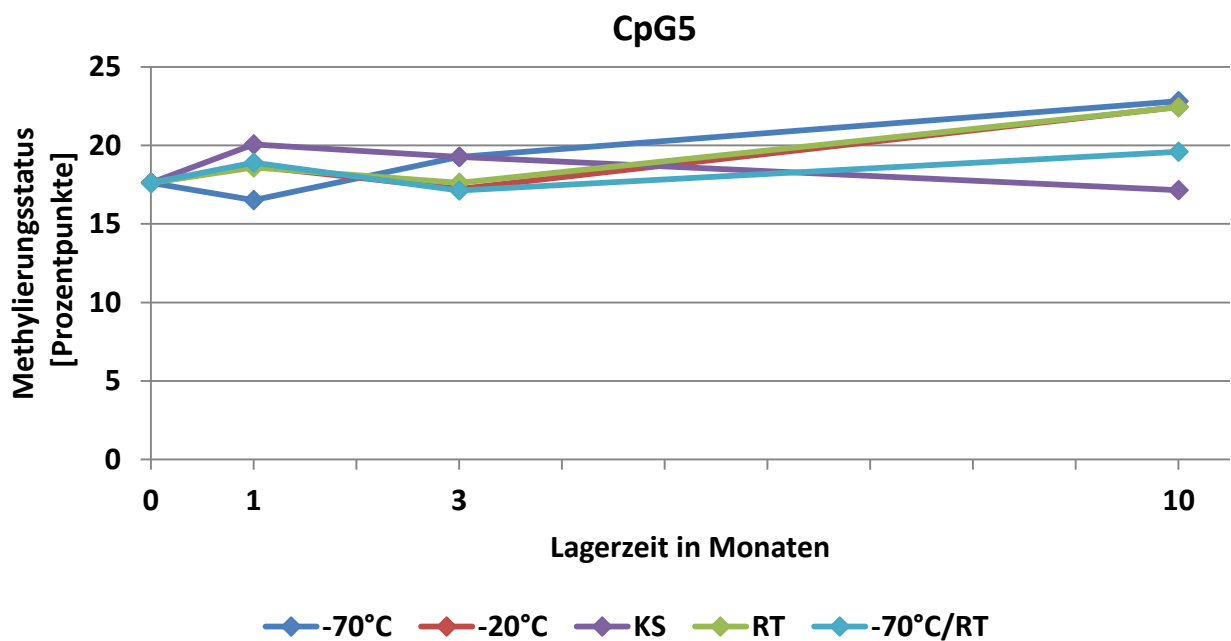
Lagerzeit	3 Monate				10 Monate			
Lagerbed.	M	Dif abs	Dif %	p	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	5,04 ± 1,1	1,1 ± 1,7	45,4 ± 61,0	0,060	6,13 ± 1,0	2,2 ± 1,4	75,8 ± 63,7	0,001
-20 °C	3,63 ± 1,0	-0,28 ± 1,0	-1,41 ± 28,4	0,395	5,02 ± 1,4	1,12 ± 1,6	43,1 ± 0,6	0,056
KS	3,72 ± 0,88	-0,18 ± 1,5	7,9 ± 50,0	0,712	3,78 ± 1,6	-0,12 ± 1,4	0,56 ± 45,6	0,788
RT	3,74 ± 0,86	-0,16 ± 1,2	3,94 ± 33,2	0,670	5,03 ± 1,9	1,13 ± 2,3	46,5 ± 84,8	0,162
-70 °C/ RT	3,65 ± 0,81	-0,25 ± 1,5	5,49 ± 44,9	0,600	4,51 ± 1,3	0,61 ± 2,1	34,5 ± 70,9	0,392



CpG5

Lagerzeit	T ₀	1 Monat			
Lagerbed.	M	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	17,61 ± 5,8	16,52 ± 5,3	-1,09 ± 2,5	4,66 ± 19,9	0,200
-20 °C	17,61 ± 5,8	18,68 ± 4,0	1,07 ± 2,3	10,5 ± 17,6	0,180
KS	17,61 ± 5,8	20,06 ± 5,4	2,45 ± 3,3	18,6 ± 27,2	0,043
RT	17,61 ± 5,8	18,60 ± 4,7	0,99 ± 2,5	9,21 ± 17,8	0,247
-70 °C/RT	17,61 ± 5,8	18,91 ± 6,0	1,30 ± 3,2	9,89 ± 18,6	0,231

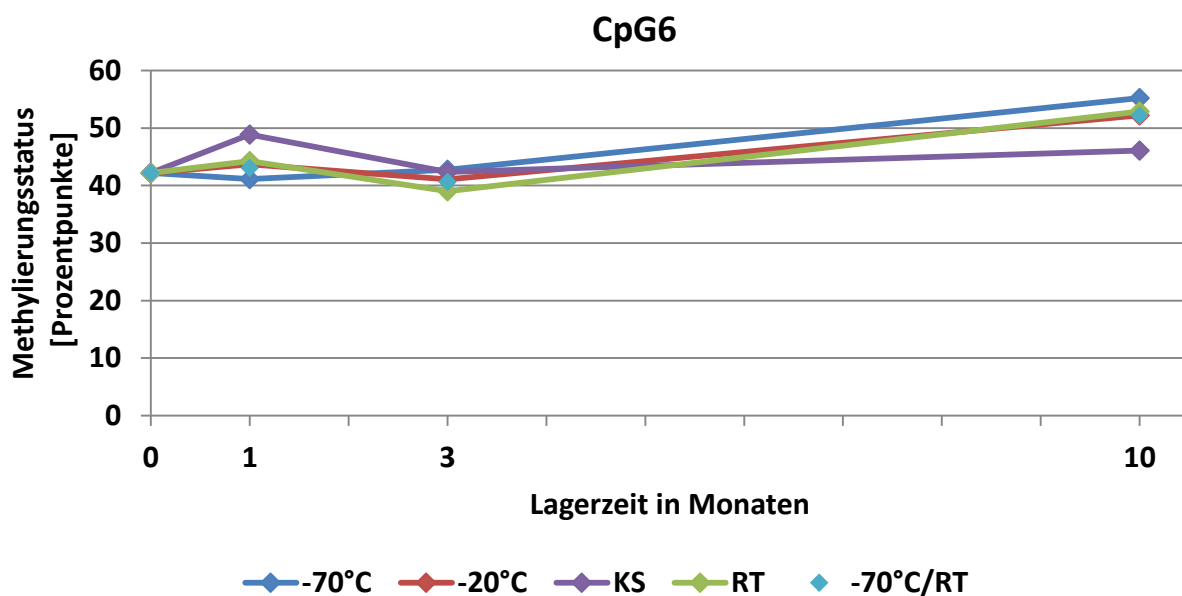
Lagerzeit	3 Monate				10 Monate			
Lagerbed.	M	Dif abs	Dif %	p	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	19,28 ± 4,9	1,67 ± 2,3	13,0 ± 19,9	0,051	22,81 ± 6,2	5,20 ± 3,3	34,6 ± 28,9	0,001
-20 °C	17,23 ± 5,2	-0,38 ± 2,1	-0,48 ± 12,8	0,579	22,46 ± 6,5	4,85 ± 2,4	30,9 ± 22,4	0,000
KS	19,27 ± 5,6	1,66 ± 1,8	11,5 ± 12,0	0,017	17,15 ± 6,4	-0,46 ± 3,0	-1,51 ± 20,2	0,641
RT	17,62 ± 5,3	0,01 ± 2,2	2,11 ± 17,2	0,989	22,43 ± 6,3	4,82 ± 2,8	30,4 ± 20,4	0,000
-70 °C/ RT	17,13 ± 4,5	-0,48 ± 2,2	0,26 ± 14,0	0,504	19,60 ± 5,9	1,99 ± 1,8	13,0 ± 13,7	0,006



CpG6

Lagerzeit	T ₀	1 Monat			
Lagerbed.	M	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	42,19 ± 5,6	41,12 ± 6,8	-1,07 ± 3,9	-2,62 ± 9,5	0,402
-20 °C	42,19 ± 5,6	43,71 ± 5,4	1,52 ± 4,5	4,26 ± 11,2	0,339
KS	42,19 ± 5,6	48,89 ± 6,1	6,70 ± 4,3	16,5 ± 11,0	0,001
RT	42,19 ± 5,6	44,26 ± 5,9	2,07 ± 3,4	5,23 ± 8,7	0,083
-70 °C/RT	42,19 ± 5,6	43,10 ± 6,8	0,91 ± 4,2	2,32 ± 9,5	0,511

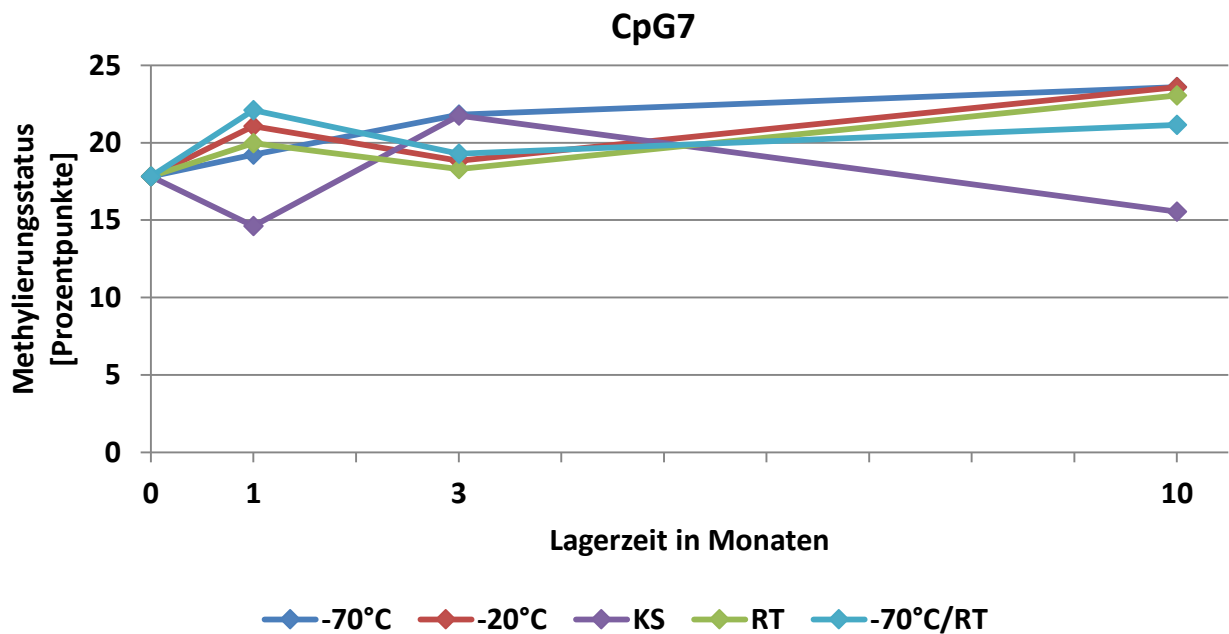
Lagerzeit	3 Monate				10 Monate			
Lagerbed.	M	Dif abs	Dif %	p	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	42,77 ± 5,1	0,58 ± 3,8	1,90 ± 9,2	0,638	55,24 ± 5,3	13,0 ± 2,0	31,6 ± 7,6	0,000
-20 °C	41,06 ± 6,4	-1,13 ± 3,5	-2,69 ± 8,1	0,339	52,20 ± 5,3	10,0 ± 4,9	24,6 ± 13,3	0,000
KS	42,36 ± 5,5	0,17 ± 2,5	0,57 ± 5,9	0,838	46,07 ± 7,3	3,88 ± 5,0	9,47 ± 12,5	0,037
RT	39,03 ± 3,0	-3,16 ± 2,2	-7,61 ± 5,3	0,001	52,89 ± 9,4	10,7 ± 4,6	24,9 ± 9,6	0,000
-70 °C/RT	40,64 ± 3,9	-1,56 ± 3,8	-2,98 ± 8,2	0,228	52,20 ± 7,0	10,0 ± 3,0	24,0 ± 7,5	0,000



CpG7

Lagerzeit	T ₀	1 Monat			
Lagerbed.	M	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	17,82 ± 2,9	19,24 ± 4,3	1,42 ± 2,8	7,89 ± 14,7	0,145
-20 °C	17,82 ± 2,9	21,07 ± 4,3	3,24 ± 3,1	18,7 ± 18,2	0,009
KS	17,82 ± 2,9	24,41 ± 6,1	6,59 ± 3,9	35,7 ± 19,5	0,000
RT	17,82 ± 2,9	19,98 ± 5,5	2,16 ± 3,8	11,1 ± 21,4	0,102
-70 °C/RT	17,82 ± 2,9	22,10 ± 4,0	4,28 ± 2,6	24,6 ± 13,5	0,001

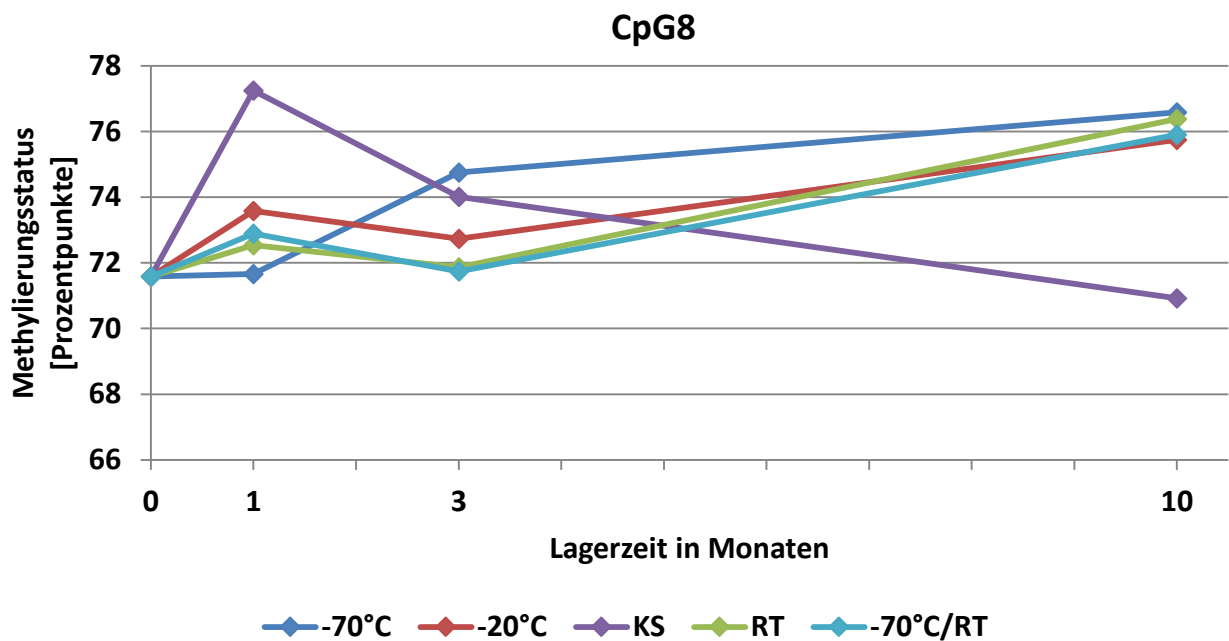
Lagerzeit	3 Monate				10 Monate			
Lagerbed.	M	Dif abs	Dif %	p	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	21,81 ± 4,5	3,99 ± 2,7	22,3 ± 13,7	0,001	23,60 ± 5,3	5,78 ± 3,0	31,6 ± 14,3	0,000
-20 °C	18,84 ± 4,3	1,02 ± 1,7	4,81 ± 8,6	0,093	23,60 ± 4,4	5,78 ± 2,5	32,6 ± 13,3	0,000
KS	21,76 ± 4,2	3,93 ± 2,4	22,1 ± 14,6	0,001	15,55 ± 3,5	-2,28 ± 3,0	-12,0 ± 18,3	0,041
RT	18,31 ± 4,8	0,49 ± 2,3	1,29 ± 13,0	0,520	23,06 ± 4,1	5,24 ± 3,2	30,7 ± 21,2	0,001
-70 °C/ RT	19,30 ± 3,4	1,48 ± 2,2	8,88 ± 12,8	0,052	21,15 ± 4,5	3,32 ± 2,6	18,6 ± 13,8	0,003



CpG8

Lagerzeit	T ₀	1 Monat			
Lagerbed.	M	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	71,59 ± 4,7	71,66 ± 6,3	0,08 ± 2,7	0,02 ± 3,9	0,931
-20 °C	71,59 ± 4,7	73,58 ± 5,1	2,00 ± 3,6	2,88 ± 5,2	0,111
KS	71,59 ± 4,7	77,24 ± 6,2	5,66 ± 3,6	7,91 ± 5,2	0,001
RT	71,59 ± 4,7	72,54 ± 7,1	0,96 ± 3,2	1,18 ± 4,5	0,374
-70 °C/RT	71,59 ± 4,7	72,89 ± 6,2	1,31 ± 3,6	1,82 ± 5,0	0,285

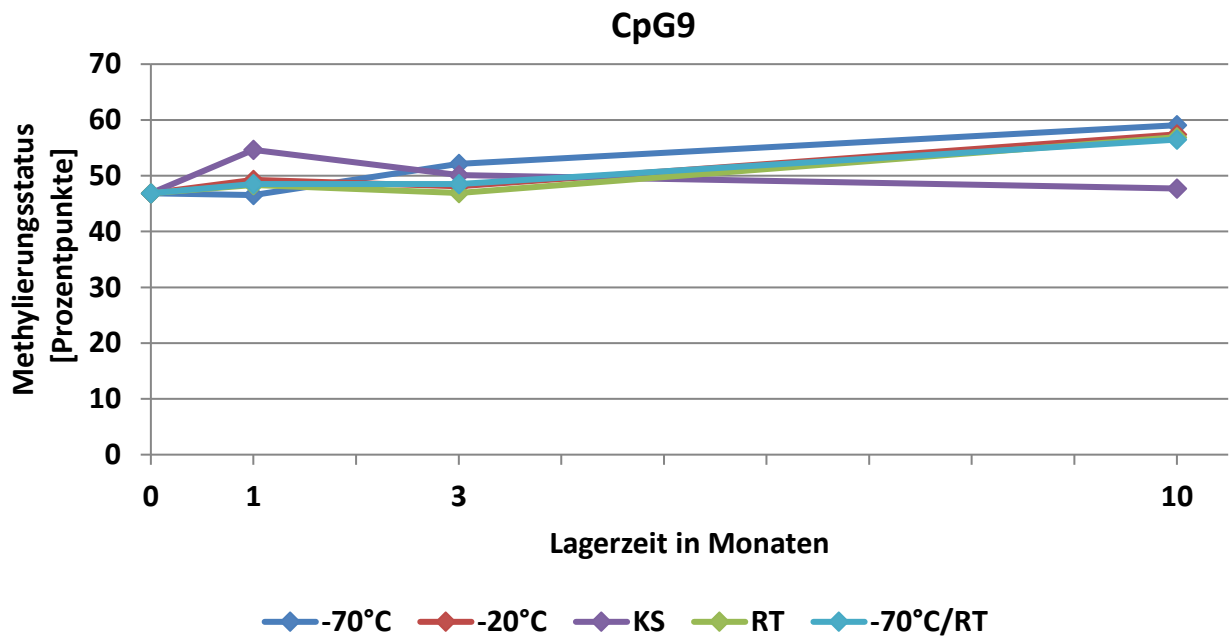
Lagerzeit	3 Monate				10 Monate			
Lagerbed.	M	Dif abs	Dif %	p	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	74,8 ± 6,3	3,17 ± 3,1	4,38 ± 4,3	0,010	76,58 ± 5,4	5,00 ± 3,0	7,03 ± 4,6	0,001
-20 °C	72,73 ± 6,7	1,14 ± 3,1	1,49 ± 4,2	0,270	75,74 ± 5,0	4,15 ± 3,0	5,88 ± 4,3	0,002
KS	74,01 ± 5,5	2,42 ± 3,0	3,42 ± 4,4	0,031	70,92 ± 6,7	-0,66 ± 3,9	-1,00 ± 5,8	0,602
RT	71,86 ± 6,5	0,28 ± 3,0	0,28 ± 4,1	0,776	76,38 ± 6,2	4,79 ± 4,9	6,87 ± 7,0	0,013
-70 °C/RT	71,74 ± 4,7	0,15 ± 2,5	0,27 ± 3,7	0,853	75,91 ± 5,8	4,32 ± 2,9	6,04 ± 4,0	0,001



CpG9

Lagerzeit	T ₀	1 Monat			
Lagerbed.	M	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	46,86 ± 5,7	46,54 ± 5,9	-0,32 ± 1,9	-0,68 ± 4,4	0,607
-20 °C	46,86 ± 5,7	49,28 ± 5,8	2,41 ± 4,3	5,59 ± 10,0	0,110
KS	46,86 ± 5,7	54,63 ± 6,1	7,78 ± 3,5	17,0 ± 8,6	0,000
RT	46,86 ± 5,7	48,32 ± 6,7	1,46 ± 4,2	3,26 ± 9,1	0,304
-70 °C/RT	46,86 ± 5,7	48,51 ± 5,1	1,65 ± 4,0	4,08 ± 8,7	0,224

Lagerzeit	3 Monate				10 Monate			
Lagerbed.	M	Dif abs	Dif %	p	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	52,15 ± 6,2	5,29 ± 2,1	11,4 ± 4,7	0,000	59,06 ± 4,7	12,2 ± 2,8	26,8 ± 8,6	0,000
-20 °C	48,11 ± 6,7	1,25 ± 2,1	2,53 ± 4,3	0,096	57,42 ± 6,2	10,6 ± 2,8	22,9 ± 7,6	0,000
KS	50,14 ± 5,9	3,28 ± 2,8	7,24 ± 6,3	0,005	47,71 ± 6,9	0,85 ± 5,0	2,07 ± 10,6	0,603
RT	46,90 ± 7,9	0,04 ± 3,8	-0,23 ± 8,1	0,973	56,92 ± 7,1	10,1 ± 5,9	22,2 ± 13,9	0,000
-70 °C/ RT	48,53 ± 4,3	1,67 ± 2,3	4,03 ± 5,7	0,050	56,48 ± 7,5	9,63 ± 2,7	20,5 ± 4,6	0,000



CpG10

Lagerzeit	T ₀	1 Monat			
Lagerbed.	M	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	42,92 ± 7,2	42,50 ± 8,2	-0,42 ± 2,8	1,19 ± 6,7	0,651
-20 °C	42,92 ± 7,2	44,53 ± 6,8	1,61 ± 3,7	4,41 ± 9,6	0,205
KS	42,92 ± 7,2	47,43 ± 7,1	4,51 ± 3,3	11,1 ± 9,5	0,002
RT	42,92 ± 7,2	44,39 ± 6,5	1,47 ± 3,1	3,99 ± 7,1	0,170
-70 °C/RT	42,92 ± 7,2	4,26 ± 7,3	-0,67 ± 2,8	-1,36 ± 6,8	0,478

Lagerzeit	3 Monate				10 Monate			
Lagerbed.	M	Dif abs	Dif %	p	M	Dif abs	Dif %	p
-70 °C	46,31 ± 7,0	3,39 ± 2,8	8,33 ± 6,3	0,004	51,36 ± 6,7	8,44 ± 3,6	20,7 ± 11,2	0,000
-20 °C	44,06 ± 8,3	1,14 ± 3,3	2,61 ± 7,4	0,300	49,44 ± 6,3	6,52 ± 3,1	16,2 ± 9,0	0,000
KS	44,91 ± 7,3	4,99 ± 3,7	5,13 ± 9,8	0,119	44,05 ± 10,2	1,13 ± 7,2	2,84 ± 16,4	0,632
RT	41,77 ± 8,2	-0,15 ± 3,1	-0,48 ± 7,5	0,884	49,59 ± 6,3	6,66 ± 4,7	16,9 ± 13,7	0,002
-70 °C/RT	42,76 ± 6,5	-0,16 ± 2,5	0,04 ± 6,2	0,845	48,02 ± 9,1	5,10 ± 3,9	11,8 ± 9,0	0,003

