

Lehrstuhl für Experimentelle Genetik

**Methodische und klinische Untersuchungen zur
Pharmakogenetik der Psychopharmakotherapie
Assoziationen zwischen Effektivität und Sicherheit der Therapie
und Polymorphismen im dopaminergen und serotonergen
System, sowie in Strukturen des Arzneistoffwechsels und
-transportes**

Johannes Popp

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Alfons Gierl

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Martin Hrabé de Angelis
2. Priv.-Doz. Dr. Werner Steimer

Die Dissertation wurde am 14.03.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 07.06.2006 angenommen.

**Für
meine Eltern
und
Susanne**

1	Einleitung	8
1.1	Depression	9
1.1.1	Ätiopathogenese der Depression	9
1.1.2	Symptomatologie und Diagnose der Depression	9
1.1.3	Therapie der Depression und Antidepressiva	10
1.2	Schizophrenie	12
1.2.1	Ätiopathogenese der Schizophrenie	12
1.2.2	Symptomatologie und Diagnose der Schizophrenie	14
1.2.3	Therapie der Schizophrenie und Antipsychotika	15
1.3	Pharmakogenetik	18
1.4	Für die Variabilität einer Therapie mit Antidepressiva und Antipsychotika relevante Kandidaten-Gene und deren Polymorphismen	20
1.4.1	Der Serotonintransporter	20
1.4.1.1	HTTLPR Polymorphismus	20
1.4.1.2	HTT-VNTR Polymorphismus	20
1.4.2	Der HT _{2A} -Rezeptor	21
1.4.2.1	HT _{2A} -1438 G/A Polymorphismus	21
1.4.2.2	HT _{2A} His452Tyr Polymorphismus	21
1.4.3	Der HT _{2C} Cys23Ser Polymorphismus im HT _{2C} Rezeptor	22
1.4.4	Der Dopamin D2-Rezeptor	22
1.4.4.1	DRD2 -141C Ins/Del Polymorphismus	23
1.4.4.2	DRD2 Taq I Polymorphismus	23
1.4.4.3	DRD2 Ser311Cys Polymorphismus	23
1.4.5	Der Ser9Gly Polymorphismus im D3 Rezeptor	24
1.4.6	Der D4-Rezeptor	24
1.4.6.1	DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus	24
1.4.6.2	DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus	25
1.4.6.3	DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus	25
1.4.7	Die Cytochrome CYP1A2 und CYP2C19	25
1.4.7.1	CYP1A2*1F Polymorphismus	26
1.4.7.2	CYP2C19*2, *3 und *4 Polymorphismus	26
1.4.8	Der C3435T Polymorphismus im MDR1-Gen	27

1.5 Genotypisierungsmethoden	28
2 Ziele der Arbeit	29
3 Material und Methoden	30
3.1 Material.....	30
3.2 Methoden	32
3.2.1 Beschreibung der Studie.....	32
3.2.1.1 Studiendesign.....	32
3.2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	32
3.2.1.3 Datenerhebung.....	32
3.2.2 Statistik	34
3.2.3 Genotypisierung.....	35
3.2.3.1 DNA-Extraktion.....	36
3.2.3.2 Konventionelle PCR am Thermocycler	36
3.2.3.3 PCR am LightCycler.....	39
3.2.3.4 Enzymatischer Verdau	40
3.2.3.5 Gelelektrophorese	41
3.2.3.6 Sonden und Primer.....	42
3.2.3.7 Optimierung der PCR-Bedingungen.....	48
3.2.4 Die Genotypisierungsmethoden.....	49
3.2.4.1 Cytochrom 1A2*1F Polymorphismus	49
3.2.4.2 Cytochrom2C19 *2, *3 und *4 Polymorphismus.....	51
3.2.4.3 Cytochrom 2D6*9 Polymorphismus	55
3.2.4.4 DRD2 -141C Ins/Del Polymorphismus	56
3.2.4.5 DRD2 TaqI Polymorphismus.....	58
3.2.4.6 DRD2 Ser311Cys Polymorphismus	59
3.2.4.7 DRD3 Ser9Gly Polymorphismus	60
3.2.4.8 DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus	62
3.2.4.9 DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus	63
3.2.4.10 DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus	64
3.2.4.11 HT _{2A} -1438 G/A Polymorphismus	64
3.2.4.12 HT _{2A} His452Tyr Polymorphismus.....	65
3.2.4.13 HT _{2C} Cys23Ser Polymorphismus	66
3.2.4.14 HTTLPR Polymorphismus.....	68
3.2.4.15 HTT-VNTR Polymorphismus.....	68
3.2.4.16 MDR1 C3435T Polymorphismus.....	69

4	Ergebnisse	71
4.1	Methodik	71
4.1.1	Methodische Neuentwicklungen am LightCycler	71
4.1.1.1	Cytochrom 1A2*1F Polymorphismus	71
4.1.1.2	Cytochrom 2C19*2, *3 und *4 Polymorphismus	72
4.1.1.3	Cytochrom 2D6*9 Polymorphismus	75
4.1.1.4	DRD3 Ser9Gly Polymorphismus	76
4.1.1.5	Polymorphismen im HT _{2A} Rezeptor	77
4.1.1.6	MDR1 C3435T Polymorphismus	80
4.1.2	Optimierte und adaptierte Methoden am Thermocycler	81
4.1.2.1	Polymorphismen im DRD2	81
4.1.2.2	Polymorphismen im DRD4	83
4.1.2.3	HT _{2C} Cys23Ser Polymorphismus	86
4.1.2.4	Polymorphismen im HTT	87
4.2	Ergebnisse der statistischen Auswertung	90
4.2.1	Studienpopulation	90
4.2.2	Demographische Daten und Krankheitsmerkmale	90
4.2.3	Untersuchte Patientenpopulationen	91
4.2.4	Untersuchungen an Patienten mit depressiven Störungen	92
4.2.4.1	Aufenthaltsdauer und Genotyp	94
4.2.4.2	Ansprechen und Genotyp	95
4.2.4.3	Nebenwirkungen und Genotyp	96
4.2.5	Untersuchungen an Patienten die vorwiegend mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden	99
4.2.5.1	Ansprechen auf die Therapie mit HTT-blockierenden Antidepressiva und Genotyp	99
4.2.5.2	Nebenwirkungen unter der Therapie mit Antidepressiva, die den HTT blockieren und Genotyp	101
4.2.6	Untersuchungen an Patienten die mit Mirtazapin behandelt wurden	103
4.2.7	Untersuchungen an Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis	104
4.2.7.1	Aufenthaltsdauer und Genotyp	106
4.2.7.2	Ansprechen auf die Therapie und Genotyp	107
4.2.7.3	Nebenwirkungen und Genotyp	108
4.2.7.4	Extrapyramidalmotorische Nebenwirkungen und Genotyp	109

4.2.7.5	Gewichtszunahme und DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus bzw. HT _{2C} Cys23Ser Polymorphismus.....	110
4.2.8	Untersuchungen an Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis, die mit Olanzapin therapiert wurden	115
4.2.9	Polymorphismen in den Cytochromen CYP2C19 und CYP1A2 und Effektivität bzw. Sicherheit einer Therapie mit Antidepressiva und Antipsychotika	119
4.2.9.1	CYP1A2*1F Polymorphismus	120
4.2.9.2	CYP2C19 *2, *3 und *4 Polymorphismus.....	122
5	Diskussion	124
5.1	Diskussion der Methoden	124
5.1.1	Neuentwicklungen am LightCycler.....	125
5.1.2	Optimierte und adaptierte Methoden am Thermocycler.....	129
5.2	Diskussion der Studienergebnisse	132
5.2.1	Ergebnisse die eine Assoziation zwischen Genotyp und Nebenwirkungen oder Response zeigen	134
5.2.1.1	HTT-Polymorphismen und Nebenwirkungen unter der Therapie mit Antidepressiva	134
5.2.1.2	DRD4 48 bp Polymorphismus und Gewichtszunahme unter der Therapie mit Antipsychotika.....	137
5.2.1.3	DRD3 Ser9Gly Polymorphismus, HT _{2A} -1438 G/A Polymorphismus, MDR1 C3435T Polymorphismus und Olanzapin-Response	141
5.2.2	Ergebnisse die keine Assoziation zwischen Genotyp und Response oder Nebenwirkungen zeigen	145
5.2.2.1	Polymorphismen im serotonergen System und Ansprechen auf eine antidepressive Therapie	145
5.2.2.2	Polymorphismen im serotonergen und dopaminergen System und Ansprechen auf eine antipsychotische Therapie	149
5.2.2.3	Polymorphismen im serotonergen und dopaminergen System und Nebenwirkungen unter einer antipsychotischen Therapie	157
5.2.2.4	Polymorphismen im Cytochrom CYP1A2 und Cyp2C19 und Response bzw. Nebenwirkungen	161
5.2.3	Besonderheiten sowie Limitationen der Studie und Ausblick	164
6	Zusammenfassung	167
7	Abbildungsverzeichnis	171

8	Tabellenverzeichnis	172
9	Abkürzungsverzeichnis	175
10	Literaturverzeichnis	179
11	Publikationen und Kongressbeiträge im Zusammenhang mit dieser Arbeit	203
12	Danksagung.....	205
13	Anhang.....	206

1 Einleitung

Psychiatrische Erkrankungen wie die des depressiven und schizophränen Formenkreises sind schwerwiegende, häufig auftretende Erkrankungen, und tragen besonders in den Industrienationen wesentlich zur Gesamtmorbidität und -mortalität bei. So wird die Prävalenz schizophrener Psychosen mit einer Größenordnung von ca. 1 % angegeben (Freedman, 2003) und etwa 8-20 % der Gesamtbevölkerung erkranken im Laufe ihres Lebens an einer Depression (Lebenszeitprävalenz) (Möller et al., 1995). Nach Untersuchungen der WHO (Murray et al., 1997) nahm die schwere Depression (Major Depression) 1990 den 4. Rang unter den 15 Hauptursachen für „verlorene Lebensjahre durch schwerwiegende Behinderung oder Tod“ (Disability Adjusted Life Years, DALY) ein. Es wird prognostiziert, dass die Major Depression bis zum Jahr 2020 den 2. Rang nach der ischämischen Herzerkrankung in der DALY-Statistik einnehmen wird.

Neben zahlreichen anderen Therapieoptionen ist besonders die Psychopharmakotherapie ein Eckpfeiler in der Behandlung psychiatrischer Patienten. Obwohl es heutzutage eine große Auswahl an antidepressiv und antipsychotisch wirksamen Substanzen gibt, ist es schwierig, die für den Patienten geeignete Pharmakotherapie auszuwählen. Etwa 30-50 % aller Patienten mit schizophrenen oder depressiven Erkrankungen sprechen nicht oder nur ungenügend auf ihre primäre Behandlung an (Evans, 2003; Doris et al., 1999). Da es noch keine ausreichenden Vorhersagemöglichkeiten für das Ansprechen auf eine Psychopharmakotherapie gibt, können therapieresistente Patienten oft erst nach 6 Wochen identifiziert werden, da die Wirkung der eingesetzten Medikamente erst mit Verzögerung einsetzt (Doris et al., 1999; Herz et al., 1997). Die Behandlung solcher Patienten ist nicht nur sehr kostenintensiv, sondern verlängert auch deren Leiden. Andererseits gibt es auch zahlreiche Patienten die unter schweren Nebenwirkungen der Psychopharmakotherapie leiden. Von den etwa 2,2 Millionen Fällen schwerer Arzneimittelnebenwirkungen pro Jahr in den USA, die Kosten in Höhen von 4,3 Milliarden US \$ zur Folge haben, ist vermutlich ein nicht unerheblicher Teil auf die Psychopharmakotherapie zurückzuführen (Steimer, 2002a).

Das relativ junge Forschungsfeld der Pharmakogenetik beschäftigt sich mit dem Einfluss genetischer Variabilität auf die Pharmakotherapie. Es wird geschätzt, dass etwa 20 bis 95 % der Variabilität der Arzneimittelwirkungen, und -nebenwirkungen durch Variationen in den Genen verursacht wird (Kalow et al., 1998). Neue Genotypisierungsmethoden und die Zunahme der Erkenntnisse auf dem Gebiet der Pharmakogenetik könnten es in Zukunft realisierbar machen, nach Genotypisierung der Patienten vor ihrer initialen Therapie, die effektivsten Arzneimittel mit den geringsten Nebenwirkungen individuell auszuwählen. Eine solch individuelle Arzneimitteltherapie hätte nicht nur großen medizinischen Nutzen, sondern könnte auch zu erheblichen finanziellen Einsparungen führen (Steimer et al., 2002b).

1.1 Depression

1.1.1 Ätiopathogenese der Depression

Die Depression ist eine komplexe Erkrankung, deren Entstehung auch nach dem heutigen Erkenntnisstand nicht eindeutig erklärt werden kann. Man geht von einer multifaktoriellen Ätiopathogenese aus (Doris et al., 1999). Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien zeigen, dass depressive Erkrankungen familiär gehäuft auftreten, was auf eine genetisch bedingte Veranlagung hinweist (McGuffin et al., 1989). Bisher ist es in Kopplungs- und Assoziationsstudien allerdings nicht abschließend gelungen, ein oder mehrere Risikogene für die Depression zu finden (Doris et al., 1999). Auch neuroendokrinologische Abnormalitäten, wie erhöhte Cortisol-Spiegel, die toxische Effekte auf hippocampale Regionen ausüben (Dinan, 1994; Sapolsky et al., 1985) und Veränderungen der Schilddrüsenfunktion (Musselman et al., 1996) scheinen an der Ätiologie depressiver Erkrankungen beteiligt zu sein.

Die bekannteste und am besten untersuchte Theorie zur Entstehung einer Depression ist die Monoamin-Mangel-Hypothese (Schildkraut, 1965; Coppen, 1969). Depressive Erkrankungen sollen demnach vor allem mit einer Verminderung der Neurotransmitter Noradrenalin und Serotonin im ZNS zusammenhängen. Gestützt wird diese Hypothese vor allem durch den Wirkmechanismus antidepressiv wirkender Medikamente, die die Konzentration der Neurotransmitter Serotonin und Noradrenalin im synaptischen Spalt erhöhen (Schafer, 1999).

Die Monoamin-Mangel-Hypothese kann die Entstehung depressiver Erkrankungen jedoch nur teilweise erklären. So geht man heutzutage eher von einer Dysbalance verschiedener Neurotransmittersysteme (monoaminerge Systeme, GABAerges System, glutamaterges System) aus und auch sekundäre Signaltransduktionssysteme an denen u. a. G-Proteine (Wachtel, 1989) und Phosphoinositol (Pacheco et al., 1996) beteiligt sind, sind in das Interesse der Forschung gerückt. Diese Signaltransduktionssysteme stellen die intrazelluläre Kontaktstelle zu verschiedenen Rezeptoren dar und können über mehrere Schritte Transkriptionsfaktoren, wie z. B. CREB aktivieren (Nibuya et al., 1996). Sie beeinflussen somit die Bildung zahlreicher Proteine (z. B. neurotrophe Faktoren, BDNF), die für die Funktion von Nervenzellen von Bedeutung sind. Eine Störung in der Bildung dieser Proteine der zu einem Verlust der neuronalen Plastizität führen kann, wird als eine der möglichen Ursachen für die Entstehung einer Depression diskutiert (Vetulani et al., 2000).

1.1.2 Symptomatologie und Diagnose der Depression

Depressive Erkrankungen können in ihrem klinischen Bild sehr verschiedenartig sein. Als Leitsymptome werden depressive Verstimmung, Verlust von Interesse und Freude (Anhedonie), verminderter Antrieb sowie Ermüdbarkeit und Aktivitätseinschränkung angesehen.

Daneben äußert sich eine Depression oft in Zusatzsymptomen (verminderte Konzentration und Aufmerksamkeit, vermindertes Selbstwertgefühl und Selbstvertrauen, Schuldgefühle und Gefühl

der Wertlosigkeit, pessimistische Zukunftsperspektive, Suizidgedanken/-handlungen), weiteren charakteristischen Symptomen (Verlust des sexuellen Interesses, Gefühl der Gefühllosigkeit, Wahn, vor allem hinsichtlich eigener Schuld oder Versündigung), psychomotorischen Störungen (Agitiertheit, Getriebenheit, Stupor, Akinese) und somatischen Symptomen (Schlafstörungen mit frühmorgentlichem Erwachen, Appetitstörungen mit Gewichtsverlust, gastrointestinale Störungen, Herz-/ Kreislaufprobleme) (World Health Organisation, 1992, Möller et al., 1995: S. 68-83).

Das Ausmaß, die Dauer dieser und anderer Symptome kann dabei unterschiedlich ausgeprägt sein und anhaltend sein oder rezidivierend (> 2 Episoden) auftreten.

Leitsymptome der Manie dagegen sind inadäquat gehobene Stimmung, Antriebssteigerung, beschleunigtes Denken mit Ideenflucht und Selbstüberschätzung (Möller et al., 1995: S. 68-83).

In neuen Diagnosesystemen, wie der „international classification of disease“ (ICD)-10 Klassifikation der WHO, erfolgt die Klassifizierung einer depressiven Episode auf Basis der Symptomatik (mindestens 2 Leitsymptome, mindestens 2 Zusatzsymptome), dem Schweregrad der Erkrankung (Anzahl der Symptome, Alltagseinschränkung) und Zeitkriterien (Mindestdauer 2 Wochen) (World Health Organisation, 1992).

1.1.3 Therapie der Depression und Antidepressiva

Aufgrund der multifaktoriellen Ätiopathogenese affektiver Erkrankungen kommen bei der Behandlung meist Kombinationen aus psychotherapeutischen Verfahren, Soziotherapie und biologischen Therapien zum Einsatz. Zur letztgenannten Gruppe gehören Lichttherapie, Schlafentzug, Elektrokrampftherapie und als zentrale Behandlungsform die Psychopharmakotherapie.

Nach chemischer Struktur und Funktionsweise lassen sich Antidepressiva in verschiedene Klassen einteilen. Man unterscheidet hauptsächlich (modifiziert nach Forth et al., 2001; S. 347-50):

- Tri- und tetrazyklische Antidepressiva (TCA, z. B. Amitriptylin, Imipramin, Desipramin und Maprotilin)
- Monoaminoxidase-Hemmer (MAO-Hemmer, z. B. Tranylcypromin, Moclobemid)
- selektive Serotoninwiederaufnahmehemmer (SSRI, z. B. Fluoxetin, Citalopram)
- selektive Serotonin-Noradrenalin-Rückaufnahmehemmer (SSNRI, Venlafaxin)
- selektive Noradrenalin-Rückaufnahmehemmer (SNRI, z. B. Reboxetin)
- und α_2 -Adrenorezeptor-Antagonisten (z. B. Mirtazapin).

Initial hemmen TCAs die Wiederaufnahme von 5-HT und NA und führen zu einer Erhöhung der jeweiligen Neurotransmitter im synaptischen Spalt. Sie blockieren zusätzlich verschiedene Rezeptoren, wie histaminerge (H_1 -Rezeptoren), cholinerge, adrenerge (α_1 - und α_2 -Adrenorezeptoren) und serotonerge Rezeptoren (HT_{2A} -Rezeptoren). Durch die Blockade verschiedener postsynaptischer Rezeptoren sind typische Nebenwirkungen abzuleiten.

Tabelle 1: Nebenwirkungen durch Blockade verschiedener Rezeptoren (nach Benkert et al. 2000; S. 23)

Rezeptortyp	Möglicher klinischer Effekt bei Rezeptorantagonismus
Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	Akkomodationsstörungen, Mundtrockenheit, Obstipation, Sinustachykardie, Miktionsstörungen, Gedächtnisstörungen, Verwirrtheit, Delir
Histamin-1-Rezeptoren	Müdigkeit, Sedation, Gewichtszunahme, Verwirrtheit
5-HT ₂ -Rezeptoren	Gewichtszunahme, Anxiolyse, Sedation
Dopamin-Rezeptoren	Prolaktinerhöhung, Libidoverlust, EPS-Störungen
α ₁ -adrenerge-Rezeptoren	Orthostatische Hypotonie, Schwindel, Müdigkeit, reflektorische Tachykardie

Die sogenannten selektiven Substanzen hingegen haben keine oder eine vernachlässigbare Affinität zu diesen Rezeptoren, und blockieren somit selektiv die Wiederaufnahme von 5-HT und/oder NA. Durch erhöhte 5-HT- oder NA-Spiegel im synaptischen Spalt und der Wirkung auf die entsprechenden Rezeptoren, kann es unter diesen Antidepressiva vor allem zu serotonergen oder noradrenergen Nebenwirkungen kommen. Im Allgemeinen treten die Nebenwirkungen bevorzugt zu Beginn einer Therapie auf.

Tabelle 2: Typische Symptome bei der Hemmung der Rückaufnahme von 5-HT und NA (nach Benkert et al., 2000; S. 24)

Hemmung der Rückaufnahme	Typische klinische Symptome
5-HT	Appetitminderung, Übelkeit, Nausea, Kopfschmerzen, Schwitzen, Schlafstörungen, innere Unruhe, Agitiertheit, sexuelle Funktionsstörungen
NA	Tremor, Tachykardie, Unruhe, Kopfschmerzen

Das Antidepressivum Mirtazapin hingegen weist einen neuartigen Wirkmechanismus auf. Es stimuliert den sogenannten „cross talk“ zwischen NA- und 5-HT-Neuronen durch Blockade von α₂-Autorezeptoren auf präsynaptischen NA-Neuronen. Die dadurch erhöhte NA-Freisetzung führt zur verstärkten Stimulation postsynaptischer 5-HT-Neurone, die dadurch verstärkt 5-HT freisetzen (Van Praag et al., 1995).

Trotz der zum Teil sehr unterschiedlichen Angriffspunkte führt die Gabe von Antidepressiva somit akut zu einer Erhöhung der Neurotransmitter Noradrenalin und/oder Serotonin im synaptischen Spalt (Schildkraut, 1965; Coppen, 1969). Da jedoch die antidepressive Wirkung zeitverzögert erst einige Wochen nach Beginn einer Therapie mit Antidepressiva einsetzt, werden andere Prozesse als ursächlich für den antidepressiven Effekt diskutiert, wie adaptive Veränderungen auf der Ebene von Neurorezeptoren. Die akuten Effekte einer erhöhten extrazellulären 5-HT-Konzentration sollen nach längerer Anwendung zu einer Herabregulation von postsynaptischen β_2 -Rezeptoren (Banarjee et al., 1977) und Herabregulation präsynaptischer α_2 -Rezeptoren oder Heraufregulation postsynaptischer α_1 -Rezeptoren (Vetulani, 1984) führen. Eine Downregulation von 5-HT₂-Rezeptoren ist ebenfalls nach chronischer Gabe von Antidepressiva beobachtet worden (Eison et al., 1996).

Der verzögerte Wirkungseintritt bei SSRIs wird auch mit der kontinuierlich erhöhten extrazellulären 5-HT-Konzentration erklärt, die unter Langzeitanwendung zu einer Herabregulation von somatodentritischen (5-HT-freisetzungshemmenden) 5-HT_{1A}-Autorezeptoren und präsynaptischen 5-HT_{1D}-Autorezeptoren führt. Diese funktionelle Desensibilisierung bewirkt eine Reduktion der Feedbackhemmung und eine Entthemmung der serotonergen neuronalen Aktivität (Cowen, 2000; Gleiter et al., 1999).

Neuere Erkenntnisse lassen auch darauf schließen, dass für die Normalisierung neuronaler Systeme neben den Effekten an der Synapse und den Rezeptoren, besonders sekundäre Signaltransduktionsmechanismen, intrazelluläre Proteinphosphorylierung bis hin zur Beeinflussung der Genexpression eine fundamentale Rolle spielen. Über die Aktivierung einer second-messenger-Kaskade mit Phosphorylierung des CREB (cAMP responsive element binding protein) sollen Antidepressiva zu einer verstärkten Expression des brain derived neurotropic factor (BDNF), der für die Funktion, das Wachstum und die Regeneration serotonerger Neurone wichtig ist, im Gehirn führen. Somit können Antidepressiva einem durch Stress induzierten verringerten Wachstum oder einer Atrophie von Nervenzellen entgegenwirken (Altar, 1999). Die Zeitverzögerung des Wirkungseintritts von Antidepressiva ist ein starkes Indiz für deren Wirkung auf genomischer Ebene, jedoch muss diese Neurogenesehypothese gegenwärtig noch kritisch gesehen werden.

1.2 Schizophrenie

1.2.1 Ätiopathogenese der Schizophrenie

Unter dem Krankheitsbegriff der Schizophrenie werden vermutlich verschiedene ätiologisch heterogene Krankheiten zusammengefasst. Man geht heute, ebenso wie bei der Depression, von einer multifaktoriellen Ätiopathogenese aus. Die Evidenz einer genetischen Grundlage für die Entstehung der Schizophrenie basiert auf Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien. Die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen, die genetisch 100%ig gleich sind, liegt mit 50 % wesentlich höher als bei dizygoten Zwillingen (14 % Konkordanzrate) (McGuffin et al., 1995).

Adoptivstudien zeigen zudem, dass das Risiko, an Schizophrenie zu erkranken, bei Adoptierten, die von schizophrenen Eltern stammen, größer ist als für Adoptierte, die bei schizophrenen Eltern aufwachsen. Der genetische Anteil für die Empfänglichkeit für eine Schizophrenie wird gegenwärtig mit 63-85 % angegeben, wobei wahrscheinlich viele verschiedene Gene, oder ein Hauptgen kombiniert mit verschiedenen Hintergrundgenen, eine Rolle für die Suszeptibilität spielen (McGuffin et al., 1995).

Die bekannteste und am besten untersuchte neurochemische Hypothese für die Entstehung einer Schizophrenie ist die Dopaminhypothese. Sie postuliert eine Dysregulation in der dopaminergen Neurotransmission, mit gleichzeitig bestehender Unter- oder Überfunktion in einzelnen Hirnregionen. Danach wird die Plussympomatik der Schizophrenie einer mesolimbischen dopaminergen Hyperaktivität (erhöhte Dopaminspiegel selbst, erhöhte Anzahl an Dopaminrezeptoren) zugeschrieben (Owen et al., 1978), während eine dopaminerge Hypoaktivität im präfrontalen Cortex als Ursache für die Negativsymptomatik diskutiert wird (Lewis, et al., 2000; Leucht et al., 2005). Die Dopamin-Hypothese basiert vor allem auf dem Wirkungsmechanismus von Antipsychotika (Seeman et al., 1975) und der Tatsache, dass durch Amphetamine, die die Dopamintransmission erhöhen, schizophrene Symptome ausgelöst oder verstärkt werden können (Breier et al., 1997).

Die halluzinogene Wirkung von LSD (Lysergsäurediethylamid), die über die Wirkung auf 5-HT-Rezeptoren im ZNS erfolgt, stützt die Vermutung einer Beteiligung des serotonergen Systems an der Schizophrenie (Serotoninhypothese) (Glennon et al., 1984). Die Tatsache, dass viele atypische Antipsychotika eine hohe Affinität zu HT_{2A} -Rezeptoren haben, bestätigt dies (Kapur et al., 1996). Da Ritanserin, ein selektiver HT_{2A} -Rezeptor-Antagonist therapeutische Effekte auf die Negativsymptomatik einer Schizophrenie zeigte, wird besonders die Negativsymptomatik mit einer serotonergen Fehlfunktion in Verbindung gebracht (Burnet et al., 1996).

Die Auslösung psychotischer Symptome durch den NMDA-Rezeptor-Antagonisten Phencyclidin führten zu der Annahme, dass auch eine Dysregulation des exzitatorischen glutamatergen Systems im ZNS an der Entstehung der Schizophrenie beteiligt ist (Javitt et al., 1991). Eine glutamaterge Unterfunktion kann nicht nur zu einer Psychose führen und das dopaminerge System beeinflussen, sondern auch neurodegenerative Auswirkungen haben (Olney et al., 1995).

Der letztgenannte Punkt stimmt mit der Tatsache überein, dass ein Teil der Schizophrenen strukturelle Abnormalitäten im ZNS zeigt. So findet man vergrößerte Ventrikel (laterale Ventrikel, 3.Ventrikel) ein erniedrigtes Hirnrindenvolumen, Zellverkleinerungen oder abnorme Zellverbindungen vor allem im Temporallappen, Hippocampus, präfrontalen Cortex und anderen Bereichen des limbischen Systems (Harrison, 1999). Die strukturellen Abnormalitäten sind oft schon zu Beginn der Erkrankung vorhanden und sprechen für eine gestörte prä- oder perinatale neuronale Entwicklung. Es wird angenommen, dass die veränderten neuronalen Regelkreise instabil sind oder keine ausreichende Plastizität aufweisen und zu einem veränderten Reifungsprozess des ZNS in der Adoleszenz führen. Dies kann im Sinne einer erhöhten

Vulnerabilität zur Manifestation einer Schizophrenie prädisponieren.

Die vielfältige symptomatische, neuropathologische und ätiologische Befundlage der Schizophrenie erschwert insbesondere die Frage, inwieweit der Erkrankung eine gemeinsame Pathogenese zugrunde liegt oder ob alternativ unterschiedliche pathogenetische Mechanismen verantwortlich sind, die in einer gemeinsamen klinischen Phänomenologie münden.

1.2.2 Symptomatologie und Diagnose der Schizophrenie

Die Schizophrenie ist auch in ihrem Erscheinungsbild sehr heterogen. Nach klinischen und pharmakologischen Gesichtspunkten kann im Wesentlichen zwischen Plus- oder Positivsymptomen und Minus- oder Negativsymptomen unterschieden werden (Möller et al., 1995: S. 133-139).

Tabelle 3: Schizophrene Positiv- und Negativsymptomatik

Symptomatik	Beispiele
Positive Symptome	Wahn (optisch, akustisch, olfaktorisch, gustatorisch), Halluzinationen, bizarres, desorganisiertes Verhalten, Ich-Störungen (Gedankeneingebung, Gedankenentzug, Willensbeeinflussung, Teile des Körpers werden als fremd bzw. die Umwelt als andersartig empfunden), formale Denkstörungen, Katatonie
Negative Symptome	Sprachverarmung, Affektverarmung, Apathie, Anhedonie (Verlust der Lebensfreude), mangelnder Antrieb, Aufmerksamkeitsstörungen

Entgegen dem Verständnis von Laien, welche mit Schizophrenie meist Wahnvorstellungen und Halluzinationen in Verbindung bringen, beobachtet man diese zwar häufig, doch sind sie keineswegs obligat bei einem schizophrenen Patienten vorhanden (Möller et al., 1995: S. 133-139). Ein weiterer wichtiger Aspekt im Krankheitsbild, aber auch in der Behandlung der Schizophrenie, ist die mangelnde Krankheitseinsicht der Patienten.

Die Diagnose der Schizophrenie, sowie die Einordnung in die verschiedenen Subtypen, geschieht heute mittels moderner Diagnosesysteme, welche eine operationalisierte Symptomerfassung ermöglichen. Nach ICD-10 werden die Schizophrenie, schizotype und wahnhafte Störungen in verschiedene Subtypen unterteilt (World Health Organisation, 1992).

Um die Diagnose Schizophrenie nach Kriterien der ICD-10 stellen zu können, müssen eine Mindestanzahl von Symptomen aus zwei Symptomgruppen (mindestens ein Symptom aus der diagnostisch bedeutsameren Gruppe 1, wie Wahnphänomene, kommentierende Stimmen oder mindestens 2 Symptome aus der Gruppe 2, wie Halluzinationen, katatone oder negative Symptome) über einen bestimmten Zeitraum (mindestens einem Monat oder länger) deutlich vorhanden sein.

1.2.3 Therapie der Schizophrenie und Antipsychotika

Orientiert an der multifaktoriellen Ätiopathogenese der Schizophrenie werden psychotherapeutische, soziotherapeutische und psychopharmakologische Therapieansätze praktiziert. Besonders in der akuten Krankheitsphase steht die Psychopharmakotherapie mit Antipsychotika im Vordergrund.

Durch die Entwicklung von Chlorpromazin in den 1950er Jahren war erstmals eine effektive Therapie der Positivsymptomatik schizophrener Erkrankungen möglich. Chlorpromazin gehört neben anderen Substanzen wie Haloperidol zu den sogenannten typischen Antipsychotika. Antipsychotika der 2. Generation (z. B. Quetiapin, Olanzapin, Zotepin, Risperidon, Ziprasidon, Sulpirid, Amisulprid, Aripiprazol), deren Leitsubstanz Clozapin darstellt, rufen trotz antipsychotischer Wirkung im Vergleich zu typischen Antipsychotika keine oder kaum extrapyramidal-motorische Nebenwirkungen hervor. Weitere Charakteristika von atypischen Antipsychotika sind ihre bessere Wirksamkeit gegenüber den Negativsymptomen einer Schizophrenie und eine geringere Erhöhung der Prolaktinspiegel, und den damit verbundenen Nebenwirkungen (Reynolds, 1997, Leucht et al., 1999, Bridler et al., 2003). Für die pharmakologischen Wirkungen und die Nebenwirkungen von Antipsychotika spielen vor allem vier dopaminerge Systeme eine entscheidende Rolle (siehe Tabelle 4).

Für die Wirkung, aber auch die extrapyramidal-motorischen Nebenwirkungen und die Nebenwirkungen aufgrund einer Prolaktinerhöhung durch typische Antipsychotika wird ein Antagonismus an Dopamin D2-Rezeptoren (DRD2) postuliert (Seeman et al., 1975).

Die Ursachen für eine Atypizität von Antipsychotika sind bisher nicht vollständig geklärt, und werden in zahlreichen Hypothesen diskutiert.

So wird angenommen, dass womöglich die hohe Affinität von atypischen Neuroleptika zu HT_{2-} Rezeptoren und die relativ geringe Affinität zu den D2-Rezeptoren ursächlich für die Atypizität sein könnte (Meltzer et al., 1989). Über $5-HT_{2A}$ -Rezeptoren hemmt Serotonin die Freisetzung von Dopamin in A8 und A9-Neuronen, wogegen in den A10 Neuronen kaum Serotonin-Rezeptoren exprimiert sind. Durch Blockade von HT_{2A} -Rezeptoren im nigrostriatalen und tuberoinfundibulären System soll es unter Therapie mit atypischen Antipsychotika zu einer Aufhebung der Hemmung dopaminergischer Neurone durch Serotonin (Disinhibition) mit folglich weniger EPS und einem geringeren Prolaktinanstieg kommen.

Daneben wurden auch den zur D2-Rezeptor-Familie gehörenden D3- und D4-Rezeptoren eine besondere Bedeutung für die Wirkungsweise atypischer Antipsychotika zugeschrieben. Grundlage dafür war die hohe Affinität von Clozapin zum D4-Rezeptor (Seeman, 1992) und von Amisulprid zum D3-Rezeptor (Coukell et al., 1996) (siehe auch Tabelle 5). Es wird angenommen, dass ein hohes Verhältnis von D3/D2 bzw. D4/D2-Rezeptoraffinität einen wichtigen Faktor für eine gute antipsychotische Wirkung und eine niedrige Rate an EPS darstellt (Arndt et al., 1998).

Tabelle 4: Dopaminerge Systeme (nach Naber et al., 2002: S. 21)

	Nigrostriatales System	Mesolimbisches System	Mesocortikales System	Tuberoinfundibuläres System
Ursprung	Zona compacta der Substantia nigra (A9-Region)	Area ventralis tegmentalis (A10-Region)	Area ventralis tegmentalis (A10-Region)	Nucleus arcuatus des Hypothalamus (A8-Region)
Projektionsareale	Striatum, Globus pallidus	Nucleus accumbens, Mandelkern, Tuberkulum olfactorium	Cingulum, Cortex frontalis	Eminentia medialis
Physiologische Bedeutung	Regulation der unwillkürlichen und willkürlichen Motorik	Regulation von Affekt, Gedächtnis, Lernen	Regulation von Affekt, Gedächtnis, Lernen	Regulation der Prolaktin-Freisetzung
Überfunktion	Dyskinesien	Psychose (Positivsymptome)	Unterfunktion im frontalen Cortex: Psychose (Negativsymptome)	Erniedrigte Prolaktinspiegel
Blockade	Extrapyramidal-motorische Symptome	Antipsychotischer Effekt	Antipsychotischer Effekt auf Negativsymptomatik	Hyperprolaktinämie

Tabelle 5: Inhibitionskonstanten (K_i -Werte in nmol/l) von atypischen Antipsychotika und Haloperidol (nach Naber et al., 2002 S. 25)

Rezeptor	Clozapin	Zotepin	Risperidon	Olanzapin	Amisulprid	Quietapin	Ziprasdon	Haloperidol
D2	36	4,5	0,44	20	2,8	69	5	0,82
D3	160	3,1	14	16	3,2	340	7	9,6
D4	22	8,9	16	26	>1000	1600	32	2,5
5-HT _{2A}	4,0	0,83	0,39	2,5	>2000	20	0,4	28
5-HT _{2C}	5,0	0,3	6,6	29	>2000	440	1	1500
5-HT _{2A} /D2	0,11	0,18	0,88	0,12	>1000	1,18	0,12	34,1

Eine weitere wichtige Hypothese zur Erklärung der Atypizität von Antipsychotika (Hypothese der mesolimbischen Selektivität) leitet sich aus der Beobachtung ab, dass für Clozapin, Amisulprid und Sulpirid wiederholt eine dosisabhängige Blockade von D2-Rezeptoren in verschiedenen Gehirnarealen nachgewiesen wurde. So wurden D2-Rezeptoren im limbischen System schon in Dosierungen blockiert, die nur zu einer relativ geringen DRD2-Blockade im nigrostriatalen oder tuberoinfundibulären Arealen führen (mesolimbische Selektivität) (Arndt et al., 1998).

Eine andere Theorie postuliert wiederum, dass ausschließlich der DRD2-Antagonismus für den antipsychotischen Effekt verantwortlich ist, jedoch atypische Neuroleptika wesentlich schneller als typische vom D2-Rezeptor abdissoziieren (Hypothese der schnellen Dissoziation). Die Dauer der DRD2-Rezeptorblockade reicht zwar aus für eine antipsychotische Wirkung, verursacht allerdings keine unerwünschten Wirkungen wie EPS. Weiterhin kann der Neurotransmitter Dopamin bei atypischen Antipsychotika seine physiologischen Funktionen besser erfüllen (Kapur et al., 2001).

Aripiprazol, ein neues atypisches Antipsychotikum zeigt einen partiellen Antagonismus am D2-Rezeptor. Unter hyperdopaminergen Bedingungen (mesolimbisches System) wird die Wirkung des Dopamins abgeschwächt, während Aripiprazol bei Dopaminmangel (mesocortikales System) agonistische Wirkung am D2-Rezeptor zeigt und somit gut sowohl gegen Positiv- als auch Negativsymptomatik wirksam ist. Das Fehlen der Nebenwirkungen auf das nigrostriatale und tubero-infundibuläre dopaminerge System wird ebenso durch den partiellen Dopaminantagonismus erklärt (Green, 2004; Leucht et al., 2005).

Aus der variierenden Affinität der einzelnen Antipsychotika zu verschiedenen Rezeptoren ergeben sich nicht nur die oben genannten Wirkmechanismen, sondern auch unterschiedliche Nebenwirkungsprofile (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Antipsychotika

Rezeptorantagonismus	Unerwünschte Arzneimittelwirkung
Nigrostriatale D2-Rezeptoren	EPS (Frühdyskinesie, Spätdyskinesie, Parkinson-Syndrom, Akathisie), Malignes Neuroleptisches Syndrom
Tuberoinfundibuläre D2-Rezeptoren	Prolaktinerhöhung, Gynäkomastie, Amenorrhoe, Galaktorrhoe, sexuelle Dysfunktionen
5-HT _{2C} -Rezeptoren	Appetit- und Gewichtszunahme
H ₁ -Rezeptoren	Sedierung, Benommenheit, Erniedrigung der Krampfschwelle, Gewichtszunahme
α ₁ -Rezeptoren	Orthostase, Blutdruckabfall (auch durch Verstärkung der Wirkung von α ₁ -Blocker), Schwindel, Benommenheit, Reflextachykardie,
M ₁ -Rezeptor-Antagonismus	Mundtrockenheit, Akkomodationsstörungen, verschwommenes Sehen, Engwinkelglaukom, Obstipation, Harnretention, Miktionsstörungen, Sinustachykardie, pharmakogenes Delir

Werden D2-Rezeptoren im tuberoinfundibulären System blockiert, führt dies zu einer Hemmung der physiologischen Unterdrückung der Prolaktinsekretion, mit der Folge einer Hyperprolaktinämie und sexuellen und endokrinen Dysfunktionen (Gharidian et al., 1982). Die Blockade von D2-Rezeptoren im nigrostriatalen System führt hingegen zu EPS. Antagonistische Eigenschaften verschiedener Neuroleptika an muskarinergen, histaminergen und serotonergen Rezeptoren können Auslöser zusätzlicher unerwünschter Wirkungen sein. Die Blockade von H₁-Rezeptoren und besonders der antiserotonerge Effekt durch die Blockade des HT_{2C}-Rezeptors werden mit einer Gewichts- und Appetitzunahme in Verbindung gebracht. Unter der Behandlung mit Clozapin und Olanzapin wurden die stärksten Gewichtszunahmen, mit über 4 kg unter zehnwöchiger Therapie beobachtet (Bridler et al., 2003). Neben der potentiellen Gesundheitsgefährdung (z. B. kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität) stellt die Gewichtszunahme auch ein erhebliches Problem für die Bereitschaft des Patienten die therapeutischen Anweisungen zu befolgen dar.

1.3 Pharmakogenetik

Wie bereits oben erwähnt, untersucht das relativ junge Forschungsfeld der Pharmakogenetik den Einfluss genetischer Variabilität auf die Pharmakotherapie. Die vielfältigen Wechselwirkungen zwischen Arzneimitteln und dem Organismus können dabei im Wesentlichen in Pharmakokinetik und Pharmakodynamik aufgeteilt werden. Die Pharmakokinetik beschreibt den Einfluss des Organismus auf den Arzneistoff (Absorption, Verteilung, Verstoffwechslung und Ausscheidung), wogegen die Pharmakodynamik die Wirkungen des Arzneistoffs auf den Organismus beschreibt (Steimer, 2002a). Beide, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik, können durch genetische Variabilität beeinflusst werden, was wiederum auf die Arzneimittelwirkungen und –nebenwirkungen Einfluss hat (Abbildung 1).

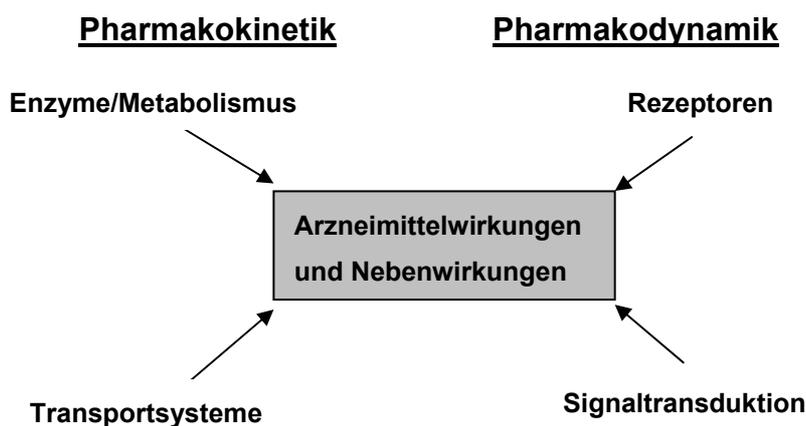


Abbildung 1: Genetische Beeinflussung der Pharmakotherapie (nach Steimer, 2002a)

Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts wurde ein genetischer Einfluss auf die Arzneimittelwirkung beobachtet (Evans et al., 1960). Das Wissen über die genetischen Ursachen der Variabilität von Arzneimittelwirkungen hat sich inzwischen in den letzten Jahrzehnten vervielfacht. Im Rahmen des Human Genom Projektes konnten bis zum Jahre 2000 mehr als 1,4 Millionen SNPs identifiziert werden, von denen sich etwa 60000 in Exons befinden (Sachidanandam et al., 2001). Als Polymorphismus wird dabei definitionsgemäß eine genetische Variation bezeichnet, die mit einer Häufigkeit von mindestens 1% in der Bevölkerung auftritt. Einige dieser Polymorphismen wurden in sogenannten Assoziationsstudien bereits hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf den Metabolismus und die Wirkung oder Nebenwirkungen von Arzneimitteln untersucht (Steimer et al., 2002a; Steimer et al., 2005b).

Dabei profitieren Assoziationsstudien von Erkenntnissen über die Veränderung des Gehirnstoffwechsels beim Erkrankten, oder von Erkenntnissen zu den pharmakologischen Wirkmechanismen der eingesetzten Medikamente, um Polymorphismen in geeigneten Strukturen zur Untersuchung auszuwählen (sogenannter Kandidaten-Gen-Ansatz) (Cargill et al., 2000).

Während in den Anfängen pharmakogenetischer Untersuchungen hauptsächlich der Arzneimittel-metabolismus (Pharmakokinetik) im Vordergrund stand, bedingt durch das Paradigma in der Pharmakologie, dass die Konzentration eines Arzneistoffes am Rezeptor für die Vermittlung der Wirkung aber auch der Nebenwirkungen verantwortlich ist (Preskorn et al., 1993), geraten mittlerweile auch zunehmend Neurotransmitter-Transporterproteine, Rezeptoren oder Signaltransduktionsmoleküle in das Zentrum des Interesses (Pharmakodynamik).

Offensichtlich liefern Mutationen in metabolisierenden Enzymen keine ausreichende Erklärung für das beobachtete Maß an Heterogenität bei der Psychopharmakotherapie. Es kommt in der Klinik immer wieder zu Fällen, in denen Patienten trotz Arzneimittel-Spiegel im therapeutischen Bereich nicht auf die Pharmakotherapie ansprechen. Die pharmakodynamische Variabilität ist häufig ausgeprägter als die beobachtete Variabilität der Pharmakokinetik (Levy et al., 1994). Besonders bei komplexen multigenetischen Krankheiten, wie Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis oder affektiven Erkrankungen scheint eine Kombination aus verschiedenen Polymorphismen in Strukturen der Pharmakokinetik und in Strukturen der Pharmakodynamik verantwortlich für das individuell unterschiedliche Ansprechen auf die Arzneimitteltherapie zu sein.

Antidepressiva und Antipsychotika entfalten vor allem ihre Wirkung aber auch ihre Nebenwirkungen über Zielstrukturen (Targets) im serotonergen bzw. dopaminergen System (siehe auch Kapitel 1.1.3 und 1.2.3). In bestimmten Genen dieser beiden Neurotransmitter-Systeme gibt es Polymorphismen, die die Funktionalität der entsprechenden Arzneimittel-Zielstrukturen verändern und damit die Effektivität und Sicherheit einer antidepressiven und antipsychotischen Therapie beeinflussen könnten.

Bestimmte Antidepressiva und Antipsychotika werden durch Cytochrome metabolisiert oder sind Substrate von Arzneimitteltransportern. Funktionelle Polymorphismen in Genen die für diese Strukturen codieren, könnten ebenso zu Unterschieden in der individuellen Wirksamkeit bzw. zu

Unterschieden in den auftretenden Nebenwirkungen unter einer antidepressiven oder antipsychotischen Pharmakotherapie beitragen.

Im folgenden Kapitel sind solche relevante Strukturen und deren Genpolymorphismen näher erläutert.

1.4 Für die Variabilität einer Therapie mit Antidepressiva und Antipsychotika relevante Kandidaten-Gene und deren Polymorphismen

1.4.1 Der Serotonintransporter

Der Serotonintransporter (HTT) ist auf der präsynaptischen Terminale serotonerger Neuronen lokalisiert und ist verantwortlich für die Natrium-abhängige Wiederaufnahme von Serotonin in die präsynaptische Nervenendigung, und damit für die Terminierung einer serotonergen Neurotransmission (Ogilvie et al., 1996). Der HTT ist Zielstruktur für zahlreiche Antidepressiva (z. B. SSRIs und TCAs). Das für den HTT codierende Gen liegt auf dem Chromosomen-Abschnitt 17q11.1-q12. Es erstreckt sich über etwa 31 Kilobasen und besteht aus 14 Exons. Das HTT-Gen weist zwei Polymorphismen auf, welche die Expression des HTT beeinflussen (Heils et al., 1996; Fiskerstrand et al., 1999, MacKenzie et al., 1999).

1.4.1.1 HTTLPR Polymorphismus

Der sogenannte HTTLPR Polymorphismus (LPR=Linked Polymorphic Region) entsteht durch die Deletion eines 44 bp langen GC-reichen DNA-Abschnittes im Promotor des HTT-Gens. Man unterscheidet das lange (l=long) Allel und das kurze (s=short) Allel. In-vitro-Studien zeigten, dass das lange Allel mit einer mehr als 2-fach erhöhten transkriptionellen Aktivität verknüpft ist, mit der Folge einer stärkeren Wiederaufnahme von Serotonin (Heils et al., 1996, Lesch et al., 1996).

1.4.1.2 HTT-VNTR Polymorphismus

Der HTT-VNTR Polymorphismus (VNTR=Variable Number of Tandem Repeats) liegt im Intron 2 des HTT-Gens. Er entsteht durch 9, 10 oder 12 Wiederholungen eines 16-17 bp langen DNA-Abschnittes (Ogilvie et al., 1996). In vitro Studien und Versuche an Mäuseembryonen zeigten eine erhöhte Expression bei Vorliegen der 12-fach Wiederholung, verglichen mit der 10-fach Wiederholung (Fiskerstrand et al.; 1999, MacKenzie et al., 1999). Es wird vermutet, dass der polymorphe Abschnitt Transkriptionsfaktoren bindet und auch das Expressionsmuster in den verschiedenen Geweben beeinflusst (Fiskerstrand et al., 1999; MacKenzie et al., 1999).

1.4.2 Der HT_{2A}-Rezeptor

Der HT_{2A}-Rezeptor ist ein postsynaptischer G-Protein gekoppelter Rezeptor mit 7 transmembranen Domänen (Erdmann et al., 1996). Das codierende Gen befindet sich auf dem Chromosomenabschnitt 13q14-q21 (Hsieh et al., 1990), besteht aus 3 Exons und erstreckt sich über etwa 20 Kilobasenpaare. Der HT_{2A}-Rezeptor ist für pharmakogenetische Studien zur Effektivität und Sicherheit von Antidepressiva interessant, da er zum einen durch bestimmte Antidepressiva unter Langzeittherapie desensibilisiert (herabreguliert) wird (Eison et al., 1996), zum anderen, weil durch Antidepressiva in seiner Konzentration erhöhtes Serotonin im synaptischen Spalt auch verstärkt auf den postsynaptischen HT_{2A}-Rezeptor wirken kann. Nach einem Tiermodell für Ängstlichkeit und Depression scheinen über den HT_{2A}-Rezeptor antidepressive Effekte vermittelt zu werden (Skrebuhhova et al., 1999). Zahlreiche Antipsychotika zeigen eine hohe Affinität zum HT_{2A}-Rezeptor (siehe auch Tabelle 5). Eine hohe HT_{2A}-Rezeptor-Affinität bei gleichzeitiger DRD2-Blockade wird als eine der Ursachen für die Atypizität eines Antipsychotikums und der damit verbundenen geringeren Gefahr von extrapyramidalmotorischen Symptomen und der verbesserten Wirkung auf die Negativsymptomatik diskutiert (Meltzer et al., 1989).

1.4.2.1 HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus

Der HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus liegt in der Promotorregion des HT_{2A}-Rezeptor-Gens und wird gemeinsam mit einem anderen Polymorphismus (HT_{2A} T102C Polymorphismus) vererbt (linkage disequilibrium; Kopplungsungleichgewicht) (Kouzmenko et al., 1999). Gemeinsam vererbt zu werden scheint das 102 T-Allel mit dem –1438 A-Allel, bzw. das 102 C-Allel mit dem –1438 G-Allel (Kouzmenko et al., 1999). Bisher gibt es kontroverse Ergebnisse zur Beeinflussung der Expression des HT_{2A}-Rezeptors durch den HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus. Spurlock et al. (1998) fanden in vitro keine Unterschiede der basalen Transkriptionsaktivität in HeLa Zellen und in der HT_{2A}-Rezeptor mRNA-Bildung zwischen G/G- und A/A-homozygoten Lymphozyten. In einer kleinen post mortem Studie konnte hingegen eine höhere HT_{2A}-Bindungskapazität in präfrontalen Hirnarealen bei Probanden mit dem A-Allel festgestellt werden (Tureki et al., 1999). Die Ergebnisse einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung stimmen mit denen aus der post mortem Studie überein. In Gegenwart eines Enhancers war die Promotor-Aktivität bei Vorhandensein des A-Allels signifikant höher als bei Vorhandensein des G-Allels (Parsons et al., 2004). Die funktionellen Unterschiede könnten sich auch auf die Therapie mit Antidepressiva und Antipsychotika auswirken.

1.4.2.2 HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus

Der HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus wurde erstmals von Erdmann et al. (1996) beschrieben. Er entsteht durch eine Substitution der Base Cytosin durch Thymin an Position 1354 des HT_{2A}-Rezeptorgens. Als Folge kommt es zum Austausch der Aminosäure Histidin durch Tyrosin im intrazellulären C-terminalen Bereich des Rezeptorproteins. Da hierbei eine basische Aminosäure durch eine neutrale ausgetauscht wird, könnte dies möglicherweise zu einer Änderung der

Tertiärstruktur des Rezeptors und damit zu Funktionsveränderungen führen (Erdmann et al., 1996). Eine Beeinflussung der Signaltransduktion durch den Polymorphismus konnte von (Hazelwood et al. 2004) gezeigt werden. Dem entsprechend beschrieben Ozaki et al. (1997) eine geringere intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung bei Vorliegen der Tyr-Rezeptor-Variante. Damit ist eine Auswirkung auf die pharmakologische Wirkung und die Nebenwirkungen von Antidepressiva und Antipsychotika möglich.

1.4.3 Der HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus im HT_{2C} Rezeptor

Wie der HT_{2A}-Rezeptor ist auch der HT_{2C}-Rezeptor ein postsynaptisch lokalisierter G-Protein gekoppelter Rezeptor (Kaufmann et al., 1995). Das Gen für den menschlichen HT_{2C}-Rezeptor befindet sich auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq24) (Lappalainen et al., 1995). Lappalainen et al. (1995) beschrieben erstmals den HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus, der durch den Austausch der Aminosäure Cystein durch Serin an Position 23 des Rezeptorproteins gekennzeichnet ist. Der Aminosäureaustausch wird verursacht durch eine Substitution der Base Guanin durch Cytosin an Position 68 der codierenden Sequenz (Codon TGT wird zu TCT). Lappalainen et al. (1995) konnten in vitro (Expression der Rezeptorvarianten in Xenopus Oozyten) keine funktionellen Unterschiede zwischen den Rezeptorvarianten feststellen. Da der Aminosäureaustausch im N-terminalen extrazellulären Bereich des Rezeptorproteins liegt, kann er jedoch möglicherweise zu funktionellen Veränderungen des Rezeptors führen. So konnten Okada et al. (2004) eine reduzierte Bindungsaffinität zu meta-Chlorphenylpiperazin (m-CPP) und Serotonin bei Vorliegen des Ser-Allels in einer Radioligandenuntersuchung zeigen. Wie bedeutsam die funktionellen Veränderungen im Rezeptorprotein in vivo sind kann abschließend noch nicht gesagt werden. Da besonders atypische Antipsychotika, wie Clozapin eine hohe Affinität zum HT_{2C}-Rezeptor haben (siehe Tabelle 5), scheint eine Auswirkung des Polymorphismus auf die pharmakologische Wirkung und die Nebenwirkungen dieser Arzneistoffe möglich.

1.4.4 Der Dopamin D2-Rezeptor

Der D2-Rezeptor gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und zusammen mit dem DRD3 und DRD4 zu den sogenannten D2-ähnlichen (D2-like) Rezeptoren. Das Gen des Dopamin D2-Rezeptors liegt auf dem menschlichen Chromosom 11 (11q22-q23) (Grandy et al., 1989). Er kommt innerhalb des ZNS im nigrostriatalen System, in limbischen Regionen, dem frontalen Kortex und auch im tuberoinfundibulären System vor (siehe auch Tabelle 4). Er scheint eine Schlüsselrolle in der dopaminergen Neurotransmission zu spielen. Besonders typische Antipsychotika haben eine hohe Affinität zum DRD2 und die antipsychotische Potenz dieser Substanzen korreliert mit der DRD2-Affinität (Seeman et al., 1975).

1.4.4.1 DRD2 -141C Ins/Del Polymorphismus

Der DRD2 -141C Ins/Del Polymorphismus wurde erstmals von Arinami et al. (1997) beschrieben und liegt in der Promotor-Region des D2-Rezeptor-Gens. Das mutierte Allel weist eine Deletion eines Cytosin-Nukleotids innerhalb einer zweifachen Cytosin-Nukleotid-Wiederholung auf (Arinami et al. 1997). Der Polymorphismus scheint die Expression des D2-Rezeptors zu beeinflussen, wobei nach in vitro Experimenten das C Del-Allel zu einer verminderten Expression führt (Arinami et al., 1997). In vivo konnte dem entsprechend bei Probanden ohne Del-Allel eine geringere DRD2-Dichte in bestimmten Hirnarealen nachgewiesen werden (Jönsson et al., 1999). Der funktionelle Polymorphismus könnte somit Einfluss auf die DRD2-Blockade durch antipsychotische Arzneistoffe haben.

1.4.4.2 DRD2 Taq I Polymorphismus

Der DRD2 Taq I Polymorphismus liegt ungefähr 10 kbp entfernt vom 3'-Ende des letzten Exons des DRD2-Gens (Grandy et al., 1989). Der Polymorphismus schafft eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Taq I. Bei Vorliegen des selteneren sogenannten A1-Allels wird die DNA geschnitten. In der Literatur gibt es Hinweise, dass der DRD2 Taq I Polymorphismus einen Einfluss auf die dopaminerge Aktivität hat. In vivo Studien zeigten eine signifikante Abnahme der D2-Rezeptor-Bindungskapazität im Positronen-Emissions-Tomogramm bei Patienten mit dem A1-Allel (Pohjalainen et al., 1998). Postmortem Studien zeigten übereinstimmend eine geringere DRD2-Dichte in bestimmten Hirnarealen (Nucleus caudatus, Striatum) von Trägern des A1-Allels (Noble, 1998). Wie der DRD2 Taq I Polymorphismus die Expression beeinflusst, ist gegenwärtig unklar. Eventuell wird er mit einem anderen die Expression beeinflussenden Polymorphismus gemeinsam vererbt (Kopplungsungleichgewicht).

1.4.4.3 DRD2 Ser311Cys Polymorphismus

Der DRD2 Ser311Cys Polymorphismus ist durch den Austausch der Aminosäure Serin durch Cystein an Position 311 im Rezeptorprotein gekennzeichnet (Itokawa et al., 1993). Dem zugrunde liegt ein Basenaustausch, bei dem die Base Cytosin durch Guanin ersetzt und damit das Codon 311 von Serin (TCC) nach Glycin (TGC) umcodiert wird. Der Austausch der Aminosäure liegt in der dritten intrazellulären Schleife und kann eventuell zu funktionellen Veränderungen führen, da dieser Bereich wichtig für die G-Protein-Kopplung ist (Itokawa et al., 1993). Der Austausch von Serin durch Cystein kann möglicherweise zur Ausbildung von neuen Disulfidbrücken führen und somit die Struktur der dritten intrazellulären Schleife verändern. In in vitro Versuchen an CHO-Zellen konnten Unterschiede in der Inhibition der cAMP-Synthese bei den beiden Rezeptorvarianten gezeigt werden (Cravchik, et al., 1996).

1.4.5 Der Ser9Gly Polymorphismus im D3 Rezeptor

Das DRD3 Gen ist auf dem Chromosom 3 (3q13.3) lokalisiert. Es enthält im Exon 1 einen Austausch der Base Adenin durch Guanin, der wiederum zum Austausch der Aminosäure Glycin durch Serin in der N-terminalen extrazellulären Region des DRD3-Proteins führt (Lannfelt et al., 1992). Es gibt Hinweise aus Rezeptor-Bindungsstudien, unter Verwendung des Semiliki Forest Virus Systems, dass die Bindungsaffinität von Dopamin bei der Glycin-Rezeptorvariante höher ist (Gly/Gly > Gly/Ser = Ser/Ser) bzw. der D3-Rezeptor-selektive Ligand GR99841 eine signifikant niedrigere Affinität für die Ser-Variante hat (Ser/Ser > Ser/Gly und Gly/Gly) (Lundstrom et al., 1996). Polymorphismen im DRD3-Gen sind für pharmakogenetische Studien besonders interessant, da der DRD3 hauptsächlich im limbischen System exprimiert wird und dort eine Blockade von Dopaminrezeptoren mit einer antipsychotischen Wirkung in Verbindung gebracht wird (siehe Tabelle 4). Sowohl typische als auch atypische Antipsychotika blockieren den DRD3 (Schwarz et al., 2000). Im Gegensatz zu typischen Antipsychotika wie Haloperidol, scheinen atypische Antipsychotika jedoch eine besonders hohe Affinität zu präfrontalen DRD3 Rezeptoren zu haben (Kovacs et al., 2001). Die Expression des DRD3 im limbischen System kann durch Antipsychotika beeinflusst werden (Buckland et al., 1993).

1.4.6 Der D4-Rezeptor

Das DRD4-Gen ist auf dem Chromosom 11 (11p15.5) lokalisiert und enthält vier Exons und 3 Introns (Van Tol et al., 1991). Der D4-Rezeptor ist für pharmakogenetische Studien von besonderem Interesse, da er in hoher Dichte vor allem im mesolimbischen und mesokortikalen System, den Zielstrukturen für eine antipsychotische Wirkung (siehe Tabelle 4), vorkommt (Catalano et al., 1993). Er ist dagegen nur in geringer Dichte im nigrostriatalen System anzutreffen, in dem eine Dopaminrezeptorblockade vor allem mit der Entstehung von extrapyramidal-motorischen Symptomen in Verbindung gebracht wird (Sanyal et al., 1997; Iversen, 1992). Clozapin, das vor allem bei der Behandlung therapieresistenter Schizophrenien anderen Antipsychotika überlegen ist, hat eine besonders hohe D4-Rezeptor-Affinität, die etwa 10-fach höher ist als zum DRD2 und DRD3 (Van Tol et al., 1991).

1.4.6.1 DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus

Catalano et al. (1993) identifizierten erstmals diesen Polymorphismus im ersten Exon des D4-Rezeptorgens, der durch eine Wiederholung von 12 Basenpaaren gekennzeichnet ist. Die 12 wiederholten Basenpaare codieren für jeweils 4 Aminosäuren (AlaSerAlaGly) im extrazellulären N-terminalen Teil des Rezeptorproteins, der an die erste Transmembrandomäne grenzt (Catalano et al. 1993). Der Polymorphismus entsteht durch die 2-fache Wiederholung der 12 Basenpaare in der häufigeren Allelvariante A1 und dem einfachen Vorkommen der 12 Basenpaare in der seltener vorkommenden Allelvariante A2. Computergestützte Auswertungen ergaben keine Veränderung

der Hydrophobie/Hydrophilie des Proteins und keine Veränderungen in Bereichen, die für die Funktion des Rezeptors entscheidend sind (z. B. G-Protein-Bindungsstelle). Genaue Auswirkungen des Polymorphismus auf die Funktionalität in vivo sind bisher noch nicht bekannt.

1.4.6.2 DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus

Der DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus liegt im Exon 1 des menschlichen D4-Rezeptorgens und verursacht eine Leserasterverschiebung, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon führt (Nöthen et al., 1994). Die Folge ist ein verkürztes, funktionsloses Protein. Bei Homozygotie wird kein funktionsfähiger D4-Rezeptor ausgebildet. Diese Mutation ist die erste Null-Mutation (Nonsense-Mutation), die in einem humanen Dopaminrezeptor-Gen gefunden wurde (Nöthen et al., 1994).

1.4.6.3 DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus

1992 beschrieben Van Tol et al. (1992) einen Polymorphismus der sich aus einer mehrfachen Wiederholung eines Abschnitts von 48 bp im dritten Exon des D4-Rezeptorgens ergibt. Der 48 bp lange Genabschnitt codiert für 16 Aminosäuren in der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptorproteins. Es ist bekannt, dass die Länge der dritten intrazellulären Schleife die G-Proteinbindung beeinflussen kann. Van Tol et al. (1992) zeigten im Rahmen einer in vitro Untersuchung, dass der D4.7-Rezeptor (7-fache Wiederholung) für Clozapin und Spiperon weniger sensitiv ist, als die kürzeren Formen D4.4 und D4.2. In einer weiteren in vitro Studie konnte jedoch zwischen den einzelnen polymorphen Varianten des D4-Rezeptors nur ein geringer Unterschied der Bindung verschiedener Liganden festgestellt werden (Ashigari et al., 1994). Die am häufigsten vorkommenden humanen D4-Rezeptorformen in der kaukasischen Bevölkerung sind der D4.4-Rezeptor, gefolgt vom D4.7-Rezeptor und dem D4.2-Rezeptor (Sanyal et al., 1997).

1.4.7 Die Cytochrome CYP1A2 und CYP2C19

Das Cytochrom (CYP) P450 Enzymsystem spielt eine zentrale Rolle im oxidativen Phase-I-Metabolismus zahlreicher Antidepressiva und Antipsychotika (siehe Tabelle 7).

Eine Vielzahl von Polymorphismen in verschiedenen Cytochromen sind bisher beschrieben worden (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles>). Etliche Polymorphismen, wie z. B. die unten beschriebenen im CYP1A2 und CYP2C19, haben eine Auswirkung auf die Aktivität oder Struktur des entsprechenden Enzyms und können somit potentiell die Pharmakotherapie beeinflussen.

Tabelle 7: Substrate des CYP1A2 und CYP2C19

Substrate des CYP1A2	Substrate des CYP2C19
Amitriptylin	Amitriptylin
Koffein	(Es)Citalopram
Clomipramin	Clomipramin
Clozapin	Clozapin
Fluvoxamin	Moclobemid
Haloperidol	Fluoxetin
Imipramin	Imipramin
Mirtazapin	Sertralin
Olanzapin	Doxepin
Zotepin	S-Mephenytoin

Modifiziert nach www.medicine.iupui.edu/flockhart/Flockhart DA: Cytochrome P450 drug interaction table;

1.4.7.1 CYP1A2*1F Polymorphismus

Das Cytochrom CYP1A2 ist sowohl am oxidativen Abbau zahlreicher Psychopharmaka und von Koffein, als auch an der Aktivierung bestimmter Kanzerogene (aromatische und heterozyklische Amine) beteiligt (Butler et al., 1989). Die Expression des CYP1A2, das hauptsächlich in der Leber vorkommt, ist durch eine Reihe von Nahrungsbestandteilen und vor allem durch Bestandteile des Tabakrauchs (z. B. Nikotin, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine) induzierbar (Kalow et al., 1991).

Ein kürzlich entdeckter Polymorphismus, der sogenannte CYP1A2*1F Polymorphismus, scheint die Induzierbarkeit des Cytochroms zu beeinflussen (Nakajima et al., 1999). Es handelt sich dabei um eine Substitution der Base Cytosin durch Adenin 734 bp strangabwärts vom ersten transkribierten Nukleotid, im Intron 1 des CYP1A2-Gens. Es wird angenommen, dass dieser Polymorphismus die Bindung bestimmter regulatorischer Proteine beeinflusst, oder, dass der Polymorphismus gemeinsam mit einem bisher noch unbekanntem Polymorphismus vererbt wird (Kopplungsungleichgewicht), der seinerseits die Induzierbarkeit beeinflusst. Der A/A-Genotyp stellt dabei den hoch-induzierbaren Genotyp dar (Sachse et al., 1999).

1.4.7.2 CYP2C19*2, *3 und *4 Polymorphismus

Auch das Cytochrom CYP2C19 ist an der Metabolisierung zahlreicher Psychopharmaka beteiligt (siehe Tabelle 7). Das CYP2C19 wird als S-Mephenytoin-Hydroxylase bezeichnet, da es das S-Enantiomer von Mephenytoin verstoffwechselt. Das CYP2C19-Gen liegt auf dem menschlichen Chromosom 10 und weist mehrere Polymorphismen auf, die die Funktion des Enzyms beeinträchtigen. Es gibt deutliche Unterschiede in der Häufigkeit der Polymorphismen in verschiedenen Bevölkerungsgruppen. Die Inzidenz sogenannter „poor metabolizer“ (PM), Personen, die nur eine

geringe CYP2C19-Stoffwechselaktivität aufweisen, ist in der orientalischen Bevölkerung mit 13-23 % höher als in der kaukasischen (2-5 % PM). Durch den *2 und *3 Polymorphismus können etwa 87 % der defekten Allele in der kaukasischen Bevölkerung und mehr als 99 % der defekten Allele in der asiatischen Bevölkerung identifiziert werden. Zusätzlich ist in der kaukasischen Bevölkerung das *4-Allel zu etwa 3 % für defekte Allele verantwortlich (Ibeanu et al., 1999; Ferguson et al., 1998). Bei der dem *2-Polymorphismus zugrunde liegenden Mutation, handelt es sich um einen Guanin durch Adenin Basenaustausch im Exon 5 des CYP2C19 Gens. Durch die Mutation entsteht eine veränderte Splice Stelle, wodurch das Leseraster verschoben wird. Dadurch bedingt entsteht ein vorzeitiger Stopcodon mit dem Ergebnis eines verkürzten und nicht funktionsfähigen Proteins (De Morais et al., 1994a). Der CYP2C19*3 Polymorphismus ist durch einen Guanin durch Adenin Basenaustausch im Exon 4 des CYP2C19 Gens gekennzeichnet. Die Folge ist hier ebenfalls ein vorzeitiger Stopcodon im Gen, der zu einem verkürzten und inaktiven Protein führt (De Morais et al., 1994b). Der CYP2C19*4 Polymorphismus wurde erstmals von Ferguson et al. (1998) beschrieben und ist gekennzeichnet durch einen Adenin durch Guanin Basenaustausch des 1. Nukleotids im Exon 1. Dies bedeutet eine Umänderung des Initiationscodons ATG in GTG und führt dazu, dass keine Proteinexpression stattfindet (Ferguson et al., 1998).

1.4.8 Der C3435T Polymorphismus im MDR1-Gen

Das P-Glykoprotein gehört zur Familie der sogenannten „ATP-Binding Cassette“ (ABC)-Transportern und ist ein Produkt des sogenannten MDR1-Gens (Multi Drug Resistance). Das MDR1-Gen erstreckt sich über etwa 7,8 kb und enthält 7 Exons. Das P-Glykoprotein ist ein 1280 Aminosäuren langes glykosyliertes Transmembranprotein und kann bestimmte Stoffe durch einen energiereichen gerichteten Transport über die Zellmembran aus der Zelle heraustransportieren (Hoffmeyer et al., 2000). Damit schützt sich die Zelle vor toxischen Substanzen, kann aber auch zahlreiche Arzneistoffe transportieren. Bisher sind noch keine genauen Struktureigenschaften bekannt, die als Voraussetzung für ein Substrat des P-Glykoproteins gelten. Einige Antidepressiva wie Citalopram, Trimipramin (Uhr et al., 2003), Metaboliten von Amitriptylin (Grauer et al., 2004), und Antipsychotika wie Olanzapin (Wang et al., 2004) gehören zu den Substraten des P-Glykoproteins. Das in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke vorkommende P-Glykoprotein kontrolliert den aktiven Rücktransport bestimmter Stoffe aus dem Zentralnervensystem in das Blut. Dem entsprechend kann die Menge des synthetisierten P-Glykoproteins, abhängig von der Expression, auch die Wirkung von Psychopharmaka an ihrem Wirkort im ZNS beeinflussen.

Hoffmeyer et al. (2000) beschrieben im Exon 26 des MDR1-Gens einen Cytosin durch Thymin Basenaustausch, der die Expression beeinflusst. Homozygote Träger des T-Allels zeigten die signifikant niedrigste Expression des P-Glykoproteins, homozygote für das C-Allel dem entsprechend die höchste P-Glykoprotein-Expression. Eine Beeinflussung der Arzneistoffkonzentration von Substraten des P-Glykoproteins, wie z. B. Olanzapin (Wang et al., 2004), durch

diesen Polymorphismus und damit eine Beeinflussung der Therapie mit diesen Arzneistoffen ist denkbar.

1.5 Genotypisierungsmethoden

Der starke Zuwachs an Erkenntnissen auf dem Gebiet der Pharmakogenetik erfordert Genotypisierungstechniken, die zeitsparend sind und mit denen eine hohe Anzahl von Polymorphismen untersucht werden können. Klassische Methoden wie RFLP-Analyse (Parsons et al. 1997), PCR mit allelspezifischen Primern (Newton et al., 1989), und andere auf Gelelektrophorese basierende Detektionsmethoden sind sehr zeitaufwändige Techniken, jedoch günstig in der Anschaffung und den Materialkosten. Sie haben damit ihre Berechtigung für die Detektion eines, oder weniger Polymorphismen, für eine überschaubare Anzahl von Proben. Solche Methoden sind noch häufig Standard in Forschungslabors. Entwicklungen der letzten Jahre ermöglichen es nun, eine große Anzahl von Polymorphismen in relativ kurzer Zeit zu untersuchen. Genotypisierungsmethoden die mit Fluoreszenzfarbstoffen arbeiten, wie der TaqMan Assay (Holland et al., 1991), Methoden mit sogenannten Molecular Beacons (Tyagi et al., 1996), der Invader Assay (Lyamichev et al., 1999) oder die Real-Time-PCR am LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim), die unter anderem in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde, haben eine geringere Kontaminationsgefahr, da PCR und Alledifferenzierung im gleichen Ansatz ablaufen, sind meist sensitiver als herkömmliche Methoden, sehr schnell in der Durchführung und weniger zeitintensiv in ihrer Vorbereitung. Solche Methoden eignen sich gut für den Einsatz in größeren epidemiologischen Studien und sind auch in der Routinediagnostik einsetzbar, wo oft die schnelle Verfügbarkeit der Ergebnisse notwendig ist. Neueste Entwicklung auf dem Gebiet der Genotypisierungstechniken sind verschiedene, auf Gen-Chips basierende Methoden (McGall et al., 2002; Gabig et al., 2001), und Genotypisierungsmethoden die mittels Massenspektrometrie detektieren (Fei et al., 2000). Solche Methoden eignen sich hervorragend zur Genom-weiten Analyse von zahlreichen Polymorphismen in einer großen Probandenpopulation. Der erste kommerziell erhältliche Hochdurchsatzroboter von der Firma GAG BioScience GmbH ermöglicht mit seiner auf Massenspektrometrie basierenden vollautomatisierten Analysetechnik bis zu 60000 Genotypisierungen pro Tag (www.gag-bioscience.de/robotik.html). Auf dem Markt befindet sich auch bereits der erste kommerzielle Gen-Chip, der Amplichip der Firma Roche Diagnostics, mit dem die 34 wichtigsten Mutationen in den Genen der Cytochrome 2D6 und 2C19 simultan getestet werden können. Die Testergebnisse sind innerhalb eines Tages verfügbar (www.roche.de/diagnostics/labor/amplichip_cyp450.htm).

2 Ziele der Arbeit

Es gilt heute als gesichert, dass angeborene genetische Variationen im Allgemeinen erheblich zu den interindividuellen Unterschieden in der Arzneimittelwirksamkeit und im Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen beitragen. Dies gilt im Besonderen auch für die Therapie mit Antidepressiva und Antipsychotika.

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war, zu untersuchen, ob eine Assoziation zwischen einer Reihe von Polymorphismen in speziellen Kandidaten-Genen und der Effektivität oder der Sicherheit einer antipsychotischen bzw. antidepressiven Pharmakotherapie besteht. Folgende Polymorphismen waren Bestandteil dieser Untersuchung:

- HTTLPR Polymorphismus
- HTT-VNTR Polymorphismus
- HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus
- HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus
- HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus
- DRD2 -141C ins/del Polymorphismus
- DRD2 Taq I Polymorphismus
- DRD2 Ser311Cys Polymorphismus
- DRD3 Ser9Gly Polymorphismus
- DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus
- DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus
- DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus
- CYP1A2*1F Polymorphismus
- CYP2C19*2, *3, *4 Polymorphismus
- MDR1 C3435T Polymorphismus

Dazu wurde eine im Bezug auf den Genotyp doppelblind angelegte, prospektive Diagnostikstudie durchgeführt. Alle Patienten deren Erkrankungen eine Therapie mit Antidepressiva und Antipsychotika erfordert und die bestimmte Einschlusskriterien erfüllten, wurden in die Untersuchung eingeschlossen und hinsichtlich der oben genannten Polymorphismen genotypisiert.

Das zweite zentrale Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung neuer Methoden bzw. die Optimierung bereits publizierter Methoden zum Nachweis der oben genannten Polymorphismen. Da im Falle des Einsatzes einer prätherapeutischen Genotypisierung in der klinischen Praxis eine schnelle pharmakologische Intervention gewährleistet sein muss, sollten insbesondere schnelle, effiziente und verlässliche, auf Fluoreszenz basierende PCR-Methoden am LightCycler entwickelt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 8: Reagenzien

Aqua Spüllösung DeltaSelect	Delta Select GmbH, Pfullingen
Bovine Serum Albumine (für PCR) 20 mg/ml	Roche, Mannheim
Bovine Serum Albumine (für enzymat. Verdau) 10mg/ml	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
50bp, 100 bp DNA Ladder	Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein, Germany
dNTP-Mix	PeqLab, Erlangen
Ethidiumbromid, 1 %-ige Lösung in Wasser	Merck, Darmstadt
Gel Loading Solution, Type 1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MetaPhor Agarose	FMC BioProducts, Rockland, USA
MgCl ₂ (25mM)	Roche, Mannheim
Mineral Oil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PeqGold Universalagarose	PeqLab, Erlangen
10x TBE-Puffer	Qbiogene, Heidelberg
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega, Mannheim

Tabelle 9: Primer und Hybridisierungssonden

Hybridisierungssonden	TIB MOLBIOL, Berlin
Primer	Invitrogen, Karlsruhe

Tabelle 10: Polymerasen, Restriktionsenzyme und Puffer

Incubation MixTaq Polymerase mit MgCl ₂	Qbiogene, Heidelberg
LightCycler-DNA Master Hybridisation Probes	Roche, Mannheim
LightCycler-FastStart DNA Master Hybridisation Probes	Roche, Mannheim
MasterAmp 2x PCR PreMixes D, J, K	BIOzym, Oldendorf
NEBuffer 1, 2, 3, 4	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main
Restriktionsendonucleasen	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main

SAWADY Long PCR System, Long PCR Enzyme	PeqLab, Erlangen
SAWADY Long PCR System, 10x Reaktionspuffer	PeqLab, Erlangen
Taq DNA Polymerase	Qbiogene, Heidelberg

Tabelle 11: Geräte und Laborausrüstung

Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Circomix-Vortexer	Braun, Melsungen
GeneAmp PCR System 9700	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
LightCycler Capillaries	Roche, Mannheim
LightCycler	Roche, Mannheim
LightCycler Carousel Centrifuge	Roche, Mannheim
Mupid-2 Mini Gel Migration Trough	Cosmo Bio Co, LTD, Offenbach
Photoprint OO-IP-010.SD	LTF Labortechnik, Wasserburg
Pipettenspitzen 10 µl, 30 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl	PeqLab, Erlangen
SAFESKIN SATIN PLUS, puderfreie Latexhandschuhe	Semperit Technische Produkte GmbH & Co KG, Wien, Austria
Sempermed NITRIL, puderfreie Untersuchungshandschuhe	Kimberly-Clark Corporation, Zaventem, Belgium
SL-Pette Autoclavable	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
Thermal Printer DPU-414	Seiko Instruments GmbH Neu-Isenburg, Germany
Thermomixer 5433	Eppendorf, Hamburg
Thermostat 5310	Eppendorf, Hamburg
ThermoTube PCR Tubes 0,2 ml	PeqLab, Erlangen
Eppendorf-Cups (1,5 ml, 200 µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf-Cup Ständer	Eppendorf, Hamburg
Video Copy Processor	Mitsubishi Digital Electronics, Ratingen, Germany
Waage 1702 MP 8	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach

3.2 Methoden

3.2.1 Beschreibung der Studie

3.2.1.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive, im Bezug auf den Genstatus doppelblind angelegte Diagnostikstudie, die an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. H. Förstl) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. D. Neumeier) durchgeführt wurde. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Fakultät für Medizin der TU München bewilligt und entspricht den Anforderungen der Deklaration von Helsinki. Verantwortlicher Projektleiter war Herr PD Dr. W. Steimer, Oberarzt des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie. Die Studie wurde weiterhin überwacht von Herrn Dr. W. Kissling und Herrn PD Dr. S. Leucht, beide Oberärzte der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie und Herrn Dr. S. Heres, Assistenzarzt an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie.

3.2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie aufgenommen wurden über einen Zeitraum von 2 Jahren (1. Mai 2002 - 30. April 2004) alle neu in die Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar stationär aufgenommenen Patienten, die die Einschlusskriterien erfüllten, und sich nach Aufklärung über die Studie mit ihrer Teilnahme schriftlich einverstanden erklärten. Die Einwilligung zur Studienteilnahme konnte jederzeit widerrufen werden.

In die Studie eingeschlossen werden konnten alle einwilligungsfähigen männlichen und weiblichen Patienten ab dem vollendeten 18. Lebensjahr mit Grunderkrankungen, die eine Therapie mit Antidepressiva oder Antipsychotika notwendig machen. Dazu gehören depressive Störungen, Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis, Zwangsstörungen und Angststörungen. Ausschlusskriterien waren andere Diagnosen, wie organisch bedingte Psychosen und Depressionen, Demenzen, Abhängigkeitserkrankungen, Persönlichkeits- oder Essstörungen, sowie Schwangerschaft und Stillzeit. Außerdem wurden keine Personen in die Studie eingeschlossen, die auf gerichtliche oder behördliche Anordnung in die Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar eingewiesen wurden.

3.2.1.3 Datenerhebung

Bei der stationären Aufnahme der Patienten in die Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar wurden demographische Daten, medizinische Anamnese, psychiatrische Vorgeschichte und Vorgeschichte der aktuellen Erkrankung, sowie Körpergröße und Gewicht erfasst. Die Diagnose der Erkrankung wurde nach ICD-10 gestellt. Der Krankheitszustand der

Patienten zum Aufnahmezeitpunkt wurde durch die Paranoid-Depressivitäts-Skala (PD-S) (Zerssen, 1996) und dem Clinical Global Impression (CGI) (National Institute of Mental Health, 1996) beurteilt. Im Rahmen der routinemäßigen Blutabnahmen wurde den Patienten bei Aufnahme zusätzlich EDTA-Blut zur Bestimmung des pharmakogenetischen Status abgenommen. Die Therapie erfolgte dann entsprechend dem jeweiligen Krankheitsbild, gemäß dem aktuellen Stand medizinischer Erkenntnis bzw. gültiger Leitlinien.

Nach 4 Wochen wurde der Therapieerfolg anhand CGI und PD-S bestimmt und eventuell aufgetretene Nebenwirkungen global mit Hilfe einer abgewandelten Form der DOTES-Skala (Dosage Record and Treatment Emergent Symptom scale) (Guy et al, 1976) dokumentiert. Des Weiteren wurden innerhalb der ersten 4 Behandlungswochen die angewandte medikamentöse Therapie mit Begleitmedikation, sowie die Gabe von Biperiden erfasst. Biperiden ist ein sogenannter Muskarinrezeptor-Antagonist und wird zur Behandlung extrapyramidalmotorischer Symptome (EPS) unter der Therapie mit Antipsychotika eingesetzt.

Zusätzlich zu den bereits genannten Parametern wurde die Dauer des stationären Aufenthaltes eines jeden Patienten erfasst.

Die PD-S (Paranoid-Depressivitäts-Skala)

Die PD-S ist eine Selbstbeurteilungsskala und umfasst eine P-Skala mit 16 Items zur Messung paranoider Tendenzen, sowie eine D-Skala mit ebenfalls 16 Items zur Feststellung ängstlich-depressiver Verstimmung. Für die Auswertung der Response wurde eine Verbesserung des PD-S-Wertes (PDS-D bzw. PDS-P) um 50% oder mehr als Kriterium für das Ansprechen auf die Therapie gewählt. In placebokontrollierten Studien mit Antidepressiva wird immer wieder von hohen Placebo-Responderraten berichtet. Von Witte et al. (1995) fanden z. B. in einer Studie nach 6-wöchiger Therapie unter Placebo einen Rückgang des PDS-D im Mittel um 41 %. Um auch möglichst nur Patienten zu erfassen die wirklich auf die Arzneimitteltherapie ansprechen, wurde im Rahmen der hier vorliegenden Studie ein PDS-D-Rückgang von 50 % oder mehr als Kriterium für das Ansprechen auf die Therapie festgelegt. Entsprechendes gilt für den Rückgang des PDS-P. Auch in anderen pharmakogenetischen Untersuchungen wurde bereits der Rückgang depressiver Symptome (Reduktion des HAM-D Scores, HAMilton-Depression rating scale) bzw. psychotischer Symptome (Reduktion PANSS, Positive And Negative Syndrome Scale) um 50 % oder mehr als Response definiert (Durham et al., 2003; Schäfer et al., 2001).

Der CGI (Clinical Global Impressions)

Der CGI ist eine Fremdbeurteilungsskala. Die Beurteilung erfolgt durch den Arzt, der nacheinander den Schweregrad der Krankheit (CGI 1), den Heilungsverlauf seit Beginn der Behandlung (CGI 2), sowie den therapeutische Wirksamkeitsindex (Verhältnis von therapeutischen Effekt und auftretenden Nebenwirkungen; CGI 3) einzuschätzen hat. Der Item CGI 2 enthält 7 Antwortrubriken (1=Zustand ist sehr viel besser, 2=Zustand ist viel besser; 3=Zustand ist nur wenig besser, 4=Zustand ist unverändert, 5=Zustand ist etwas schlechter, 6=Zustand ist viel schlechter,

7=Zustand ist sehr viel schlechter) und eine Rubrik „nicht beurteilbar“ (=0).

Für die Auswertung der Studie wurden alle Patienten, die 4 Wochen nach der stationären Aufnahme einen CGI 2-Wert von 1 oder 2 (siehe oben) hatten als Responder und alle die einen CGI 2-Wert von 3-7 hatten als Non-Responder gewertet.

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

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Abwandlung der DOTES-Skala konnte der Arzt die Nebenwirkungen eines Patienten aufgrund vorgegebener Nebenwirkungssymptome (*Verhaltenssymptome*: toxischer Verwirrtheitszustand, Erregung/Agitation, depressive Stimmung, gesteigerte/verminderte motorische Aktivität, Schlaflosigkeit, Schläfrigkeit/Somnolenz/Dösigkeit; *neurologische Symptome*: Rigor, Tremor, dystonische Symptome, Akathisie, Spätdyskinesien; *vegetative Symptome*: Mundtrockenheit, behinderte Nasenatmung, verschwommenes sehen, Obstipation, vermehrter Speichelfluss, Schwitzen, Übelkeit/Erbrechen, Diarrhoe; *kardiovaskuläre Symptome*: Hypotonie, Ohnmacht/Schwindelgefühl, Tachykardie, Hypertonie, abnormes EKG; *andere Symptome*: dermatologische Symptome, Gewichtszunahme, Gewichtsverlust, Anorexie/ Appetitverlust, Kopfschmerzen) insgesamt als *deutlich*, *mäßig*, *sehr wenig* oder *gar nicht beeinträchtigend* beurteilen. Die Beurteilung der Nebenwirkungssymptome erfolgte rückblickend über den 4-wöchigen Behandlungszeitraum. Ein Patient wurde als Nebenwirkungs-positiv gewertet, wenn seine Nebenwirkungen vom Arzt global als mäßig oder deutlich beurteilt wurden und als Nebenwirkungs-negativ, wenn der Patient nach Beurteilung des Arztes gar keine oder sehr wenig beeinträchtigende Nebenwirkungen hatte.

3.2.2 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die Programme SPSS 12.0.1 für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) und Excel 2000 (Microsoft Corporation, Seattle, USA) verwendet. In der konfirmatorischen Statistik wurden Ergebnisse mit einem Signifikanzniveau $\alpha \leq 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Dies bedeutet, dass in 1 von 20 Tests ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt wird, obwohl das Ergebnis nur ein zufälliges ist (Typ I-Fehler) Für die Auswertung des Unterschiedes qualitativer (ordinaler und nominaler) Merkmale wurden Kreuztabellen erstellt und mit dem χ^2 -Test oder dem Fisher-Exakt-Test auf ihre Signifikanz hin untersucht. Die Normalverteilung quantitativer Variablen wurde anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests beurteilt. Da in keinem Falle eine Normalverteilung nachgewiesen werden konnte, wurden als nicht-parametrische Verfahren der Mann-Whitney-U-Test bei 2 unabhängigen Variablen und der Kruskal-Wallis-Test bei > 2 unabhängigen Variablen zur Analyse eingesetzt. Alle ermittelten p-Werte stellen die 2-seitige Signifikanz dar. Eine Korrektur der p-Werte nach Bonferroni aufgrund multipler Testung wurde nicht durchgeführt. Die monotone Beziehung zwischen den ordinalskalierten Größen PDS-D (Differenz 4 Wochen-Aufnahme) bzw. PSD-P (Differenz 4 Wochen-Aufnahme) und CGI 2 wurde mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman

berechnet. Odds Ratios (OR) und zugehörige 95 % Konfidenzintervalle (95 % CI), sowie das 95 % Konfidenzintervall einer Häufigkeit/Proportion wurden über online zugängliche Software-Tools berechnet (<http://members.aol.com/johnp71/ctab2x2.html> bzw. <http://graphpad.com/quickcalcs/ConfIntervall.cfm>).

Die Genotypen der biallelischen Polymorphismen wurden auf ihre Verteilung bezüglich des Hardy-Weinberg-Equilibriums untersucht (bei Vorliegen zweier Allele A und B mit den Allelfrequenzen p und q gilt: $p^2+2pq+q^2=1$). Mittels der beobachteten Genotypen lassen sich die Allelfrequenzen (p und q), und aufgrund dieser wiederum die erwarteten Genotypfrequenzen (p^2 ; $2pq$ und q^2) berechnen. Die Unterschiede zwischen ermittelten und erwarteten Genotypen wurden mit dem χ^2 -Test geprüft. Fällt die Irrtumswahrscheinlichkeit unter das festgelegte Signifikanzniveau von $p<0,05$, so befinden sich die Genotypen nicht im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht.

3.2.3 Genotypisierung

Von der Gewinnung des Probenmaterials bis hin zur Bestimmung des Genotyps einer Patienten-Probe sind eine Vielzahl von Arbeitsschritten nötig. Diese einzelnen Arbeitsschritte sind in Abbildung 2 kurz skizziert und werden in den folgenden Kapiteln der Methodik näher erläutert.

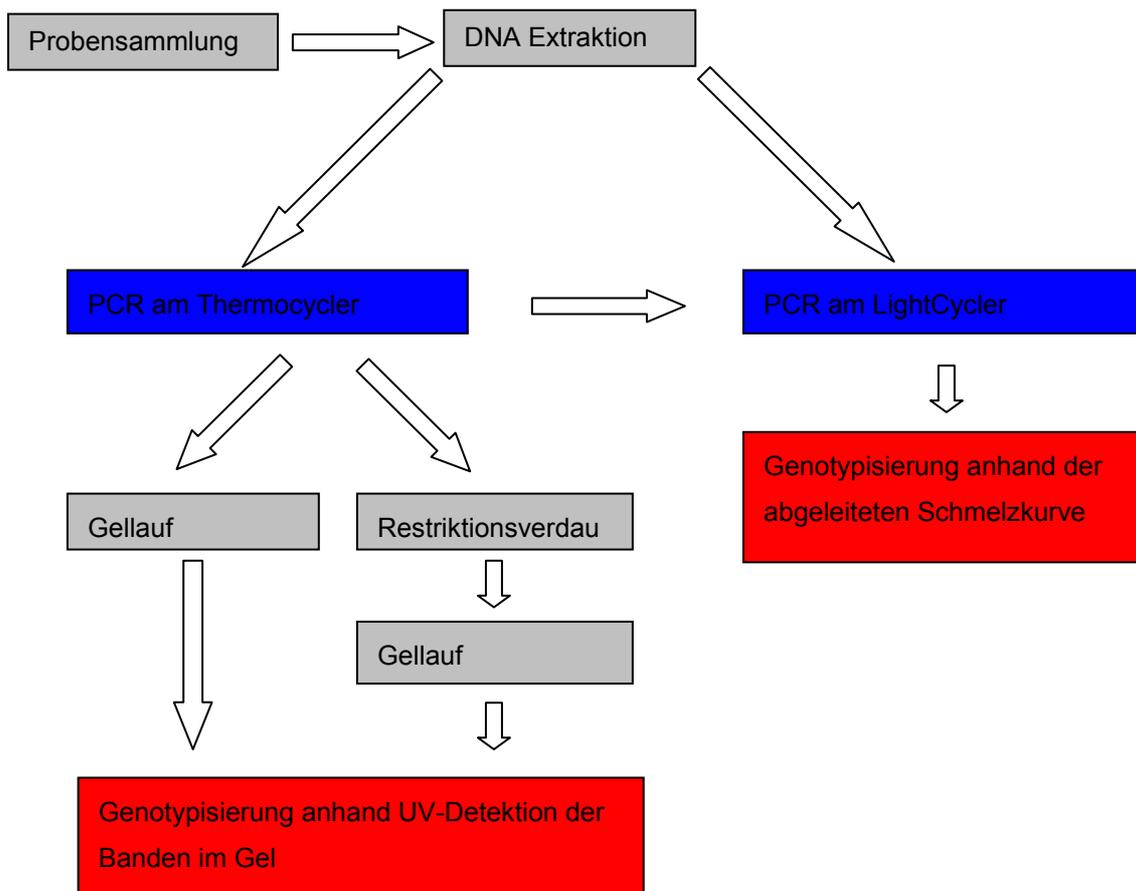


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Bestimmung des Genotyps

3.2.3.1 DNA-Extraktion

Den in die Studie aufgenommenen Patienten wurde, im Rahmen der routinemäßigen Blutabnahme, bei Aufnahme in die Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar mit einer Sarstedt-Monovette ca. 2,7 ml EDTA-Blut abgenommen. Die Blutproben wurden zusammen mit dem Blutentnahme-Anforderungsschein unverzüglich über die Rohrpost dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie zugeschickt und möglichst sofort, spätestens jedoch 14 Stunden nach dem Eintreffen, aufgearbeitet. In diesem Zeitraum wurden die Proben bei Raumtemperatur gelagert. Zur Vermeidung einer Verunreinigung der Blutproben mit Fremd-DNA bzw. zur Vermeidung der Kontamination des Laborpersonals mit infektiösen Blutbestandteilen wurden alle Arbeitsschritte der DNA-Isolierung mit Latex-Handschuhen durchgeführt und sterile Pipettenspitzen und Behältnisse verwendet. Die DNA-Extraktion aus den Leukozyten im EDTA-Blut wurde mit dem kommerziell erhältlichen Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Mannheim) entsprechend den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Pro Blutprobe wurde 2-fach extrahiert (2x 300 µl EDTA-Blut) und der Extrakt in zwei separate Zentrifugenröhrchen abgefüllt. Aus 300 µl EDTA-Blut können nach Angaben des Herstellers etwa 5-15 µg DNA gewonnen werden (abhängig vom Gehalt des Blutes an Leukozyten). Der durch den Wizard Genomic DNA Purification Kit gewonnene DNA-Extrakt kann direkt für eine PCR verwendet werden, ohne störende Einflüsse der verwendeten Reagenzien. Ein Zentrifugenröhrchen mit DNA-Extrakt wurde nach der Extraktion bei -70°C tiefgefroren, das andere für die anstehende Genotypisierung bei $2-8^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank aufbewahrt. Ein zusätzliches 1,5 ml Zentrifugenröhrchen wurde mit dem EDTA-Blut befüllt und bei -70°C gelagert.

3.2.3.2 Konventionelle PCR am Thermocycler

Die PCR ist eine in-vitro Reaktion, mit der kleinste Mengen an DNA in wenigen Stunden millionenfach vermehrt werden können. Sie wurde Anfang der 1980er Jahre von K.B. Mullis und Mitarbeitern der Firma Cetus entwickelt (Saiki et al., 1994). Benötigt werden neben der zu vervielfältigenden DNA als Matrize (siehe Abbildung 3) zwei Oligonucleotide (Primer, in Abbildung 3 als gepunktete Linien dargestellt), welche die Zielfrequenz flankieren und jeweils komplementär zu einem der DNA-Stränge sind, die vier verschiedenen Desoxyribonukleosid-Triphosphate in ausreichender Menge, DNA-Polymerase (P) und Puffer, um eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherzustellen. Jeder Zyklus der PCR besteht aus drei Phasen. In der Strangtrennungsphase (Denaturierungsphase 1) wird die DNA-Doppelhelix bei ca. $93-95^{\circ}\text{C}$ getrennt. Dadurch wird eine Anlagerung der Oligonukleotid-Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Matrix während der Anlagerungsphase (Annealingphase 2) ermöglicht. Im letztgenannten Schritt erfolgt eine Abkühlung des Reaktionsansatzes auf die Anlagerungstemperatur (Annealingtemperatur), die abhängig von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer ist. In der darauffolgenden, sogenannten Verlängerungsphase (Elongationsphase 3), die meist bei 72°C abläuft, werden die Primer durch die DNA-Polymerase (P) verlängert, indem an ihr

freies 3'-OH-Ende zur DNA-Matrix komplementäre Desoxyribonukleosid-Triphosphate angeknüpft werden (in Abbildung 3 als elongierter Primer bezeichnet). Durch mehrfaches Wiederholen dieser Zyklen wird der zu vervielfältigende DNA-Bereich exponentiell angereichert, im Idealfall nach n Zyklen auf das 2^n -fache. Es entstehen neben den einheitlichen PCR Produkten die genau der Zielsequenz entsprechen (A) auch PCR Produkte unterschiedlicher Länge (B), die bei steigender Zykluszahl quantitativ keine mehr Rolle spielen ($2n$ nach n Zyklen). Die PCR Produkte unterschiedlicher Länge entstehen durch Verlängerung der Primer über die zweite Primerbindungsstelle hinaus, wenn als Matzize die DNA dient. In der Praxis ist die Vermehrung der Zielsequenz nach 20-30 Zyklen ca. 10^6 bis 10^7 -fach.

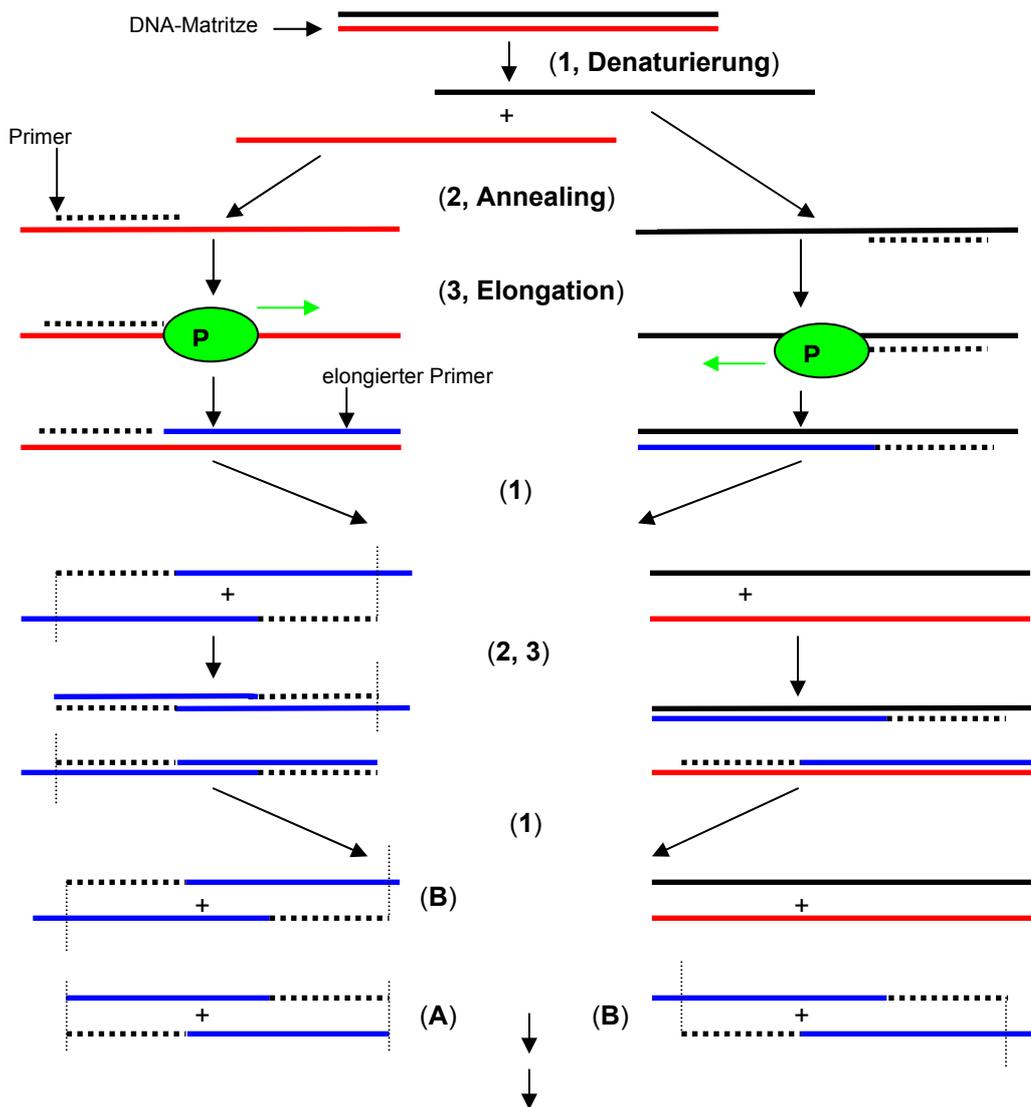


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Ablaufs einer PCR

Die PCR weist nicht nur eine hohe Sensitivität auf, da theoretisch auch ein einziges DNA-Molekül vervielfacht werden kann, sondern hat bei geeigneter Primerauswahl und geeigneten Reaktionsbedingungen auch eine sehr hohe Spezifität. Im Idealfall wird nur die gewünschte Zielfrequenz vervielfältigt.

Voraussetzung für den Erfolg der PCR-Methode war die Entwicklung von Geräten, die für den automatischen Wechsel der Temperaturen sorgen, sogenannte Thermocycler, aber auch die Isolation hitzestabiler DNA-Polymerasen, die auch bei den hohen Temperaturen der Denaturierungsphase nicht zerstört werden. Heute wird hauptsächlich die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus Aquaticus* zur Amplifikation im Rahmen einer PCR verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Thermocycler das GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet, in dem bis zu 96 PCR-Ansätze mit einem maximalem Ansatzvolumen von 100µl gleichzeitig amplifiziert werden können. Die Temperaturänderung der Ansätze erfolgt hier über einen beheizbaren Metallblock, ein PCR-Zyklus benötigt ungefähr 2 bis 8 Minuten. Zur Detektion der Genotypen der Proben sind neben der DNA-Vervielfältigung weitere Schritte, wie Restriktionsverdau und/oder Gelelektrophorese nötig. Bei Insertions- und Deletionsmutationen oder auch sogenannten Variable Number of Tandem Repeats (VNTR), bei denen die Mutation einen ausreichend großen Längenunterschied der entsprechenden PCR Produkte verursacht, kann der Genotyp schon alleine anhand des nachfolgenden Gellaufes zugeordnet werden. Sind die Längenunterschiede zu klein wie bei Insertionen oder Deletionen kleiner Sequenzabschnitte oder gar nicht vorhanden wie bei Vorliegen eines Austausches einer einzelnen Base (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), so kann nach der PCR der sogenannte Restriktionsverdau mit anschließender Gelelektrophorese zur Genotypisierung herangezogen werden (siehe Kapitel 3.2.3.4). Eine Variation der PCR, die im Rahmen dieser Arbeit am Thermocycler durchgeführt wurde, ist die sogenannte Allel-Spezifische-PCR (Newton et al., 1989). Einer der beiden Primer im Reaktionsansatz kommt dabei mit seinem 3'-Ende genau auf der polymorphen Stelle der DNA-Matrix zu liegen. Im Falle einer Basenfehlpaarung am 3'-Ende kann der Primer nicht durch die Polymerase verlängert werden und es wird in diesem Fall kein PCR Produkt gebildet. Für die Genotypisierung einer DNA-Probe mit Allel-Spezifischer-PCR werden zwei Reaktionsansätze gemacht. In einem befindet sich z. B. neben dem Vorwärtsprimer ein sequenzspezifischer Rückwärtsprimer, mit dem selektiv nur Wildtyp DNA vermehrt wird, in dem anderen ein sequenzspezifischer Rückwärtsprimer, mit dem nur selektiv DNA mit der entsprechenden Mutation vermehrt wird. In der anschließenden Gelelektrophorese sind nur dann Banden zu sehen, wenn im jeweiligen Ansatz die zum sequenzspezifischen Oligonukleotid entsprechende DNA-Sequenz vorliegt (siehe Abbildung 20).

3.2.3.3 PCR am LightCycler

Die PCR am LightCycler ist eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR und ermöglicht eine wesentlich schnellere Durchführung der Zyklen (Wittwer, 2001). Die kurze Zykluszeit von etwa 20 bis 60 s wird durch die Verwendung von speziellen Glaskapillaren (hohe Wärmeleitfähigkeit, hohes Oberflächen/Volumen-Verhältnis), die eine schnellere und gleichmäßigere Durchwärmung des Reaktionsansatzes ermöglichen, und durch die luftgesteuerte Temperaturänderung des Reaktionsansatzes ermöglicht. Durch die geringe Wärmekapazität der Luft werden schnelle Aufwärm- und Abkühlgeschwindigkeiten von bis zu 20 °C/s erreicht. Zusätzlich zu den Reagenzien, die für eine konventionelle PCR nötig sind, werden den LightCycler-Ansätzen noch ein Paar sogenannter Hybridisierungssonden (Sensor- und Anchorsonde) zugegeben, die eine Detektion des Genotyps ohne weitere Analysenschritte, wie Restriktionsverdau und/oder Gelelektrophorese, direkt am Anschluss der Amplifikation ermöglichen. Dies führt zu einer weiteren Zeitersparnis, ermöglicht eine weitgehende Automatisierung der PCR/Genotyp-Analyse, und verhindert mögliche Kontaminationen durch weitere Arbeitsschritte. Eine der Hybridisierungssonden ist an ihrem 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff LightCycler-Red-640-N-Hydroxy-Succinimidester, die andere an ihrem 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein markiert. Im Anschluss an die PCR wird für die Aufnahme der sogenannten Schmelzkurve die Temperatur des Reaktionsansatzes so weit abgekühlt, dass die Sonden sich mit ihren markierten Enden einander zugewandt, nebeneinander an die zu untersuchende Zielsequenz anlagern. Dabei wird der Farbstoff Fluorescein (Donor, D) durch eine Diode, die Licht mit der Wellenlänge 470 nm emittiert, energetisch angeregt und überträgt wiederum einen Teil der Anregungsenergie auf den Farbstoff LC-Red-640 (Akzeptor, A). Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz Energie Transfer (FRET) bezeichnet. Der angeregte Farbstoff LC-Red-640 wiederum emittiert Licht im Bereich von 640 nm, das vom LightCycler Fluorimeter detektiert werden kann (siehe Abbildung 4) (Bernard et al., 2001). Im Laufe der auf die PCR-Zyklen folgenden kontinuierlichen Temperaturerhöhung von 0,1 bis 0,2 °C/s sind statistisch gesehen immer weniger Sonden nebeneinander gebunden, so dass das detektierte Fluoreszenzsignal kontinuierlich schwächer wird. Am Wendepunkt der aufgezeichneten Schmelzkurve sind dann noch 50 % der Sensorsonden an der Ziel-DNA gebunden. Die Temperatur am Wendepunkt der Schmelzkurve wird als Schmelztemperatur (T_m) der Sonde bezeichnet. Für eine bessere Auswertung wird computergestützt die negative Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur ($-dF/dT$) berechnet und als die sogenannte abgeleitete Schmelzkurve graphisch dargestellt (Bernard et al., 2001). Die Schmelztemperatur einer Sonde ist dann durch ein Maximum gekennzeichnet. Befindet sich unter der Sensorsonde in der Ziel-DNA eine Mutation so kommt es dort zu einer Basenfehlpaarung, die eine geringere thermische Stabilität aufweist als die Basenpaarung zwischen zwei komplementären Basen (Wildtyp). Die Schmelztemperatur der Sensorsonde verschiebt sich somit zu niedrigeren Temperaturen und kann anhand der Verschiebung des Maximums in der abgeleiteten Schmelzkurve abgelesen werden (Bernard et al., 2001). Typische Schmelzkurven sind in den Beschreibungen der einzelnen Nachweismethoden zu finden.

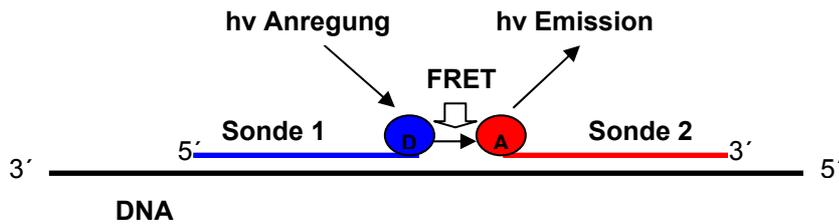


Abbildung 4: Schematische Darstellung des FRET-Prozesses

3.2.3.4 Enzymatischer Verdau

Zur Analyse verschiedener SNPs, im Rahmen dieser Arbeit, wurde im Anschluss an die konventionelle PCR am Thermocycler der sogenannte Restriktionsverdau durchgeführt.

Tabelle 12: Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Erstisolierung aus dem Bakterium	Erkennungssequenz und Spaltmuster *
BstNI	Bacillus stearothermophilus N	5' CC / ^A TGG 3' 3' GG ^T / _A CC 5'
TaqI	Thermophilus aquaticus	5' T / CGA 3' 3' AGC / T 5'
HaellI	Haemophilus aegypticus	5' GG / CC 3' 3' CC / GG 5'
MspI	Moraxella species	5' C / CGG 3' 3' GGC / C 5'
BbvI	Bacillus brevis	5' GCAGC(N) ₈ / 3' 3' CGTCG(N) ₁₂ / 5'.
BsrDI	Bacillus stearothermophilus D70	5' GCAATGNN / 3' 3' CGTTAC / NN 5'.

*Die Schnittstellen sind durch fett markierte Schrägstriche gekennzeichnet

Die dabei eingesetzten Restriktionsenzyme erkennen eine typische Abfolge von meist 4-6 Basen einer doppelsträngigen DNA, hauptsächlich sogenannte Palindrome (gegenläufig gleiche Basensequenzen der DNA), und spalten Phosphodiesterbindungen beider Stränge innerhalb der Erkennungssequenz oder in einem bestimmten Abstand davon. Durch eine Mutation in der DNA kann entweder eine solche Erkennungssequenz verloren gehen oder auch entstehen. Somit wird vom Enzym nur eine der beiden DNA-Varianten geschnitten und anhand des Bandenmusters im

anschließenden Gellauf kann dann der entsprechende Genotyp zugeordnet werden. Entdeckt wurden die Restriktionsenzyme durch den Befund, dass Stämme von *E.coli* gegen bestimmte Bakteriophagen resistent waren. Untersuchungen ergaben, dass diese Bakterien hochspezifische Endonukleasen besitzen mit denen sie injizierte Fremd-DNA abbauen können. In Tabelle 12 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme aufgeführt. Die Bezeichnung z. B für das Enzym EcoRI setzt sich aus dem Gattungsnamen (z. B. *Eschecheria*) dem Artnamen (z. B. *coli*) dem Stamm bzw. Serotypen (z. B. *R*) des Bakteriums, aus dem das Enzym isoliert wurde und der Reihenfolge der Entdeckung des Enzyms in dem Bakterium (z. B. *I* = 1. entdecktes Enzym) zusammen.

Für die Genotypisierung wurden kommerziell erhältliche Restriktionsenzyme der Firma New England BioLabs GmbH (Frankfurt am Main) und die jeweiligen empfohlenen Puffersysteme und Bovines Serum Albumin (BSA) von der gleichen Firma eingesetzt. Die Enzyme, der Puffer und das BSA wurden bei -20°C gelagert und unmittelbar vor ihrer Verwendung dem Gefrierschrank entnommen.

3.2.3.5 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können zur Kontrolle der korrekten Amplifikation und zur Analyse der Genotypen die PCR-Produkte bzw. die Produkte aus dem Restriktionsverdau in Agarosegelen aufgetrennt werden. Die Gelmatrix eines Agarosegels besteht aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L Galactose, die alternierend durch β -1,4- und α -1,3-glycosidische Bindungen linear verestert sind. Die Porengröße des Gels lässt sich über die Agarosekonzentration variieren. Da DNA-Moleküle bei neutralen pH-Wert aufgrund ihrer Phosphorsäuregruppen negativ geladen sind, wandern sie im Gleichstrom zur Anode. Aufgrund der Siebstruktur der Agarosegels können sie dann entsprechend ihrer Größe bzw. ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Es bilden sich DNA-Banden aus, die durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden können. Ethidiumbromid interkaliert zwischen aromatische Ringsysteme benachbarter Nukleotide, kann unter UV-Licht energetisch angeregt werden, und fluoresziert dann intensiv orangerot. Die Fluoreszenz kann durch geeignete Apparaturen detektiert und photographisch dokumentiert werden.

Die DNA-Auftrennung im Rahmen dieser Arbeit erfolgte mit horizontalen Agarosegelen (Konzentration zwischen 0,7 und 2 % (m/V) Agarose in 1x TBE-Puffer). Zur Herstellung der Gele wurde eine entsprechende Menge Agarose (PeqGOLD Universal Agarose, Erlangen oder Metaphor Agarose, FMC BioProducts, Rockland, USA) auf der Analysenwaage in einen autoklavierten 200ml Erlenmeyer-Weithalskolben eingewogen und 30 ml eines, aus 10x TBE-Puffer (Tris 0,89 M; Borsäure 0,89 M; EDTA 0,02 M) frisch hergestellten, 1x TBE-Puffers zugegeben. Der Ansatz wurde mehrmals in der Mikrowelle aufgekocht, bis eine schlierenfreie Lösung entstand. Unter dem Abzug wurde die Lösung dann, nach Zupipettieren von 3 μl Ethidiumbromid (1 %ige Lösung in Wasser), und kurzem Umschwenken, in eine Gelkammer mit Taschenkamm (17 Taschen, max. Füllungsvolumen 20 μl) gegossen. Dieser Arbeitsschritt, wurde aufgrund der kanzerogenen

Wirkung des Ethidiumbromids unter dem Abzug und unter Verwendung spezieller Nitrilhandschuhe (Sempermed NITRIL, puderfreie Untersuchungshandschuhe) durchgeführt. Die Agarose-Lösung war dann nach ca. 20-30 min erstarrt, worauf das Gel mit 10 µl 1x TBE Puffer/Ethidiumbromid Mischung (1 µl 1 %ige Ethidiumbromidlösung in 10 ml 1x TBE) übergossen wurde.

Zum Gellauf wurden nach der PCR bzw. dem Restriktionsverdau 5-10 µl des Reaktionsgemisches zusammen mit 1-2 µl Gelladepuffer in die Geltaschen (Slots), aus denen kurz vorher der Gelkamm entfernt wurde, pipettiert. Der Gelladepuffer (Gel Loading Solution Type 1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinhausen) verhindert ein Ausschwimmen der DNA aus den Geltaschen (enthält 40 % [m/V] Saccharose, das die Dichte der Auftragsprobe erhöht und dadurch ein Absinken der DNA in die Geltasche bewirkt) und enthält zwei Längenmarker (Bromphenolblau, Xylencyanol FF), die zur Abschätzung der Laufweite der DNA-Moleküle herangezogen werden können (Xylencyanol FF zeigt nach Angaben des Herstellers in einem 0,5-1,4 %-igem Agarosegel Banden auf der Höhe von etwa 4 kbp, Bromphenolblau bei etwa 300 bp). Zusätzlich zu den Proben wurde auf jedes Gel ein DNA-Längenmarker (Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein) aufgetragen. Die DNA-Längenmarker bestehen aus DNA-Fragmenten bekannter Länge und ermöglicht eine Einordnung der Fragmentlänge der DNA-Moleküle. Nach dem Auftragen der Proben und des DNA-Längenmarkers wurden die Gele aus der Gelgießkammer entnommen und in die Elektrophoresekammer (Mupid 2, Cosmo Bio Co, LTD, Offenbach) eingesetzt. Die Elektrophoresekammer war mit 1x TBE-Puffer so weit aufgefüllt, dass das Agarosegel vollständig mit Puffer bedeckt wurde. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei 100 V Gleichspannung die Laufzeiten können aus der jeweiligen Beschreibung der einzelnen Methoden entnommen werden. Anschließend wurde das Gel der Elektrophorese-Kammer entnommen und in die Beleuchtungs- und Photoapparatur gelegt. Darin wurde das Gel unter UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt und die fluoreszierenden Banden zur Dokumentation photographiert.

3.2.3.6 Sonden und Primer

Auffinden der zu untersuchenden DNA-Sequenz

Das Humangenomprojekt, sowie andere Projekte zur Erforschung des menschlichen Genoms, liefern eine große Menge an Gen-Informationen, die mit Hilfe des Internets aus verschiedenen Datenbanken für jedermann abrufbar sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gensequenzen aus der NCBI (National Center for Biotechnology Information) Nucleotide Datenbank abgerufen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/queri.fcgi?db=Nucleotide>) und zur weiteren Bearbeitung in das nicht kommerziell erhältliche PCR-Design-Programm NukWork (entwickelt von Dr. Burkhard Müller, ehemals Arzt am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar) eingelesen. In der Tabelle 13 und Tabelle 14 sind die für die Entwicklung der Primer und Sonden zugrunde liegenden Zugangsnummern (Accession Numbers, Acc. No.) aufgelistet.

Konstruktion der Primerpaare

Ein Faktor, der das Gelingen einer PCR wesentlich beeinflusst, ist die Konstruktion geeigneter Primer. Für die Genotypisierungsreaktionen wurden die Primer mit Hilfe des PCR-Design-Programms NukWork und auf Basis der eingelesenen Gensequenzen (siehe oben) so gewählt, dass die Primer, jeweils einer zu einem der DNA-Stränge komplementär, die zu untersuchende Mutation umfassten. Die Primerlänge betrug 18 bis 25 Basen Paare (bp). Statistisch gesehen kommen erst Sequenzen ab einer Länge von 16 bp nur einmal im ganzen menschlichen Genom vor, und es ist deshalb aus Spezifitätsgründen nicht sinnvoll, kürzere Primer einzusetzen. Je länger die Primer hingegen sind, desto ineffizienter lagern sie sich an die komplementäre Zielsequenz an, mit dem Ergebnis einer geringeren PCR-Produktausbeute. Die Primer eines Primerpaares wurden ferner so gewählt, dass sich ihre Schmelztemperaturen (T_m) möglichst nur geringfügig unterschieden ($\Delta T_m < 5^\circ\text{C}$). Als Schmelztemperatur wird die Temperatur bezeichnet, bei der 50 % der Primer an ihrer komplementären Zielsequenz angelagert sind. Sie wurde im Programm NukWork nach einer thermodynamischen Methode berechnet (Schutz et al., 1999). Wenn Primer zu große Unterschiede hinsichtlich ihrer Schmelztemperaturen besitzen, kann es in der PCR entweder zur Ausbildung von Fehlprodukten kommen (Fehlanlagerungen des höher schmelzenden Primers bei einer Annealingtemperatur weit unterhalb seiner T_m), oder es wird kein bzw. nur ungenügend Amplifikationsprodukt gebildet, wenn die Annealingtemperatur weit oberhalb der T_m des niedriger schmelzenden Primers liegt. Bei der Auswahl der Primersequenzen im Programm NukWork wurden repetitive und Palindrom-Sequenzen vermieden, da solche häufig im Genom vorkommen, und somit die Spezifität der Primer, die solche Sequenzen erhalten, sinkt. Weiterhin wurden die Primer auf Ausbildung von Haarnadelstrukturen oder Primer-Dimere überprüft. Haarnadelstrukturen entstehen durch Aneinanderlagerung komplementärer Sequenzabschnitte innerhalb eines Primers und stören somit seine Anlagerung an die eigentliche Zielsequenz. Dies hat zur Folge, dass die Effizienz der PCR sinkt. Wenn komplementäre Sequenzabschnitte in zwei verschiedenen Primern vorhanden sind, können sich diese Abschnitte aneinander lagern, und es kommt zur Ausbildung sogenannter Primer-Dimere. Sind die homologen Sequenzabschnitte dabei in mittleren Primerabschnitten wird durch Dimerenbildung die Anlagerung an die eigentliche Zielsequenz gestört. Sind jedoch die Primer an ihren 3'-Enden zueinander komplementär, und lagern sich dort aneinander, so werden sie an diesem Ende verlängert, wobei jeweils der andere Primer als Matrize dient. Dies ist dann eine Konkurrenzreaktion zur eigentlichen Primerverlängerung an der Zielsequenz und verschlechtert die Ausbeute an gewünschtem PCR-Produkt.

Überprüfung der Primerspezifität

Nachdem die Primer im Programm NukWork konstruiert oder die Sequenzen aus Publikationen übernommen worden waren, wurde jeder einzeln auf seine Spezifität für die zu vervielfältigende Gensequenz mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)-Suche (Altschul et al., 1990) überprüft (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/BLAST/>). Dabei wird jede einzelne Primersequenz mit

einer Datenbank verglichen (Alignment). Ergaben sich vollständige Homologien der Primersequenzen mit anderen als den zu untersuchenden Genabschnitten der Spezies Mensch, so wurden die Primer nicht für die Genotypisierung ausgewählt.

Die zur Genotypisierung verwendeten Primer

Die für die PCR geeigneten Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) in lyophilisierter Form geliefert. Nach Abzentrifugation des Lyophilisats bei 14000 U/min für 1 min, wurde so viel steriles, pyrogenfreies Wasser in das Röhrchen mit dem Lyophilisat zugegeben, dass eine 25 µM Lösung entstand. Zum vollständigen Lösen des Lyophilisats wurden die Primer-Röhrchen für ca. 30 min auf ein Rollbrett gegeben, danach aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Meist wurden für die Amplifikation eines bestimmten Genabschnittes mehrere Primerpaare konstruiert und nach PCR-Vorversuchen die beste Kombination aus Vorwärts- und Rückwärtsprimer ausgewählt. Die letztendlich für die Genotypisierung verwendeten Primer sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Verwendete Primer

Bezeichnung*	Sequenz (5'-XXX-3')	Acc. No.	Länge (bp)
C1A2/1F-F	GTCACCTGCCTCTACTCCAGC	M31664	21
C1A2/1F-R	CTGATGCGTGTTCTGTGCTTG	M31664	21
C2C19/2-F	ATTACAACCAGAGCTTGGC	M31506	20
C2C19/2-R	TATCACTTTCCATAAAAGCAAG	M31506	22
C2C19/3-F	TATTATTATCTGTAACTAATATGA	L32982	25
C2C19/3-R	ACTTCAGGGCTTGGTCAATA	L32982	20
C2C19/4-F	ATTATA TTAACAAGAGGAGAAGGCT GCA **	L39097	28
C2C19/4-F2	CTCACGGTTGTCTTAACAAGA	L39097	21
C2C19/4-R	TTGGTTAAGGATTTGCTGACA	L39097	21
C2D6/9-F	CTCCTATCCACGTCAGAGAT	M33388	20
C2D6/9-R	GAGAGCATACTCGGGACAG	M33388	19
DRD2/141-F	ACTGGCGAGCAGACGGTGAGGACCC	AF148806	25
DRD2/141-R	TGCGCGCGTGAGGCTGCCGGTTCGG	AF148806	25
DRD2/311-F	GGTGCAGGAGGCTGCCCGGCGAGCC	XM041426	25
DRD2/Cys311	AGTGCTGTGGAGACCATGGTGG C ***	XM041426	23
DRD2/Ser311	AGTGCTGTGGAGACCATGGTGG G ***	XM041426	23
DRD2/Taq-F	ACGGCTGGCCAAGTTGTCTAA	L22303	21
DRD2/Taq-R	CCTTCCTGAGTGTCAATCAACC	L22303	21

Bezeichnung*	Sequenz (5'-XXX-3')	Acc. No.	Länge (bp)
DRD3/9-F	GCTCTATCTCCA <u>ACTCT</u> CACA	U25441	21
DRD3/9-R	AAGTCTACTCACCTCCAGGTA	U25441	21
DRD4/12-F	CGCCATGGGGAACCGCAG	L12397	18
DRD4/12-R	CGGCTCACCTCGGAGTAGA	L12397	19
DRD4/13-F	GGGGGCGTGCTGCTCATC	L12397	18
DRD4/13-R	CGGCTCACCTCGGAGTAGA	L12397	19
DRD4/48-F	GCCCGCTCATGCTGCTGCTC	L12398	20
DRD4/48-R	TCTTGGCACGCGCCTCCTG	L12398	20
HT2A/1438-1R	CAAGGTAGCAACAGCCAGGAG	S78723	21
HT2A/1438-2F	CTGAGCCTATGTGGCCAATGT	S78723	21
HT2A/452-1F	CAAAGCAAGATGCCAAGACA	X57830	20
HT2A/452-1R	GGCATA <u>CAGATATGATCGTTGG</u>	X57830	22
HT2C/23-F	TTGGCCTATTGGTTTGGCAAT	X80763	21
HT2C/23-R	GTCTGGGAATTTGAAGCGTCCAC	X80763	23
HTT/in2-F	GTCAGTATCACAGGCTGCGAG	X76754	21
HTT/in2-R	CCTAGTCTTACGCCAGTG	X76754	18
HTT/prF	GGCGTTGCCGCTCTGAATGCC	X76753	21
HTT/pr-R	GAGGGACTGAGCTGGACAACCACG	X76753	24
MDR1/3435-F	TGTTTTCAGCTGCTTGATGG	M29445	20
MDR1/3435-R	AAGGCATGTATGTTGGCCTC	M29445	20

* F: Forwardprimer (Vorwärtsprimer); R: Reverseprimer (Rückwärtsprimer)

**6 bp overhang und mismatch (zur Erzeugung einer Enzymschnittstelle) fett und unterstrichen gekennzeichnet

***Primer für eine sequenzspezifische PCR: die zur polymorphen Stelle jeweils komplementäre Basen sind fett und unterstrichen gekennzeichnet

Konstruktion der Sondenpaare

Für das Gelingen einer Real-Time-PCR am LightCycler ist, neben der Auswahl geeigneter Primer, besonders die Auswahl geeigneter Sonden von großer Bedeutung. Die für die Konstruktion der Sondenpaare im Programm NukWork zugrunde liegenden Acc. No. sind in Tabelle 14 aufgeführt. Um bei der Schmelzkurvenanalyse eine gute Unterscheidung zwischen Wildtyp- und Mutationsallel zu erreichen, sollte die Temperaturverschiebung im Falle einer Basenfehlpaarung möglichst hoch (5-10 °C) sein (Landt, 2001).

Deshalb wurden die Sensorsonden so ausgewählt, dass sich die zu untersuchende polymorphe

Stelle möglichst zentral unter ihr befand. Im Falle ungleicher GC-Anteile auf beiden Seiten konnte sich die zur polymorphen Stelle komplementäre Base auch etwas mehr auf der GC-reichen Seite befinden. Die zentrale Position der zur polymorphen Stelle komplementären Base bezieht sich somit auf die Bindungsstärken. Die zur polymorphen Stelle komplementäre Base war mindestens 4 bp vom Sondenende entfernt.

Die Sensorsonde wurde möglichst so konstruiert, dass eine instabile Basenfehlpaarung bei Vorliegen der Mutation zustande kam. Statt einer Sonde mit G-T Basenfehlpaarung (ΔT_m etwa 2-4 °C), wurde, wenn möglich die Sensorsonde verwendet, die vollständig zum mutierten Allel oder zum anderen DNA-Strang komplementär war, wodurch anstelle der stabilen G-T Basenfehlpaarung eine instabile C-A Basenfehlpaarung (ΔT_m etwa 5-10 °C) entsteht (Bernard et al., 2001). Die empirisch ermittelte Stabilität von Basenpaarungen ist wie folgt: G-C > A-T > G-T \geq G-A > T-T \geq G-G A-A \geq C-C > C-T > C-A (Bernard et al., 2001). Da die Sondenlage durch die Mutation schon sehr genau vorgegeben ist und hinsichtlich der Sondensequenzen wichtige Design-Regeln beachtet werden mussten (siehe unten; Landt, 2001), war die Vermeidung einer G-T-Basenfehlpaarung nicht immer möglich.

Die Ankersonde (Anchorsonde) wurde komplementär zum gleichen DNA-Strang wie die Sensorsonde so konstruiert, dass sie eine um 5-10 °C höhere Schmelztemperatur besaß, als die über der polymorphen Stelle anlagernde Sensorsonde. Dadurch ist gewährleistet, dass bei der Aufnahme der Schmelzkurve die Anchorsonde fest an der Ziel DNA-Sequenz angelagert bleibt, während die Sensorsonde sich ablöst. Das Maximum einer abgeleiteten Schmelzkurve wird damit durch die T_m der Sensorsonde, bzw. die T_m -Verschiebung der Sensorsonde im Falle einer Basenfehlpaarung, bestimmt. Die T_m der Anchorsonde durfte aber auch nicht wesentlich höher als die Elongationstemperatur in der PCR sein, da durch das stabile Anlagern der Sonde an die zu vervielfältigende DNA, der Elongationsschritt in der PCR gestört würde.

Um eine gute Energieübertragung zwischen den Farbstoffen der beiden Proben zu gewährleisten, aber auch um eine gegenseitige sterische Behinderung der Farbstoffe zu verhindern, wurde eine Lücke zwischen Sensor- und Anchorsonde von ein bis zwei Basenpaaren gewählt.

Als Farbstoff für das 5'-Ende einer Sonde diente LC-Red 640, für das 3'-Ende der zugehörigen anderen Sonde Fluorescein, wobei immer die Enden die sich nebeneinander an die Ziel-DNA anlagerten markiert wurden. Der Farbstoff Fluorescein am 3'-Ende verhindert gleichzeitig eine Verlängerung der Sonde während der PCR, das 3'-Ende der LC-Red 640 markierten Sonde wurde aus diesem Grund mit Phosphat blockiert.

Bei der Auswahl der Sonden wurden repetitive Sequenzen, Palindrome, komplementäre Abschnitte innerhalb der Sonden und komplementäre Abschnitte zwischen den Sonden oder den Sonden und Primern vermieden. Komplementäre Abschnitte innerhalb der Sonden führen zu Ausbildung von Haarnadelstrukturen und stören das Anlagern an die Ziel-Sequenz (Konzentration der freien für das Annealing zur Verfügung stehenden Sonden sinkt). Komplementäre Abschnitte zwischen den beiden Sonden können zum Annealing führen, mit der Folge eines FRET zwischen den Sonden

unabhängig vom vorliegenden PCR Produkt (Störung der Schmelzkurvenanalyse). Komplementäre Abschnitte am 3'-Ende der Sonden und Primer können die Entstehung von Primer-Dimeren verursachen. Da die Lage der Sonden durch die Lage des zu untersuchenden Polymorphismus schon stark vorgegeben ist, kann jedoch nicht jede Sonde mit optimaler Basensequenz konstruiert werden.

Zur Überprüfung der SONDENSPEZIFITÄT für die zu untersuchende Gensequenz wurde ein BLAST-Alignment durchgeführt (siehe oben). Es wurde ferner mittels einer Suche nach SNPs in der SNP-Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) überprüft, dass die Sensorsonde auf keiner weiteren bekannten Mutation zu liegen kommt, da sonst die Spezifität für die zu untersuchende Mutation verloren geht (ΔT_m kann durch die weitere Mutation bedingt sein und bei gleicher Größe nicht von der ΔT_m der zu untersuchenden Mutation zu unterscheiden sein; Bernard et al., 2001).

Sonden für die Real-Time PCR

Die Sonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) als lyophilisiertes Pulver bezogen. Nach einer ersten Sichtkontrolle, bei der das Lyophilisat aus LCR-640 markierten Sonden blau, und das aus Fluorescein markierten Sonden gelb gefärbt sein musste, wurde der Inhalt der Röhren bei 14000 U/min für 1 min abzentrifugiert. Danach wurden den Sonden soviel steriles und pyrogen-freies Wasser zugegeben, dass eine 10 μ M Lösung entstand. Die Sonden wurden in ca. 15 min unter Lichtschutz durch mehrmaliges, vorsichtiges Umschwenken, in Lösung gebracht. Die gelösten Sonden wurden aliquotiert und bei -20°C bis zu ihrem Gebrauch aufbewahrt. Die in den Real-Time PCRs verwendeten Sonden sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Verwendete Sonden

Bezeichnung****	Modifikation 5'-Ende***	Sequenz (5'-XXX-3')*	Modifikation 3'-Ende	Acc. No.
C2D6/9sens		AGAGATGG <u>AGA</u> AGGTGAGA	Fluorescein	M33388
C2D6/9anch	LCR-640	TGGCTGCCACGGTGGGG	Phosphat	M33388
C1A2/1Fanch	LCR-640	GTAGATGGAGCTTAGTCTTTCTG GTATCCA	Phosphat	M31664
C1A2/1Fsens		GGGC <u>C</u> CAGGACGCAT	Fluorescein	M31664
C2C19/2anch		ATGCAATAATTTTCCCCTATCATT	Fluorescein	L31506
C2C19/2sens	LCR-640	ATTATTTCCC <u>G</u> GGAACCC	Phosphat	L31506
C2C19/3anch	LCR-640	GGTAAGGCCAAGTTTTTTGCTTCCTGA	Phosphat	L32982
C2C19/3sens		GTAAGCACCCCTG <u>G</u> ATCC	Fluorescein	L32982

Bezeichnung****	Modifikation 5'-Ende***	Sequenz (5'-XXX-3')*	Modifikation 3'-Ende	Acc. No.
C2C19/4anch		AGACAGAGCACAAGGACCACA	Fluorescein	L39097
C2C19/4sens	LCR-640	AAGGATCCA <u>T</u> GAAAGCCTTC	Phosphat	L39097
DRD3/9anch		GTTCTCTGCCCCACAGGTGTAGT	Fluorescein	U25441
DRD3/9sens	LCR-640	CAGGTGGCC <u>C</u> ACTCAGCT**	Phosphat	U25441
HT2A/1438anch		CTGGACACAAACACTGTTGGCTTTG	Fluorescein	S78723
HT2A/1438sens	LCR-640	ATGGAAGTGCC <u>A</u> GACACTCA**	Phosphat	S78723
HT2A/452anch		CCGTCGCTATTGTCTTTAGAAGCC	Fluorescein	X57830
HT2A/452sens	LCR-640	TTCAGAAT <u>G</u> CTGCTTTCCTA	Phosphat	X57830
MDR1/3435anch		GACAACAGCCGGGTGGTGTCA	Fluorescein	AC005068
MDR1/3435sens	LCR-640	GGAAGAGAT <u>C</u> GTGAGGGCAG	Phosphat	AC005068

*Die zur polymorphen Stelle komplementären Basen sind unterstrichen und fett gedruckt

**korrekte Basenpaarung mit mutierter Sequenz

***LCR-640 (LightCycler-Red-640)

****sens: Sensorsonde; anch: Anchorsonde

3.2.3.7 Optimierung der PCR-Bedingungen

Neben der Primer- und Sondensequenz beeinflussen noch zahlreiche andere Faktoren das Gelingen einer PCR. In methodischen Vorversuchen wurden deshalb die optimalen Primer-, Sonden-, Polymerasen-, Nukleotid- und MgCl₂-Konzentrationen ermittelt, und die Programme auf dem Thermo- bzw. LightCycler hinsichtlich Annealingtemperatur und -dauer sowie der Elongationszeit optimiert. Ließ sich mit diesen Parametern kein befriedigendes Ergebnis erzielen, kamen noch Reaktionsverstärker (Betaine = Trimethylglycin, enthalten in den MasterAmp Premixen A-L, Bovines Serum Albumin = BSA) und das Prinzip der Hot-Start-PCR zum Einsatz.

Betaine (Trimethylglycin) ist ein Zwitterion, das besonders die Stabilität GC-reicher DNA-Abschnitte durch Anlagerung an die DNA destabilisiert. Dadurch kann ein besseres Aufschmelzen der DNA-Templates und eine bessere Elongation durch die thermostabile Polymerase erreicht werden. Polymerasen zeigen teilweise auch die Eigenschaft sich an die Oberfläche von PCR-Tubes/Kapillaren anzulagern, wodurch die Effektivität der PCR sinkt. Durch Zugabe von BSA, das die Oberflächenstruktur abdeckt, kann dies verhindert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete LightCycler FastStart DNA Master Hybridisation Probes Mischung ist eine Reaktionsmischung für die Durchführung einer Hot-Start PCR. Bei der darin enthaltenen FastStart Taq DNA Polymerase sind bestimmte Aminosäurereste mit hitzelabilen Blockierungsgruppen versehen, die das Enzym bei Raumtemperatur inaktivieren. Im Reaktionsansatz findet somit bei Raumtemperatur, bei der die Primer unspezifisch an die DNA binden

können, keine Elongation statt, und die Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte wird unterdrückt. Die FastStart Taq DNA Polymerase wird erst durch Abspaltung der hitzelabilen Blockierungsgruppen bei hohen Temperaturen (z. B. Inkubation bei 95°C für 5-10 min) aktiviert. Die in den folgenden Kapiteln aufgeführten Methoden beschreiben letztendlich die optimierten PCR-Reaktionen.

3.2.4 Die Genotypisierungsmethoden

3.2.4.1 Cytochrom 1A2*1F Polymorphismus

Zur Genotypisierung des CYP1A2 *1F Polymorphismus (siehe auch Kapitel 1.4.7.1) wurde eine Methode am LightCycler etabliert (Popp et al., 2003). Die Primer (Vorwärtsprimer: C1A2/1F-F und Rückwärtsprimer C1A2/1F-R; siehe Tabelle 13) und Sonden (Anchorsonde: C1A2/1Fanch und C1A2/1Fsens; siehe Tabelle 14) wurden basierend auf der Gensequenz mit der Identifikationsnummer M31664 konstruiert und die Position und Länge hinsichtlich Spezifität, Schmelztemperaturen und möglicher Interaktionen zwischen den Oligonukleotiden optimiert. Die kürzere Sensorsonde liegt über der polymorphen Stelle und hat im Vergleich zur Anchorsonde eine um 4,3 °C niedrigere Schmelztemperatur. Die Schmelztemperatur beider Sonden liegt über der Annealingtemperatur der PCR, so dass am Ende der Annealingphase Fluoreszenzdetektion möglich ist und damit die Amplifikation in Echtzeit überwacht werden kann. Wenn die Sonden sich an die amplifizierte DNA anlagern sind sie durch eine Base voneinander getrennt. Dieser Abstand ermöglicht einen optimalen FRET zwischen den gegenüberliegenden Fluorophoren. In Vorversuchen mit Taq Polymerase als hitzestabile DNA-Polymerase kam es zu Oligomerenbildung zwischen den Sonden bzw. Primern und zur Bildung unspezifischer Amplifikationsprodukte, die in der abgeleiteten Schmelzkurve störende Peaks verursachten. Um die Entstehung dieser unspezifischen Amplifikationsprodukte zu verringern, wurde mit dem Einsatz der FastStart DNA Master Hybridisation Probes Mischung (Roche Diagnostics, Mannheim), das Prinzip einer Hot-Start PCR angewandt. Die Störpeaks in der Schmelzkurve und die Fehlbanden im Gellauf konnten damit eliminiert werden.

Nach dem Auftauen der bei -20 °C gelagerten Reagenzien wurden diese in der in Tabelle 15 aufgeführten Reihenfolge, und in einer für eine bestimmte Anzahl an Proben berechneten Menge, in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Cup pipettiert, kurz gevortext und abzentrifugiert.

Jeweils 19 µl der Stammlösung wurden mit einer Pipette in LightCycler Glaskapillaren übergeführt, die sich bereits im gekühlten LightCycler Rotor befanden und mit 1 µl Proben- oder Kontroll-DNA, bzw. mit 1 µl Wasser (Leerkontrolle), auf 20 µl ergänzt. Nach dem Verschließen der Glaskapillaren mit den dazugehörigen Kunststoffkappen, wurde der Rotor in die LC Carousel Centrifuge eingesetzt und die Ansätze bei 3000 U/min für 15 s abzentrifugiert. Durch das Abzentrifugieren wird laut Hersteller auch eine homogene Durchmischung des Ansatzes erreicht. Der Rotor wurde wieder entnommen und in den LightCycler eingesetzt. Die Amplifikation der Proben-DNA begann mit einem initialen Aktivierungsschritt bei 95 °C für 10 min, in dem die Polymerase durch Entfernen der

hitelabilen Blockierungsgruppen aktiviert wurde. Gleichzeitig erfolgte dabei eine Denaturierung der DNA-Doppelstränge. Danach wurden zur Amplifizierung der Ziel-Sequenz 35x folgende Zyklen durchlaufen: Denaturierung bei 95 °C für 10 s, Annealing bei 57 °C für 10 s und Elongation bei 72 °C für 20 s. Die Aufheiz- bzw. Abkühlgeschwindigkeit (ramp rate) betrug bei allen Zyklen 20 °C/s. Im Anschluss an die Amplifikation wurde die Schmelzkurve aufgezeichnet. Dazu wurden die Ansätze nach dem letzten Amplifikations-Zyklus mit einer Abkühlgeschwindigkeit von 20 °C/s auf 43 °C abgekühlt, und, nach Beibehaltung dieser Temperatur für 1 min, wieder langsam mit einer Aufwärmgeschwindigkeit von 0,1 °C/s bis 73 °C erwärmt. Während der langsamen Erwärmung wurde kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen und damit die Dissoziation der Sensorsonde vom Amplifikat bestimmt.

Tabelle 15: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des CYP1A2 *1F Polymorphismus

Reagenz	Menge (µl)	Konzentration	Endkonzentration
H ₂ O, steril	15,2		
MgCl ₂	0,8	25 mM	2 mM ¹
Vorwärtsprimer C1A2/1F-F	0,3	25 µM	375 nM
Rückwärtsprimer C1A2/1F-R	0,3	25 µM	375 nM
Sensorsonde C1A2/1Fsens	0,2	10 µM	100 nM
Anchorsonde C1A2/1Fanch	0,2	10 µM	100 nM
FastStart DNA Master Hybridisation Probes Mischung 10x	2	10x	1x
Summe	19		

¹ aus MgCl₂ der FastStart DNA Master Hybridisation Probes Mischung und der 25mM MgCl₂ -Lösung

Zum Ausschluss falsch positiver und falsch negativer Befunde wurde in jedem LC-Lauf eine Leerkontrolle (1 µl steriles Wasser in 19 µl PCR-Stammlösung) bzw. zwei Positivkontrollen (1 µl Wildtyp- und Mutanten-Kontroll-DNA in jeweils 19 µl PCR-Stammlösung) eingesetzt.

Zur Überprüfung der korrekten Genotypisierung durch die Methode am LightCycler, wurden die Amplifikationsprodukte von 101 Proben hinsichtlich ihrer Länge im Gellauf (1,5 % Agarosegel, 30 min Laufzeit bei 100 V, 5 µl Auftragsmenge) überprüft, und zusätzlich einem diagnostischen Verdau mit dem Enzym BstN I für 4 h bei 60 °C unterzogen. Dazu wurde die für eine bestimmte Anzahl an Proben berechnete Menge an Verdau-Stammlösung in der in Tabelle 16 angegebenen Reihenfolge in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Cup pipettiert und nach kurzem Vortexen zu je 10 µl auf sterile 1,5 ml Eppendorf Cups aufgeteilt. Zur Stammlösung wurden dann 10 µl des PCR Produktes gegeben und durch Auf- und Abpipettieren mit dieser homogen vermischt. Die Mischung wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und nach Verschließen der Cups zur Inkubation

bei 60 °C für 4 Stunden in das Wasserbad oder das Thermostat gegeben.

Tabelle 16: Stammlösung für den enzymatischen Verdau mit BstN I

Reagenz	Menge (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	7,4		
Puffer NEB2, 10x	2,0	500 mM NaCl 100 mM Tris-HCl 100 mM MgCl ₂ 10 mM Dithiothreitol	50 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM Dithiothreitol
BSA, 100x	0,2	10 mg/ml	2 µg/20 µl
Enzym BstN I	0,4	10000 U/ml	4 U/20 µl

¹ bezogen auf den kompletten Verdau-Ansatz

Nach der Entnahme aus dem Wasserbad wurden von jedem Verdau-Ansatz 5 µl entnommen, mit 1 µl Auftragspuffer vermischt und in die Geltaschen eines 1,5 %-igen Agarosegels (PeqGold Universalagarose) aufgetragen. Zur Längenkontrolle diente ein 50 bp Längenmarker (Invitrogen, Karlsruhe), die in einer separaten Spur auf jedem Gel mitlief. Nach 30-minütigem Gellauf bei 100 V wurden die Banden unter dem UV-Illuminator detektiert und photographisch dokumentiert.

3.2.4.2 *Cytochrom2C19 *2, *3 und *4 Polymorphismus*

Das Gen des Cytochroms CYP2C19 wurde auf das Vorliegen der drei Hauptpolymorphismen *2, *3, *4 überprüft (siehe auch Kapitel 1.4.7.2).

CYP2C19*2 Polymorphismus

Zur Genotypisierung des CYP2C19*2 Polymorphismus wurde eine Methode am LightCycler entwickelt. Die Primersequenzen (Vorwärtsprimer: C2C19/2-F; Rückwärtsprimer: C2C19/2-R; siehe Tabelle 13) wurden aus der Arbeit von de Morais et al. (1994a) übernommen, die Sonden (Anchorsonde: C2C19/2anch; Sensorsonde: C2C19/2sens) wurden basierend auf der Gensequenz mit der Identifikationsnummer L31506 konstruiert (siehe Tabelle 14). Die Schmelztemperaturen beider Sonden liegen über der Annealingtemperatur der PCR, so dass am Ende der Annealingphase Fluoreszenzdetektion möglich ist und damit die Amplifikation in Echtzeit überwacht werden kann. Wenn die Sonden sich an die amplifizierte DNA anlagern sind sie durch eine Base voneinander getrennt. Die Arbeitsschritte im Labor entsprechen denen, die unter der Methode am LightCycler für den CYP1A2*1F Polymorphismus bereits genauer beschrieben wurden. Die Stammlösung für die Untersuchung des CYP2C19*2 Polymorphismus am LightCycler ist in Tabelle 17 aufgeführt. Es wurde pro Ansatz 1 µl Proben-DNA-Extrakt verwendet.

Die Amplifikation begann mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 3 min, gefolgt von 40 Zyklen mit 10 s. Denaturierung bei 95 °C, 12 s Annealing bei 54 °C und 25 s Elongation bei

72 °C, mit einer Aufheiz- bzw. Abkühlgeschwindigkeit von jeweils 20 °C/s. Danach wurde zur Aufnahme der Schmelzkurve der Ansatz für 1 min bei 95 °C erhitzt, 1 min lang auf 42 °C abgekühlt, und danach mit einer Aufheizgeschwindigkeit von 0,1 °C/s bis auf 70 °C erwärmt.

Tabelle 17: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des CYP2C19*2 Polymorphismus

Reagenz	Menge (µl)	Konzentration	Endkonzentration
H ₂ O, steril	14,2		
MgCl ₂	1,6	25 mM	3 mM ¹
Vorwärtsprimer C2C19/2-F	0,4	25 µM	500 nM
Rückwärtsprimer C2C19/2-R	0,4	25 µM	500 nM
C2C19/2sens	0,2	10 µM	100 nM
C2C19/2anch	0,2	10 µM	100 nM
LightCycler-DNA Master Hybridisation Probes 10x	2	10x	1x
Summe	19		

¹ aus MgCl₂ der LightCycler-DNA Master Hybridisation Mischung und der 25mM MgCl₂-Lösung

In allen LC-Läufen erfolgte der Ausschluss falsch positiver und falsch negativer Befunde durch Einsatz von einer Leerkontrolle und zwei Positivkontrollen (WT, MT).

Die Validierung der Methode am LC erfolgte durch die Überprüfung der Länge des Amplifikationsproduktes von 85 Proben und drei bereits vorhandenen Kontrollproben (*1/*1-Genotyp, *1/*2-Genotyp, *2/*2-Genotyp) mittels Gellauf und durch zusätzlichen Verdau dieser Amplifikationsprodukte mit dem Enzym BstN I für 120 min bei 60 °C im Wasserbad. Dafür wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 10 µl der Verdau-Stammlösung versetzt. Der Reaktionsansatz für den Verdau entspricht bis auf der um 0,1 µl niedrigeren Menge des Enzyms und der entsprechend höheren Menge an Wasser, dem in Tabelle 16 aufgeführten.

Nach dem Verdau wurden die Restriktionsfragmente in 2 %-igem Agarosegel (PeqGold Agarose) bei 100 V für 30 min aufgetrennt. Die Auftragsmenge betrug jeweils 10 µl + 1 µl Auftragspuffer.

CYP2C19*3 Polymorphismus

Die Primersequenzen (Vorwärtsprimer: C2C19/3-F; Rückwärtsprimer: C2C19/3-R, siehe Tabelle 13) für die Genotypisierungsmethode zum Nachweis des CYP2C19*3 Polymorphismus am LightCycler wurden aus der Arbeit von de Morais (1994b) übernommen, die Sonden (Anchorsonde: C2C19/3anch; Sensorsonde: C2C19/3sens) basierend auf der Gensequenz mit der Identifikationsnummer L32982 entworfen (siehe Tabelle 14). Die Sensorsonde ist zur Wildtyp-Sequenz komplementär. Auch in diesem Ansatz liegen die Schmelztemperaturen beider Sonden über der Annealingtemperatur der PCR, so dass die Amplifikation in Echtzeit überwacht werden

kann. Die quantitative Zusammensetzung der Stammlösung für die Genotypisierung des CYP2C19*3 Polymorphismus am LightCycler ist entspricht der in Tabelle 17 aufgeführten. Es wurde pro Ansatz 1 µl DNA-Extrakt verwendet.

Nach initialer Denaturierung bei 95 °C für 3 min wurde die DNA in 40 Zyklen, jeweils bestehend aus Denaturierung bei 95 °C für 10 s, Annealing bei 50°C für 15 s, und Elongation bei 72 °C für 30 s vervielfältigt. Die Aufnahme der Schmelzkurve erfolgte durch Erwärmung der Ansätze von 50 °C auf 72 °C bei 0,1 °C/s Aufheizgeschwindigkeit.

In allen LC-Läufen erfolgte der Ausschluss falsch positiver und falsch negativer Befunde durch den Einsatz einer Leerkontrolle und zweier Positivkontrollen (*1/*3-Genotyp, *1/*1-Genotyp).

Zur Validierung der Methode wurde, wie bei der Detektionsmethode für den CYP2C19*2 Polymorphismus, das PCR-Produkt aus dem LC-Lauf von den beiden Kontrollproben und weiteren 85 Proben hinsichtlich seiner Länge überprüft und zusätzlich mit dem Enzym Hinf I für 120 min bei 37°C im Wasserbad verdaut. Dafür wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 10 µl der Verdau-Stammlösung versetzt. Der Reaktionsansatz für den Verdau ist in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Stammlösung für den enzymatischen Verdau mit Hinf I

Reagenz	Menge (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	7,7		
Puffer NEB2, 10x	2,0	500 mM NaCl 100 mM Tris-HCl 100 mM MgCl ₂ 10 mM Dithiothreitol	50 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM Dithiothreitol
Enzym Hinf I	0,3	10000 U/ml	3 U/20 µl

¹ bezogen auf den kompletten Verdau-Ansatz

Nach dem Verdau wurden die Restriktionsfragmente in 1,5 %-igem Agarosegel (PeqGold Agarose) bei 100 V für 30 min aufgetrennt. Die Auftragsmenge betrug jeweils 10 µl + 1 µl Auftragspuffer.

CYP2C19*4 Polymorphismus

Zur Detektion des CYP2C19*4 Polymorphismus auf dem LightCycler wurden der Vorwärtsprimer (C2C19/4-F2) und die beiden Sonden (Anchorsonde: C2C19/4anch, Sensorsonde: C2C19/4sens) basierend auf der Gensequenz mit der Identifikationsnummer L39097 entworfen (siehe Tabelle 13 und Tabelle 14). Die Sequenz des Rückwärtsprimers (C2C19-4-R) entstammt der Publikation von Ferguson et al. (1998). Der Vorwärtsprimer aus dieser Publikation (C2C19/4-F) hat einen 5'-overhang aus 6bp und ein 1bp mismatch (jeweils fett und unterstrichen in Tabelle 13). Er ist für die Real-Time PCR nicht gut geeignet, da sein 3'-Ende direkt zur polymorphen Stelle benachbart ist, und er somit mit einer Sensorsonde, die auf dem gleichen DNA-Strang bindet, überlappen würde, oder mit einer solchen, die auf dem Gegenstrang bindet, zu großen Teilen komplementär wäre (9

Basen am 3'-Ende wären komplementär zur hier verwendeten Sensorsonde). Dieser Primer kam lediglich zur Validierung der LightCycler-Methode mit Hilfe der konventionellen PCR nach Ferguson et al. (1998) zum Einsatz (siehe unten).

Der Reaktionsansatz für die Genotypisierung am LightCycler unterscheidet sich nur durch die entsprechenden Sonden und Primer von dem für die Detektion des CYP2C19 *2 und *3 Polymorphismus (siehe Tabelle 17).

Zur Amplifikation der Ziel-Sequenz wurde nach einer initialen Denaturierung für 3 min bei 95 °C 38-mal folgender Zyklus durchlaufen: Denaturierung bei 95 °C für 10 s, Annealing bei 55 °C für 15 s und Elongation bei 72 °C für 27 s. Die Aufnahme der Schmelzkurve erfolgte durch kontinuierliche Temperaturerhöhung der Ansätze von 50 °C auf 72 °C bei 0,1 °C/s Aufheizgeschwindigkeit.

Der Ausschluss falsch positiver und negativer Befunde erfolgte, wie bei den oben genannten Methoden zur Detektion des CYP2C19 *2 und *3 Polymorphismus, durch den Einsatz von einer Leerkontrolle und von zwei Positivkontrollen (*1/*1-Genotyp, *1/*4-Genotyp) in jedem LC-Lauf.

Die Validierung der Methode am LightCycler erfolgte durch Vergleich der Ergebnisse der Genotypisierung der beiden Kontrollproben und weiterer 85 Patienten-Proben mit denen einer bereits publizierten Methode am Thermocycler (Ferguson et al., 1998) für die gleichen Proben. Die Stammlösung für die konventionelle PCR ist in Tabelle 19 aufgeführt. Es wurde 1 µl DNA eingesetzt.

Tabelle 19: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des CYP2C19*4 Polymorphismus

Reagenz	Menge (µl)	Konzentration	Endkonzentration
H ₂ O, steril	20,9		
MgCl ₂	-	-	3 mM ¹
Vorwärtsprimer C2C19/3-F	0,25	25 µM	250 nM
Rückwärtsprimer C2C19/3-R	0,25	25 µM	250 nM
Incubation Mix (Taq Polymerase mit MgCl ₂) 10x	2,5	10x	1x
dNTP-Mix	0,1	5 mM	20 µM
Summe	24		

¹ aus Incubation Mix

Im Anschluss an die PCR wurden jeweils 10 µl PCR-Produkt mit 10 µl Verdau-Stammlösung (siehe Tabelle 20) für 120 min bei 37 °C versetzt.

Die Restriktionsfragmente wurden anschließend in 2 %-igem Agarosegel (PeqGold Agarose) für 30 min bei 100 V aufgetrennt. Die Auftragsmenge betrug 10 µl + 1 µl Auftragspuffer.

Tabelle 20: Stammlösung für den enzymatischen Verdau mit Pst I

Reagenz	Menge (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	7,7		
Puffer NEB3, 10x	2,0	1000 mM NaCl 500 mM Tris-HCl 100 mM MgCl ₂ 10 mM Dithiothreitol	100 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM Dithiothreitol
Enzym Pst I	0,3	10000 U/ml	3 U/20 µl
Summe	10		

¹ bezogen auf den kompletten Verdau-Ansatz

Die Restriktionsfragmente wurden anschließend in 2 %-igem Agarosegel (PeqGold Agarose) für 30 min bei 100 V aufgetrennt. Die Auftragsmenge betrug 10 µl + 1 µl Auftragspuffer.

3.2.4.3 Cytochrom 2D6*9 Polymorphismus

Im Jahr 1991 fand Tyndale et al. (1991) eine Mutation im Gen des Cytochroms 2D6, die durch eine Deletion von 3 bp im Exon 5 gekennzeichnet ist. Das entsprechende Enzym, dem die Aminosäure Lysin an der Position 281 fehlt, hat eine reduzierte metabolische Aktivität (Broly et al., 1993). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur die Genotypisierungsmethode zum Nachweis des CYP2D6*9 Polymorphismus entwickelt. Eine Untersuchung des Polymorphismus im Rahmen der Studie erfolgte nicht. Die beiden Primer (Vorwärtsprimer: C2D6/9-F, Rückwärtsprimer: C2D6/9-R) und die Sonden (Anchorsonde: C2D6/9anch, Sensorsonde: C2D6/9sens) wurden basierend auf der Gensequenz mit der Identifikationsnummer M33388 entworfen (siehe Tabelle 13 und Tabelle 14). Die Sequenz der Sensorsonde ist vollständig komplementär zur Wildtyp-Sequenz und lagert sich so an die DNA an, dass die polymorphen Nucleotide genau zentral bedeckt werden (entsprechende Nucleotide sind in der Tabelle 14 unterstrichen und fett dargestellt). Fehlen die 3 Nucleotide in der DNA bzw. dem Amplifikationsprodukt, so bilden die entsprechenden Nucleotide in der Sonde eine Art Schleife und destabilisieren die Anlagerung der Sensorsonde sehr stark. Die starke Destabilisierung führt zu einer großen Verschiebung der Schmelztemperatur. Die Anchorsonde hat eine um ca. 11 °C höhere Schmelztemperatur als die Sensorsonde, wodurch gewährleistet ist, dass die Abnahme des Fluoreszenzsignals während der Schmelzkurve nur durch die Ablösung der Sensorsonde von der DNA bedingt ist. Bei der Auswahl der Sonden wurde besonders darauf geachtet, dass diese nicht zusätzlich auf einer weiteren der zahlreichen Mutationen im CYP2D6 Gen zu liegen kamen. Zur Steigerung der Sensitivität und Spezifität der Genotypisierung für das CYP2D6 Gen, wurde dem LightCycler-Lauf eine PCR mit CYP2D6 spezifischen Primern vorgeschaltet (verschachtelte PCR, nested PCR), wie sie von Stüven bereits publiziert wurde (Stüven et al., 1996). Die korrekte Amplifikation in der nested PCR wurde durch Gelelektrophorese

mit 0,7-%igem Agarosegel bei 100V Spannung und 30 min Laufzeit überprüft. 10 µl des Amplikons wurden mit 40 µl sterilem und pyrogenfreiem Wasser verdünnt (Verdünnung 1:5), und 1 µl davon als Template für die nachfolgende Echtzeit-PCR am LightCycler verwendet. Die Stammlösung für den LightCycler-Ansatz ist in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des CYP2D6*9 Polymorphismus

Reagenz	Menge (µl)	Konzentration	Endkonzentration
H ₂ O, steril	14,8		
MgCl ₂	0,4	25 mM	3 mM ¹
Vorwärtsprimer C2D6/9-F	0,6	25 µM	750 nM
Rückwärtsprimer C2D6/9-R	0,6	25 µM	750 nM
C2D6/9sens	0,3	10 µM	150 nM
C2D6/9anch	0,3	10 µM	150 nM
LightCycler-DNA Master Hybridisation Probes Mischung 10x	2	10x	1x
Summe	19		

¹ aus MgCl₂ der LightCycler-DNA Master Hybridisation Probes Mischung und der 25mM MgCl₂-Lösung

Nach Denaturierung bei 95 °C für 3 min wurde die DNA in 40 Zyklen, jeweils bestehend aus Denaturierung bei 95 °C für 10 s, Annealing bei 50 °C für 15 s, und Elongation bei 72 °C für 30 s vervielfältigt. Die Aufnahme der Schmelzkurve erfolgte durch Erwärmung der Ansätze von 50 °C auf 72 °C bei 0,1 °C/s Aufheizgeschwindigkeit.

Die Validierung der Methode am LC erfolgte durch Genotypisierung von 14 Kontrollproben (9x heterozygot für das *9-Allel, 5x WT), die von Prof. Peter J. Wedlund, Division of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Kentucky and UK Mental Health Research Center at Eastern State Hospital, Lexington, KY 40536, freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden. Das Amplifikationsprodukt aus der PCR am LC wurde hinsichtlich seiner Länge zusätzlich durch Gelelektrophorese (1,5%-iges Agarosegel, 30 min bei 100 V, 5 µl Auftragsmenge) überprüft und mit der theoretischen, in NukWork berechneten Länge verglichen.

3.2.4.4 DRD2 -141C Ins/Del Polymorphismus

Die Methode zur Untersuchung des DRD2 –141C Ins/Del Polymorphismus basiert auf einer von Arinami et al. (1997) entwickelten PCR. Die verwendeten Primersequenzen (Vorwärtsprimer: DRD2/141-F; Rückwärtsprimer:DRD2/141-R; siehe Tabelle 13) wurden aus der Arbeit von Arinami et al. (1997) übernommen, die Reaktionsbedingungen in Vorversuchen optimiert. Die Vorgehensweise bei der PCR zur Detektion des D2 –141C Ins/Del Polymorphismus am Thermo-

cycler wird im folgenden exemplarisch für alle anderen PCRs am Thermocycler ausführlich erläutert.

Nach dem Auftauen der Reagenzien wurden diese in der in Tabelle 22 aufgeführten Reihenfolge, und in einer für eine bestimmte Anzahl von zu untersuchenden Proben berechneten Menge, in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Cup pipettiert. Vor Zugabe der tiefgekühlten (-20°C) Taq Polymerase wurden die Bestandteile auf dem Vortexer kurz gemischt und dann abzentrifugiert. Die Taq Polymerase wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit den anderen Komponenten vermischt und der Ansatz erneut abzentrifugiert. Von der Stammlösung wurden dann je 19 µl in sterile, vorher mit der Patientenummer beschriftete, 200 µl Eppendorf Cups pipettiert. Nach Zugabe von 1 µl der entsprechenden DNA, bzw. der gleichen Menge an sterilem Wasser (Leerkontrolle), wurden die Ansätze mit jeweils einem Tropfen Mineralöl bedeckt, um eine Kondensation von Wasser an der Gefäßwand während der PCR zu vermeiden, und dann unverzüglich in den GeneAmp Thermocycler gegeben. Diese Arbeitsschritte wurden analog auch bei den weiteren PCRs am Thermocycler durchgeführt.

Tabelle 22: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des DRD2 -141C Ins/Del Polymorphismus

Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration
H ₂ O, steril	8,1		
Premix D, 2x	10	100 mM Tris-HCl 100 mM KCl je 400 µM dNTP MgCl ₂ 3,0 mM MasterAmp PCR Enhancer 4x ²	50 mM 50 mM je 200 µM dNTP MgCl ₂ 1,5 mM MasterAmp PCR Enhancer 2x ²
Vorwärtsprimer D2/141-F	0,3	25 µM	375 nM
Rückwärtsprimer D2/141-R-	0,3	25 µM	375 nM
Taq-Polymerase	0,3	5 U/µl	1,5 U/20 µl
Summe	19		

² enthält Betaine (Trimethylglycin)

Die Amplifikationsreaktion begann mit einer initialen Denaturierung für 3 min bei 94°C, gefolgt von 40 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 94°C, 20 s Annealing bei 71°C und 30 s Elongation bei 72°C. Die abschließende Elongation dauerte 5 min. Zur Feststellung von Verunreinigungen und der korrekten Amplifikation dienten in jedem PCR-Lauf eine Leerkontrolle bzw. zwei Positivkontrollen (Wildtyp- und heterozygote Kontrolle).

Zur Unterscheidung der Allele wurde anschließend an die PCR mit dem Amplifikationsprodukt ein

Restriktionsverdau durchgeführt. Dabei wurde analog zur Methode von Arinami et al. (1997) das Enzym BstN I verwendet. Das Enzym BstN I erkennt und schneidet nur DNA mit dem polymorphen Cytidin (C Ins-Allel) nicht jedoch beim Vorliegen des C Del-Allels.

10 µl des PCR-Produktes wurden für den Restriktionsverdau aus dem 200 µl Röhrchen entnommen und in einem sterilen 1,5 ml Eppendorf Cup mit 10 µl der Verdau-Stammlösung vermischt. Die Stammlösung weicht nur durch die erhöhte Menge an BstN I (1 µl pro Ansatz) und die entsprechend niedrigere Menge an Wasser (6,8 µl pro Ansatz) von der in Tabelle 16 dargestellten ab. Die Mischung wurde dann mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt, um ein Verdunsten des Wassers und die Kondensation am Deckel des Röhrchens zu vermeiden (Konzentrationsveränderung im Verdau-Ansatz). Der Ansatz wurde für 4 h bei 60°C inkubiert. Anschließend wurden 10 µl aus dem Ansatz entnommen, mit 2 µl Gellade-Puffer vermischt, und die Mischung dann auf ein 2%-iges Agarose-Gel (PeqGold Agarose) aufgetragen. Zur Identifizierung der Länge der verdauten Amplifikationsprodukte lief auf den Gelen jeweils ein Marker, dessen Banden einen Abstand von 100 bp hatten, auf einer separaten Spur mit. Die Elektrophorese dauerte 30 min und wurde bei einer Spannung von 100 V durchgeführt. Zur Dokumentation der Banden wurde ein Polaroid-Foto angefertigt.

3.2.4.5 DRD2 TaqI Polymorphismus

Zur Detektion des TaqI Polymorphismus (siehe auch Kapitel 1.4.4.2) wurde die Methode von Grandy et al. (1993) auf das GeneAmp PCR System 9700 adaptiert. Die Primersequenzen wurden modifiziert (siehe Tabelle 13). Der Vorwärtsprimer (DRD2/Taq-F) wurde am 5'-Ende um die Sequenz CCGTCG verkürzt und am 3'-Ende um A verlängert. Der Rückwärtsprimer (DRD2/Taq-R) wurde an seinem 5'-Ende um die Sequenz CCGTCGA verkürzt und an seinem 3'-Ende um ACC verlängert. Dadurch konnte eine Fehlbande, die bei der Methode nach Grandy et al. (1993) bei 650 bp auftrat eliminiert werden. Der Reaktionsansatz für die PCR setzt sich aus 19 µl der Stammlösung (siehe Tabelle 23) und 1 µl DNA-Extrakt zusammen. Das Vorgehen bei der Durchführung der PCR am Thermocycler entspricht dem bereits ausführlich beschriebenen Vorgehen bei der Genotypisierung des DRD2-141C Ins/Del Polymorphismus.

Die DNA wurde mit dem folgenden Programm amplifiziert: Initiale Denaturierung für 5 min bei 94°C, gefolgt von 35 Zyklen aus 30 s Denaturierung bei 94°C, 25 s Annealing bei 58°C und 30 s Elongation bei 72°C, und einem terminalen Elongationsschritt von 2 min bei 72°C.

Zum Nachweis der Allele wurde 10 µl des PCR-Produktes nach der Amplifikation in einem sterilen 1,5 ml Eppendorf Cup mit 10 µl der Verdau-Stammlösung (siehe Tabelle 24) versetzt.

Die Inkubation des Verdau-Ansatzes erfolgte bei 65°C im Wasserbad für 4 Stunden. Die Spaltprodukte wurden in 1,5%-igem Agarosegel für 30 min bei 100 V aufgetrennt (Auftragsmenge 7 µl PCR-Produkt + 1 µl Auftragspuffer), in der Photokammer detektiert und photographisch dokumentiert.

Tabelle 23: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des DRD2 TaqI Polymorphismus

Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration
H ₂ O, steril	7,9		
Premix D, 2x	10	100 mM Tris-HCl 100 mM KCl je 400 µM dNTP MgCl ₂ 3,0 mM MasterAmp PCR Enhancer 4x ¹	50 mM 50 mM je 200 µM dNTP MgCl ₂ 1,5 mM MasterAmp PCR Enhancer 2x ¹
Vorwärtsprimer DRD2/Taq-F	0,4	25 µM	500 nM
Rückwärtsprimer DRD2/Taq-R	0,4	25 µM	500 nM
Taq-Polymerase	0,3	5 U/µl	1,5 U/20 µl
Summe	19		

¹ enthält Betaine (Trimethylglycin)

Tabelle 24: Stammlösung für den enzymatischen Verdau mit TaqI

Reagenz	Menge (µl)	Konzentration	Endkonzentration
H ₂ O, steril	7,4		
TaqI Puffer 10x	2	1000mM NaCl 100 mM Tris-HCl 100 mM MgCl ₂	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂
BSA 100x	0,2	10 mg/ml	2 µg/20 µl
Enzym Taq ^o I	0,4	20000 U/ml	8 U/20 µl
Summe	10		

3.2.4.6 DRD2 Ser311Cys Polymorphismus

Zur Detektion des DRD2 Ser311Cys Polymorphismus (siehe auch 1.4.4.3) kam eine sequenz-spezifische PCR zum Einsatz. Der Vorwärtsprimer (DRD2/311-F) und die sequenzspezifischen Rückwärtsprimer (DRD2/Ser311 und DRD2/Cys311; siehe Tabelle 13) wurden aus der Arbeit von Ito-kawa et al. (1993) übernommen. Die Reaktionsbedingungen wurden in Vorversuchen optimiert. Zur Genotypisierung des DRD2 Ser311Cys Polymorphismus wurden zwei Ansätze gemacht. Jeder Ansatz enthielt neben dem gemeinsamen Vorwärtsprimer den jeweils für die Wildtyp- oder Mutanten-DNA spezifischen Rückwärtsprimer. Die jeweils zur polymorphen Stelle komplementären

Basen der sequenzspezifischen Primer sind in Tabelle 13 fett und unterstrichen gekennzeichnet. Die Stammlösung für den Ansatz zur Detektion des Ser-Allels ist in Tabelle 25 aufgeführt. Pro Reaktionsansatz wurde 1 µl DNA verwendet.

Tabelle 25: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des Ser-Allels des DRD2 Ser311Cys Polymorphismus

Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration
H ₂ O, steril	7,9		
Premix D, 2x	10	100 mM Tris-HCl 100 mM KCl je 400 µM dNTP MgCl ₂ 3,0 mM MasterAmp PCR Enhancer 4x ¹	50 mM 50 mM je 200µM dNTP MgCl ₂ 1,5 mM MasterAmp PCR Enhancer 2x ¹
Vorwärtsprimer DRD2/311-F	0,4	25 µM	500 nM
Rückwärtsprimer DRD2/Ser311	0,4	25 µM	500 nM
Taq-Polymerase	0,3	5 U/µl	1,5 U/20µl
Summe	19		

¹ enthält Betaine (Trimethylglycin)

Die Stammlösung zur Detektion des Cys311-Allels weicht durch höhere Primermenge von je 0,6 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Sequenzspezifischer Rückwärtsprimer DRD2/Cys311) pro Ansatz und der entsprechend geringeren Menge an Wasser von der in Tabelle 25 aufgeführten ab. Die DNA beider Reaktionsansätze konnte in einem gemeinsamen PCR-Lauf amplifiziert werden, der wie folgt aussieht: Initiale Denaturierung für 3 min bei 94°C, gefolgt von 37 Zyklen mit je 45 s Denaturierung bei 94°C, 45 s Annealing bei 66°C und 45 s Elongation bei 72°C. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte durch Gelelektrophorese für 20 min bei 100 V unter Verwendung eines 1,5 %-igen Agarosegels (PeqGold). Die Auftragsmenge betrug 7 µl des PCR-Produktes aus der PCR zur Detektion des Ser311-Allels und 10 µl des PCR-Produktes aus der PCR zur Detektion des Ser311-Allels, gemischt mit jeweils 1 µl Auftragspuffer.

3.2.4.7 DRD3 Ser9Gly Polymorphismus

Zur Genotypisierung des DRD3 Ser9Gly Polymorphismus wurde eine Methode auf dem LightCycler etabliert. Die Primer (Vorwärtsprimer: DRD3/9-F und Rückwärtsprimer: DRD3/9-R) sind in Tabelle 13 dargestellt. Die Sonden (Anchorsonde: DRD3/9anch und Sensorsonde: DRD3/9sens; siehe Tabelle 14) wurden basierend auf der Gensequenz mit der Identifikationsnummer U25441 ausgewählt und die Position und Länge hinsichtlich Spezifität, Schmelztemperatur und möglicher

Interaktionen zwischen den Oligonukleotiden optimiert. Die kürzere Sensorsonde liegt über der polymorphen Stelle und ist vollständig komplementär zur DNA mit der Mutation. Die Schmelztemperatur beider Sonden liegt über der Annealingtemperatur der PCR, so dass am Ende der Annealingphase eines jeden Zyklus Fluoreszenzdetektion möglich ist und damit die Amplifikation in Echtzeit überwacht werden kann. Wenn die Sonden sich an die amplifizierte DNA anlagern, sind sie durch zwei Basen voneinander getrennt. Der Reaktionsansatz setzt sich zusammen aus 1 µl DNA-Extrakt und 19 µl Stammlösung (siehe Tabelle 26). Zur Vermeidung von unspezifischen Amplifikationsprodukten und von Oligomerenbildung wurde hier das Prinzip einer Hot-Start-PCR (siehe Kapitel 3.2.3.7) angewandt. Die Arbeitsschritte im Labor entsprechen denen, die unter der Methode zur Detektion des CYP1A2*1F Polymorphismus am LightCycler bereits genauer beschrieben wurden.

Tabelle 26: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des DRD3 Ser9Gly Polymorphismus

Reagenz	Menge (µl)	Konzentration	Endkonzentration
H ₂ O, steril	14		
MgCl ₂	1,6	25 mM	3 mM ¹
Vorwärtsprimer DRD3/9-F	0,4	25 µM	500 nM
Rückwärtsprimer DRD3/9-R	0,4	25 µM	500 nM
Sensorsonde DRD3/9sens	0,3	10 µM	150 nM
Anchorsonde DRD3/9anch	0,3	10 µM	150 nM
FastStart DNA Master Hybridisation Probes Mischung 10x	2	10x	1x
Summe	19		

¹ ergibt sich aus MgCl₂-Konzentration der FastStart DNA Master Hybridisation Probes Mischung und der 25mM MgCl₂-Lösung

Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95°C für 10 min, in dem die DNA denaturiert und die hitzelabilen Blockierungsgruppen der Polymerase entfernt werden, erfolgte die DNA Vervielfältigung in 37 Zyklen, jeweils bestehend aus Denaturierung bei 95°C für 10 s, Annealing bei 56°C für 18 s und Elongation bei 72°C für 45 s. Die Schmelzkurve wurde während einer langsamen Erwärmung der Ansätze (0,1°C/s Aufheizgeschwindigkeit) von 44°C auf 75°C aufgenommen.

In allen LC-Läufen erfolgte der Ausschluss falsch positiver und falsch negativer Befunde durch Einsatz einer Leerkontrolle und zweier Positivkontrollen (WT, MT).

Zur Validierung der Methode wurde das PCR-Produkt von 84 Proben zusätzlich mit dem Enzym Hae III für 180 min bei 37°C im Thermoblock (Thermostat 5310, Eppendorf, Hamburg) verdaut. Dazu wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 10 µl der Verdau-Stammlösung (7,4 µl H₂O, steril; 2 µl NEB2 Puffer 10x [siehe Tabelle 16]; 0,6 µl Enzym Hae III mit 10000 U/ml) versetzt.

Die Restriktionsfragmente wurden mit 1,5%-igem Agarosegel (PeqGold Agarose) für 30 min bei 100 V aufgetrennt. Die Auftragsmenge betrug 7 µl Verdau Ansatz, vermischt mit 1 µl Auftragspuffer.

3.2.4.8 DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus

Die Sequenz der Primer (Vorwärtsprimer: DRD4/12-F und Rückwärtsprimer: DRD4/12-R, siehe Tabelle 13) für die PCR zum Nachweis des DRD4 12bp Wiederholungspolymorphismus wurden aus der Arbeit von Catalano et al. (1993) übernommen und mit einer BLAST-Suche nochmals auf Spezifität für den D4-Rezeptor überprüft. Der Reaktionsansatz bestand aus 18,5 µl Stammlösung und 1,5 µl DNA.

Zur Amplifikation der Zielsequenz wurde nach einer initialen Denaturierung bei 94°C für 3 min, 35 mal folgender Zyklus durchlaufen: Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 57°C für 20 s und Elongation bei 72°C für 30 min, gefolgt von einer Schlusselongation bei 72°C für 3 min.

Der Gellauf zur Auftrennung der PCR Produkte erfolgte mit 2%-igem Agarosegel (MetaPhor Agarose, FMC BioProducts, Rockland, USA) für 70 min bei 100 V Spannung und einer Auftragsmenge von 9 µl.

Tabelle 27: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus

Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	7,3		
Premix D, 2x	10	100 mM Tris-HCl 100 mM KCl je 400 µM dNTP MgCl ₂ 3,0 mM MasterAmp PCR Enhancer 4x ¹	50 mM 50 mM je 200 µM dNTP MgCl ₂ 1,5 mM MasterAmp PCR Enhancer 2x ¹
Vorwärtsprimer DRD4/12-F	0,2	25 µM	250 nM
Rückwärtsprimer DRD4/12-F	0,2	25 µM	250 nM
Bovines Serum Albumin	0,5	20 mg/ml	10 µg/20 µl
Taq-Polymerase	0,3	5 U/µl	1,5 U/20 µl
Summe	18,5		

¹ enthält Betaine (Trimethylglycin)

Zur Überprüfung der korrekten Amplifikation und zum Ausschluss falsch positiver Ergebnisse wurden in jedem PCR-Lauf Positivkontrollen (heterozygot und Wildtyp) sowie eine Leerkontrolle verwendet.

3.2.4.9 DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus

Zur Detektion des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus wurden die Sequenzen der Primer aus der Veröffentlichung von Cohen et al. (1999) übernommen (Vorwärtsprimer: DRD4/48-F und Rückwärtsprimer: DRD4/48-R, siehe Tabelle 13) und hinsichtlich ihrer Sequenzspezifität durch BLAST-Suche überprüft. Die Reaktionsbedingungen wurden im Rahmen von Vorversuchen optimiert. Der endgültige Reaktionsansatz bestand aus 38,5 µl Stammlösung (siehe Tabelle 28) und 1,5 µl DNA-Extrakt.

Die Amplifikation begann mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 94°C für 3 min, gefolgt von 38 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94°C, 10 s Annealing bei 65°C und 40 s Elongation bei 72°C. Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (2% MetaPhor Agarose, FMC BioProducts, Rockland, USA) für 45 min bei 100 V und einer Auftragsmenge von 10 µl PCR-Produkt + 1 µl Auftragspuffer.

Zur Kontrolle der Länge der Amplifikationsprodukte wurde bei jeder Gelelektrophorese in einer separaten Spur ein Längenmarker, dessen Banden einen Abstand von 50 bp voneinander hatten, aufgetragen. Der Ausschluss von falsch-positiven und falsch-negativen Befunden erfolgte durch den Einsatz einer Leerkontrolle und vier Positivkontrollen (D4.2/4.3 heterozygote Kontrolle, D4.4 homozygote Kontrolle, D4.6/4.7 heterozygote Kontrolle D4.7/4.8 heterozygote Kontrolle). Die Banden wurden wie bereits beschrieben detektiert und dokumentiert.

Tabelle 28: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus

Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration
H ₂ O, steril	17,1		
Premix J, 2x	20	100 mM Tris-HCl 100 mM KCl je 400 µM dNTP MgCl ₂ 3,0 mM MasterAmp PCR Enhancer 8x ¹	50 mM 50 mM je 200 µM dNTP MgCl ₂ 1,5 mM MasterAmp PCR Enhancer 4x ¹
Vorwärtsprimer DRD4/48-F	0,5	25 µM	312,5 nM
Rückwärtsprimer DRD4/48-F	0,5	25 µM	312,5 nM
Taq-Polymerase	0,4	5 U/µl	2 U/40 µl
Summe	38,5		

¹ enthält Betaine (Trimethylglycin)

3.2.4.10 DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus

Zum Nachweis des DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus wurden die Primersequenzen aus der Arbeit von Nöthen et al. (1994) übernommen (Vorwärtsprimer: DRD4/13-F und Rückwärtsprimer: DRD4/13-R, siehe Tabelle 13) und auf Spezifität hin überprüft. Die durch Vorversuche optimierte Stammlösung unterscheidet sich von der zur Detektion des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus durch eine niedrigere Primerkonzentration (250 nM) und der geringeren Menge an eingesetzter Polymerase (0,3 µl pro Ansatz), bei entsprechen höherer Menge an Wasser. Der Reaktionsansatz setzte sich ebenfalls aus 38,5 µl Stammlösung und 1,5 µl DNA zusammen. Die Amplifikation begann mit einem initialen Denaturierungsschritt bei 94°C für 3 min, gefolgt von 35 Zyklen mit 30 s. Denaturierung bei 95°C, 10 s. Annealing bei 60°C und 20 s. Elongation bei 72°C. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch Gelelektrophorese mit 2%igem Agarosegel (MetaPhor Agarose) für 45 min bei 100 V. Die Auftragsmenge betrug 9 µl PCR-Produkt und 2 µl Auftragspuffer.

3.2.4.11 HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus

Zur Detektion des HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode am LightCycler etabliert. Die Primer (Vorwärtsprimer: HT2A/1438-2F und Rückwärtsprimer: HT2A/1438-1R, siehe Tabelle 13) und Sonden (Anchorsonde: HT2A/1438anch und Sensorsonde: HT2A/1438sens; siehe Tabelle 14) wurden basierend auf der Gensequenz mit der Identifikationsnummer S78723 konstruiert und die Position und Länge hinsichtlich Spezifität, Schmelztemperaturen und möglicher Interaktionen zwischen den Oligonukleotiden optimiert. Die kürzere Sensorsonde liegt über der polymorphen Stelle und hat im Vergleich zur Anchorsonde eine um 4,1°C niedrigere Schmelztemperatur. Sie wurde so konstruiert, dass sie sich vollständig komplementär an die mutierte Zielsequenz anlagert. Die Schmelztemperatur beider Sonden liegt über der Annealingtemperatur der PCR, so dass am Ende der Annealingphase Fluoreszenzdetektion möglich ist und damit die Amplifikation in Echtzeit überwacht werden kann. Wenn die Sonden sich an die amplifizierte DNA anlagern sind sie durch eine Base voneinander getrennt. Die Arbeitsschritte im Labor entsprechen denen, die unter der Methode am LightCycler für den CYP1A2*1F Polymorphismus bereits genauer beschrieben wurden. Die Stammlösung für die Untersuchung des HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus am LightCycler ist in Tabelle 29 aufgeführt. Es wurde pro Ansatz 1 µl DNA-Extrakt verwendet.

Die Amplifikation begann mit der initialen Denaturierung für 3 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen jeweils bestehend aus 10 s Denaturierung bei 95°C, 15 s Annealing bei 57°C und 28 s Elongation bei 72°C. Die Schmelzkurve wurde über einem Temperaturbereich von 44°C bis 70°C, bei einer Aufheizgeschwindigkeit von 0,1°C/s, aufgenommen.

Zum Ausschluss falsch positiver und falsch negativer Befunde wurde in jedem LC-Lauf eine Leerkontrolle (1 µl steriles Wasser in 19 µl PCR-Stammlösung) bzw. zwei Positivkontrollen (je 1 µl WT- und MT-Kontroll-DNA in jeweils 19 µl PCR-Stammlösung) eingesetzt.

Zur Validierung der Methode wurden 80 Patienten-Proben nach der PCR am LC einem Verdau mit dem Restriktionsenzym Msp I unterworfen. Dazu wurden 10 µl aus der PCR mit 10 µl der Verdau-Stammlösung (7,7 µl H₂O, steril; 2 µl NEB2 Puffer 10x [siehe Tabelle 16]; 0,3 µl Enzym Msp I mit 20000 U/ml) für 5 h bei 37°C im Thermostat 5310 (Eppendorf, Hamburg) inkubiert.

Die Restriktionsprodukte wurden dann auf einem 1,5%-igen Agarosegel für 30 min bei 100 V aufgetrennt und anschließend photographisch dokumentiert. Die Auftragsmenge betrug 8 µl PCR-Produkt und 1 µl Auftragspuffer.

Tabelle 29: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus

Reagenz	Menge (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	14,4		
MgCl ₂	0,8	25 mM	2 mM ²
Vorwärtsprimer HT2A/1438-2F	0,6	25 µM	750 nM
Rückwärtsprimer HT2A/1438-1R	0,6	25 µM	750 nM
HT2A/1438sens	0,3	10 µM	150 nM
HT2A/1438anch	0,3	10 µM	150 nM
LightCycler-DNA Master Hybridisation Probes 10x	2	10x	1x
Summe	19		

¹ Bezogen auf einen 20µl Ansatz bestehend aus Stammlösung und 1µl DNA

² aus MgCl₂-Konzentration der LightCycler-DNA Master Hybridisation Probes Mischung und der 25mM MgCl₂ -Lösung

3.2.4.12 HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus

Zum Nachweis des HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus wurde eine Methode auf dem LightCycler etabliert. Die Primer (Vorwärtsprimer: HT2A/452-1F und Rückwärtsprimer HT2A/452-1R; siehe Tabelle 13) und die Sonden (Anchorsonde: HT2A/452anch und Sensorsonde HT2A/452-1sens; siehe Tabelle 14) wurden basierend auf der Gensequenz mit der Identifikationsnummer X57830 nach den bereits beschriebenen Gesichtspunkten konstruiert. Die kürzere Sensorsonde ist so gewählt, dass sie sich vollständig komplementär an die Wildtypsequenz anlagert und hat eine um 6,9°C niedrigere Schmelztemperatur als die Anchorsonde. Die Amplifikation konnte hier nicht in Echtzeit überwacht werden, da die Schmelztemperatur der Sensorsonde unter der Annealingtemperatur der PCR lag. Wenn die Sonden sich an die amplifizierte DNA anlagern sind sie durch zwei Basen voneinander getrennt, wodurch FRET optimal stattfinden kann. Pro Ansatz wurden 1 µl DNA-Extrakt und 19 µl Stammlösung eingesetzt.

Die Amplifikationsreaktion begann mit einer initialen Denaturierung für 1,5 min bei 95°C, gefolgt von 36 Zyklen mit je 10 s Denaturierung bei 95°C, 10 s Annealing bei 62°C und 11 s Elongation bei

72°C. Die Aufnahme der Schmelzkurve erfolgte während der Erwärmung der Ansätze von 50°C auf 72°C bei 0,1°C/s Aufheizgeschwindigkeit.

Zum Ausschluss falsch positiver und falsch negativer Befunde wurde in jedem LC-Lauf eine Leerkontrolle (1 µl steriles Wasser in 19 µl PCR-Stammlösung) bzw. zwei Positivkontrollen (je 1 µl Kontroll-DNA homozygot für das Wildtyp-Allel oder homozygot für das mutierte Allel in jeweils 19 µl PCR-Stammlösung) eingesetzt.

Tabelle 30: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus

Reagenz	Menge (µl)	Konzentration	Endkonzentration
H ₂ O, steril	7,2		
Vorwärtsprimer HT2A/452-1F	0,2	25 µM	250 nM
Rückwärtsprimer HT2A/452-1R	0,2	25 µM	250 nM
Sensorsonde HT2A/452sens	0,3	10 µM	150 nM
Anchorsonde HT2A/452anch	0,3	10 µM	150 nM
Bovine Serum Albumin	0,5	20 mg/ml	10 µg/20 µl
Premix D 2x	10	100 mM Tris-HCl 100 mM KCl je 400 µM dNTP MgCl ₂ 3,0 mM MasterAmp PCR Enhancer 4x ¹	50 mM 50 mM je 200 µM dNTP MgCl ₂ 1,5 mM MasterAmp PCR Enhancer 2x ²
Taq DNA Polymerase	0,3	5U/µl	1,5 U/20 µl
Summe	19		

¹ enthält Betaine (Trimethylglycin)

Die Methode auf dem LightCycler wurde durch zusätzlichen Verdau des PCR-Produktes von 87 Patienten-Proben mit dem Enzym Bbv I validiert. Der Verdau-Ansatz bestand aus 10 µl PCR-Produkt aus dem LC-Lauf und 10 µl Stammlösung (7,0 µl H₂O, steril; 2 µl NEB2 Puffer 10x [siehe Tabelle 16]; 1,0 µl Enzym Bbv I mit 2000 U/ml).

Die Elektrophoresebedingungen waren die gleichen wie beim Gellauf zur Detektion des HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus.

3.2.4.13 HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus

Zum Aufbau einer Genotypisierungsmethode am Thermocycler mit anschließendem Restriktionsverdau wurde der Rückwärtsprimer (HT2C/23-R) aus der Arbeit von Lappalainen et al. (1995) übernommen und der Vorwärtsprimer (HT2C/23-F) aus dieser Arbeit, basierend auf der

Gensequenz mit der Identifikationsnummer X80763, an Position 18 abgewandelt (C anstelle von G) (siehe Tabelle 13). Der letztgenannte Primer enthält im Gegensatz zum originalen Vorwärtsprimer kein Mismatch an Position 18, um eine künstliche Erkennungsstelle für das Enzym Hinf I zu schaffen, das von Lappalainen et al. (1995) für den Restriktionsverdau verwendet wurde. Statt dessen wurde der Restriktionsverdau im Rahmen dieser Arbeit mit dem Enzym BsrD I durchgeführt. BsrD I erkennt die häufiger vorkommende Wildtyp-Sequenz und schneidet diese. Das mutierte Allel bleibt unverdaut. Pro Ansatz wurden 1 µl DNA-Extrakt und 19 µl Stammlösung eingesetzt.

Tabelle 31: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus

Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	7,9		
Premix D, 2x	10	100 mM Tris-HCl 100 mM KCl je 400 µM dNTP MgCl ₂ 3,0 mM MasterAmp PCR Enhancer 4x ²	50 mM 50 mM je 200 µM dNTP MgCl ₂ 1,5 mM MasterAmp PCR Enhancer 2x ²
Vorwärtsprimer HT2C/23-F	0,4	25 µM	500 nM
Rückwärtsprimer HT2C/23-R	0,4	25 µM	500 nM
Taq-Polymerase	0,3	5 U/µl	1,5 U
Summe	19		

¹ bezogen auf einen 20 µl Ansatz inklusive 1 µl DNA bzw. Wasser

² enthält Betaine (Trimethylglycin)

Nach Denaturierung bei 94°C für 5 min wurde die DNA in 38 Zyklen, jeweils bestehend aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 54°C für 30 s, Elongation bei 72°C für 30 s und einer terminalen Schlusselongation für 5 min bei 72°C vervielfältigt. Das Amplifikationsprodukt wurde anschließend an die PCR bei 60°C für 4 h im Wasserbad mit dem Enzym BsrD I verdaut. Der Verdau-Ansatz bestand aus 10 µl PCR-Produkt und 10 µl Stammlösung (7,7 µl H₂O, steril; 2 µl NEB2 Puffer 10x [siehe Tabelle 16]; 0,2 µl BSA mit 10 mg/ml; 1,5 µl Enzym BsrD I mit 2000 U/ml). Die Restriktionsprodukte wurden im Gellauf mit 2 %-igem Agarosegel (PeqGold Universalagarose) für 30 min bei 100 V aufgetrennt. Die Auftragsmenge betrug 8 µl Verdauprodukt und 1 µl Auftragspuffer.

3.2.4.14 HTTLPR Polymorphismus

Die Primer zur Detektion des HTTLPR Polymorphismus wurden aus der Arbeit von Heils et al. (1996) entnommen (Vorwärtsprimer: HTT/pr-F und Rückwärtsprimer HTT/pr-R; siehe Tabelle 13). Der optimierte Reaktionsansatz bestand aus 38,5 µl Stammlösung und 1,5 µl DNA-Extrakt bzw. Wasser (Leerkontrolle). Die Zusammensetzung der Stammlösung ist in Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des HTTLPR Polymorphismus

Reagenz	Volumen (µl)	Konzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	16,6		
Premix J, 2x	20	100 mM Tris-HCl 100 mM KCl je 400 µM dNTP MgCl ₂ 3,0 mM MasterAmp PCR Enhancer 8x ²	50 mM 50 mM je 200µM dNTP MgCl ₂ 1,5 mM MasterAmp PCR Enhancer 4x ²
Vorwärtsprimer HTT/prF	0,75	25 µM	469 nM
Rückwärtsprimer HTT/prR	0,75	25 µM	469 nM
Taq-Polymerase	0,4	5 U/µl	2 U
Summe	38,5		

¹ bezogen auf einen 40 µl Ansatz inklusive 1,5 µl DNA bzw. Wasser

² enthält Betaine (Trimethylglycin)

Nach initialer Denaturierung bei 94°C für 5 min wurde die DNA in 35 Zyklen, jeweils bestehend aus Denaturierung bei 95°C für 45 s, Annealing bei 61,5°C für 30 s, und Elongation bei 72°C für 1 min, vervielfältigt. Die Amplifikationsprodukte wurden auf einem 1,5%-igen Agarosegel (PeqGold Universalagarose) für 40 min bei 100 V aufgetrennt.

3.2.4.15 HTT-VNTR Polymorphismus

Zur Detektion des HTT-VNTR Polymorphismus wurde die Methode von Ogilvie et al. (1996) optimiert. Der Vorwärtsprimer (HTT/in2-F) entsprach in seiner Sequenz dem aus der Arbeit von Ogilvie et al. (1996), der Rückwärtsprimer (HTT/in2-R) wurde am 5'-Ende um die Nukleotidsequenz TGTT verkürzt und hinsichtlich der Spezifität für das HTT-Gen überprüft. Durch Verwendung des verkürzten Primers traten in den Vorversuchen weniger Nebenprodukte auf. Die Primersequenzen sind in Tabelle 13 dargestellt. Der Reaktionsansatz bestand aus 1 µl DNA und 19 µl Stammlösung (siehe Tabelle 33).

Die DNA wurde mit folgendem Programm am Thermocycler amplifiziert: Initiale Denaturierung für 5 min bei 94°C, gefolgt von 32 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Annealing bei 61°C,

und 30 s Elongation bei 72°C. Anschließend erfolgte noch eine Schlusselongation für 7 min bei 72°C. Die PCR Produkte wurden mit 2%igem Agarosegel (PeqGold Universalagarose) für 40 min bei 100 V aufgetrennt.

Tabelle 33: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des HTT-VNTR Polymorphismus

Reagenz	Volumen (µl)	Ausgangskonzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	7,9		
Premix J, 2x	10	100 mM Tris-HCl 100 mM KCl je 400 µM dNTP MgCl ₂ 3,0 mM MasterAmp PCR Enhancer 8x ²	50 mM 50 mM je 200 µM dNTP MgCl ₂ 1,5 mM MasterAmp PCR Enhancer 4x ²
Vorwärtsprimer HTT/in2-F	0,4	25 µM	500 nM
Rückwärtsprimer HTT/in2-R	0,4	25 µM	500 nM
Taq-Polymerase	0,3	5 U/µl	1,5 U
Summe	19		

¹ bezogen auf einen 20 µl Ansatz inklusive 1 µl DNA bzw. Wasser

² enthält Betaine (Trimethylglycin)

3.2.4.16 MDR1 C3435T Polymorphismus

Zum Nachweis der C3435T Mutation im Exon 35 des MDR-1 Gens wurden die Primer und Sonden aus der Arbeit von Nauck et al. (2000) übernommen (Vorwärtsprimer: MDR1/3435-F und Rückwärtsprimer MDR1/3435-R; Anchorsonde: MDR1/3435anch und Sensorsonde: MDR1/3435sens; siehe Tabelle 13 und Tabelle 14).

Der Reaktionsansatz und die PCR-Bedingungen wurden in Vorversuchen optimiert. Die Stammlösung für die Genotypisierung am LightCycler, zur der pro Reaktions-Ansatz 1 µl DNA-Extrakt gegeben wurde, ist in Tabelle 34 aufgeführt.

Nach initialer Denaturierung bei 95°C für 1 min wurde die DNA in 40 Zyklen, jeweils bestehend aus Denaturierung bei 95°C für 12 s, Annealing bei 55°C für 10 s, und Elongation bei 72°C für 10 s vervielfältigt. Die Aufnahme der Schmelzkurve erfolgte während der Erwärmung der Ansätze von 48°C auf 72°C bei 0,1°C/s Aufheizgeschwindigkeit.

Tabelle 34: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des MDR1 C3435T Polymorphismus

Reagenz	Menge (µl)	Ausgangskonzentration	Endkonzentration ¹
H ₂ O, steril	6,3		
MgCl ₂	1	25 mM	3,5 mM ²
Vorwärtsprimer MDR1/3435-F	0,2	25 µM	500 nM
Rückwärtsprimer MDR1/3435-R	0,2	25 µM	500 nM
MDR1/3435sens	0,15	10 µM	150 nM
MDR1/3435anch	0,15	10 µM	150 nM
LightCycler-DNA Master Hybridisation Probes (10x) Mischung	1	10x	1x
Summe	9		

¹ Bezogen auf einen 10 µl Ansatz bestehend aus Stammlösung und 1 µl DNA

² MgCl₂ aus der LightCycler-DNA Master Hybridisation Probes Mischung und der 25 mM MgCl₂ -Lösung

4 Ergebnisse

4.1 Methodik

4.1.1 Methodische Neuentwicklungen am LightCycler

4.1.1.1 Cytochrom 1A2*1F Polymorphismus

In den abgeleiteten Schmelzkurven zeigten homozygote Wildtyp-Proben (WT/WT, C/C) ein Maximum bei 61°C und Proben, homozygot für die Mutation (MT/MT, A/A), ein Maximum bei ca. 50,5°C. Heterozygote Proben (WT/MT, C/A) zeigten folglich beide Maxima. Die Leerkontrolle (LK) ist als Nulllinie zu erkennen (siehe Abbildung 5).

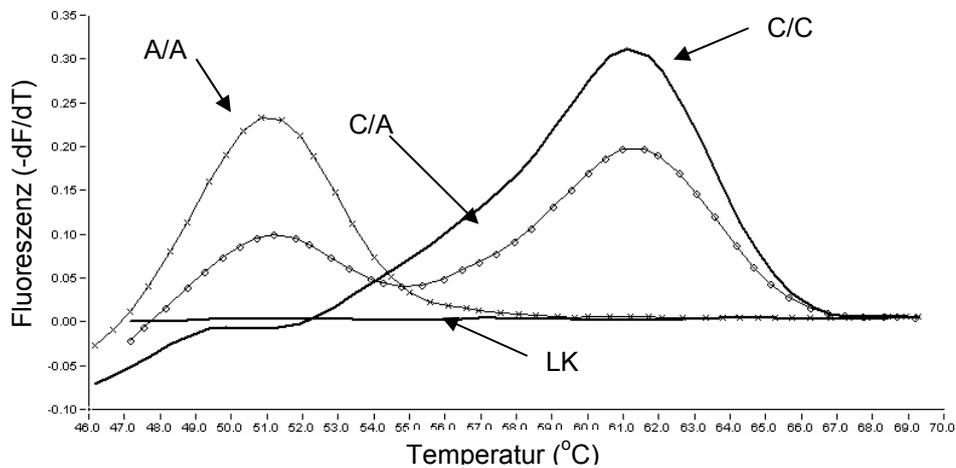
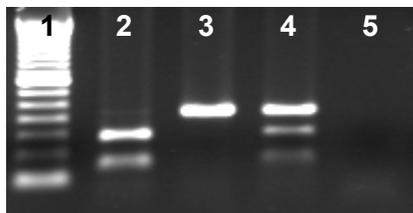


Abbildung 5: Schmelzkurven zur Darstellung des CYP1A2*1F Polymorphismus

Nach dem Verdau konnten in der Elektrophorese Banden mit folgender Länge nachgewiesen werden: 141 und 70 bp für das Wildtyp Allel, 211 bp für das mutierte Allel. Heterozygote Proben zeigten alle drei Banden, die Leerkontrolle weist keine Bande auf. Die Länge des PCR Produktes entsprach der im Programm NukWork errechneten (211 bp).



Spur 1: 50 bp Längenmarker
Spur 2: WT/WT (141 bp und 70 bp)
Spur 3: MT/MT (211 bp)
Spur 4: WT/MT (211bp, 141 bp, 70 bp)
Spur 5: Leerkontrolle

Abbildung 6: Gelelektrophorese zur Darstellung des CYP1A2*1F Polymorphismus

101 Patienten-Proben wurden parallel mit zwei Nachweis-Methoden (Bestimmung des Genotyps über Schmelzkurvenanalyse und über Restriktionsverdau mit anschließender Gelelektrophorese) untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine 100%-ige Übereinstimmung der ermittelten Genotypen. 6

Patienten hatten den C/C-Genotyp (WT), 41 den C/A-Genotyp (heterozygot, WT/MT) und 54 den A/A-Genotyp (MT/MT).

Die oben beschriebene Methode am LightCycler ermöglicht die simultane Genotypisierung von 32 Proben in ungefähr 60 min (inkl. Probenvorbereitung). Der LightCycler-Lauf mit anschließender Schmelzkurvenanalyse dauert etwa 41 min. Die Methode am LightCycler ist wesentlich einfacher und schneller durchzuführen, als bereits beschriebene konventionelle Methoden (Sachse et al., 1999).

Häufigkeiten der Allele und Genotypen in der Studienpopulation

Die Frequenz des C-Allels betrug in der gesamten Studienpopulation 28,4 %, die Frequenz des A-Allels 71,6 %. 10,3 % (30 von 292) der Patienten hatten den C/C-Genotyp, 36,3 % (106 von 292) den C/A-Genotyp und 53,4 % (156 von 292) den A/A-Genotyp. Die überwiegende Anzahl der Patienten war also Träger des mutierten, stärker induzierbaren Allels. Der χ^2 -Test bestätigt, dass sich die Genotypverteilung im Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg befindet ($\chi^2=3,381$, $df=2$, $p=0,184$). Die Allelfrequenzen sind mit denen, die bereits in anderen Studien mit Patienten kaukasischer Abstammung berichtet wurden, vergleichbar (Sachse et al., 1999).

4.1.1.2 Cytochrom 2C19*2, *3 und *4 Polymorphismus

Die verschiedenen CYP2C19 Allele zeigten in den abgeleiteten Schmelzkurven die in Tabelle 35 aufgeführten Maxima. Alle Allele können somit eindeutig identifiziert werden.

Tabelle 35: Schmelzkurvenmaxima der verschiedenen CYP2C19 Allele

Polymorphismus	Maximum Wildtyp-Allel	Maximum mutiertes Allel
*2	57°C	51°C
*3	64°C	57°C
*4	61°C	57°C

Die einzelnen Schmelzkurven zur Detektion der CYP2C19 Polymorphismen *2, *3 und *4 sind in Abbildung 7 zu sehen. Obwohl bei den Methoden zum Nachweis der CYP2C19 Polymorphismen die jeweilige Sensorsonde mit der mutierten Ziel-DNA ein relativ stabile G/T-Basenfehlpaarung bildet kommt es in den entsprechenden Schmelzkurven zu einer deutlichen Verschiebung der Schmelztemperatur um ca. 4-7°C.

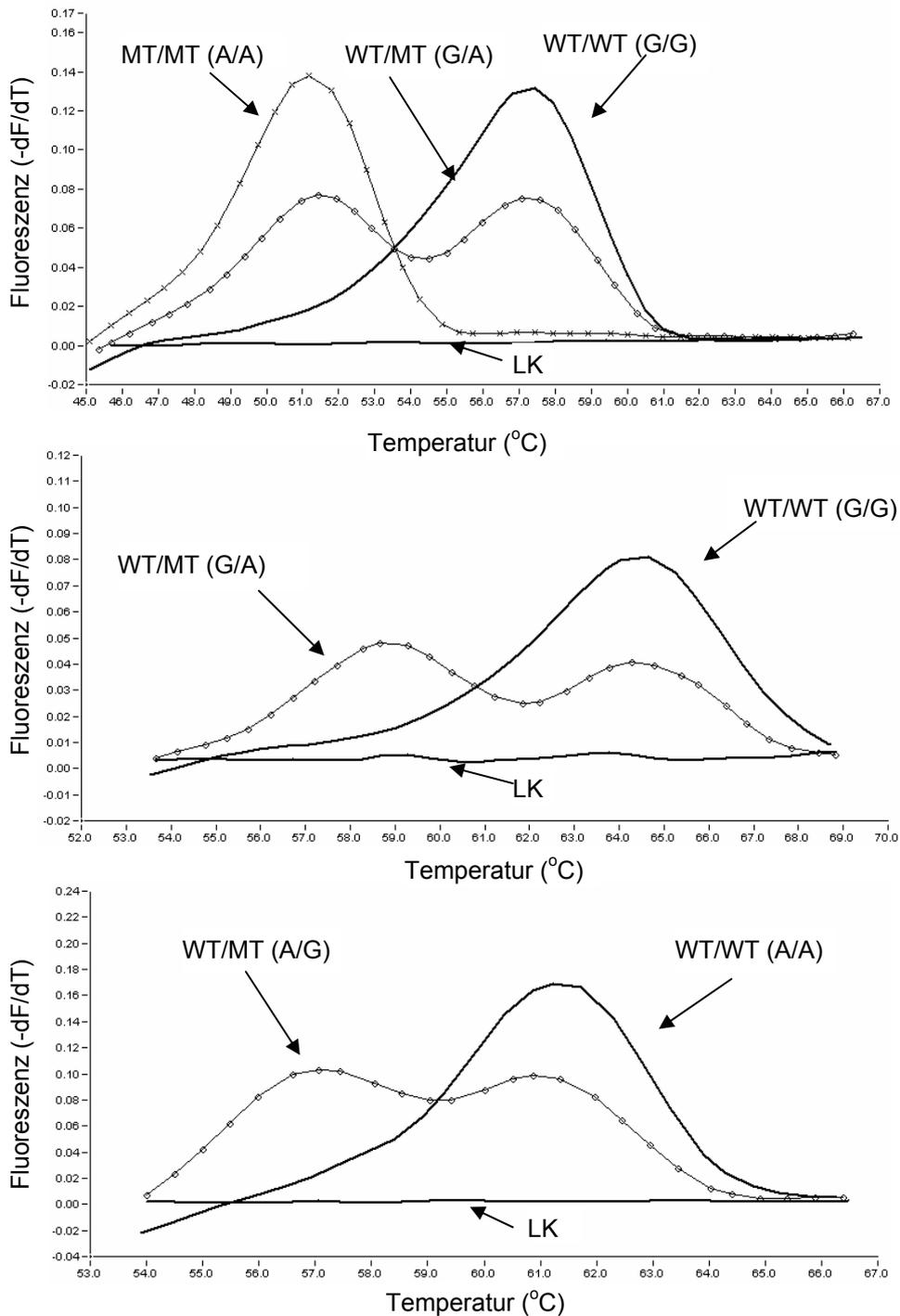


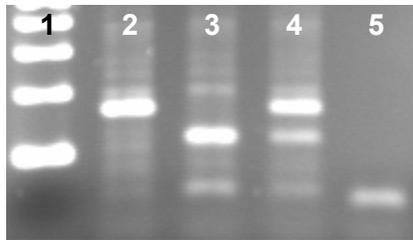
Abbildung 7: Schmelzkurven zur Darstellung des CYP2C9 *2 (oben), *3 (Mitte) und *4 (unten) Polymorphismus

Zur Validierung der LightCycler Methoden wurde mit dem Produkt aus der PCR am LC zusätzlich ein Restriktionsverdau durchgeführt (CYP2C9*2 und *3) oder parallel der Genotyp anhand einer konventionellen PCR mit anschließendem Restriktionsverdau bestimmt (CYP2C9 *4; nach Ferguson et al., 1998). In den anschließenden Gelelektrophoresen konnten die in Tabelle 36

aufgeführten Restriktionsfragmente nachgewiesen werden. Die Längen der Restriktionsfragmente und der PCR Produkte entsprachen den Berechnungen durch das Programm NukWork. Die Ergebnisse aus den LC Methoden stimmten zu 100 % mit denen aus dem Restriktionsverdau überein (*2: 58x *1/*1, 26x *1/*2 und 4x *2/*2;*3: 86x *1/*1 und 1x *1/*3;*4: 86x *1/*1 und 1x *1/*4).

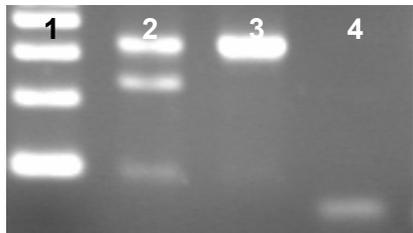
Tabelle 36: Länge der Restriktionsfragmente (bp) aus dem enzymatischen Verdau zum Nachweis der CYP2C19 Polymorphismen

Polymorphismus	Restriktionsfragmente Wildtyp (WT/WT)	Restriktionsfragmente Heterozygot (WT/MT)	Restriktionsfragmente Mutante (MT/MT)
*2	168	50, 118, 168	50, 118
*3	329	96, 233, 329	96, 233
*4	195	28, 167, 195	28, 167



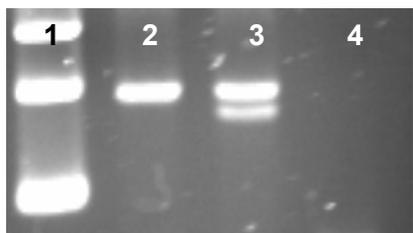
Spur 1: 100 bp Längenmarker
Spur 2: WT/WT (168 bp)
Spur 3: MT/MT(118 bp und 50 bp)
Spur 4: WT/MT (168 bp, 118 bp, 50 bp)
Spur 5: Leerkontrolle (Primer-Dimere sichtbar)

Abbildung 8: Gelelektrophorese zur Darstellung des CYP2C19*2 Polymorphismus



Spur 1: 100 bp Längenmarker
Spur 2: WT/MT (329 bp, 233 bp, 96 bp)
Spur 3: WT/WT (329 bp)
Spur 4: Leerkontrolle (Primer-Dimere sichtbar)

Abbildung 9: Gelelektrophorese zur Darstellung des CYP2C19*3 Polymorphismus



Spur 1: 100 bp Längenmarker
Spur 2: WT/WT (195 bp)
Spur 3: WT/MT (195 bp, 167 bp, die Bande bei 28 bp war im Gellauf nicht sichtbar)
Spur 4: Leerkontrolle

Abbildung 10: Gelelektrophorese zur Darstellung des CYP2C19*4 Polymorphismus

Mit den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methoden, kann die Genotypisierung hinsichtlich der drei CYP2C19 Polymorphismen, mit Vorbereitung der PCR, dem PCR-Lauf, und der Schmelzkurvenanalyse, in etwa 3 Stunden erfolgen. Herkömmliche Methoden (de Morais et al., 1994a; de Morais et al. 1994b; Ferguson et al., 1998) benötigen dazu mehr als einen Tag, unter der Annahme, das die PCR-Läufe nacheinander erfolgen müssen. Die Dauer der einzelnen

LightCycler-Läufe inklusive Schmelzkurvenanalyse beträgt ca. 41 min (*2), 46 min (*3) und 42 min (*4).

Häufigkeiten der Allele und Genotypen in der Studienpopulation

Das *1-Allel (=Wildtyp) war in der Studienpopulation mit 82,4 % (481 von 584) am häufigsten vertreten. Die Frequenz des *2-Allels betrug 17,1 % (100 von 584), die des *3-Allels (1 von 584) und des *4-Allels (2 von 584) 0,17 % bzw. 0,34 %. 68,2 % (199 von 292) der Patienten hatten zwei funktionelle Allele (EM, *1/*1), 28,4 % (83 von 292) der Patienten waren IM, mit nur einem funktionellen Allel (81x *1/*2, 2x *1/*4), und 3,4 % (10 von 292) der Patienten waren PM (9x *2/*2; 1x *2/*3). Die Allelfrequenzen liegen in den 95 % Konfidenzintervallen der Allelfrequenzen, die von Ferguson et al. (1998) an 173 gesunden Kaukasiern gefunden werden konnten (*2: 0,10-0,17, 95% CI; *3: 0,001-0,016, 95% CI; *4: 0,002-0,021, 95% CI), bzw. das *2-Allel liegt nur um 0,1% darüber. Auch die von Ferguson et al. (1998) angegebene Häufigkeit an PM in kaukasischer Bevölkerung von 2-5 % stimmt mit der Häufigkeit der PM (3,4 %) in der hier vorliegenden Studienpopulation überein.

4.1.1.3 Cytochrom 2D6*9 Polymorphismus

Die abgeleiteten Schmelzkurven zeigten bei Vorliegen des *9-Allels (Deletion der Nukleotide AGA) ein Maximum bei 38,5°C. Waren an der polymorphen Stelle die Nukleotide AGA vorhanden, so konnte in der abgeleiteten Schmelzkurve ein Maximum bei 53,5°C beobachtet werden (Abbildung 11). Die starke Verschiebung der Schmelztemperatur ist durch die starke Destabilisierung der Sondenbindung (Ausbildung einer Art Schleife in der Sonde) bei Vorliegen des *9-Allels bedingt.

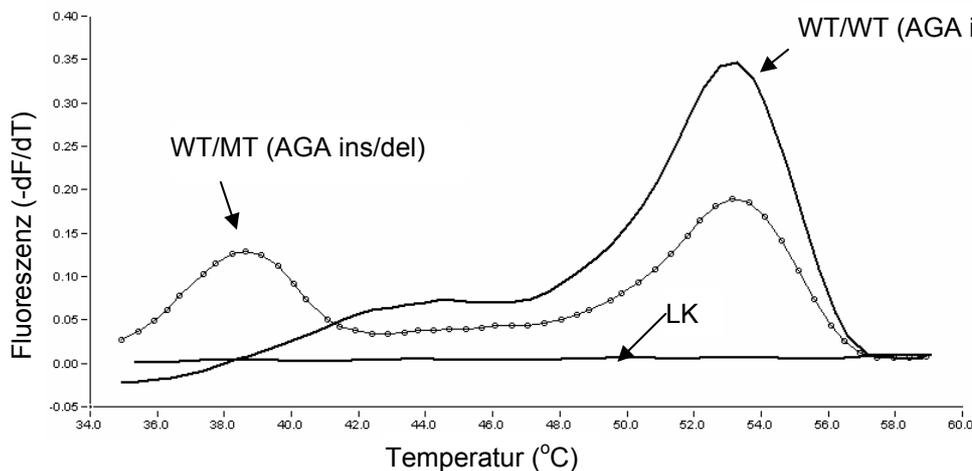


Abbildung 11: Schmelzkurven zur Darstellung des CYP2D6*9 Polymorphismus

Das in der Gelelektrophorese detektierte PCR Produkt hatte eine Länge von 581 bp. Diese stimmte mit den Berechnungen aus dem Programm NukWork überein. Alle Kontrollproben wurden vollständig korrekt genotypisiert (5x WT/WT, 15x WT/MT). Der gesamte LightCycler-Lauf dauert ca. 46 min.

4.1.1.4 DRD3 Ser9Gly Polymorphismus

In den abgeleiteten Schmelzkurven zeigte das Wildtyp-Allel (WT) ein Maximum bei 54°C und das mutierte Allel (MT) ein Maximum bei 65°C. Die beiden Allele können somit deutlich unterschieden werden. Heterozygote Proben-DNA zeigte in den Schmelzkurven beide Maxima. Der komplette LightCycler-Lauf ohne Probenvorbereitung, aber mit Genotyp-Detektion (Schmelzkurvenanalyse) benötigt ca. 62 min.

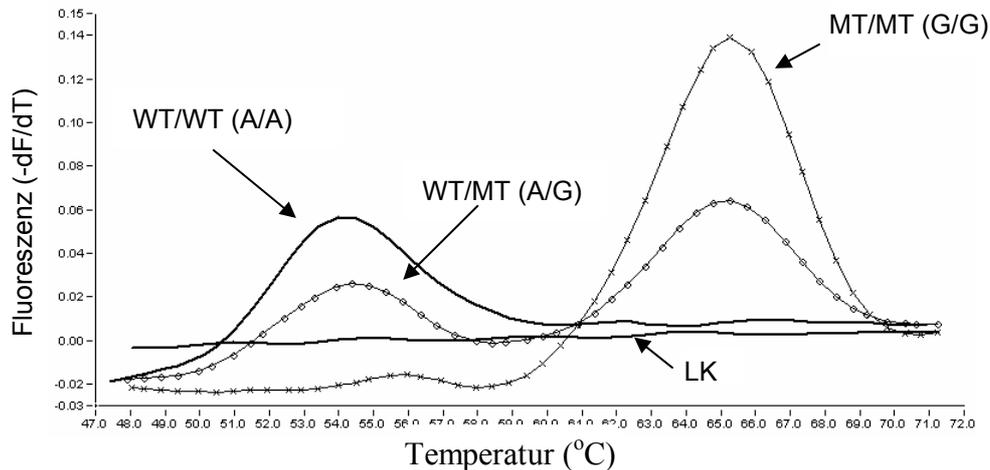
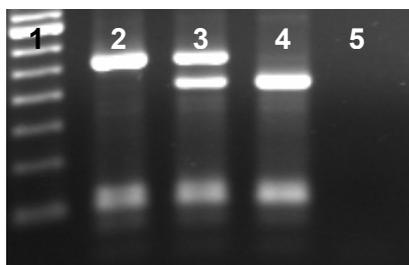


Abbildung 12: Schmelzkurven zur Darstellung des DRD3 Ser9Gly Polymorphismus

Beim Restriktionsverdau der LightCycler-Amplifikationsprodukte von 84 Patienten-Proben zur Validierung der Methode am LightCycler mit dem Enzym Hae III entstanden bei allen Allelen Restriktionsfragmente von 19, 32, 47, 48 und 60 bp. Da durch die Mutation eine weitere Schnittstelle für das Enzym entsteht, konnten bei Vorliegen des Wildtyp-Allels noch eine zusätzliche Bande bei 257 bp und bei Vorliegen eines mutierten Allels noch zwei zusätzliche Banden von 50 und 207 bp Länge nachgewiesen werden. Die kurzen Restriktionsfragmente können in der Gelelektrophorese nur sehr diffus dargestellt werden, sind allerdings für die Unterscheidung der Genotypen nicht entscheidend. Die Länge des PCR-Produktes und die Länge der Spaltprodukte entsprachen der im Programm NukWork berechneten.



Spur 1: 50 bp Längenmarker
Spur 2: WT/WT (257 bp)
Spur 3: WT/MT (257 bp, 207 bp)
Spur 4: MT/MT (207 bp)
Spur 5: Leerkontrolle

Abbildung 13: Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD3 Ser9Gly Polymorphismus.

Die Ergebnisse am LightCycler stimmten mit denen aus dem enzymatischen Verdau zu 100 % überein. Von 84 mit beiden Methoden untersuchten Kontroll-Proben hatten 41 den A/A-Genotyp (WT/WT), 36 den A/G-Genotyp (WT/MT) und 7 den G/G-Genotyp (MT/MT).

Häufigkeiten der Allele und Genotypen in der Studienpopulation

Die Frequenz des A(Ser)-Allels betrug 71,2 %, die des G(Gly)-Allels 28,8 %. Bei 51,4 % (150 von 292) der Patienten konnte der Ser/Ser-Genotyp, bei 39,7 % (116 von 292) der Ser/Gly-Genotyp und bei 8,9 % (26 von 292) der Gly/Gly-Genotyp nachgewiesen werden. Der χ^2 -Test bestätigt, dass sich die Genotypverteilung im Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg befindet ($\chi^2=0,281$, $df=2$, $p=0,869$). Die Allelfrequenzen entsprachen denen aus zahlreichen Untersuchungen an gesunden Kontrollprobanden (Frequenz des Ser-Allels: 58-73 %) (Shaikh et al. 1996).

4.1.1.5 Polymorphismen im HT_{2A} Rezeptor

Die Allele des HT_{2A} –1438 G/A und His452Tyr Polymorphismus zeigten die in Tabelle 37 aufgeführten Maxima in den abgeleiteten Schmelzkurven. Die Lage der Maxima ermöglicht eine eindeutige Unterscheidung der einzelnen Genotypen.

Tabelle 37: Schmelzkurvenmaxima der Allele des HT_{2A} –1438 G/A und HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus

Polymorphismus	Wildtyp Allel	Mutiertes Allel
-1438 G/A	56,5°C	63°C
His452Tyr	57,5°C	51,5°C

Der LightCycler Lauf zur Detektion des HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus dauert etwa 47 min, der zur Detektion des HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus etwa 27 min. Damit können mit jeder der beiden Methoden pro Lauf gleichzeitig 32 Proben in weniger als 60 min genotypisiert werden, wenn man die Probenvorbereitung in die Zeitberechnung mit einbezieht.

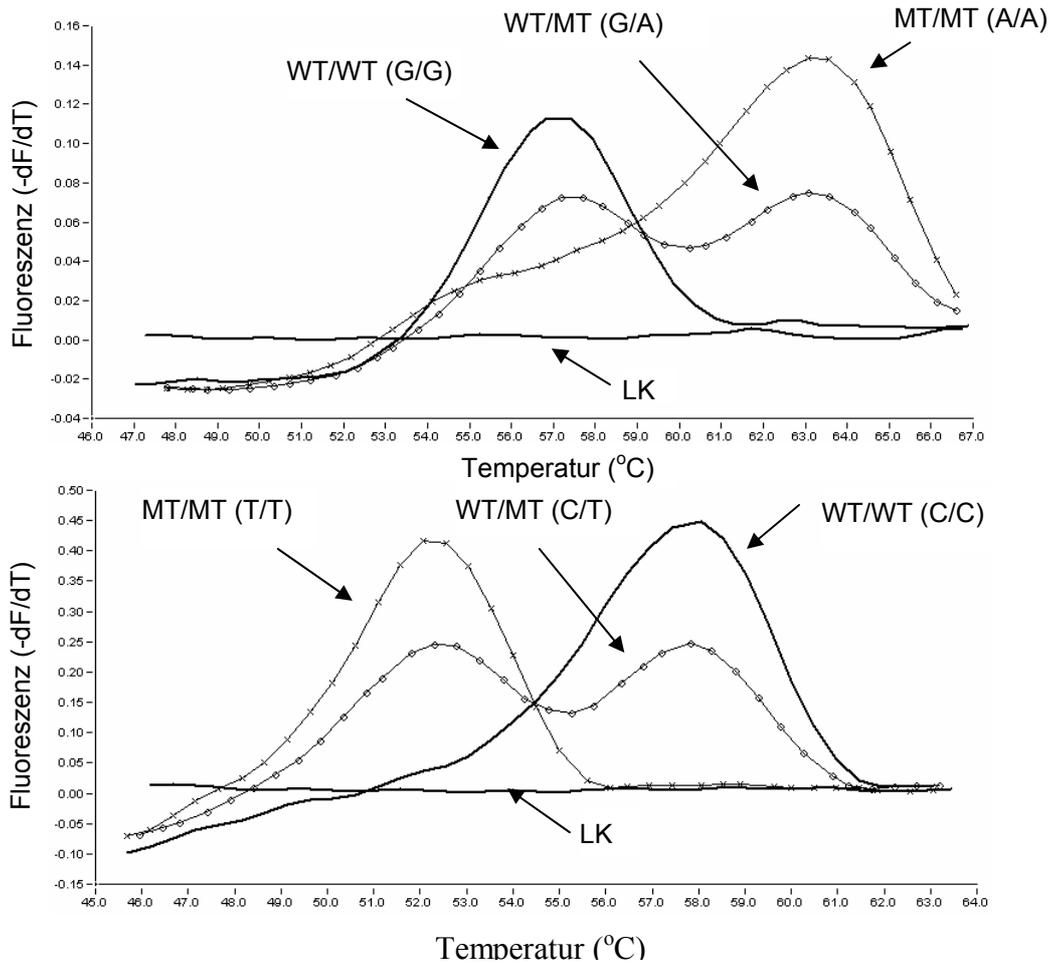


Abbildung 14: Schmelzkurven zur Darstellung des HT_{2A} -1438 G/A (oben) und HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus (unten)

Die zur Validierung der beiden Methoden am LightCycler zusätzlich einem enzymatischen Verdau unterworfenen Proben (HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus: n=80; HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus: n=87) zeigten in der Gelelektrophorese das in Tabelle 38 aufgeführte Bandenmuster, das mit den theoretischen Berechnungen (NukWork) übereinstimmte:

Tabelle 38: Länge der Restriktionsfragmente aus dem enzymatischen Verdau zum Nachweis des HT_{2A} -1438 G/A und HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus

Polymorphismus	Wildtyp Allel (WT)	Mutiertes Allel (MT)
-1438 G/A	239 und 70bp	309bp
His452Tyr	68 und 180bp	248 bp



Abbildung 15: Gelelektrophorese zur Darstellung des HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus



Abbildung 16: Gelelektrophorese zur Darstellung des HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus (die 68 bp Bande ist in der Gelelektrophorese kaum zu sehen, spielt jedoch für die Auswertung der Genotypen keine entscheidende Rolle)

Die Genotypisierung am LightCycler hinsichtlich des HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus wurde für 80 Patienten-Proben zusätzlich durch enzymatischen Verdau überprüft. Die Ergebnisse stimmten zu 100 % mit denen aus der Schmelzkurvenanalyse überein (28x WT/WT, 34x WT/MT, 18x MT/MT). Ebenso konnten für die Genotypisierung des HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus mit beiden Nachweismethoden bei 87 Patienten-Proben und zwei Kontrollproben völlig übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden (69x WT/WT, 17x Het, 1x MT/MT).

Häufigkeiten der Allele und Genotypen in der Studienpopulation

Die Frequenz des G-Allels des HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus betrug 58,0 % (339 von 584), die des A-Allels 42,0 % (245 von 584). 34,6 % (101 von 292) der Patienten hatten den G/G-Genotyp, 46,9 % (137 von 292) waren heterozygot und 18,5 % (54 von 292) hatten den A/A-Genotyp. Die Genotypverteilung in der Gesamtpopulation befindet sich im genetischen Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,399$, $df=2$, $p=0,819$). Die Allelhäufigkeiten und die Genotypverteilung entsprach der, die in einer gesunden Kontrollpopulation kaukasischer Abstammung von Kouzmenko et al. (1999) gefunden werden konnte (G/G=29,7 %, G/A=57,6 %, A/A=12,5 %).

Die Frequenz des C-Allels (His) des HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus betrug 89,9 %, die des T-Allels (Tyr) 10,1 %. Der C/C-Genotyp war mit 81,2 % (237 von 292) am häufigsten in der Patientenpopulation vertreten, gefolgt vom C/T-Genotyp (17,5 %; 51 von 292) und dem T/T-Genotyp (1,3 %; 4 von 292). Der χ^2 -Test bestätigt, dass sich die Genotypverteilung im Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg befindet ($\chi^2=0,413$, $df=2$, $p=0,813$). Die Allelfrequenzen entsprechen denen, die von Erdmann et al. (1996) in einer gesunden Kontrollpopulation nachgewiesen wurden (His-Allel=0,92; Tyr-Allel=0,08).

4.1.1.6 MDR1 C3435T Polymorphismus

Bei dieser Nachweismethode handelt es sich nicht um eine völlige Neuentwicklung. Bereits publizierte Primer und Sonden wurden aus der Literatur übernommen (Nauck et al., 2000). Die PCR-Reagenzien und die PCR-Bedingungen wurden jedoch verändert, um unter den Bedingungen im PCR-Labor des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar ein optimales Genotypisierungs-Ergebnis zu erhalten. Die Maxima der abgeleiteten Schmelzkurven lagen bei 64,5°C (Wildtyp-Allel/WT) und 56°C (mutiertes-Allel/MT) und stimmten mit den Werten der Originalpublikation überein (Nauck et al., 2000). Eine weitere Validierung dieser Methode wurde nicht durchgeführt.

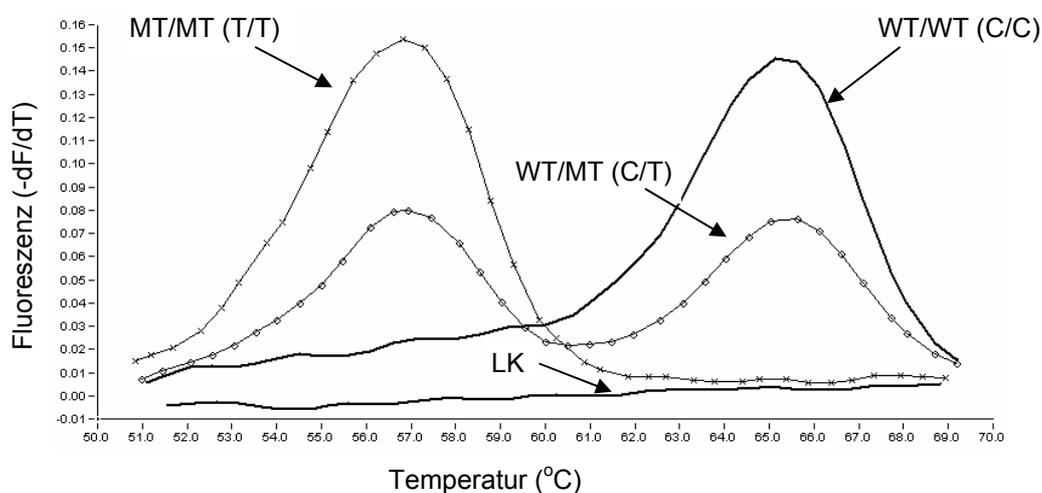


Abbildung 17: Schmelzkurven zur Darstellung des MDR1 C3435T Polymorphismus

Häufigkeiten der Allele und Genotypen in der Studienpopulation

21,2 % (62 von 292) der genotypisierten Patienten hatten den C/C-Genotyp, 55,5 % (162 von 292) waren heterozygot und 23,3 % (68 von 292) hatten den T/T-Genotyp. Dementsprechend war die Häufigkeit des C-Allels 49,0 % und die des T-Allels 51,0 %. Der χ^2 -Test bestätigt, dass sich die Genotypverteilung im Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg befindet ($\chi^2=3,53$, $df=2$, $p=0,171$). Die Ergebnisse zu den Genotyphäufigkeiten liegen in den 95 % Konfidenzintervallen der Genotypfrequenzen aus einer Untersuchung an 290 gesunden kaukasischen Probanden (CC: 16,8-26,6 95 % CI; CT: 42,7-54,5 95 % CI; TT: 24,8-35,6 95 % CI) (Gaikovitch et al., 2003).

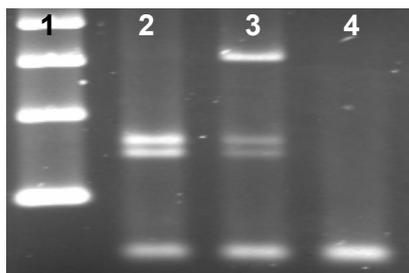
4.1.2 Optimierte und adaptierte Methoden am Thermocycler

4.1.2.1 Polymorphismen im DRD2

Die amplifizierte DNA-Sequenz zeigte in der Gelelektrophorese bezüglich des DRD2 –141C Ins/Del Polymorphismus eine Länge von 304 bp (C Ins) bzw. 303 bp (C Del). Die Länge des Amplifikationsproduktes aus der PCR des TaqI Polymorphismus betrug 304 bp. Die Längen der Restriktionsprodukte sind in Tabelle 39 aufgeführt und stimmen mit den in NukWork berechneten Längen überein bzw. sind für den DRD2 –141C Ins/Del Polymorphismus mit denen aus der Arbeit von Arinami et al. (1997) identisch (gleiche Primer).

Tabelle 39: Länge der Restriktionsfragmente aus dem enzymatischen Verdau zum Nachweis des DRD2 –141C ins/del und DRD2 TaqI Polymorphismus

Polymorphismus	Wildtyp Allel (C Ins)	Mutiertes Allel (C Del)
-141 C Ins/Del	160, 144 bp	303 bp
	“Wildtyp” Allel (A1)	“Mutiertes” Allel (A2)
TaqI	126, 178 bp	304 bp



Spur 1: 100 bp Längenmarker
Spur 2: WT/WT (160 bp, 144 bp)
Spur 3: WT/MT (303 bp, 160 bp, 144 bp)
Spur 4: Leerkontrolle

Primer Dimere am unteren Bildrand

Abbildung 18: Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD2 –141C Ins/Del Polymorphismus

In der Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD2 –141C Ins/Del Polymorphismus sind am unteren Bildrand Primer-Dimere zu sehen, die die Auswertung der Genotypen jedoch nicht stören.

Durch die Modifikation der Primer und des Reaktionsansatzes aus der Arbeit von Grandy et al. (1993) zur Detektion des DRD2 TaqI Polymorphismus konnte die dort beschriebene Fehlbande bei 650 bp eliminiert werden. Abbildung 19 zeigt die typischen Banden einer Gelelektrophorese nach dem Restriktionsverdau. Wie bei Grandy wird auch hier das A1 Allel geschnitten, dem A2 Allel geht durch die Mutation die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym TaqI (siehe Tabelle 12) verloren.

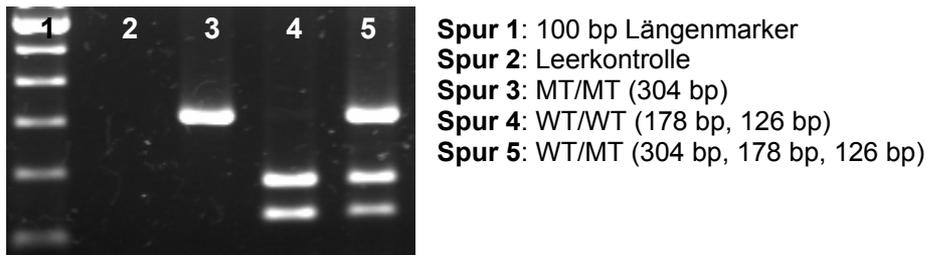


Abbildung 19: Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD2 TaqI Polymorphismus

In den Gelelektrophoresen zur Detektion des DRD2 Ser311Cys Polymorphismus waren neben dem PCR Produkt von 151 bp Länge besonders in den Ansätzen zum Nachweis des Cys-Allels (Spur 2b und 3b) und in den Leerkontrollen (Spur 4a und 4b) deutlich Primer-Dimere zu sehen. Diese störten jedoch die Auswertung der Genotypen nicht. Ein Vorteil der hier angewandten Methode gegenüber vielen herkömmlichen sequenzspezifischen PCR-Methoden besteht darin, dass die Ansätze zur Detektion von Wildtyp-Allel und Mutanten-Allel durch die Auswahl geeigneter Primer, Reagenzien und Reaktionsbedingungen in einem PCR Lauf gleichzeitig amplifiziert werden konnten. Dies führt zu einer erheblichen Zeitersparnis (Halbierung der für den PCR-Lauf benötigten Zeit).

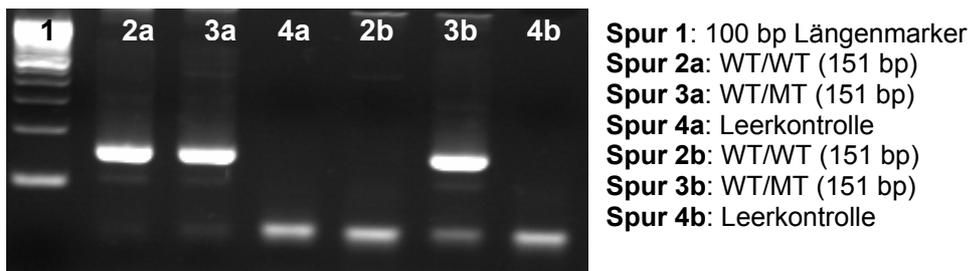


Abbildung 20: Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD2 Ser311Cys Polymorphismus

In den Spuren 2a-3a sind die Ansätze zur Detektion des Ser311-Allels aufgetragen. Die Bande bei 151 bp zeigt das Vorliegen eines Ser311-Allels an. In Spur 2b-3b sind die Ansätze zur Detektion des Cys311-Allels aufgetragen. Bei Vorliegen eines Cys311-Allels ist auch hier eine Bande bei 151 bp zu erkennen. Die Auswertung der Spur 2a und 2b ergibt somit einen Ser/Ser-Genotyp, die der Spur 3a und 3b einen heterozygoten Genotyp. Die Leerkontrollen zeigen keine Bande bei 151 bp, wodurch Verunreinigungen der PCR-Ansätze ausgeschlossen werden können.

Häufigkeiten der Allele und Genotypen in der Studienpopulation

Die Frequenz für das C Ins-Allel des DRD2 -141C Ins/Del Polymorphismus betrug in der Studienpopulation 91,4 % (534 von 584), die des C Del-Allels 8,6 % (50 von 584). 83,6 % (244 von 292) der Patienten hatten den Ins/Ins-Genotyp, 15,8 % (46 von 292) waren heterozygot und 0,7 % (2 von 292) hatten den Del/Del-Genotyp. Der χ^2 -Test bestätigt, dass sich die Genotypverteilung im Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg befindet ($\chi^2=0,018$, $df=2$, $p=0,991$). Die Untersuchung von Li et al. (1998) zeigte an 145 kaukasischen gesunden Probanden eine ähnliche Allelfrequenz für das C Del-Allel (10 %).

Das A1-Allel des DRD2 TaqI Polymorphismus konnte in der Studienpopulation in einer Frequenz von 19,0 % (111 von 584) nachgewiesen werden, das A2-Allel war in einer Frequenz von 81,0 % (473 von 584) vorhanden. 4,5 % (13 von 292) der Patienten hatten den A1/A1-Genotyp, 29,1 % (85 von 292) waren heterozygot und 66,4 % (194 von 292) der Patienten hatten den A2/A2-Genotyp. Die Genotypverteilung der Gesamtpopulation befindet sich im genetischen Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,892$, $df=2$, $p=0,640$). Die Allelfrequenzen in der Studienpopulation stimmen mit denen, die in einer Kontrollpopulation von gesunden Deutschen in der Untersuchung von Sander et al. (1999) nachgewiesen werden konnten, überein.

Die Frequenz des Ser-Allels des DRD2 Ser311Cys Polymorphismus betrug in der gesamten Studienpopulation 98,3 % (574 von 584), die des Cys-Allels nur 1,7 % (10 von 584). Der Ser/Ser-Genotyp war mit 96,6 % (282 von 292) am stärksten vertreten, nur 3,4 % (10 von 292) der Patienten hatten den Ser/Cys-Genotyp. Homozygote für das Cys-Allel konnten in der Studienpopulation nicht detektiert werden. Die Genotypverteilung der Gesamtpopulation befindet sich im genetischen Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,004$, $df=1$, $p=0,948$). Nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beträgt die erwartete Anzahl von Patienten mit dem Cys/Cys-Genotyp in einer Population mit 292 Patienten 0,084. Das insgesamt seltene Vorkommen dieses Genotyps ist somit die Ursache für die fehlende Identifizierung in der hier vorliegenden Patientenpopulation. Es müssten theoretisch 3477 Patienten genotypisiert werden, um einen zu finden, der den Cys/Cys-Genotyp trägt.

4.1.2.2 Polymorphismen im DRD4

Die verschiedenen Allele der Polymorphismen des D4-Rezeptorgens zeigten in den entsprechenden Gelelektrophoresen PCR Produkte mit charakteristischer Länge (siehe Tabelle 40 und Abbildung 21-23).

Tabelle 40: Länge der Restriktionsfragmente aus dem enzymatischen Verdau zum Nachweis des DRD4 48 bp und DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus, sowie des DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus

Polymorphismus	Allel	Länge (bp)
DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus	2x 12 bp (Wildtyp, A1)	297 (Catalano et al., 1993)
	1x 12 bp (Mutante, A2)	285 (Catalano et al., 1993)
DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus	D4.2	ca. 298 (Cohen et al., 1999)
	D4.3	ca. 344 (Cohen et al., 1999)
	D4.4	ca. 396 (Cohen et al., 1999)
	D4.7	ca. 540 (Cohen et al., 1999)
	Wildtyp	176 (Nöthen et al., 1994)

Polymorphismus	Allel	Länge (bp)
DRD4 13 bp	Wildtyp	176 (Nöthen et al., 1994)
Deletionspolymorphismus	13 bp Deletion (Mutante)	163 (Nöthen et al., 1994)

Da die Primersequenzen aus bereits veröffentlichten Arbeiten übernommen wurden, entsprachen auch die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Banden denen aus den Originalpublikationen.

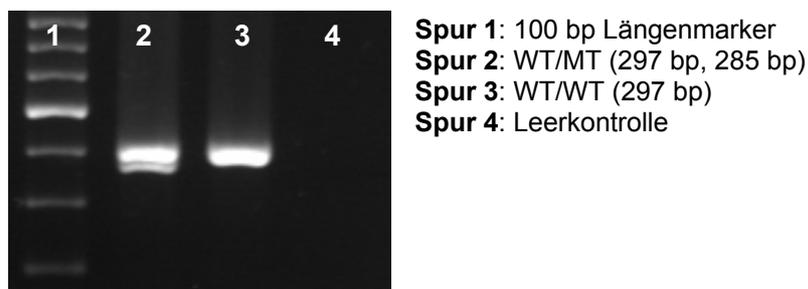


Abbildung 21: Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus

Die Auftrennung der sich nur um 12 bp unterscheidenden DNA-Fragmente gelang mit dem 2 %-igen MetaPhor Agarosegel gut. Die MetaPhor Agarose zeichnet sich aufgrund ihrer Struktur durch eine sehr hohe Auftrennung von DNA-Fragmenten, die sich nur geringfügig in der Länge unterscheiden, aus. Im Vergleich zur Originalmethode (Catalano et al., 1993) wurde hier auf den Einsatz eines Polyacrylamidgels verzichtet. Das zur Herstellung eines Polyacrylamidgels notwendige Acrylamid besitzt karzinogene und neurotoxische Eigenschaften. Die 3-fache Wiederholung des DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus konnte in der Studienpopulation nicht beobachtet werden. Dieses Allel stellt per Definition keinen Polymorphismus mehr dar, da die Auftretshäufigkeit < 1% ist, sondern wird als seltene genetische Variante bezeichnet.

In der Studienpopulation konnten hinsichtlich des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus Allele mit 2-facher bis 8-facher Wiederholung detektiert werden.

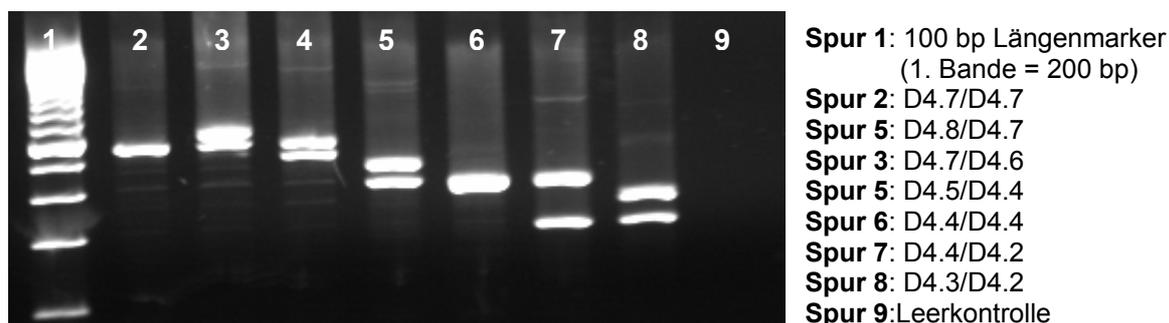


Abbildung 22: Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus

Mit dem verwendeten 2 %-igen MetaPhor Agarosegel konnten die DNA-Fragmente mit einer Länge zwischen ca. 298 und ca. 540 bp sehr gut aufgetrennt und die entsprechenden Genotypen eindeutig zugeordnet werden. Dieser Nachweis stellt eine erhebliche Vereinfachung bzw.

Verbesserung der Detektionsmethode aus der Originalpublikation von Cohen et al. (1999) dar. Cohen et al. (1999) markierten den Antisense-Primer radioaktiv und detektierten die DNA-Banden autoradiographisch. Diese Methode erweist sich als sehr zeit- und kostenintensiv und ist zur Routineanwendung weniger geeignet. Zudem besteht durch die radioaktive Strahlung eine erhöhte Gesundheitsgefährdung und es sind besondere Schutzvorkehrungen notwendig. Weiterhin war eine Hot-Start-PCR, wie von Cohen et al. (1999) angewandt, durch Optimierung des PCR-Reaktionsansatzes und der Reaktionsbedingungen nicht notwendig.

Hinsichtlich des DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus konnte bei Vorliegen des Wildtyp-Allels eine 176 bp lange Bande detektiert werden, die PCR Amplifikate bei Vorliegen des mutierten Allels (13 bp Deletion) waren 163 bp lang.

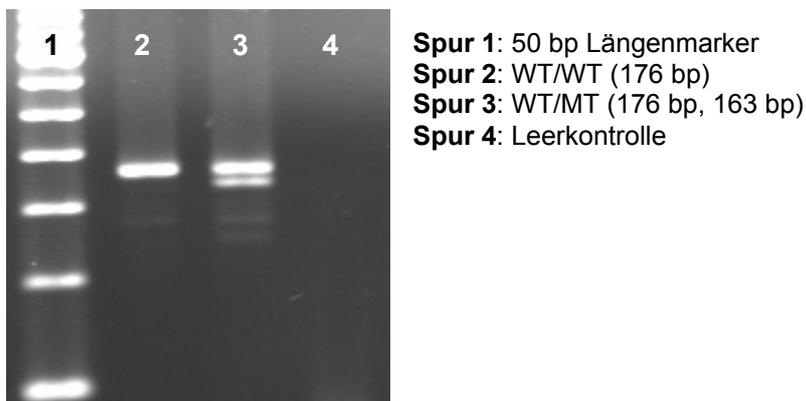


Abbildung 23: Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus

Die beiden sich um 13 bp unterscheidenden DNA-Fragmente ließen sich mit dem 2 %-igen MetaPhor Agarosegel und den gewählten Laufbedingungen eindeutig auftrennen. Homo- und Heteroduplices (4-Banden Muster) bei Heterozygoten Personen, wie sie in der Originalpublikation in einer Laufhöhe von etwa 350 bis 450 bp auftraten (Nöthen et al., 1994), konnten durch die in dieser Arbeit gewählten Reagenzien und Reaktionsbedingungen vermieden werden (siehe auch Abbildung 23). Auch der Umgang mit Acrylamid, wie in der Arbeit von Nöthen et al. (1994) durch Verwendung eines 10 %-igen Polyacrylamidgels (Acrylamid:Bisacrylamid = 49:1) notwendig, konnte durch die Agarose-Gelelektrophorese unterbleiben.

Häufigkeiten der Allele und Genotypen in der Studienpopulation

Die Frequenz des A1-Allels des *DRD4* 12 bp Wiederholungspolymorphismus (2-fache Wiederholung) betrug 88,9 % (519 von 584), die des A2-Allels 11,1 % (65 von 584). 78,1 % (228 von 292) der Patienten hatten den A1/A1-Genotyp, 21,6 % (63 von 292) den A1/A2-Genotyp und nur 1 Patient (0,3 %) war homozygot für das A2-Allel. Die Genotypverteilung der Studienpopulation befindet sich im genetischen Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg ($\chi^2=2,418$, $df=2$, $p=0,298$). Die Allelfrequenzen entsprechen denen einer gesunden Kontrollpopulation aus der Studie von Catalano et al. (1993) (A1-Allel: 92,4 %, A2-Allel: 7,6 %).

Hinsichtlich des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus war das D4.4-Allel (64,4 %; 376 von 584) am häufigsten nachweisbar, gefolgt vom D4.7-Allel (19,5 %; 114 von 584), dem D4.2-Allel (9,8 %; 57 von 584), dem D4.3-Allel (3,9 %; 23 von 584), dem D4.8-Allel (1,0 %; 6 von 584), dem D4.5-Allel (0,9 %; 5 von 584) und mit 0,5 % (3 von 584) dem D4.6-Allel. Aufgrund der funktionellen Unterschiede zwischen der langen Form (D4.7) und den kürzeren Formen hinsichtlich der Bindungsaffinität für Clozapin und Spiperon (Van Tol et al., 1992) wurden die Allele zur weiteren Studienauswertung in kurze (short=S) Allele (< 7 Wiederholungen) und lange (long=L) Allele (≥ 7 Wiederholungen) eingeteilt. Diese Klassifizierung wurde auch bereits in anderen pharmakogenetischen Studien praktiziert (Zalsman et al., 2003). 66,4 % (194 von 292) der Patienten hatten den S/S-Genotyp, 29,5 % (86 von 292) waren heterozygot und 4,1 % (12 von 292) hatten den L/L-Genotyp. Die Frequenzen der Allele entsprechen denen, die bei einer gesunden Kontrollpopulation in der Untersuchung von Cohen et al. (1999) gefunden wurden.

Das Wildtyp-Allel des DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus kam mit 97,1 % (567 von 584) wesentlich häufiger vor als das mutierte Allel (13 bp Deletion) (2,9 %; 17 von 584). 94,2 % (275 von 292) der Patienten waren homozygot für das Wildtyp-Allel, 5,8 % (17 von 292) waren heterozygot. Kein Patient war homozygoter Träger des mutierten Allels. Die Genotypverteilung der Gesamtpopulation befindet sich im genetischen Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,022$, $df=1$, $p=0,882$). Nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht beträgt die erwartete Anzahl von Patienten mit dem Del/Del-Genotyp in einer Population mit 292 Patienten 0,246. Das insgesamt seltene Vorkommen dieses Genotyps ist somit die Ursache für die fehlende Identifizierung in der hier vorliegenden Patientenpopulation. Es müssten theoretisch 1187 Patienten genotypisiert werden, um einen zu finden, der den Del/Del-Genotyp trägt. Die Frequenz des mutierten Allels in der hier untersuchten Studienpopulation lag etwas höher als bei gesunden Kontrollprobanden (2 %) oder schizophrenen Patienten (1 %) in der Untersuchung von Nöthen et al. (1994).

4.1.2.3 *HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus*

Das im Restriktionsverdau verwendete Enzym BsrD I hat in der häufiger vorkommenden Wildtyp-Sequenz (G/Cys-Allel) eine Erkennungsstelle und schneidet diese in zwei Fragmente von 86 bp und 18 bp. Der Einsatz eines Mismatch-Primers, wie in der Methode nach Lappalainen et al. (1995) verwendet, um eine Erkennungssequenz für das Enzym Hinf I zu schaffen, ist damit überflüssig. In die Sequenz eines Mismatch-Primers ist eine Base eingebaut, die nicht zum entsprechenden DNA-Strang komplementär ist. Dadurch entsteht jedoch nach der Elongation entweder bei Vorliegen des Wildtyp-Allels oder des mutierten Allels eine Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym. Der Nachteil eines Mismatch-Primers liegt jedoch darin, dass sich dieser schlechter an die DNA anlagern kann und die Sensitivität und die Ausbeute der PCR sich dadurch möglicherweise verringern.

Die kürzere Bande (18 bp) war nach der Gelelektrophorese oft schlecht zu erkennen, spielt jedoch für die Bestimmung des Genotyps keine entscheidende Rolle. Das mutierte Allel bleibt unverdaut

und zeigte somit eine Bande bei 104 bp. Spur 4 zeigt eine heterozygote Probanden-DNA mit allen Banden (Bande bei 18 bp kaum zu erkennen).

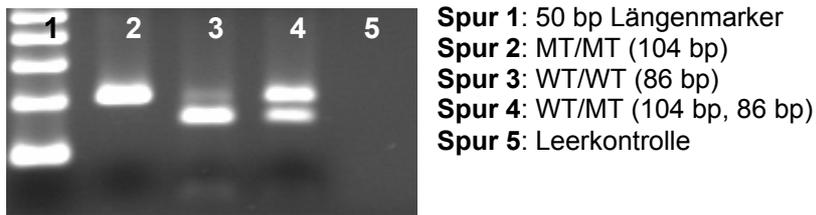


Abbildung 24: Gelelektrophorese zur Darstellung des HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus

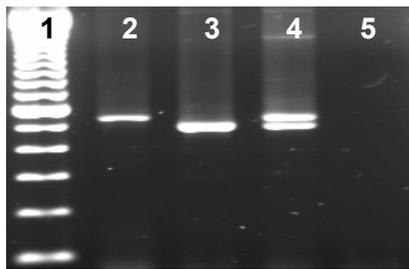
Im Vergleich zur Originalmethode (Lappalainen et al., 1995) wurde hier auf den Einsatz eines Polyacrylamidgels verzichtet, da das zur Herstellung eines Polyacrylamidgels notwendige Acrylamid karzinogene und neurotoxische Eigenschaften besitzt.

Häufigkeiten der Allele und Genotypen in der Studienpopulation

Das Gen für den HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus liegt auf dem X-Chromosom (Lappalainen et al. 1995). Bezüglich der Genotypen wurden deshalb Männer und Frauen getrennt ausgewertet. Der G/G-Genotyp wurde bei 70,9 % (117 von 165) aller Frauen detektiert, 27,3 % (45 von 165) hatten den G/C-Genotyp und 1,8 % (3 von 165) den C/C-Genotyp. Männliche G-Hemizygoten waren in der Studienpopulation häufiger (85,8 %; 109 von 127) vertreten als C-Hemizygoten (14,2 %; 18 von 127). Die drei Genotypen bei den Frauen sind im genetischen Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg ($\chi^2=0,330$, $df=2$, $p=0,848$). Die Genotypfrequenzen stimmen mit denen einer gesunden Kontrollpopulation aus der Arbeit von Segman et al. (2000) überein ([m]: 82,1 % Cys-Hemizygot, 17,9 % Ser-Hemizygot; [w]: 74,1 % Cys/Cys-Genotyp, 25,9 % Cys/Ser-Genotyp, 0 % Ser/Ser-Genotyp).

4.1.2.4 Polymorphismen im HTT

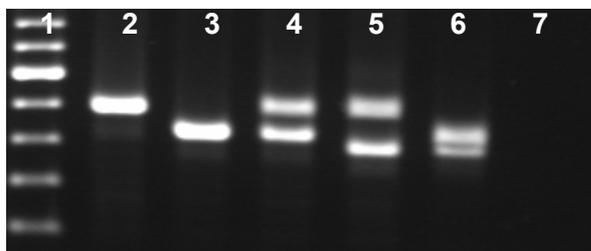
Die Längen der Amplifikationsprodukte zur Detektion des *HTTLPR* Polymorphismus entsprachen denen aus der Originalpublikation von Heils et al. (1996), da identische Primersequenzen verwendet wurden. Wie aus Abbildung 25 ersichtlich konnte bei Vorhandensein eines mutierten Allels (44 bp Deletion) eine Bande bei 484 bp und bei Vorhandensein des Wildtyp-Allels eine Bande bei 528 bp detektiert werden. Mit dem 1,5 %-igen PeqGold Agarosegel konnten die Genotypen gut aufgetrennt und eindeutig zugeordnet werden.



Spur 1: 100 bp Längenmarker
Spur 2: WT/WT (528 bp)
Spur 3: MT/MT (484 bp)
Spur 4: WT/MT (528 bp, 484 bp)
Spur 5: Leerkontrolle

Abbildung 25: Gelelektrophorese zur Darstellung des HTTLPR Polymorphismus

In der Patientenpopulation konnten 3 verschiedene Allele des HTT-VNTR Polymorphismus nachgewiesen werden. Das Allel mit der 9-fachen Wiederholung (2.9) des 16-17 bp umfassenden DNA-Abschnittes zeigte im Gellauf eine Länge von 246 bp, das mit der 10-fachen Wiederholung (2.10) eine Länge von 263 bp und das mit der 12-fachen Wiederholung (2.12) eine Länge von 296 bp. Die in der Gelelektrophorese nachgewiesenen Banden entsprachen hinsichtlich der Länge den Berechnungen im Programm NukWork. Die Abbildung 26 zeigt verschiedene Allelkombinationen.



Spur 1: 100 bp Längenmarker
Spur 2: 2.12/2.12 (296 bp)
Spur 3: 2.10/2.10 (263 bp)
Spur 4: 2.12/2.10 (296 bp, 263 bp)
Spur 5: 2.12/2.9 (296 bp, 246 bp)
Spur 6: 2.10/2.9 (263 bp, 246 bp)
Spur 7: Leerkontrolle

Abbildung 26: Gelelektrophorese zur Darstellung des HTT-VNTR Polymorphismus

Häufigkeiten der Allele und Genotypen in der Studienpopulation

Die Frequenz des I-Allels des HTTLPR Polymorphismus in der Studienpopulation betrug 59,6 % (348 von 584 Allelen), die des s-Allels 40,4 % (236 von 584). 37,0 % (108 von 292) Patienten hatten den I/I-Genotyp, 45,2 % (132 von 292) den I/s-Genotyp und 17,8 % (52 von 292) waren homozygot für das s-Allel. Die Genotypverteilung zeigte keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($\chi^2=1,149$, $df=2$, $p=0,563$). Die Allelfrequenzen entsprachen denen, die im Rahmen anderer Studien bei kaukasischer Bevölkerung festgestellt werden konnten (I-Allel: 54 %; Durham et al., 2004).

Hinsichtlich des HTT-VNTR Polymorphismus war das 2.12-Allel mit 61,0 % (356 von 584 Allelen) in der Studienpopulation am häufigsten vertreten, gefolgt vom 2.10-Allel mit 37,5 % (219 von 584) und dem 2.9-Allel (1,5 %; 9 von 584). Die Allelverteilung entspricht der von Ogilvie et al. (1996) gefundenen in einer gesunden kaukasischen Kontrollpopulation (2.9-Allel: 1,04 %, 2.10-Allel: 39,64 %; 2.12-Allel: 59,33 %). Für die statistischen Auswertungen wurden die 2.9-Allele mit den 2.10-Allelen zusammengefasst und als 2.10-Allel bezeichnet. Diese Einteilung wurde bereits in anderen pharmakogenetischen Studien vorgenommen (Ito et al., 2002) und ist nach pharmakologischen Gesichtspunkten sinnvoll, da in in vitro Versuchen eine höhere Expression für das Allel mit der 12-fach Wiederholung (2.12) gezeigt werden konnte (Fischerstrand et al., 1999).

Dieser Einteilung entsprechend hatten 37,0 % (108 von 292) Patienten den 2.12/2.12-Genotyp, 47,9 % (140 von 292) den 2.12/2.10-Genotyp und 15,1 % (44 von 292) den 2.10/2.10-Genotyp.

4.2 Ergebnisse der statistischen Auswertung

4.2.1 Studienpopulation

Patienten, die ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie gaben, wurden dem Aufnahmescreening unterzogen (n=358). Allerdings widerriefen 2 Patienten ihre Einverständniserklärung nachträglich. Bei 34 der verbleibenden 356 Patienten konnte kein EDTA-Blut zur Genotypisierung entnommen werden und bei weiteren 30 konnten nach Einschluss in die Studie keine Daten erhoben werden, womit letztendlich 292 Patienten in die statistische Auswertung eingingen.

4.2.2 Demographische Daten und Krankheitsmerkmale

Von den 292 in die Studiauswertung eingeschlossenen Patienten waren 127 männlich (43,5 %) und 165 weiblich (56,5 %). Das Durchschnittsalter betrug 42,5 +/-15,6 Jahre, wobei der jüngste Patient 18 Jahre und der älteste Patient 82 Jahre alt war. Das durchschnittliche Körpergewicht betrug 72,5 +/-13,88 kg (40 kg-120 kg), die durchschnittliche Körpergröße war 171,7 +/-9,1 cm (155 cm-196 cm). Unter den Patienten waren 129 Raucher (44,2 %) und 163 Nichtraucher. 281 der Patienten (96,2 %) waren kaukasischer Abstammung, 10 Patienten waren asiatischer Abstammung und 1 Patient afrikanischer Abstammung.

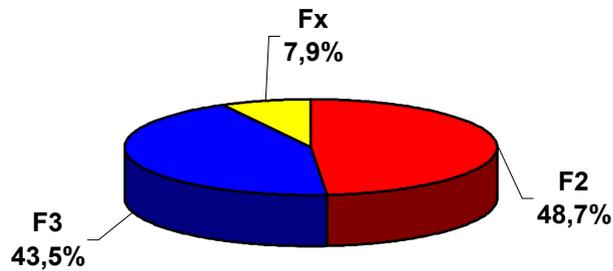


Abbildung 27: Diagnosen nach ICD-10

142 (48,7 %) Patienten hatten primär eine Störung aus dem schizophrenen Formenkreis (ICD-10: F2), 127 (43,5 %) litten an affektiven Störungen (ICD-10: F3) und 23 (7,9 %) der Patienten hatten andere psychische- oder Verhaltensstörungen (ICD-10: andere F-Diagnosen/Fx). Eine Übersicht über die einzelnen ICD-10 Diagnosen in der gesamten Studienpopulation zeigt Tabelle 41.

Tabelle 41: Übersicht über die ICD-10 Diagnosen in der gesamten Studienpopulation

Diagnosen	n
F2-Diagnosen:	<u>142</u>
Schizophrenie (F20)	98
Schizotype Störung (F21)	1
Anhaltende wahnhaftige Störung (F22)	3
Akute vorübergehende psychotische Störungen (F23)	7
Schizoaffective Störungen (F25)	33

Diagnosen	n
F3-Diagnosen	<u>127</u>
Manische Episode (F30)	3
Bipolare affektive Störung (F31)	28
Depressive Episode (F32)	43
Rezidivierende depressive Störung (F33)	53
Andere F-Diagnosen	<u>23</u>
Phobische Störungen (F40)	2
Andere Angststörungen (F41)	3
Zwangsstörungen (F42)	3
Reaktionen auf schwere Belastungen und Anpassungsstörungen (F43)	10
Paranoide Persönlichkeitsstörung (F60)	5

4.2.3 Untersuchte Patientenpopulationen

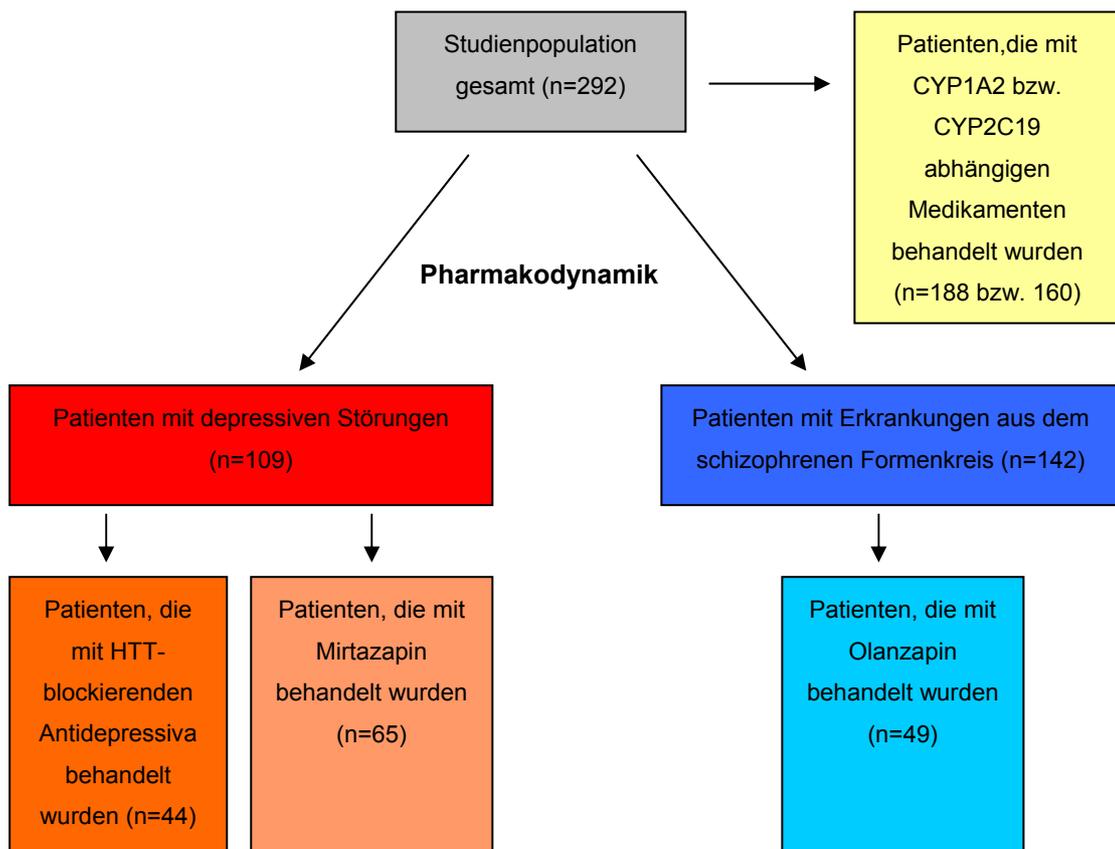


Abbildung 28: Die untersuchten Patientenpopulationen

In Abbildung 28 sind die verschiedenen Patientenpopulationen abgebildet, die im Rahmen dieser Studie untersucht wurden.

4.2.4 Untersuchungen an Patienten mit depressiven Störungen

3 der 127 Patienten mit affektiven Störungen (ICD-10 Diagnose: F3; siehe Tabelle 41) hatten eine Manie (F30) und 15 eine manische Episode im Rahmen einer bipolaren Störung (15 aus F31). Zur Therapie der manischen Krankheitsphasen bekamen diese Patienten vor allem Lithium, Phasenprophylaktika (wie Carbamazepin, Valproinsäure und Lamotrigin) und Antipsychotika verabreicht. Um eine homogenere Patientenpopulation zu bekommen und gezielter die Nebenwirkungen unter einer antidepressiven Therapie untersuchen zu können, wurden nur die Patienten mit einer depressiven Episode (n=109) in die folgenden Auswertungen einbezogen.

Da alle Antidepressiva unter anderem Veränderungen im serotonergen System des ZNS verursachen, wurden bei den 109 Patienten mit depressiver Episode folgende Polymorphismen im serotonergen System hinsichtlich einer Assoziation mit der Liegedauer, dem Ansprechen auf die Therapie (Response nach PDS-D und CGI 2), sowie den auftretenden Nebenwirkungen nach DOTES untersucht:

- HTTLPR Polymorphismus
- HTT-VNTR Polymorphismus
- HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus
- HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus

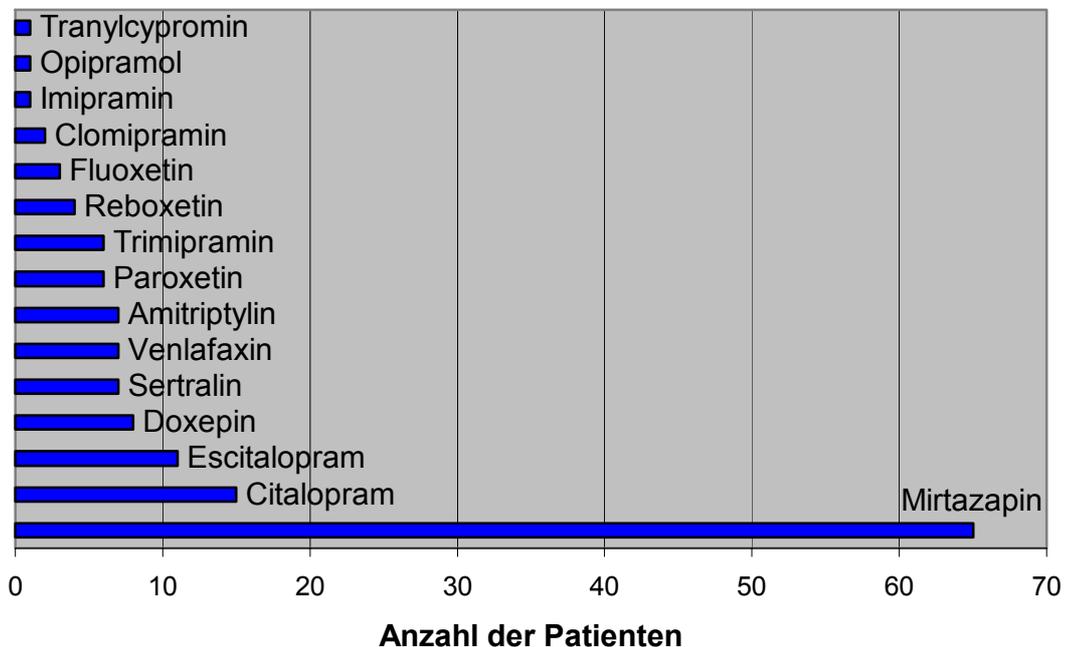


Abbildung 29: Antidepressive Medikation der Patienten mit depressiver Episode

Die antidepressive Medikation der Patienten mit depressiven Episoden, sowie die psychotrope Komedikation innerhalb der ersten 4 Wochen, können der Abbildung 29 und Tabelle 42 entnommen werden.

Tabelle 42: Psychotrope Komedikation der Patienten mit depressiver Episode

Psychotrope Komedikation	Anzahl der Verordnungen*
<u>Niederpotente Antipsychotika**</u>	<u>22</u>
Chlorprotixen	3
Melperon	2
Perazin	3
Pipamperon	12
Promethazin	2
<u>Hochpotente Antipsychotika</u>	<u>1</u>
Flupentixol	1
<u>Atypische Antipsychotika</u>	<u>55</u>
Olanzapin	44
Quetiapin	5
Risperidon	4
Sulpirid	1
Zotepin	1
<u>Phasenprophylaktika/Antiepileptika</u>	<u>24</u>
Carbamazepin	9
Lamotrigin	3
Lithium	9
Valproinsäure	3
<u>Sedativa/Hypnotika</u>	<u>78</u>
Alprazolam	2
Bromazepam	2
Clorazepat	1
Diazepam	2
Lorazepam	43
Lormetazepam	9
Zolpidem	13
Zopiclon	6

*Mehrfachverordnungen pro Patient innerhalb der ersten 4 Wochen möglich

**Neuroleptische Potenz kleiner 1 (=Chlorpromazin)

67 (61,5 %) der 109 Patienten bekamen neben ihrer antidepressiven Therapie mindestens ein Antipsychotikum, davon 52 mindestens ein starkes oder atypisches. 20 (18,3 %) Patienten bekamen innerhalb der ersten 4 Wochen zusätzlich ein Antiepileptikum/Phasenprophylaktikum, 2 Patienten zwei verschiedene Antiepileptika und 60 (55,0 %) zusätzlich ein Sedativum (Verordnung mehrerer verschiedener Sedativa innerhalb der 4 Wochen pro Patient möglich).

4.2.4.1 Aufenthaltsdauer und Genotyp

Die Aufenthaltsdauer kann einen Hinweis auf das Ansprechen eines depressiven Patienten geben, da genesene Patienten möglichst bald nach der Besserung ihrer Symptomatik aus der Klinik entlassen werden.

Die durchschnittliche mittlere Aufenthaltsdauer der depressiven Patienten (n=109) betrug 58,7 +/- 33,5 Tage. Da nur 1 Patient aus der F3-Population den Tyr/Tyr-Genotyp hinsichtlich des HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus hatte, wurde dieser zur Auswertung in die Gruppe der heterozygoten Patienten mit einbezogen. Dies gilt auch für die nachfolgenden Untersuchungen an Patienten mit depressiver Episode.

Für keinen der untersuchten Polymorphismen im Gen des HTT und des HT_{2A}-Rezeptors konnte eine signifikante Assoziation mit der Aufenthaltsdauer gefunden werden (siehe Tabelle 43).

Die Häufigkeit des l-Allels betrug 63,8 % (139 von 218 Allelen; 95 % CI 57,2-69,9) und entspricht damit den bereits in anderen pharmakogenetischen Untersuchungen gefundenen Allelhäufigkeiten in kaukasischen Populationen (l-Allel=54,7 %; Serretti et al, 2005) und unterscheidet sich von der Allelhäufigkeit in einer asiatischen Population deutlich (l-Allel=20,3 %; Serretti et al, 2005).

Tabelle 43: Aufenthaltsdauer der Patienten mit depressiver Episode und Genotyp

HTTLPR	l/l (n=47)	l/s (n=45)	s/s (n=17)	p
Aufenthaltsdauer	62,7 +/-36,3 Tage	57,1 +/-30,2 Tage	51,7 +/-33,0 Tage	0,602*
HTT-VNTR	2.10/2.10 (n=41)	2.10/2.12 (n=50)	2.12/2.12 (n=18)	
Aufenthaltsdauer	58,7 +/-35,0 Tage	56,9 +/-32,1 Tage	63,2 +/-33,4 Tage	0,603*
HT _{2A} -1438 G/A	G/G (n=42)	G/A (n=47)	A/A (n=20)	
Aufenthaltsdauer	59,8 +/-39,1 Tage	58,3 +/-28,7 Tage	57,3 +/-30,3 Tage	0,968*
HT _{2A} His452Tyr	His/His (n=94)	His/Tyr und Tyr/Tyr (n=15)		
Aufenthaltsdauer	58,2 +/-34,4 Tage	61,2 +/-28,1 Tage		0,625**

*Kruskal-Wallis-Test; **Mann-Whitney-U-Test

Um den Zusammenhang zwischen der Kenngröße Länge der Aufenthaltsdauer, und dem GCI 2-Wert nach 4 Wochen (bzw. am letzten Tag des stationären Aufenthaltes, wenn die Aufenthaltsdauer < 4 Wochen war; n=18), oder der Differenz zwischen dem PDS-D nach 4 Wochen (bzw. am letzten Tag des stationären Aufenthaltes; n=18) und dem PDS-D zum Zeitpunkt der Aufnahme

(entspricht Rückgang oder Zunahme der depressiven Verstimmtheit) zu beschreiben, wurde die Korrelation nach Spearman berechnet. Die Länge der Aufenthaltsdauer korrelierte nur schwach mit dem CGI 2-Wert (Spearman $r_s=0,437$; $p<0,001$), oder der Differenz zwischen den PDS-D-Werten (Spearman $r_s=0,365$; $p=0,001$).

4.2.4.2 Ansprechen und Genotyp

4 Wochen (am Tag 28) nach der stationären Aufnahme wurde das Ansprechen auf die Therapie (Response) mittels der CGI 2-Skala und der PDS-D-Skala bestimmt. Die gewählten Kriterien für Response wurden bereits in Kapitel 3.2.1.3 beschrieben. Bei Patienten, die weniger als 28 Tage stationär behandelt wurden ($n=18$), wurde die Response am letzten Tag ihres Aufenthaltes bestimmt (LOCF; Last Observation Carried Forward).

Der CGI 2-Wert nach 4-wöchiger Behandlung bzw. am letzten Tag des stationären Aufenthaltes korrelierte schwach mit der Differenz zwischen dem PDS-D nach 4 Wochen (bzw. am letzten Tag des stationären Aufenthaltes) und der Aufnahme (entspricht Rückgang oder Zunahme der depressiven Verstimmtheit) (Spearman $r_s=0,336$; $p<0,001$).

Response nach CGI 2

Da von 2 Patienten mit depressiver Episode kein CGI erhoben werden konnte, gingen diese nicht in die statistische Auswertung mit ein.

Von den restlichen 107 Patienten erreichten 57,9 % (62 von 107) nach 4 Wochen bzw. zum Zeitpunkt ihrer Entlassung einen CGI 2-Wert von 1 oder 2 (entspricht Response). Der durchschnittliche CGI 2 nach 4 Wochen war $3,32 \pm 0,91$.

Tabelle 44: CGI 2 Response bei Patienten mit depressiver Episode und Genotyp

HTTLPR	l/l	l/s	s/s	p
Responder	59,6 % (28 von 47)	54,5 % (24 von 44)	62,5 % (10 von 16)	0,834*
HTT-VNTR	2.10/2.10	2.10/2.12	2.12/2.12	
Responder	61,0 % (25 von 41)	59,2 % (29 von 49)	47,1 % (8 von 17)	0,629*
HT _{2A} -1438 G/A	G/G	G/A	A/A	
Responder	48,8 % (20 von 41)	67,4 % (31 von 46)	55,0 % (11 von 20)	0,215*
HT _{2A} His 452 Tyr	His/His	His/Tyr und Tyr/Tyr		
Responder	55,4 % (51 von 92)	73,3 % (11 von 15)		0,386*

*Fisher-Exact-Test

Eine Assoziation zwischen den untersuchten Polymorphismen und der Response nach CGI 2 konnte nicht nachgewiesen werden.

Response nach PDS-D

Neben dem CGI 2 wurde auch der PDS-D als Response-Kriterium verwendet. Allerdings waren 26 Patienten nicht bereit, den PDS-Bogen auszufüllen, oder die Daten hierzu konnten aus anderen Gründen nicht erhoben werden.

Der durchschnittliche PDS-D der verbleibenden 83 depressiven Patienten bei Aufnahme betrug 22,2 +/-8,6. Nach 28 Tagen hatten die Patienten einen durchschnittlichen PDS-D von 15,3 +/-11,2. Dies entspricht einem durchschnittlichen Rückgang um 6,9 Punkte oder 31,1 % vom Ausgangswert. Der Rückgang des PDS-D war statistisch signifikant ($p < 0,001$; Wilcoxon-Test).

39,8 % (33 von 83) der Patienten respondierten nach PDS-D. Bei der Auswertung der Response nach PDS-D zeigte keiner der Polymorphismen eine signifikante Assoziation mit dem Ansprechen auf die Therapie.

Tabelle 45: PDS-D Response bei Patienten mit depressiver Episode und Genotyp

HTTLPR	l/l	l/s	s/s	p
Responder	38,9 % (14 von 36)	45,5 % (15 von 33)	28,6 % (4 von 14)	0,579*
HTT-VNTR	2.10/2.10	2.10/2.12	2.12/2.12	
Responder	34,3 % (11 von 32)	42,4 % (14 von 33)	44,4 % (8 von 18)	0,740*
HT _{2A} -1438 G/A	G/G	G/A	A/A	
Responder	29,0 % (9 von 31)	51,4 % (19 von 37)	33,3 % (5 von 15)	0,154*
HT _{2A} His 452 Tyr	His/His	His/Tyr und Tyr/Tyr		
Responder	40,3 % (29 von 72)	36,4 % (4 von 11)		0,473**

*Fisher-Exact-Test

4.2.4.3 Nebenwirkungen und Genotyp

Am Tag 28 nach der stationären Aufnahme bzw. bei kürzerer Aufenthaltsdauer am Tage der Entlassung (n=18; LOCF) wurden durch den behandelnden Arzt die aufgetretenen Nebenwirkungen beurteilt. 25 (22,9 %; 95 % CI 15,4-32,0) der 109 Patienten mit depressiver Episode hatten nach der globalen DOTES-Beurteilungsskala mäßige bis deutliche Nebenwirkungen. Die Häufigkeit des Auftretens von Nebenwirkungen in Abhängigkeit vom Genotyp ist in Tabelle 46 dargestellt.

Bei den Patienten mit depressiver Episode zeigte der HTT-VNTR Polymorphismus eine signifikante Assoziation mit den Nebenwirkungen nach DOTES ($p = 0,004$; Fisher-Exact-Test). Keiner der Patienten mit dem 2.12/2.12-Genotyp (0 von 18) hatte Nebenwirkungen, dagegen 19,0 % der heterozygoten Patienten und 36,6 % der Patienten die homozygot für das 2.10-Allel waren (siehe auch Abbildung 30).

Tabelle 46: Nebenwirkungen bei Patienten mit depressiven Episoden und Genotyp

HTTLPR	l/l	l/s	s/s	p
Patienten mit NWs	21,3 % (10 von 47)	20,0 % (9 von 45)	35,3 % (6 von 17)	0,439*
HTT-VNTR	2.10/2.10	2.10/2.12	2.12/2.12	
Patienten mit NWs	36,6 % (15 von 41)	20,0 % (10 von 50)	0,0 % (0 von 18)	0,004*
HT _{2A} -1438 G/A	G/G	G/A	A/A	
Patienten mit NWs	21,4 % (9 von 42)	19,1 % (9 von 47)	35,0 % (7 von 20)	0,378*
HT _{2A} His 452 Tyr	His/His	His/Tyr und Tyr/Tyr		
Patienten mit NWs	22,3 % (21 von 94)	27,7 % (4 von 15)		0,795*

*Fisher-Exact-Test

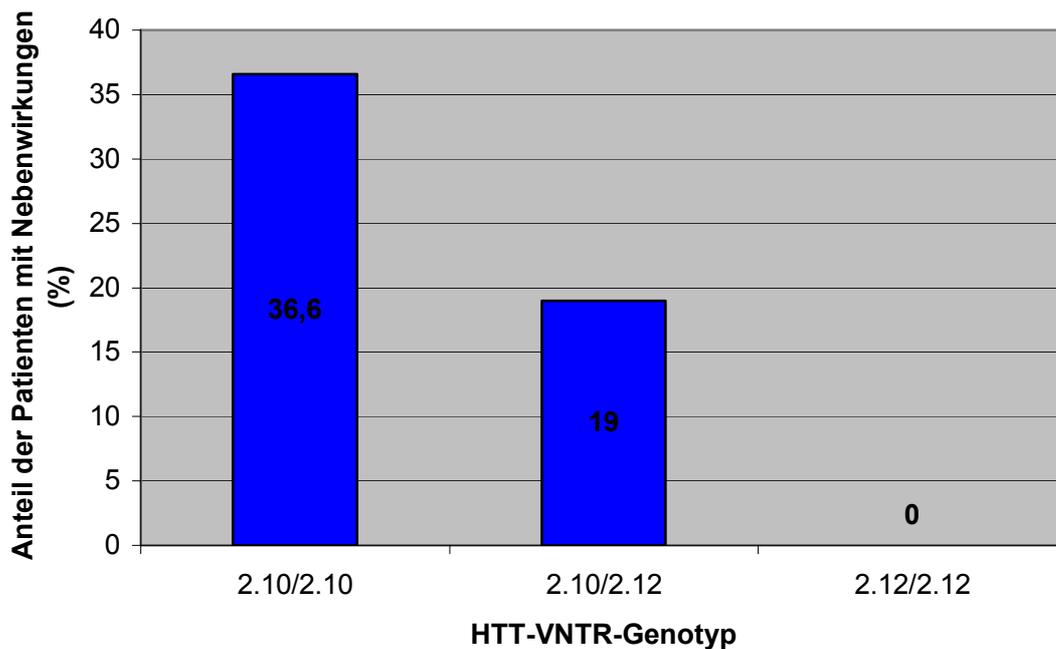


Abbildung 30: HTT-VNTR Genotyp und Prävalenz von Nebenwirkungen bei Patienten mit depressiver Episode

Modell der HTT-Risiko-Gruppen

Basierend auf den in der Literatur beschriebenen funktionellen Auswirkungen (Lesch et al., 1996; Heils et al. 1996; Fishkerstrand et al. 1999) und den theoretischen Nebenwirkungsrisiken (erhöhte synaptische 5-HT-Konzentrationen könnten, über zentrale und periphere Serotoninrezeptoren

vermittelt, zu vermehrten, vor allem serotonergen Nebenwirkungen, führen) der beiden Polymorphismen wurden sogenannte High-, Medium- und Low-Risk-HTT-Gruppen definiert (siehe Tabelle 47). Als Patienten mit dem höchsten Risiko für Nebenwirkungen (High-Risk) wurden solche eingestuft, die die Genotyp-Kombination mit der niedrigsten Serotoninwiederaufnahme bzw. der niedrigsten HTT-Genexpression (l/s- oder s/s-Genotyp des HTTLPR Polymorphismus und 2.10/2.10-Genotyp des HTT-VNTR Polymorphismus) aufweisen. Patienten mit Allelen, die zu höherer Genexpression führen (l/l-Genotyp des HTTLPR Polymorphismus und 2.10/2.12- oder 2.12/2.12-Genotyp des HTT-VNTR Polymorphismus) wurden der Low-Risk-HTT-Gruppe zugeordnet. Alle anderen Kombinationen wurden als Medium-Risk-HTT-Gruppe definiert.

Tabelle 47: HTT-Risiko-Gruppen

HTTLPR/HTT-VNTR	2.10/2.10	2.10/2.12 oder 2.12/2.12
l/l	Medium Risk	Low risk
s/l oder s/s	High Risk	Medium Risk

Besonders in der High-Risk-Gruppe war die Prävalenz von Nebenwirkungen mit 42,9 % (12 von 28) hoch. Dagegen hatten nur 20,0 % (7 von 35) der Patienten aus der Low-Risk-Gruppe und 13,0 % (6 von 46) der Patienten aus der Medium-Risk-Gruppe Nebenwirkungen nach DOTES. Der Unterschied zwischen den drei HTT-Risiko-Gruppen war statistisch signifikant ($p=0,014$; Fisher-Exact-Test).

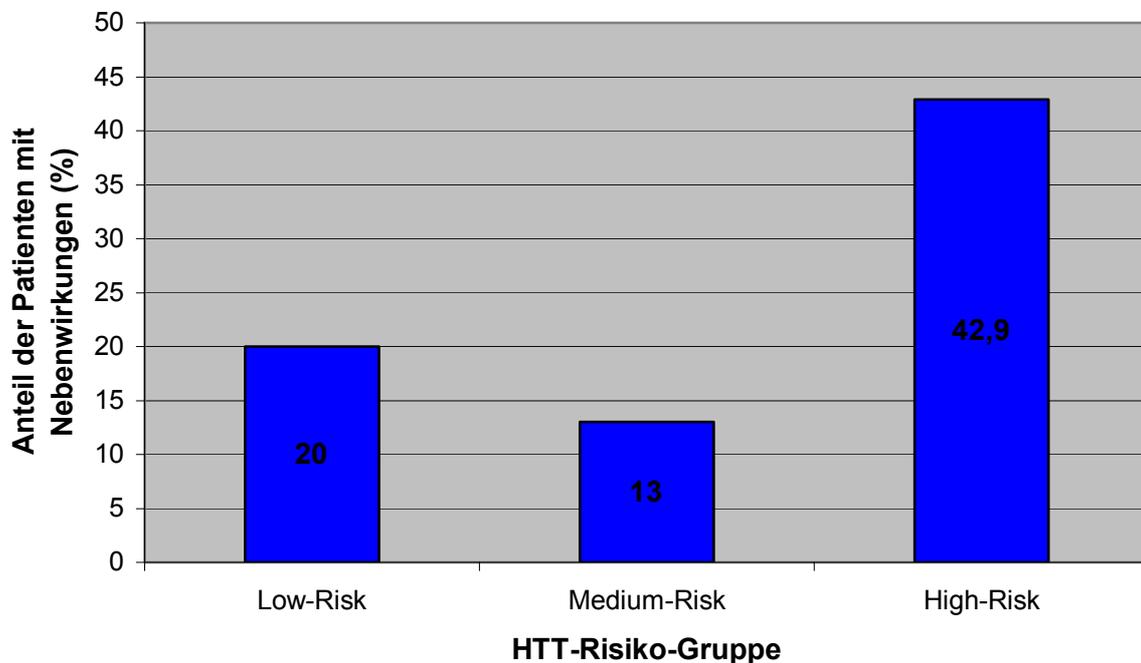


Abbildung 31: HTT-Risiko-Gruppe und Prävalenz von Nebenwirkungen bei Patienten mit depressiver Episode

Vergleicht man die High-Risk-Gruppe mit allen anderen, ergibt sich folgendes Signifikanzniveau: χ^2 -Test; $p=0,008$ (OR=3,92 für den High-Risk Patienten im Vergleich zu Medium- und Low-Risk Patienten; 95 % CI 1,53-10,08).

Störgrößen (Confounder)

Verschiedene Faktoren, wie das Alter, das Geschlecht, oder die Schwere der Erkrankung zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme, können selbst einen Einfluss auf die Aufenthaltsdauer, die Response und die auftretenden Nebenwirkungen haben (Confounder). Zwischen den Genotypgruppen eines jeden einzelnen der untersuchten Polymorphismen bzw. der definierten HTT-Risiko-Gruppen gab es jedoch keine signifikanten ($p>0,05$) Unterschiede hinsichtlich Alter, Geschlecht und Schwere der Erkrankung bei Aufnahme in die Studie (CGI 1). Die Daten hierzu sind im Anhang in Tabelle 61 im Detail aufgeführt.

Die Genotypverteilung der biallelischen Polymorphismen entsprach dem genetischen Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg (HTTLPR Polymorphismus: $\chi^2=1,220$, $df=2$, $p=0,543$; HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus: $\chi^2=1,098$, $df=2$, $p=0,578$; HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus: $\chi^2=0,311$, $df=2$, $p=0,856$).

4.2.5 Untersuchungen an Patienten die vorwiegend mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden

Wie aus der Abbildung 29 ersichtlich, bekamen 65 der depressiven Patienten innerhalb der ersten 4 Wochen Mirtazapin (25 Patienten davon in Kombination mit anderen Antidepressiva). Mirtazapin ist ein zentral wirksamer, präsynaptisch angreifender α_2 -Rezeptor-Antagonist, und erhöht auf diese Weise die Noradrenalin und Serotonin-Freisetzung. Der HTT-Transporter stellt kein Target von Mirtazapin dar (Puzantian, 1998). Die 44 anderen Patienten wurden mit Ausnahme von 2 Patienten (1x Tranylcypromin und 1x Reboxetin als Monotherapie) mit mindestens einem Antidepressivum therapiert, das direkt am HTT antagonistisch wirkt und dadurch die Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt erhöht (vorwiegend SSRIs, TCAs und Venlafaxin). Die verordneten Antidepressiva waren (Es)Citalopram (17x), Venlafaxin (6x), Doxepin (5x), Paroxetin (5x), Amitriptylin (4x), Sertralin (3x), Reboxetin (3x), Trimipramin (3x) Clomipramin (2x), und jeweils 1-mal Fluoxetin, Opipramol und Tranylcypromin (Mehrfachverordnungen pro Patient möglich). Aufgrund der pharmakologischen Unterschiede wurden Patienten, die vorwiegend mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden, jedoch kein Mirtazapin bekamen, gesondert ausgewertet.

4.2.5.1 Ansprechen auf die Therapie mit HTT-blockierenden Antidepressiva und Genotyp

Response nach PDS-D

Da bei 9 Patienten zum Tag 28 kein PDS-D erhoben werden konnte, gingen nur die Daten von 35

Patienten in die Auswertung mit ein. Der durchschnittliche PDS-D-Wert dieser 35 mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelten Patienten betrug bei Aufnahme $22,6 \pm 9,6$ und sank nach 4 Wochen auf $15,4 \pm 10,0$. Dies entspricht einem durchschnittlichen Rückgang um 7,2 Punkte oder 31,9 %. Der Rückgang des PDS-D nach 4 Wochen war statistisch signifikant ($p < 0,001$; Wilcoxon-Test). 31,4 % (11 von 35) der Patienten respondierten nach PDS-D. Die Assoziation zwischen den Genotypen und der Response nach dem Kriterium PDS-D ist in Tabelle 48 dargestellt.

Tabelle 48: Ansprechen auf die Therapie mit HTT-blockierenden Antidepressiva nach PDS-D und Genotyp

HTTLPR	l/l	l/s	s/s	p
Responder	23,7 % (3 von 11)	43,8 % (7 von 16)	12,5 % (1 von 8)	0,299*
HTT-VNTR	2.10/2.10	2.10/2.12	2.12/2.12	
Responder	26,7 % (4 von 15)	27,3 % (3 von 11)	44,4 % (4 von 9)	0,653*
HT _{2A} -1438 G/A	G/G	G/A	A/A	
Responder	25,0 % (4 von 16)	46,2 % (6 von 13)	0,0 % (1 von 6)	0,389*

*Fisher-Exact-Test

Response nach CGI 2

Lediglich von 2 Patienten mit HTT-blockierenden Antidepressiva konnte nach 4 Wochen kein CGI 2 bestimmt werden. Die restlichen 42 Patienten hatten zu diesem Zeitpunkt einen durchschnittlichen CGI 2 Wert von $3,51 \pm 0,99$ und 45,2 % (19 von 42) erreichten einen CGI 2 Wert von 1 oder 2 (= Response). Die Assoziation zwischen den Genotypen und der Response hinsichtlich des Kriteriums CGI 2 ist aus Tabelle 49 ersichtlich.

Tabelle 49: Ansprechen auf die Therapie mit HTT-blockierenden Antidepressiva nach CGI 2 und Genotyp

HTTLPR	l/l	l/s	s/s	p
Responder	56,3 % (9 von 16)	36,8 % (7 von 19)	42,9 % (3 von 7)	0,501*
HTT-VNTR	2.10/2.10	2.10/2.12	2.12/2.12	
Responder	52,6 % (10 von 19)	40,0 % (8 von 15)	37,5 % (3 von 8)	0,716*
HT _{2A} -1438 G/A	G/G	G/A	A/A	
Responder	33,3 % (6 von 18)	62,5 % (10 von 16)	37,5 % (3 von 8)	0,255*

*Fisher-Exact-Test

Keiner der Polymorphismen zeigte eine signifikante Assoziation zum Ansprechen auf die antidepressive Therapie nach den Auswertungskriterien CGI 2 und PDS-D.

4.2.5.2 Nebenwirkungen unter der Therapie mit Antidepressiva, die den HTT blockieren und Genotyp

27,3 % (12 von 44; 95 % CI 15,0-42,8) der mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelten depressiven Patienten hatten Nebenwirkungen nach DOTES.

Tabelle 50: Nebenwirkungen unter der Therapie mit HTT-blockierenden Antidepressiva und Genotyp

HTTLPR	l/l	l/s	s/s	p
Patienten mit NWs	0% (0 von 16)	40,0% (8 von 20)	50,0% (4 von 8)	0,002*
HTT-VNTR	2.10/2.10	2.10/2.12	2.12/2.12	
Patienten mit NWs	52,6% (10 von 19)	12,5% (2 von 16)	0% (0 von 9)	0,004*
HTT-Risk-Gruppe	Low	Medium	High	
Patienten mit NWs	0% (0 von 13)	13,3% (2 von 15)	62,5% (10 von 16)	0,00018*

*Fisher-Exact-Test

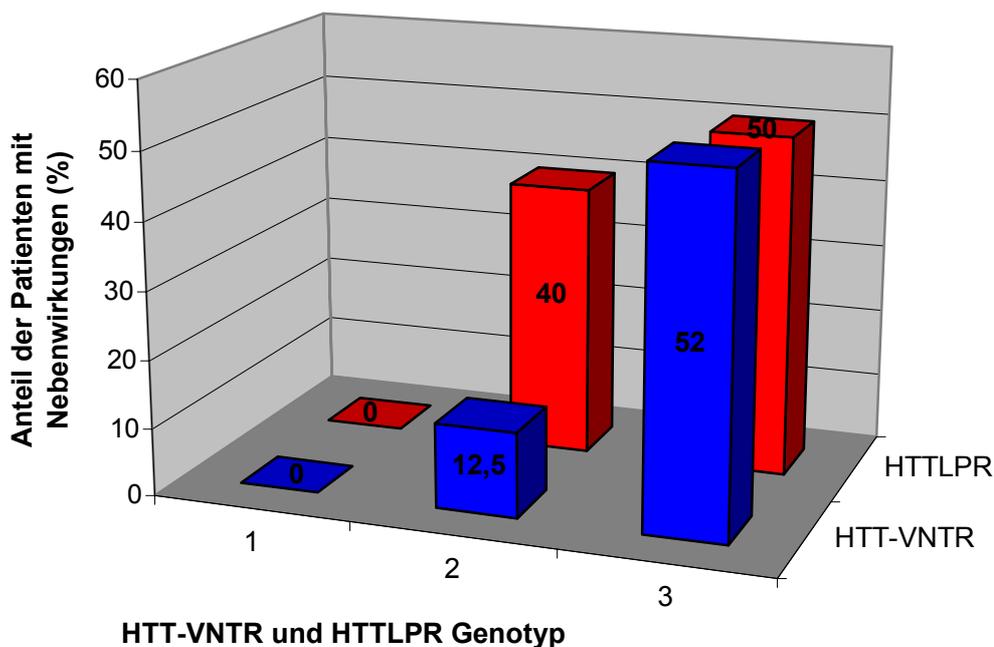


Abbildung 32: HTT-VNTR und HTTLPR Polymorphismus und Prävalenz von Nebenwirkungen bei Patienten die mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden (Genotyp 1: l/l bzw. 2.12/2.12; Genotyp 2: l/s bzw. 2.10/2.12; Genotyp 3: s/s bzw. 2.10/2.10)

Der HTT-VNTR Polymorphismus zeigte eine signifikante Assoziation mit den auftretenden Nebenwirkungen ($p=0,004$; Fisher-Exact-Test). 52,6 % der für das 2.10-Allel homozygoten Patienten, jedoch nur 12,5 % der heterozygoten und keiner der für das 2.12-Allel homozygoten Patienten hatten substantielle Nebenwirkungen nach der verwendeten DOTES-Skala. Auch der Unterschied der Nebenwirkungshäufigkeit zwischen den Genotypgruppen des HTTLPR

Polymorphismus war hier, im Gegensatz zur gesamten F3-Population, signifikant ($p=0,002$; Fisher-Exact-Test).

Die HTT-Risiko-Gruppe (siehe „Modell der HTT-Risiko-Gruppen“ unter 4.2.3.3) zeigte eine hochsignifikante Assoziation mit der Nebenwirkungshäufigkeit ($p=0,00018$; Fisher-Exact-Test). Keiner der Patienten aus der Low-Risk-Gruppe hatte Nebenwirkungen. Patienten aus der Medium-Risk-Gruppe zeigten mit einer Prävalenz von 13,3 % eine mittlere Auftretshäufigkeit, während 62,5 % der Patienten aus der High-Risk-Gruppe unter Nebenwirkungen litten. Es zeigte sich somit eine starke Korrelation zwischen den definierten Risikogruppen und der Prävalenz von Nebenwirkungen bei Patienten, die mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden (OR=21,67 für den High-Risk Patient im Vergleich zu Medium- und Low-Risk Patienten; 95 % CI 4,04-111,24).

Keine Korrelation mit den auftretenden Nebenwirkungen zeigte hingegen die HTT-Risiko-Gruppe bei Patienten, die mit Mirtazapin behandelt wurden (siehe hierzu Kapitel 4.2.6).

Die Prävalenz von Nebenwirkungen bei den beiden Patientengruppen bezogen auf die HTT-Risiko-Gruppen ist in Abbildung 33 dargestellt.

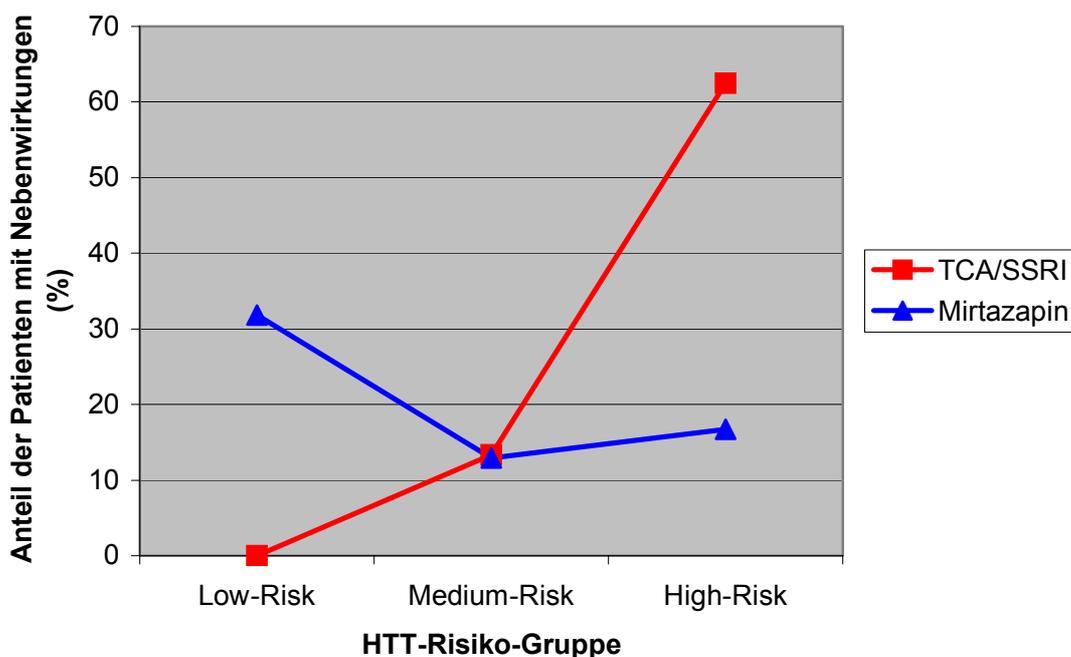


Abbildung 33: HTT-Risiko-Gruppe und Prävalenz von Nebenwirkungen bei Patienten die mit HTT-blockierenden Antidepressiva oder mit Mirtazapin behandelt wurden

Störgrößen (Confounder)

Zwischen den Genotypgruppen eines jeden einzelnen der untersuchten Polymorphismen bzw. der definierten HTT-Risiko-Gruppen gab es keine signifikanten ($p>0,05$) Unterschiede hinsichtlich Alter, Geschlecht und Schwere der Erkrankung bei Aufnahme in die Studie (CGI 1). Die Daten hierzu sind im Anhang in Tabelle 62 im Detail aufgeführt.

Die Genotypverteilung der beiden biallelischen Polymorphismen entsprach dem genetischen Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg (HTTLPR Polymorphismus: $\chi^2=0,151$, $df=2$, $p=0,927$; HT_{2A} - 1438 G/A Polymorphismus: $\chi^2=1,340$, $df=2$, $p=0,512$).

4.2.6 Untersuchungen an Patienten die mit Mirtazapin behandelt wurden

Mirtazapin war das bei Patienten mit depressiver Episode am häufigsten angewandte Antidepressivum (n=65). 25 (38,5 %) der mit Mirtazapin behandelten Patienten bekamen während der ersten 4 Wochen ein zusätzliches Antidepressivum. Die Auswertungen zum Ansprechen auf die Therapie und zu den auftretenden Nebenwirkungen erfolgten analog zu der in der Patientenpopulation, die vorwiegend mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurde.

Zwischen keinem der untersuchten Polymorphismen (HTTLPR Polymorphismus, HTT-VNTR Polymorphismus und HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus) und der Response nach CGI 2 (n=65,) und PDS-D (n=48, von 17 Patienten konnte kein PDS-D erhoben werden) zeigte sich eine theoretisch nachvollziehbare, signifikante Assoziation ($p>0,05$; Fisher-Exact-Test; siehe Tabelle 63 und Tabelle 64 im Anhang).

20,0 % (13 von 65; 95 % CI 11,1-31,8) der Patienten hatten Nebenwirkungen nach DOTES. Die Nebenwirkungshäufigkeit unterscheidet sich nicht signifikant von der Nebenwirkungshäufigkeit in der mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelten Population. Bei den mit Mirtazapin behandelten Patienten zeigte sich überraschenderweise ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den auftretenden Nebenwirkungen und den Genotypen des HTTLPR Polymorphismus. Das Ergebnis scheint jedoch zufällig zu sein, da heterozygote Patienten bezüglich dieses Polymorphismus deutlich weniger Nebenwirkungen zeigten als andere und dies unter pharmakologischen Gesichtspunkten nicht nachvollziehbar ist. Für den HTT-Risiko-Genotyp konnte keine Assoziation mit den Nebenwirkungen gefunden werden (siehe Tabelle 65 und Abbildung 33).

Confounder

Die möglichen Confounder Geschlecht, Alter und Schwere der Erkrankung zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme unterschieden sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Genotypen der untersuchten Polymorphismen ($p>0,05$; siehe Tabelle 66 im Anhang).

Die Genotypverteilung der beiden biallelischen Polymorphismen entsprach dem genetischen Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg (HTTLPR Polymorphismus: $\chi^2=1,134$, $df=2$, $p=0,567$; HT_{2A} - 1438 G/A Polymorphismus: $\chi^2=0,167$, $df=2$, $p=0,920$).

4.2.7 Untersuchungen an Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis

Typische Antipsychotika entwickeln ihre antipsychotischen Effekte, aber auch ihre Nebenwirkungen hauptsächlich über die Blockade von D2-Rezeptoren. Neuere, so genannte atypische Antipsychotika zeigen hingegen auch eine hohe Affinität zu HT₂-Rezeptoren (HT_{2A}-Rezeptor und HT_{2C}-Rezeptor; siehe auch Tabelle 5). Clozapin hat zudem eine besonders hohe D4-Rezeptor-Affinität (Seeman, 1992) und auch der D3-Rezeptor ist ein Target von zahlreichen atypischen Antipsychotika (Naber et al., 2002; S 24-26; siehe auch Tabelle 5). Polymorphismen, die die Struktur oder Expression der oben genannten Rezeptoren verändern, könnten sich somit auf die Therapie mit Antipsychotika auswirken. Auf Basis dieses theoretischen Hintergrundes wurden folgende Polymorphismen hinsichtlich ihrer Beeinflussung einer Therapie mit Antipsychotika untersucht (Kandidaten-Gen-Ansatz, siehe 1.3):

- DRD2 –141C ins/del Polymorphismus
- DRD2 TaqI Polymorphismus
- DRD2 Ser311Cys Polymorphismus
- DRD3 Ser9Gly Polymorphismus
- DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus
- DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus
- DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus
- HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus
- HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus
- HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus

Die antipsychotische Studienmedikation der F2-Population innerhalb der ersten 4 Wochen nach der stationären Aufnahme setzte sich wie in Abbildung 34 aufgezeigt zusammen:

45 (31,7 %) der 142 Patienten wurden neben ihrer antipsychotischen Therapie antidepressiv behandelt. 22 (15,5 %) Patienten bekamen während der ersten 4 Wochen zusätzlich ein Antiepileptikum/Phasenprophylaktikum, 1 Patient 2 Antiepileptika und 94 Patienten (66,2 %) mindestens ein Sedativum (Verordnung mehrerer verschiedener Sedativa innerhalb der 4 Wochen pro Patient möglich).

Die psychotrope Komedikation der Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis ist in Tabelle 51 aufgeführt.

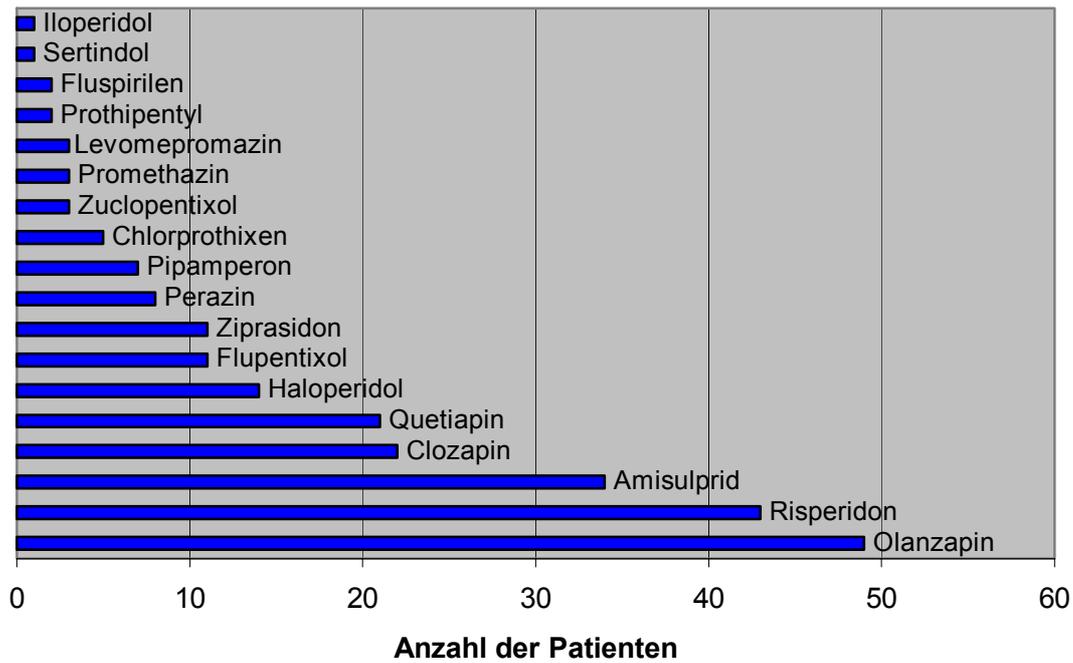


Abbildung 34: Antipsychotische Medikation der Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis (Mehrfachverordnungen pro Patient möglich)

Tabelle 51: Psychotrope Komedikation der Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis

Psychotrope Komedikation	Anzahl der Verordnungen*
<u>SSRIs</u>	<u>25</u>
Citalopram	13
Escitalopram	3
Fluoxetin	2
Paroxetin	5
Sertralin	2
<u>Mirtazapin</u>	<u>14</u>
<u>Andere Antidepressiva</u>	<u>10</u>
Doxepin	4
Moclobemid	1
Opi Pramol	1
Reboxetin	1
Trimipramin	1
Venlafaxin	2

Psychotrope Komedikation	Anzahl der Verordnungen*
<u>Phasenprophylaktika/Antiepileptika</u>	<u>23</u>
Carbamazepin	5
Oxacarbazepin	1
Lithium	12
Valproinsäure	5
<u>Sedativa/Hypnotika</u>	<u>128</u>
Diazepam	14
Flunitrazepam	4
Lorazepam	76
Lormetazepam	15
Oxazepam	1
Zolpidem	7
Zopiclon	11

*Mehrfachverordnungen pro Patient innerhalb der ersten 4 Wochen möglich

4.2.7.1 Aufenthaltsdauer und Genotyp

Die 142 Patienten mit primärer F2-Diagnose hatten eine durchschnittliche Aufenthaltsdauer von 57,7 +/-39,6 Tagen. Zur statistischen Auswertung wurde ein Patient mit dem DRD2 –141C del/del Genotyp den Patienten der C ins/del-Genotypgruppe zugeordnet. 2 Patienten, die homozygot für die 1x Wiederholung des DRD4 12bp Wiederholungspolymorphismus waren, wurden der für diesen Polymorphismus heterozygoten Gruppe zugeordnet. Da das Gen für den HT_{2C}-Rezeptor auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, wurden hinsichtlich des HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus Frauen (w) und Männer (m) getrennt ausgewertet. Diese Einteilungen wurden auch bei den folgenden Auswertungen an der F2-Population oder den entsprechenden Subpopulationen beibehalten.

Keiner der untersuchten Polymorphismen zeigte eine signifikante Assoziation zur stationären Aufenthaltsdauer ($p > 0,05$; Fisher-Exact-Test). Die Ergebnisse der einzelnen Auswertungen sind in Tabelle 67 im Anhang aufgeführt.

Um den Zusammenhang zwischen der Kenngröße Länge der Aufenthaltsdauer, und dem GCI 2-Wert nach 4 Wochen (bzw. am letzten Tag des stationären Aufenthaltes, wenn die Aufenthaltsdauer < 4 Wochen war; $n=31$), oder der Differenz zwischen dem PDS-P nach 4 Wochen (bzw. am letzten Tag des stationären Aufenthaltes; $n=31$) und dem PDS-P zum Zeitpunkt der Aufnahme (entspricht Rückgang oder Zunahme der psychotischen Symptomatik) zu beschreiben, wurde die Korrelation nach Spearman berechnet. Die Länge der Aufenthaltsdauer korrelierte kaum nennenswert mit dem CGI 2-Wert (Spearman $r_s=0,187$; $p=0,027$), und nicht mit der Differenz zwischen den PDS-P-Werten (Spearman $r_s=0,053$; $p=0,598$).

4.2.7.2 Ansprechen auf die Therapie und Genotyp

4 Wochen (am Tag 28) nach der stationären Aufnahme wurde das Ansprechen auf die Therapie (Response) mittels der CGI 2-Skala und der PDS-P-Skala bestimmt. Die gewählten Kriterien für Response wurden bereits unter 3.2.1.3 beschrieben. Bei Patienten, die weniger als 28 Tage stationär behandelt wurden (n=31), wurde die Response am letzten Tag ihres Aufenthaltes bestimmt (LOCF).

Der CGI 2-Wert nach 4-wöchiger Behandlung bzw. am letzten Tag des stationären Aufenthaltes korrelierte kaum nennenswert mit der Differenz zwischen dem PDS-P nach 4 Wochen (bzw. am letzten Tag des stationären Aufenthaltes) und dem PDS-P zum Zeitpunkt der Aufnahme (entspricht Rückgang oder Zunahme der psychotischen Symptome) (Spearman $r_s=0,154$; $p=0,046$).

Response nach PDS-P

Von 102 der 142 F2-Patienten konnte 4 Wochen nach der stationären Aufnahme oder bei Entlassung ein PDS-P bestimmt werden. Zum Zeitpunkt der Aufnahme betrug bei diesen 102 Patienten der durchschnittliche Wert der P-Skala 9,93 +/-9,11 und nach 4 Wochen (bzw. bei Entlassung) 6,76 +/-7,25. Das entspricht einem durchschnittlichen Rückgang um 3,17 Punkte (31,9 %). Der Rückgang des PDS-P war signifikant ($p<0,001$; Wilcoxon-Test). 47,1 % (48 von 102) der F2-Patienten sprachen nach 28 Tagen auf ihre Therapie an (PDS-P-Rückgang ≥ 50 %).

Keiner der untersuchten Polymorphismen zeigte eine signifikante Assoziation mit dem Ansprechen auf die Therapie nach PDS-P (siehe Tabelle 68 im Anhang).

Lediglich bei der Auswertung des DRD3 Ser9Gly Polymorphismus zeigte sich ein Trend ($p=0,146$, Fisher-Exact-Test) zu schlechterem Ansprechen der Patienten mit dem Ser/Ser-Genotyp (37,7 % Responder; 19 von 51), verglichen mit heterozygoten Patienten (57,1 % Responder; 24 von 42) und Homozygoten für das Gly-Allel (55,6 % Responder; 5 von 9). Vergleich man den Ser/Ser-Genotyp (19 von 51 oder 37,3 % Responder) mit allen anderen (29 von 51 oder 56,9 % Responder), konnte ebenso kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,074$, Fisher-Exact-Test). Da bezüglich dieser Auswertung in einer 2x2-Felder-Tabelle keine Zelle eine erwartete Häufigkeit kleiner 5 hat, kann theoretisch auch der χ^2 -Test zum Einsatz kommen, der einen statistisch signifikanten Unterschied in der Häufigkeit der Responder zeigt ($p=0,047$; OR=2,22 für Gly/Gly-Genotyp und Gly/Ser-Genotyp versus Ser/Ser-Genotyp; 95 % CI 1,01-4,882). Da der Fisher-Exact-Test exaktere Werte liefert und die Signifikanz nach dem χ^2 -Test grenzwertig ist, muss das Ergebnis allerdings vorsichtig interpretiert werden.

Response nach CGI 2

Von 6 Patienten konnte zum Zeitpunkt 4 Wochen nach der stationären Aufnahme oder bei Entlassung (wenn Aufenthaltsdauer < 4 Wochen) kein CGI 2-Wert erhoben werden. Der durchschnittliche CGI 2-Wert der restlichen 136 Patienten der F2-Population betrug $3,37 \pm 1,04$. 56,6 % (77 von 136) dieser Patienten sprachen nach dem CGI 2 auf ihre Therapie an. Keiner der untersuchten Polymorphismen zeigte eine signifikante Assoziation mit dem Ansprechen auf die Therapie nach CGI 2. Die einzelnen Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 69 im Anhang aufgeführt.

Patienten, die homozygot für das C ins-Allel des DRD2 C ins/del-Polymorphismus waren, sprachen häufiger (60,2 % Responder; 69 von 113) auf ihre Therapie an als Patienten mit dem C ins/del- und C del/del-Genotyp (39,1 % Responder; 9 von 23). Der Unterschied zwischen den Genotypen erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,070$; Fisher-Exact-Test).

Der DRD3 Ser9Gly Polymorphismus zeigte in der Auswertung nach CGI 2 keine signifikante Assoziation mit der Response ($p=0,726$; Fisher-Exact-Test). Patienten mit dem Ser/Ser-Genotyp sprachen etwas häufiger (58,8%; 40 von 68) an als heterozygote Patienten (56,1%; 32 von 57) und solche mit dem Gly/Gly-Genotyp (45,5%; 5 von 11). Der Trend aus der Auswertung mit dem PDS-P konnte damit nicht bestätigt werden.

4.2.7.3 Nebenwirkungen und Genotyp

31,2 % (44 von 141; 95 % CI 23,7-39,6) der Patienten aus der F2 Population hatten Nebenwirkungen nach DOTES (bei einem Patienten konnte kein DOTES erhoben werden). Bei der Auswertung der Nebenwirkungen zeigte sich keine Assoziation zwischen den untersuchten Polymorphismen und der Nebenwirkungshäufigkeit (siehe Tabelle 70 im Anhang).

Confounder

Die möglichen Confounder Geschlecht, Alter und Schwere der Erkrankung zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme (CGI 1) unterschieden sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Genotypen der jeweiligen Polymorphismen ($p>0,05$). Detaillierte Werte hierzu sind in Tabelle 71 im Anhang aufgeführt.

Die Genotypverteilung der biallelischen Polymorphismen wich in der F2-Population nicht signifikant vom genetischen Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg ab (DRD2 -141 C ins/del Polymorphismus: $\chi^2=0,037$, $df=2$, $p=0,982$; DRD2 Taq I Polymorphismus: $\chi^2=1,157$, $df=2$, $p=0,561$; DRD2 Ser311Cys Polymorphismus: $\chi^2=0,001$, $df=1$, $p=0,970$; DRD3 Ser9Gly Polymorphismus: $\chi^2=0,121$, $df=2$, $p=0,941$; DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus: $\chi^2=0,012$, $df=1$, $p=0,913$; DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus: $\chi^2=1,100$, $df=2$, $p=0,577$; HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus: $\chi^2=1,121$, $df=2$, $p=0,546$; HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus: $\chi^2=0,207$, $df=2$, $p=0,902$; HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus [w]: $\chi^2=0$, $df=2$, $p=1,000$).

4.2.7.4 Extrapyramidalmotorische Nebenwirkungen und Genotyp

Extrapyramidalmotorische Nebenwirkungen unter der Therapie mit Antipsychotika manifestieren sich meist zu Beginn der Behandlung als Frühdyskinesien, Parkinsonoid oder Akathisie und nach längerer Einnahme als zum Teil irreversible Spätdyskinesien. Die früh einsetzenden EPS können mit einem Muscarinrezeptor-Antagonisten wie Biperiden behandelt werden. EPS treten auf, wenn ca. 75-80 % der D2-Rezeptoren in den Basalganglien blockiert werden (Kapur, 1998). Im Rahmen der hier vorliegenden Studie wurde deshalb untersucht, ob zwischen den Polymorphismen im D2-Rezeptor-Gen (DRD2 Taq I Polymorphismus, DRD2 -141 C ins/del Polymorphismus und DRD2 Ser311Cys Polymorphismus) und dem Auftreten von EPS ein Zusammenhang besteht. Als Surrogat für das Auftreten von EPS wurde die Gabe von Biperiden ausgewertet.

12,0 % (17 von 142) Patienten aus der F2-Population erhielten während der ersten 4 Wochen ihres stationären Aufenthaltes Biperiden zur Behandlung von EPS. Von den untersuchten Polymorphismen zeigte lediglich der DRD2 Taq I Polymorphismus einen Zusammenhang mit der Auftrittshäufigkeit von EPS. Patienten mit dem schwächer exprimierenden A1/A1-Genotyp litten mehr als 3-mal so häufig unter behandlungsbedürftigen extrapyramidal-motorischen Nebenwirkungen als andere (siehe Tabelle 52 und Abbildung 35). Der Unterschied zwischen den drei Genotypgruppen ist allerdings nicht statistisch signifikant ($p=0,072$; Fisher-Exact-Test). Statistische Signifikanz wird auch knapp verfehlt, wenn man A1/A1-Genotyp-Träger mit allen anderen vergleicht ($p=0,055$; Fisher-Exact-Test). Sowohl der DRD2 -141C ins/del Polymorphismus, als auch der DRD2 Ser311Cys Polymorphismus zeigte keine signifikante Assoziation mit dem Auftreten von EPS, die mit Biperiden behandelt wurden.

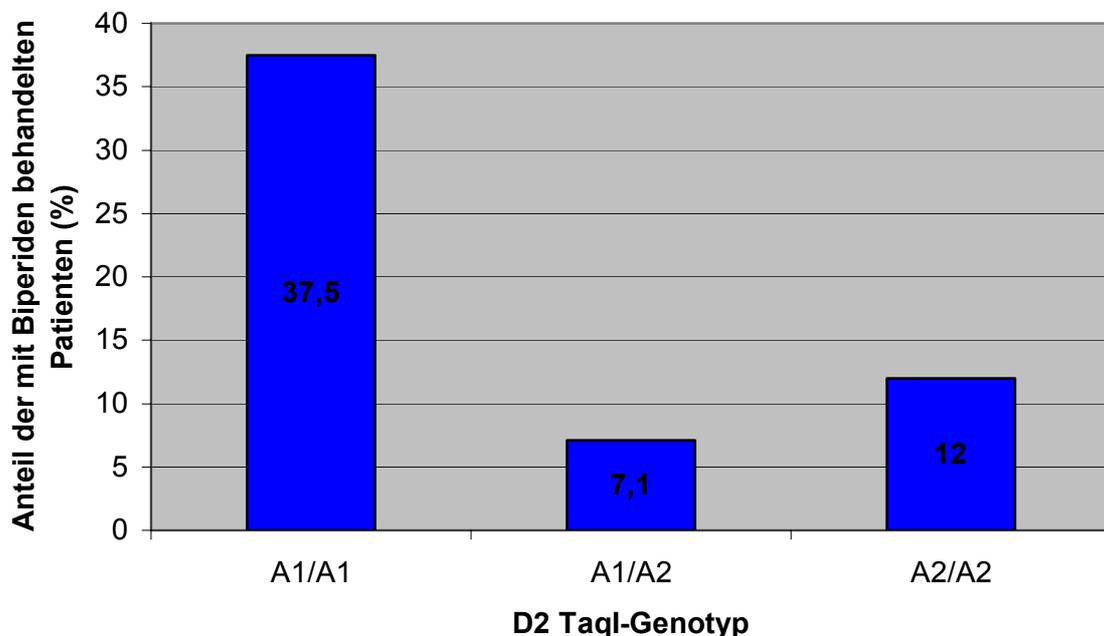


Abbildung 35: DRD2 TaqI Polymorphismus und Auftreten von EPS die mit Biperiden behandelt wurden

Tabelle 52: Extrapiramidalmotorische Symptome und Polymorphismen im DRD2

DRD2 TaqI	A1/A1	A1/A2	A2/A2	P-Wert*
Patienten mit Biperiden	37,5 % (3 von 8)	7,1 % (3 von 42)	12,0 % (11 von 92)	0,072
DRD2 -141 C ins/del	Ins/ins	Ins/del und del/del		
Patienten mit Biperiden	11,1 % (13 von 117)	16,0 % (4 von 25)		0,502
DRD2 Ser311Cys	Ser/Ser	Ser/Cys		
Patienten mit Biperiden	11,9 % (16 von 135)	14,3 % (1 von 7)		1,000

*Fisher-Exact-Test

4.2.7.5 Gewichtszunahme und DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus bzw. HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus

Aus den Daten klinischer Studien geht hervor, dass die Therapie mit Antipsychotika zu einer deutlichen Gewichtszunahme führen kann (Allison et al., 1999). Das dopaminerge System scheint an der Regulation des Körpergewichts beteiligt zu sein. So wird eine verringerte dopaminerge Aktivität mit unphysiologischem Essverhalten in Verbindung gebracht (Poston et al., 1998). Tierversuche haben gezeigt, dass auch 5-HT_{2C}-Antagonisten eine gesteigerte Nahrungsaufnahme verursachen können. Deshalb stand der 5-HT_{2C}-Rezeptor bisher im Zentrum pharmakogenetischer Studien, die eine Assoziation mit der Gewichtszunahme unter Antipsychotika-Therapie untersuchten (Reynolds et al., 2002 und 2003; Ellingrod, et al., 2005; Templeman et al., 2005).

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie wurde die Assoziation zwischen dem DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus bzw. dem HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus und der Gewichtszunahme unter einer Therapie mit Antipsychotika untersucht. Die Gewichtszunahme innerhalb einer 4-wöchigen antipsychotischen Therapie ist in den folgenden Auswertungen als Zunahme des BMI [Body Mass Index; BMI=Körpergewicht (kg)/Körpergröße (m)²] dargestellt.

Von den 142 F2-Patienten wurden 31 bereits vor Tag 28 entlassen. Da eine Beeinflussung der Gewichtszunahme durch die Dauer einer antipsychotischen Therapie zu erwarten ist, wurden Patienten, die kürzer als 4 Wochen stationär behandelt wurden (n=31), nicht in die Auswertung eingeschlossen. Von weiteren 9 Patienten, die länger als 4 Wochen stationär behandelt wurden, konnte kein Körpergewicht am Tag 28 ermittelt werden. Letztendlich gingen somit die Daten von 102 Patienten in die Berechnungen ein. Diese 102 Patienten waren durchschnittlich 171,93 cm (+/- 8,58) groß und wogen zu Beginn (Tag der Aufnahme) durchschnittlich 73,83 kg (+/-15,12). 56 (54,9 %) der Patienten waren weiblich und 46 männlich. Die Patienten erhielten eine ihrem Krankheitsbild entsprechende antipsychotische Therapie. Die in den ersten 4 Wochen verordneten Antipsychotika sind in Tabelle 53 aufgeführt.

Tabelle 53: Antipsychotische Medikation der 102 Patienten innerhalb der ersten 4 Wochen

Medikament	Anzahl der Verordnungen
<u><i>Atypische Antipsychotika</i></u>	
Olanzapin	35
Risperidon	32
Amisuprid	22
Quetiapin	16
Clozapin	16
Ziprasidon	9
<u><i>Nieder- und mittelpotente Antipsychotika</i></u>	
Perazin	7
Pipamperon	7
Chlorprothixen	3
Zuclopentixol	3
Promethazin	3
Levomepromazin	3
Prothipentyl	2
<u><i>Hochpotente Antipsychotika</i></u>	
Haloperidol	9
Flupentixol	11
Fluspirilen	1
Sertindol	1

48,0 % (49 von 102) der Patienten wurde vor Einschluss in die Untersuchung bereits mit einem Antipsychotikum behandelt. 33,4 % (33 von 102) bekamen neben der antipsychotischen auch eine antidepressive Therapie, 66,7 % (68 von 102) nahmen während der ersten 4 Wochen ein Sedativum/Hypnotikum und 16,7 % (17 von 102) ein Phasenprophylaktikum/Antiepileptikum zu sich.

DRD4 48bp Wiederholungspolymorphismus und Gewichtszunahme

Wie bereits unter 4.1.2.2 erwähnt, wurden die Allele des DRD4 48bp Wiederholungspolymorphismus, basierend auf funktionellen Unterschieden, in kurze (S=short; mit < 7 Wiederholungen des 48bp langen Abschnittes) und lange Allele (L=long; mit ≥ 7 Wiederholungen) eingeteilt. Diese Klassifizierung wurde auch bereits in anderen pharmakogenetischen Studien praktiziert (Zalsman et al., 2003).

Das Allel mit der 4-fachen Wiederholung wurde bei den 102 F2-Patienten am häufigsten detektiert (69,6 %; 142 von 204 Allelen), gefolgt vom Allel mit der 7-fachen Wiederholung (14,2 %; 29 von 204), dem Allel mit der 2-fachen Wiederholung (13,2 %; 27 von 204) und dem Allel mit der 3-fachen Wiederholung (2,0 %; 4 von 204). Das Allel mit der 5- bzw. 8-fachen Wiederholung wurde jeweils einmal nachgewiesen (0,5 %). Kein Allel mit der 6-, 9-, oder 10-fachen Wiederholung kam in der Population der 102 F2-Patienten vor.

Die Verteilung der Genotypen in dieser Population ist in Tabelle 54 dargestellt. 72,5 % der Patienten hatten gemäß der bereits oben erläuterten Einteilung den S/S-Genotyp (74 von 102), 25,5 % den S/L-Genotyp (26 von 102) und nur 2 Patienten waren homozygot für das L-Allel (2 %).

Da nur 2 Patienten homozygot für das lange Allel waren, wurden diese in die Gruppe der heterozygoten Patienten mit einbezogen. Die Einteilung der 102 Patienten erfolgte somit in 2 Genotyp-Gruppen: Gruppe 1 bestand aus Patienten, homozygot für das S-Allel, Gruppe 2 aus solchen mit mindestens einem L-Allel. Die Einteilung in 2 Genotypgruppen wurde auch so bereits von Lung et al. (2002) vorgeschlagen.

Insgesamt wurden 74 Patienten der Genotypgruppe 1 und 28 Patienten der Genotypgruppe 2 zugeordnet.

Tabelle 54: Genotypen des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und Gruppenzuordnung

DRD4 48 bp-Genotyp	n	[%]	Genotyp-Gruppe
2/2	3	2,9	1
2/4	16	15,7	1
2/5	1	1,0	1
2/7	4	3,9	2
3/4	3	2,9	1
3/7	1	1,0	2
4/4	51	50,0	1
4/7	20	19,6	2
4/8	1	1,0	2
7/7	2	2,0	2

Bei den 102 F2-Patienten kam es unter der 4-wöchigen antipsychotischen Therapie zu einer deutlichen Gewichtszunahme von durchschnittlich 1,56 kg (+/-3,26) und einer durchschnittlichen Zunahme des BMI um 0,52 kg/m² (+/-1,11).

Patienten mit einem oder zwei L-Allelen (Genotyp Gruppe 2) hatten eine signifikant stärkere Zunahme des BMI als die anderen Patienten (p=0,003; Mann-Whitney-U-Test). Zum Aufnahmezeitpunkt zeigte das durchschnittliche Körpergewicht bzw. der durchschnittliche BMI in beiden Gruppen keine signifikante Abweichung (siehe auch Tabelle 55).

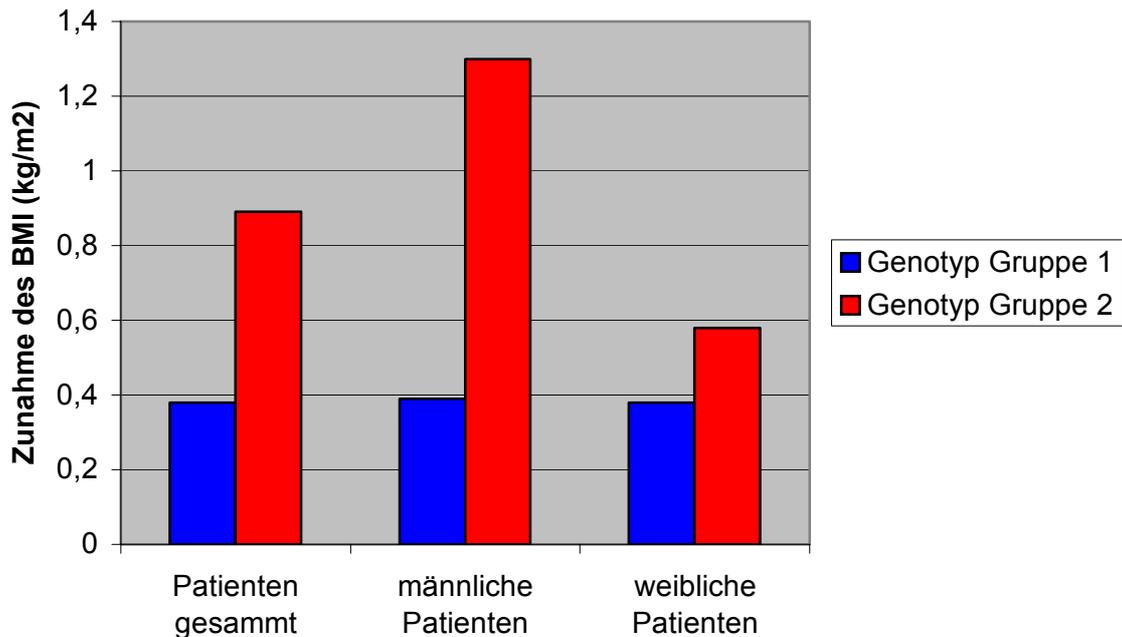


Abbildung 36: DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und Zunahme des BMI

Tabelle 55: DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und BMI

	Gruppe 1 (n=74)	Gruppe 2 (n=28)	p-Wert
Body Mass Index bei Aufnahme (kg/m ²)	25,57 +/-5,34	24,85 +/-4,33	0,925*
Körpergewicht bei Aufnahme (kg)	74,5 +/-16,1	71,9 +/-12,2	0,568*
Zunahme des BMI nach 4 Wochen (kg/m ²)	0,38 +/-1,04	0,89 +/-1,23	0,003*
Zunahme des Körpergewichts	1,14 kg, +/-3,09	2,69 kg; +/-3,50	0,004
Zunahme des BMI nach 4 Wochen (kg/m ²): Männer (n= 46)	0,39 +/-1,07 (n=34)	1,30 +/-0,75 (n=12)	0,005*
Zunahme des BMI nach 4 Wochen (kg/m ²): Frauen (n=56)	0,38 +/-1,03 (n=40)	0,58 +/-1,44 (n=16)	0,130*

*Mann-Whitney-U-Test

Interessanterweise konnte der Unterschied in der Gesamtpopulation nur für die männlichen Patienten verifiziert werden, bei den Frauen zeigte sich lediglich ein weniger ausgeprägter Trend in die gleiche Richtung.

Den Ergebnissen zum BMI in der gesamten Population entsprechend, war auch die absolute Zunahme des Körpergewichts in der Gruppe 1 nach 4-wöchiger antipsychotischer Therapie signifikant niedriger (1,14 kg, +/-3,09) als in der Gruppe 2 (2,69 kg; +/-3,50) (p=0,004; Mann-Whitney-U-Test).

In Abbildung 37 ist aufgeführt, wie häufig ein Antipsychotikum in der jeweiligen Genotypgruppe angewandt wurde (Mehrfachverordnungen pro Patient möglich).

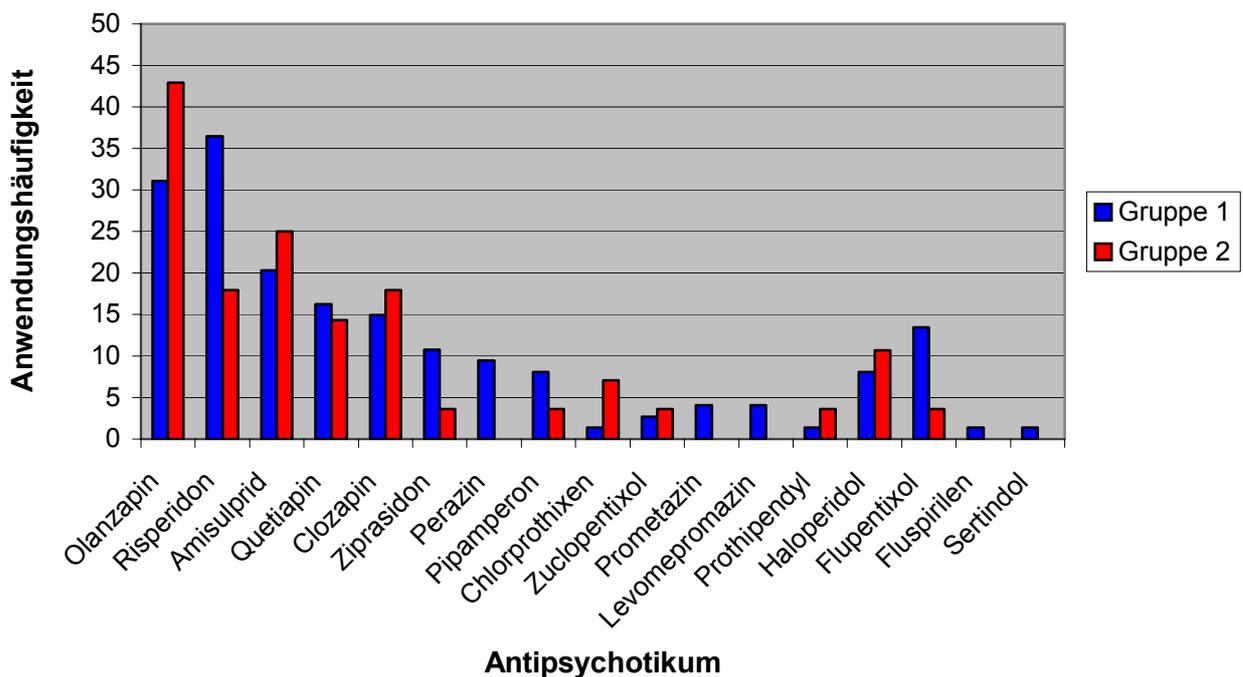


Abbildung 37: Anwendungshäufigkeit der verschiedenen Antipsychotika in den beiden Genotypgruppen des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus

Die Patientencharakteristiken sind in Tabelle 56 dargestellt. Die Patienten in den beiden Genotyp-Gruppen unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich Alter und Schwere der Erkrankung (CG 1) bei Aufnahme. Der Anteil der Raucher, der Frauen, sowie der Patienten, die bereits zum Zeitpunkt der Aufnahme mit Antipsychotika behandelt wurden war zwischen den Genotyp-Gruppen ebenso nicht signifikant unterschiedlich.

Tabelle 56: Patientencharakteristiken der Patienten aus den beiden Genotyp-Gruppen

	Gruppe 1 (n=74)	Gruppe 2 (n=28)	p-Wert
Alter bei Aufnahme (Jahre)	37,5 +/-13,6	37,6 +/-14,2	0,960*
Schwere der Erkrankung bei Aufnahme (CGI 1)	6,07 +/-0,87	6,04 +/-1,02	0,836*
Raucher (%)	55,4 (41 von 74)	53,6 (15 von 28)	1,000**
Anteil Frauen (%)	54,1 (40 von 74)	57,1 (16 von 28)	0,826**
Patienten mit Antipsychotikum bei Aufnahme (%)	51,4 (38 von 74)	39,3 (11 von 28)	0,193**

*Mann-Whitney-U-Test

**Fisher-Exact-Test

HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus und Gewichtszunahme

Da das Gen des HT_{2C}-Polymorphismus auf dem X-Chromosom liegt, wurden Männer (n=46) und Frauen (n=56) getrennt ausgewertet. Zwischen den Genotypgruppen des HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus konnte jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich einer Zunahme des BMI unter der 4-wöchigen antipsychotischen Therapie festgestellt werden.

Tabelle 57: HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus und BMI

Zunahme des BMI (kg/m ²)	Cys/Cys bzw. Cys	Ser/Ser und Cys/Ser bzw. Ser	p-Wert*
Männer	0,64 +/-1,12 (n=38)	0,55 +/-0,85 (n=8)	0,701
Frauen	0,44 +/-1,21 (n=39)	0,42 +/-1,04 (n=17)	0,857

*Mann-Whitney-U-Test

4.2.8 Untersuchungen an Patienten mit Erkrankungen aus dem schizo- phrenen Formenkreis, die mit Olanzapin therapiert wurden

Von den 142 F2-Patienten wurden 49 in den ersten 4 Wochen mit dem atypischen Antipsychotikum Olanzapin behandelt. 46,9 % (23 von 49) erhielten Olanzapin als Monotherapie, 53,1 % (26 von 49) erhielten innerhalb der ersten 4 Wochen der stationären Behandlung zusätzlich andere Antipsychotika. 32,7 % der Patienten (16 von 49) wurden zusätzlich antidepressiv behandelt, während der überwiegende Teil (32 von 49) innerhalb der 4-wöchigen Zeit ein Sedativum/Hypnotikum zu sich nahm. Die durchschnittliche Dosierung von Olanzapin betrug 16,9 +/-6,22 mg pro Tag. 31 der 49 Patienten (63,3 %) litten an Schizophrenie, 10 (20,4 %) hatten schizoaffektive Störungen, 5 (10,2 %) eine akute vorübergehende psychotische Störung, 2 (4,1 %) eine anhaltend wahnhaftige und 1 (2 %) eine schizotype Störung. 46,9 % der Patienten (23 von 49) waren Raucher und 51,0 % (25 von 49) weiblich. Das durchschnittliche Alter betrug 35,5 +/-13,1

Jahre, der mittlere CGI 1 bei Aufnahme 6,14 +/-1,12.

Olanzapin hat eine relativ hohe Affinität zum DRD3 und HT_{2A}-Rezeptor (siehe Tabelle 5) und ist Substrat des P-Glykoproteins (Wang et al., 2004). Deshalb wurde überprüft, ob eine Assoziation zwischen der Therapieresponse und dem DRD3 Ser9Gly Polymorphismus, dem HT_{2A}-1438 G/A Polymorphismus bzw. dem MDR1 C3435T besteht (Kandidaten-Gen-Ansatz). Von 2 der 49 Patienten konnte zu Tag 28 kein CGI 2 und von 11 kein PDS-P erhoben werden.

Nach dem Response-Kriterium PDS-P sprachen 42,1 % (16 von 38; 95 % CI 28,5-59,2) der Patienten an, nach dem CGI 2 61,7 % (29 von 47; 95 % CI 46,4-75,5).

Der CGI 2-Wert nach 4-wöchiger Behandlung korrelierte schwach mit der Differenz zwischen dem PDS-P nach 4 Wochen und dem PDS-P zum Zeitpunkt der Aufnahme (entspricht Rückgang oder Zunahme der psychotischen Symptome) (Spearman $r_s=0,489$; $p=0,002$).

DRD3 Ser9Gly Polymorphismus

Zwischen dem DRD3 Ser9Gly Polymorphismus und dem Ansprechen auf die Therapie mit Olanzapin nach PDS-P zeigte sich eine signifikante Assoziation. 19,0 % (4 von 21) der Patienten aus der Ser/Ser-Genotypgruppe, 64,3 % (9 von 14) der Patienten aus Ser/Gly-Genotypgruppe und 100 % (3 von 3) der Patienten aus der Gly/Gly-Genotypgruppe sprachen auf die Therapie an ($p=0,003$; Fisher-Exact-Test).

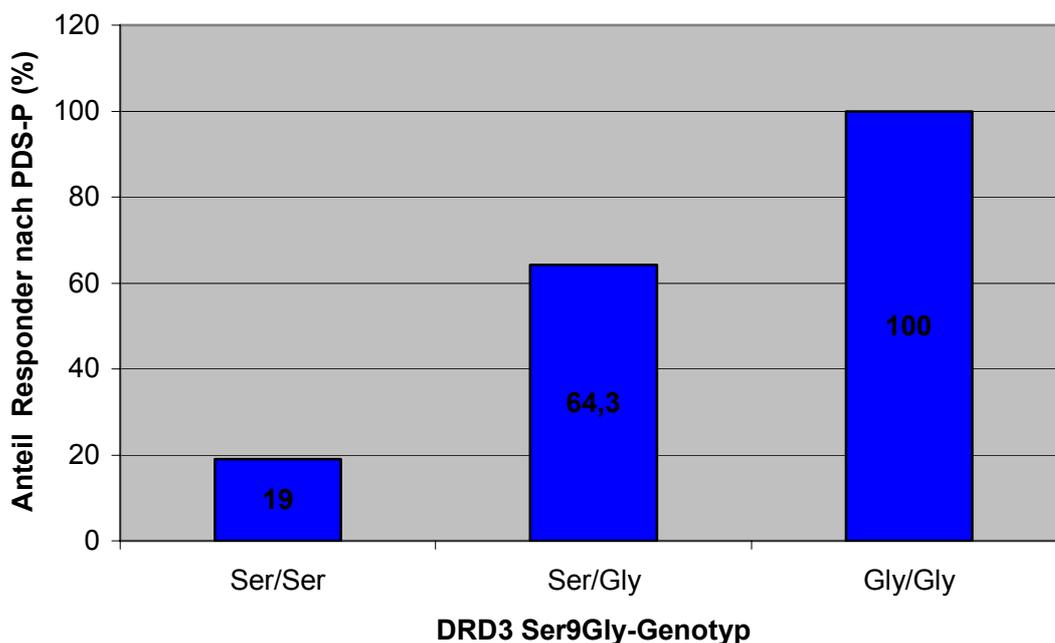


Abbildung 38: DRD3 Ser9Gly Polymorphismus und Olanzapin-Response

Vergleicht man die Patienten mit dem Ser/Ser-Genotyp mit allen anderen, so bleibt der Unterschied in der Responderrate statistisch signifikant (19,0 % Responder versus 70,6 % Responder; $p=0,003$; Fisher-Exact-Test). Die Odds Ratio (Gly/Gly-Genotyp und Ser/Gly-Genotyp versus Ser/Ser-Genotyp) bezüglich Response beträgt 10,20 (95 % CI 2,34-44,4).

Ein nicht signifikantes Ergebnis wurde hingegen bei der Auswertung des CGI 2 erhalten. 64,0 % (16 von 25) der Patienten aus der Ser/Ser-Genotypgruppe, 55,6 % (10 von 18) der Ser/Gly-Genotypgruppe und 75,0 % (3 von 4) der Gly/Gly-Genotypgruppe sprachen auf die Therapie an ($p=0,744$; Fisher-Exact-Test).

Die durchschnittliche tägliche Olanzapin-Dosis bei Patienten mit dem Ser/Ser-Genotyp betrug $16,9 \pm 7,1$ mg, die der heterozygoten Patienten $16,1 \pm 5,0$ mg und die der Patienten mit dem Gly/Gly-Genotyp $20,4 \pm 4,9$ mg. Der Unterschied zwischen den Genotyp-Gruppen war nicht statistisch signifikant ($p=0,403$; Kruskal-Wallis-Test).

HT_{2A}-1438 G/A Polymorphismus

72,7 % (8 von 11) der Patienten mit dem G/G-Genotyp, lediglich 25,0 % (5 von 20) der Patienten mit dem G/A-Genotyp und 42,9 % (3 von 7) der Homozygoten für das A-Allel sprachen nach PDS-P auf ihre Therapie an. Der Unterschied zwischen den Genotypgruppen war nicht statistisch signifikant ($p=0,051$; Fisher-Exact-Test). Wurde der G/G-Genotyp mit allen anderen verglichen, so respondierten 72,7 % (8 von 11) der Patienten mit dem G/G-Genotyp und nur 29,6 % (8 von 27) der anderen Patienten ($p=0,028$; Fisher-Exact-Test). Die Odds Ratio (G/G-Genotyp versus andere Genotypen) bezüglich der Response beträgt 6,33 (95 % CI 1,40-28,05).

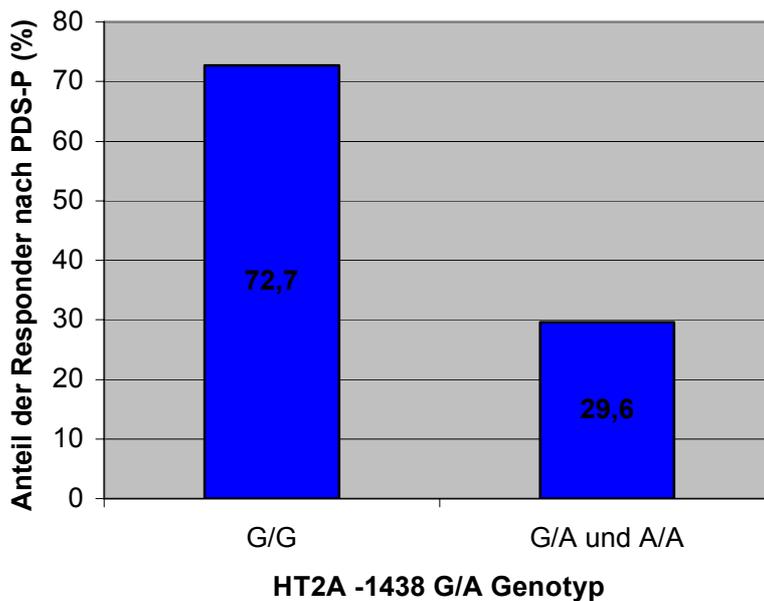


Abbildung 39: HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus und Olanzapin-Response

Verwendete man den CGI 2 als Auswertungskriterium, so sprachen Patienten mit dem G/G-Genotyp am häufigsten auf ihre Therapie an. 73,3 % (11 von 15) der Patienten mit dem G/G-Genotyp respondierten, dagegen nur 58,3 % (14 von 24) der Heterozygoten und 50,0 % (4 von 4) der Patienten mit dem A/A-Genotyp. Der Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant ($p=0,474$; Fisher-Exact-Test).

Die durchschnittliche tägliche Olanzapin-Dosis bei Patienten mit dem G/G-Genotyp betrug $19,7 \pm$

5,0 mg, die der heterozygoten Patienten 16,1 +/-6,8 mg und die der Patienten mit dem Gly/Gly-Genotyp 14,3 +/-5,0 mg ($p=0,096$; Kruskal-Wallis-Test). Die Träger des G/G-Genotyps wurden allerdings mit signifikant höheren Olanzapin-Dosen als andere Patienten behandelt (19,7 +/-5,0 mg versus 15,7 +/-6,4 mg; $p=0,040$; Mann-Whitney-U-Test).

MDR1 C3435T Polymorphismus

Da für homozygote Träger des T-Allels eine signifikant niedrigere Expression des P-Glykoproteins nachgewiesen werden konnte (Hoffmeyer et al., 2000), wurden in der folgenden Auswertung für das T-Allel homozygote Patienten mit allen anderen verglichen.

Nach dem Auswertungsparameter CGI 2 sprachen nur 50,0% (16 von 32) der schizophrenen Patienten mit dem C/C oder C/T-Genotyp auf die Therapie mit Olanzapin an, dagegen 86,7% (13 von 15) der Patienten mit dem niedriger exprimierenden T/T-Genotyp ($p=0,024$; Fisher-Exact-Test). Die Odds Ratio (T/T-Genotyp versus andere Genotypen) bezüglich Response beträgt 6,50 (95 % CI 1,38-29,56). Nach der Auswertung mit dem Parameter PDS-P sprachen zwar Patienten mit dem T/T-Genotyp ebenso häufiger (54,5%; 6 von 11) auf die Therapie mit Olanzapin an, als andere Patienten (37,0%; 10 von 27), der Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p=0,471$; Fisher-Exact-Test).

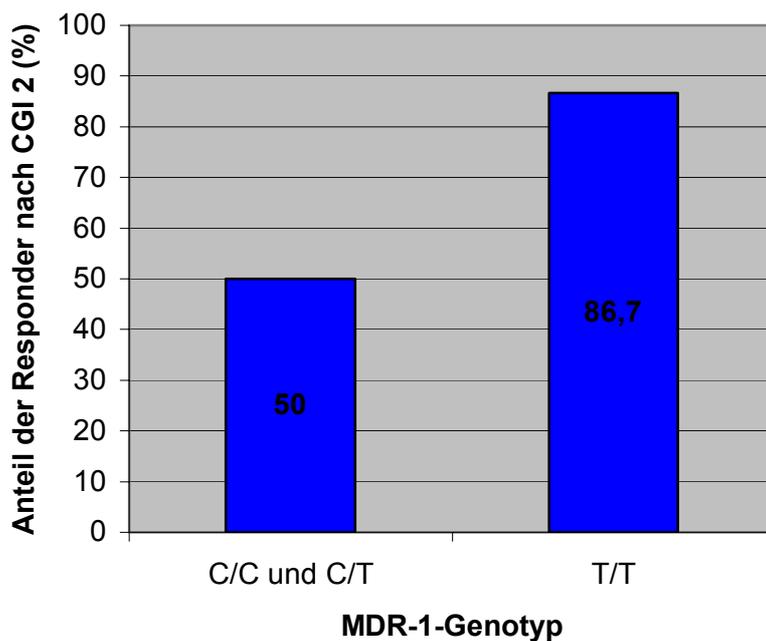


Abbildung 40: MDR1 Polymorphismus und Olanzapin-Response

Patienten mit dem TT-Genotyp wurden mit geringfügig höheren täglichen Olanzapin-Dosen (18,2 +/-5,7 mg) als andere Patienten (16,2 +/-6,4 mg) behandelt ($p=0,316$; Mann-Whitney-U-Test).

Confounder

Wie bereits in der gesamten F2-Population gab es bei den Olanzapin-therapierten Patienten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Confounder Geschlecht, Alter und Schwere der Erkrankung zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme zwischen den jeweiligen Genotypgruppen eines jeden einzelnen Polymorphismus ($p > 0,05$; Fisher-Exact-Test). Auch der Anteil der Raucher unterschied sich nicht signifikant zwischen den einzelnen Genotyp-Gruppen. Detaillierte Werte hierzu sind in Tabelle 72 im Anhang aufgeführt. Die durchschnittliche Dosierung von Olanzapin unterschied sich, wie bereits oben erwähnt, lediglich zwischen den Genotypgruppen des HT_{2A} - 1438 G/A Polymorphismus signifikant.

Die Genotypverteilung der drei Polymorphismen wich bei den 49 mit Olanzapin therapierten Patienten nicht vom genetischen Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg ab (DRD3 Ser9Gly Polymorphismus: $\chi^2=0,046$, $df=2$, $p=0,977$; HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus: $\chi^2=0,340$, $df=2$, $p=0,844$; MDR1 C3435T Polymorphismus: $\chi^2=0$, $df=2$, $p=1,000$).

4.2.9 Polymorphismen in den Cytochromen CYP2C19 und CYP1A2 und Effektivität bzw. Sicherheit einer Therapie mit Antidepressiva und Antipsychotika

Cytochrome sind am oxidativen Abbau zahlreicher Arzneistoffe beteiligt. Hohe Metabolisierungskapazitäten können zu niedrigen Plasmaspiegeln und verminderter Wirkung führen, niedrige Metabolisierungskapazitäten zu hohen Plasmaspiegeln und verstärkt auftretenden Nebenwirkungen.

Folgende der in Tabelle 58 aufgeführten Antidepressiva und Antipsychotika, die im Rahmen dieser Studie zur Therapie verwendet wurden, werden maßgeblich über die Cytochrome CYP1A2 und/oder CYP2C19 abgebaut.

Die Arzneistoffe in runden Klammern () wurden nicht in die Auswertung eingeschlossen, da durch ihre Metabolisierung über die Cytochrome aktive Metabolite entstehen, die ebenso wie die Ausgangssubstanzen zur Wirkung beitragen und auch Nebenwirkungen verursachen können. Ebenso wurden in die Auswertung solche Antidepressiva und Antipsychotika nicht eingeschlossen, bei denen der maßgebliche Abbau über das CYP1A2 und CYP2C19 durch wissenschaftliche Daten nicht gesichert ist oder der Abbau nur zu einem geringen Teil über diese beiden Cytochrome erfolgt.

Tabelle 58: Antidepressiva und Antipsychotika, die über CYP1A2 und/oder CYP2C19 verstoffwechselt werden

CYP1A2	CYP2C19
(Amitriptylin) [Venkatakrisnan et al., 1998;]	(Amitriptylin) [Venkatakrisnan et al., 1998; Steimer et al., 2004 und 2005a]
(Clomipramin) [Bertschy et al., 1991]	Citalopram [Holmgren et al., 2004 ; Bertilsson et al., 1997]
Clozapin [Scordo et al., 2002; Zullino et al., 2002]	(Clomipramin) [Bertilsson et al., 1997]
Haloperidol [Scordo et al., 2002]	Clozapin [Scordo et al., 2002; Prior et al., 2003]
(Imipramin) [Koyama et al., 1997]	Escitalopram Holmgren et al., 2004]
Mirtazapin [Antilla et al., 2001; Störmer et al., 2000]	(Imipramin) [Koyama et al., 1997]
Olanzapin [Scordo et al., 2002; Zullino et al., 2002]	Moclobemid [Bertilsson et al., 1997 ; Gram et al., 1995]
	Olanzapin [Scordo et al., 2002]

4.2.9.1 CYP1A2*1F Polymorphismus

Alle Patienten, die während der ersten 4 Wochen ihres stationären Aufenthaltes mindestens ein Medikament bekamen, das primär über das Cytochrom 1A2 abgebaut wird, wurden in die Untersuchung eingeschlossen. Bei den Antipsychotika waren dies die Arzneistoffe Olanzapin, Clozapin und Haloperidol, bei den Antidepressiva Mirtazapin. Da Patienten mit primärer F2, F3 und anderen F-Diagnosen (siehe auch Tabelle 41) in die Auswertung eingeschlossen wurden, wurde zur Beurteilung der Response zum Zeitpunkt 4 Wochen nach der stationären Aufnahme nur der Parameter CGI 2 herangezogen. Zur Auswertung einer Assoziation zwischen dem CYP1A2*1F Polymorphismus und den Nebenwirkungen wurde wie bisher die DOTES Beurteilungsskala verwendet. Insgesamt bekamen 188 (64,4 %) aller in die Studiauswertung eingeschlossenen Patienten (n=292) eines der 4 oben genannten Medikamente. 20 der 188 Patienten hatten den C/C-Genotyp (10,6 %), 65 (34,6 %) den C/A-Genotyp und 103 (54,8 %) den A/A-Genotyp. Die Genotypverteilung entspricht dem genetischen Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg ($\chi^2 = 3,77$, df=2, p=0,152).

Der Zusammenhang zwischen dem CYP1A2*1F Polymorphismus und der Response bzw. den auftretenden Nebenwirkungen ist in Tabelle 59 dargestellt. Von 5 Patienten mit CYP 1A2-abhängigen Medikamenten konnte kein CGI 2, von 2 kein DOTES erhoben werden. Somit gingen die Daten von 183 bzw. 186 Patienten in die Auswertung ein.

Tabelle 59: CYP1A2*1F Polymorphismus und Response bzw. Nebenwirkungen

Genotyp	Anteil der Responder nach CGI 2 (%)			Anteil der Patienten mit NW nach DOTES (%)		
	C/C	C/A	A/A	C/C	C/A	A/A
Patienten gesamt (n=186)	60,0 (12 von 20)	63,5 (40 von 63)	57,0 (57 von 100)	25,0 (5 von 20)	29,7 (19 von 64)	24,5 (25 von 102)
p	0,367*			0,639*		
Raucher (n=82)	33,3 (2 von 6)	55,2 (16 von 29)	62,2 (28 von 45)	33,3 (2 von 6)	34,5 (10 von 29)	25,5 (12 von 47)
p	0,496*			0,618*		
Nichtraucher (n=104)	71,4 (10 von 14)	70,6 (24 von 34)	52,7 (29 von 55)	21,4 (3 von 14)	25,7 (9 von 35)	23,6 (13 von 55)
p	0,181*			1,000*		

*Fisher-Exact-Test

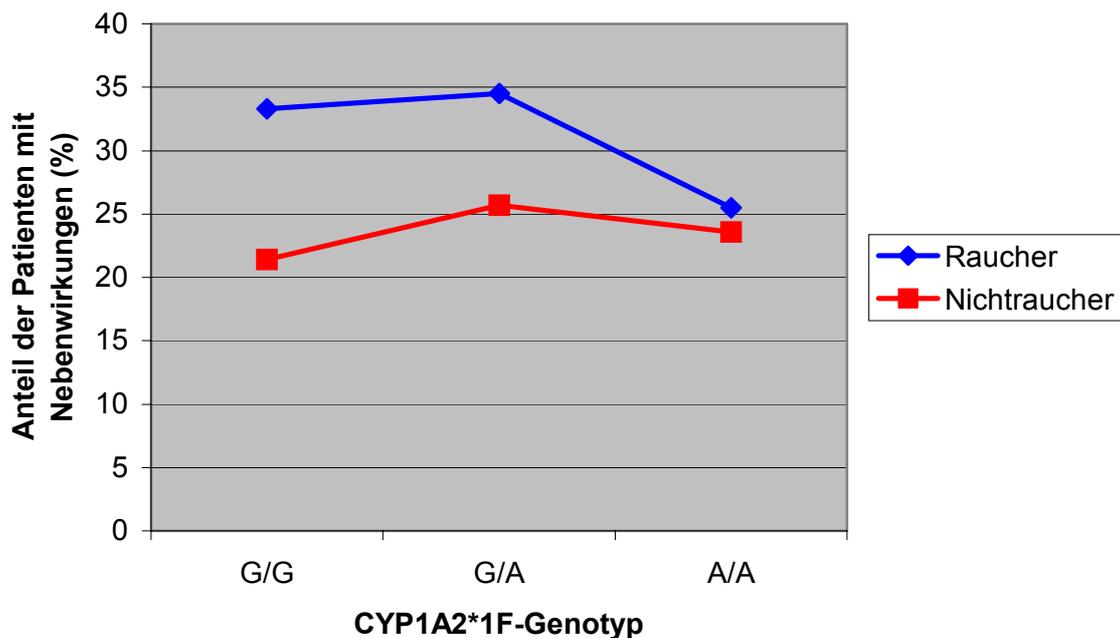


Abbildung 41: CYP1A2*1F Polymorphismus und Nebenwirkungen

Der CYP1A2*1F-Polymorphismus zeigte weder bei Rauchern, noch bei Nicht-Rauchern oder der gesamten Patientengruppe mit CYP1A2-abhängigen Medikamenten eine signifikante Assoziation mit den auftretenden Nebenwirkungen oder der Therapie-Response. Theoretisch müssten Raucher mit dem hoch-induzierbaren A/A-Genotyp aufgrund der verstärkten Verstoffwechslung und den damit niedrigeren Arzneistoffspiegeln im Blut schlechter Ansprechen und weniger unter

Nebenwirkungen leiden als Raucher mit den anderen Genotypen. Patienten aus der Raucher-Gruppe mit dem hoch induzierbaren A/A-Genotyp hatten zwar tendenziell weniger Nebenwirkungen (25,5 %) als andere Raucher (C/A-Genotyp: 34,5 % und C/C-Genotyp: 33,3 %), der Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant ($p=0,618$; Fisher-Exact-Test). Bei den Nichtrauchern war eine geringere Nebenwirkungsrate bei Patienten mit dem A/A-Genotyp nicht feststellbar (siehe auch Abbildung 41).

4.2.9.2 CYP2C19 *2, *3 und *4 Polymorphismus

Medikamente, die vor allem über das CYP2C19 abgebaut werden sind die SSRIs Citalopram und Escitalopram sowie der Monoaminoxidase-Inhibitor Moclobemid. Weiterhin liegen Daten vor, die eine Beteiligung des CYP2C19 beim Abbau von Olanzapin und Clozapin stützen (siehe Tabelle 58). 160 Patienten aus allen Subpopulationen (F2, F3, Fx) bekamen in den ersten 4 Wochen nach der stationären Aufnahme mindestens eines dieser Medikamente. Im folgenden wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der CYP2C19-Metabolisierungskapazität und der Response bzw. den Nebenwirkungen besteht, wenn Patienten mit CYP2C19 abhängigen Arzneimitteln behandelt werden. Die Beurteilung der Response bzw. der Nebenwirkungen erfolgte wie bei den Auswertungen zum CYP1A2.

Basierend auf der Anzahl funktioneller Allele wurden die 160 Patienten mit CYP2C19-abhängigen Medikamenten in EM (=extensive metabolizer), IM (=intermediate metabolizer) und PM (=poor metabolizer) eingeteilt (nach Steimer et al., 2004; Brockmöller et al., 2000). EM besitzen 2 funktionelle Allele (*1/*1), IM eines (*1/*2 oder *1/*3 oder *1/*4) und PM kein funktionelles Allel (*2/*2; *2/*3; *2/*4; *3/*3; *3/*4; *4/*4). Mit dem Nachweis der defekten Allele *2, *3 und *4 können in einer kaukasischen Bevölkerung etwa 91 % aller defekten Allele identifiziert werden (Ferguson et al. 1998).

Die Allelfrequenz des *1-Allels betrug 81,6 % (261 von 320 Allelen) und die des *2-Allels 17,8 % (57 von 320 Allelen). Das *3 und *4-Allel konnte jeweils 1-mal (0,3 %) nachgewiesen werden. Entsprechend der Allelfrequenzen konnten 68,1 % (109 von 160) der Patienten als EM (*1/*1), 26,9 % (43 von 160) als IM (42-mal *1/*2 und 1-mal *1/*4), sowie 5,0 % (8 von 160) als PM (7-mal (*2/*2 und 1-mal *2/*3) klassifiziert werden. Die Allelfrequenzen und Genotypen entsprechen denen aus anderen Untersuchungen an kaukasischen Populationen (Bertilsson 1995; Steimer 2004 und 2005a). Auch die Auftretshäufigkeit des PM stimmt mit den Angaben zur Auftretshäufigkeit in kaukasischer Bevölkerung (2-5 %) überein (Ferguson et al., 1998).

Bei 6 Patienten konnte kein CGI 2 und bei 2 Patienten keine Nebenwirkungen nach DOTES am Tag 28 nach der stationären Aufnahme erhoben werden. Der Zusammenhang zwischen der CYP2C19-Metabolisierungskapazität und der Response bzw. den auftretenden Nebenwirkungen unter Therapie mit den oben genannten CYP2C19-abhängigen Arzneistoffen ist in folgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 60: CYP2C19 Metabolisierungskapazität und Response bzw. Nebenwirkungen

Anteil der Responder nach CGI 2 (%)			Anteil der Patienten mit NW nach DOTES (%)		
EM	IM	PM	EM	IM	PM
54,7 (58 von 106)	40,0 (16 von 40)	62,5 (5 von 8)	26,2 (28 von 107)	27,9 (12 von 43)	25,0 (2 von 8)
0,218*			0,949*		

*p-Wert; Fisher-Exact-Test

Die CYP2C19-Metabolisierungskapazität zeigte keine signifikante Assoziation mit der Response oder den Nebenwirkungen. PM sprachen etwas häufiger auf die Therapie an als IM und EM.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war der Aufbau zuverlässiger Genotypisierungsmethoden mit dem Schwerpunkt der Entwicklung schneller und effizienter, auf Fluoreszenz basierender Nachweismethoden am LightCycler.

Insgesamt wurden 8 Nachweismethoden am LightCycler neu entwickelt. Dies sind die Methoden zum Nachweis des:

- *Cyp1A2*1F Polymorphismus*
- *CYP2C19*2/*3/*4 Polymorphismus*
- *CYP2D6*9 Polymorphismus*
- *DRD3 Ser9Gly Polymorphismus*
- *HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus*
- *HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus.*

1 bereits veröffentlichte Methode zum Nachweis des *MDR1 C3435T Polymorphismus* wurde an die Gegebenheiten (Reagenzien, Geräte) im PCR-Labor des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie am Klinikum rechts der Isar adaptiert.

9 konventionelle Nachweismethoden wurden am Thermocycler etabliert. Dies sind die Methoden zum Nachweis des:

- *DRD2 C ins/del Polymorphismus*
- *DRD2 Taq I Polymorphismus*
- *DRD2 Ser311Cys Polymorphismus*
- *DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus*
- *DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus*
- *DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus*
- *HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus*
- *HTTLPR Polymorphismus*
- *HTT-VNTR Polymorphismus.*

Diese Methoden stellen zumeist optimierte Methoden aus Veröffentlichungen dar.

Für das Gelingen eines Genotyp-Nachweises müssen die Methoden eine ausreichende Spezifität und Sensitivität aufweisen.

Die Spezifität einer PCR wird entscheidend durch die Primerwahl beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Primer mit einer Länge von 18 bis 25 bp eingesetzt. Da statistisch gesehen erst DNA-Sequenzen ab einer Länge von 16 bp nur einmal im Genom vorkommen ist es nicht sinnvoll kürzere Primer einzusetzen. Längere Primer hingegen lagern sich weniger effizient an die Zielsequenz an, mit dem Resultat einer geringeren Sensitivität und Produktausbeute. Zusätzlich

wurden alle konstruierten Primer, aber auch alle aus Veröffentlichungen übernommenen Primer hinsichtlich ihrer Spezifität für die zu untersuchende Zielsequenz mittels BLAST-Alignment (Altschul et al., 1990) überprüft. Nur Primersequenzen, die für die Zielsequenz spezifisch waren wurden für die Versuche ausgewählt. Weitere gültige Design-Regeln wurden bei der Konstruktion der Primer befolgt (Schmelztemperatur, komplementäre Primersequenzen, GC-Gehalt etc.) (Williams, 1989; Dieffenbach et al., 1993; siehe auch Kapitel 3.2.3.6). Die Berechnung der Schmelztemperaturen erfolgte dabei basierend auf thermodynamischen Parametern nach Schütz et al. (1999) im PCR-Design-Programm NukWork (Nearest-Neighbor Model).

Die Auswahl der Reagenzien und Reaktionsbedingungen ist ebenso entscheidend für das Gelingen einer PCR (Williams, 1989). Reagenzien und Reaktionsbedingungen wurden in Vorversuchen optimiert. Die letztendlich im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Methoden stellen die aus zahlreichen Vorversuchen hervorgegangenen optimalen Methoden dar.

Grobe systematische Fehler in der Methodik können weitestgehend ausgeschlossen werden, da die für alle Polymorphismen in der Studienpopulation gefundenen Allel- bzw. Genotypfrequenzen mit denen übereinstimmen, die bereits in publizierten Studien gefunden wurden und sich die biallelischen Polymorphismen in der Studienpopulation im genetischen Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg befanden (keine Abweichung der Genotypfrequenzen vom Hardy-Weinberg-Equilibrium durch fehlerhafte Genotypisierung). Um systematische Fehler durch falsche persönliche Verfahrensweisen zu vermeiden wurden Arbeitsanweisungen und feste Pipettierschemata ausgearbeitet.

5.1.1 Neuentwicklungen am LightCycler

Für das Gelingen einer Genotypisierung am LightCycler ist die Auswahl geeigneter Sonden von besonderer Bedeutung.

Die Sonden wurden, wie die Primer, auf ihre Spezifität für die zu untersuchende DNA-Sequenz durch BLAST-Alignment (Altschul et al., 1990) überprüft. Es wurde ferner überprüft, dass die Sensorsonde auf keiner weiteren bekannten Mutation zu liegen kommt (SNP-Suche in der SNP-Datenbank des NCBI), da sonst die Spezifität für die zu untersuchende Mutation verloren geht (ΔT_m kann durch die weitere Mutation bedingt sein und bei gleicher Größe nicht von der ΔT_m der zu untersuchenden Mutation zu unterscheiden sein; Bernard et al., 2001).

Die Auswahl der Sonden erfolgte hinsichtlich Lage, Länge und Sequenz nach bekannten und allgemein gültigen Design-Regeln bzw. Gesetzmäßigkeiten (siehe Kapitel 3.2.3.6; Landt, 2001). Um einen optimalen Fluoreszenz-Energie-Transfer zu gewährleisten, wurde die Lücke zwischen den beiden Sonden auf ein bis zwei Nukleotide begrenzt. Bei der Sondenkonstruktion wurde möglichst darauf geachtet, dass eine instabile Basenfehlpaarung (Vermeidung von stabilen G/T Basenfehlpaarungen) beim Annealing der Sensorsonde an die Zielsequenz entsteht, die wiederum eine starke Verschiebung der Schmelztemperatur bedingt (Bernard et al., 2001). Die Unterschiede der Schmelztemperaturen zwischen Wildtyp-Allel und mutiertem Allel der einzelnen Polymorphismen betragen zwischen 4 °C (Nachweis des CYP2C19*4 Polymorphismus) und 15 °C (Nachweis des

CYP2D6*9 Polymorphismus). Erstere ist bedingt durch eine stabile G-T-Basenfehlpaarung, die sich allerdings nicht vermeiden ließ, da mit anderen getesteten Sondenkonstruktionen keine befriedigenden Ergebnisse erzielt wurden, und letztere ist bedingt durch die starke Destabilisierung der Bindung der Sensorsonde an die mutierte DNA-Sequenz, die eine 3 bp Deletion (AGA-Deletion) aufweist.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sonden können die Allele der einzelnen untersuchten Polymorphismen spezifisch nachgewiesen und in der Schmelzkurvenanalyse eindeutig unterschieden werden (siehe auch Kapitel 4.1.1).

Zur Validierung der entwickelten Methoden am LightCycler wurden die Genotypisierungsergebnisse der ersten 80 (HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus) bis 101 (CYP1A2*1F Polymorphismus) Patienten-Proben aus der Schmelzkurvenanalyse mit den Ergebnissen aus einem zusätzlichen Restriktionsverdau der LightCycler-PCR-Produkte oder mit den Ergebnissen aus einer verlässlichen, bereits etablierten konventionellen Referenzmethode am Thermocycler (CYP2C19*4 Polymorphismus; Fergusson et al., 1998) verglichen. Die Ergebnisse aus den Validierungsmethoden stimmten zu 100 % mit denen aus der Schmelzkurvenanalyse überein. Die Methode zum Nachweis des CYP2D6*9 Polymorphismus wurde lediglich durch die korrekte Genotypisierung von 14 externen bereits genotypisierten Proben (Kontrollproben) validiert (siehe auch Kapitel 3.2.4.3).

Neben der Validierung durch zusätzlichen Verdau oder einer zweiten Nachweismethode erfolgte die Überprüfung der korrekten Genotypisierung in jedem LightCycler-Lauf durch den Einsatz einer Leerkontrolle und von Positivkontrollen (meist WT/WT-Kontrolle und MT/MT-Kontrolle). Dadurch können falsch positive Ergebnisse durch Verunreinigungen und falsch negative Befunde ausgeschlossen werden.

*Methode zum Nachweis des CYP1A2*1F Polymorphismus*

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Genotypisierungsmethode am LightCycler zum Nachweis des CYP1A2*1F Polymorphismus erlaubt die simultane Bestimmung der Genotypen von 32 Proben in weniger als 60 Minuten. In dieser Zeit sind die Probenvorbereitung, die DNA-Amplifikation und die Bestimmung des Genotyps anhand einer Schmelzkurve eingeschlossen (Popp et al., 2003). Mit bisher veröffentlichten konventionellen Methoden (Lang et al., 1994) benötigt man dagegen zur kompletten Genotypisierung 6 Stunden oder mehr.

Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionsprodukte, die in Vorversuchen die Schmelzkurvenanalyse störten, wurde hier das Prinzip der Hot-Start-PCR angewandt. Die Sensorsonde wurde so konstruiert, dass es in der real-time PCR zu einer relativ instabilen C/T-Basenfehlpaarung kommt. Die resultierende Verringerung der Schmelztemperatur um 10,5 °C bei Vorliegen des mutierten Allels erlaubt die eindeutige Zuordnung des Genotyps aus der Schmelzkurvenanalyse.

Die Methode am LightCycler vermindert cross-over Kontaminationen, da DNA-Amplifikation und Genotyp-Detektion in der gleichen verschlossenen Kapillare durchgeführt werden. Im Gegensatz zu konventionellen Genotypisierungsmethoden, in denen neben der DNA-Amplifikation noch zusätzliche Arbeitsschritte wie enzymatischer Verdau, Gelelektrophorese und Visualisierung der

DNA-Banden zur Ermittlung des Genotyps durchgeführt werden müssen, ist die Methode am LightCycler leichter durchzuführen und spart Arbeitszeit. Zudem können toxische Reagenzien, wie Ethidiumbromid, das zur Visualisierung der DNA-Fragmente in der Gelelektrophorese benötigt wird, vermieden werden.

Die Nachweismethode für den CYP1A2*1F Polymorphismus am LightCycler ermöglicht einen hohen Probendurchsatz und ist für die Durchführung größerer epidemiologischer Studien geeignet. Diese sind notwendig um die wissenschaftliche Basis für den möglichen klinischen Einsatz einer prätherapeutischen CYP1A2*1F Genotypisierung zu schaffen. Andererseits ist die Methode am LightCycler auch für die klinische Routinediagnostik bestens geeignet, da aufgrund der kurzen Durchführungszeit eine schnelle klinische Intervention, basierend auf den Genotypisierungsergebnissen, erfolgen kann.

Mit dem CYP1A2*1F Polymorphismus kann eine Genvariation nachgewiesen werden, die bei Rauchern zu einer verstärkten Induktion des Enzyms führt (Nakajima et al., 1999; Sachse et al., 1999). Bei Rauchern mit dem hoch-induzierbaren Genotyp (A/A-Genotyp) könnte es unter Normaldosierungen von CYP1A2-abhängigen Medikamenten (z. B. Clozapin, Olanzapin, Theophyllin) zu erniedrigten, nicht wirksamen Blutspiegeln kommen. Andererseits kann das Aufgeben des Rauchens während einer Therapie mit CYP1A2-abhängigen Medikamenten zu stark erhöhten, möglicherweise toxischen Blutspiegeln führen. Die Methode zum Nachweis des CYP1A2*1F Polymorphismus am LightCycler wird bereits am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar zur Untersuchung dieser Problematik diagnostisch eingesetzt.

*Methoden zum Nachweis des CYP2C19*2, *3 und *4 Polymorphismus*

Mit den entwickelten CYP2C19-Genotypisierungsmethoden am LightCycler können die drei wichtigsten Polymorphismen (*2, *3 und *4 Allel) des CYP2C19-Gens, die alle zum völligen Funktionsverlust des Cytochroms führen, bestimmt werden. Für die Detektion eines jeden der 3 Allele wurde ein separater LightCycler-Lauf von etwa 1 h Dauer (inklusive Probenvorbereitung) etabliert. Alle 3 Allele können somit innerhalb von etwa 3 h nachgewiesen werden.

Durch die Bestimmung der CYP2C19-Allele *2, *3 und *4 ist es möglich ca. 91 % aller defekten Allele in kaukasischer Bevölkerung und mehr als 99 % aller defekten Allele in der orientalischen Bevölkerung nachzuweisen (Ferguson et al., 1998). Eine Bestimmung der 3 Allele ermöglicht somit, nach dem heutigen Kenntnisstand, in den meisten Fällen eine Vorhersage des metabolischen Phänotyps. Die Einteilung des metabolischen Phänotyps kann, basierend auf dem ermittelten Genotyp, in extensive Metabolizer (EM, mit zwei funktionellen Allelen [*1/*1]), intermediate Metabolizer (IM, ein defektes Allel) und poor Metabolizer (PM, zwei defekte Allele) erfolgen (Brockmöller et al., 2000; Steimer et al., 2004; Steimer et al., 2005a). Bei Patienten die eine verminderte CYP2C19-Aktivität (IM und PM) haben, könnte theoretisch eine Therapie mit Standarddosierungen CYP2C19-abhängiger Medikamente zu erhöhten, womöglich toxischen Plasmaspiegeln führen.

Die Methoden zum Nachweis der CYP2C19 Polymorphismen am LightCycler werden bereits diagnostisch zur Bestimmung des CYP2C19-Genotyps am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar angewandt.

*Methode zum Nachweis des CYP2D6*9 Polymorphismus*

Eine weitere im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode am LightCycler, die bereits in der Diagnostik der CYP2D6-Metabolisierungskapazität und in pharmakogenetischen Studien am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar seine Anwendung findet, ist die zum Nachweis des CYP2D6*9 Polymorphismus. Der Polymorphismus ist durch eine Deletion von 3 bp (AGA) im Exon 5 gekennzeichnet. Das entsprechende Enzym, dem die Aminosäure Lysin an Position 281 fehlt, hat eine reduzierte metabolische Aktivität (Broly et al., 1993).

Mit der entwickelten Methode am LightCycler kann die Deletion der 3 bp im CYP2D6-Gen spezifisch und schnell nachgewiesen werden. Die Sondenkonstruktion wurde durch die zahlreichen im CYP2D6-Gen vorkommenden Mutationen (mehr als 70 Allel-Variationen sind bisher bekannt, Marez et al., 1997) erschwert. Die Sonden konnten mit Hilfe des PCR-Design Programms NukWork, basierend auf der Gensequenz mit der Identifikationsnummer M33388, so konstruiert werden, dass sie zu keiner der anderen bekannten Mutationen im CYP2D6-Gen komplementär waren. Die Verschiebung der Schmelztemperatur bei Vorliegen des mutierten Allels (AGA-Deletion) war durch die starke Destabilisierung aufgrund der 3 fehlenden Basen mit 15 °C erwartungsgemäß groß (siehe auch Kapitel 4.1.1.3).

Mit der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode zum Nachweis des CYP2D6*9 Polymorphismus konnte gezeigt werden, dass mit dem LightCycler, mit Hilfe von Hybridisierungssonden, nicht nur SNPs, sondern auch kleinere Deletionen spezifisch und effektiv nachgewiesen werden können.

Für das CYP2D6-Gen sind Pseudogene mit einer hohen Sequenzhomologie bekannt. Um die Spezifität für das CYP2D6-Gen zu erhöhen, wurden der PCR am LightCycler eine long-PCR nach Stüven et al. (1996) mit CYP2D6-spezifischen Primern vorgeschaltet (Prinzip der Nested-PCR).

Methoden zum Nachweis des HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus und HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus

Zum Nachweis der beiden Polymorphismen im HT_{2A}-Rezeptor-Gen (HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus, HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus) wurden ebenfalls Methoden am LightCycler entwickelt. Für die erstgenannte Methode wurde die Sensorsonde so konstruiert, dass es zu einer instabilen C/A-Basenfehlpaarung (Bernard et al., 2001) in der real-time PCR kommt. Bei der zweitgenannten konnte auch mit einer Sensorsonde, die zu einer relativ stabilen G/T-Basenfehlpaarung führt, ein optimales Ergebnis erzielt werden. Durch die Verschiebung der Schmelztemperatur im Falle einer Basenfehlpaarung um 6,5 °C (HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus) bzw. 6 °C (HT_{2A} His452yr Polymorphismus) ist eine eindeutige Unterscheidung der Genotypen möglich. Bisher standen für pharmakogenetische Untersuchungen zu diesen beiden Polymorphismen lediglich konventionelle

Methoden zur Verfügung. Die LightCycler-Läufe zur simultanen Genotypisierung von 32 Proben dauern etwa 47 min (HT_{2A} –1438 G/A Polymorphismus) bzw. 27 min (HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus), so dass eine Genotypisierung inklusive der Probenvorbereitung in jeweils weniger als einer Stunde möglich ist. Bisher finden die beiden neuentwickelten Genotypisierungsmethoden Anwendung in pharmakogenetischen Studien.

Methoden zum Nachweis des DRD3 Ser9Gly Polymorphismus

Eine weitere neuentwickelte Methode am LightCycler, die bisher Anwendung in pharmakogenetischen Studien findet, ist die zur Detektion des DRD3 Ser9Gly Polymorphismus. Zum spezifischen Nachweis des Basenaustausches von Adenin durch Guanin wurde das Prinzip einer Hot-Start-PCR angewandt. Die Bildung von unspezifischen Amplifikationsprodukten und Dimeren-/Oligomerenbildung aus Primern und Sonden, die in Vorversuchen die Schmelzkurvenanalyse störten, konnte dadurch verhindert werden. Die Sensorsonde wurde so konstruiert, dass eine instabile C/A-Basenfehlpaarung entstand. Durch die resultierende Schmelzkurvenverschiebung um 11 °C ist eine eindeutige Unterscheidung der einzelnen Genotypen möglich.

Die allgemeinen Vorteile der Genotypisierungsmethode am LightCycler, im Vergleich zu herkömmlichen Methoden die auf Restriktionsverdau und Gelelektrophorese basieren und die bisher zum Nachweis des DRD3 Ser9Gly Polymorphismus zur Verfügung standen, sind bereits weiter oben erwähnt.

5.1.2 Optimierte und adaptierte Methoden am Thermocycler

Methoden zum Nachweis der Polymorphismen im DRD4-Gen

Zum Nachweis der Polymorphismen im DRD4-Gen (DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus, DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus) wurden konventionelle PCR-Methoden am Thermocycler etabliert. Durch die Mutationen entstehen PCR-Produkte mit einer Längendifferenz von 12 bp, 13 bp oder 48 bp (bzw. einem Vielfachen davon). Diese können alleine anhand ihrer unterschiedlichen Längen mit Hilfe einer geeigneten Gelelektrophorese unterschieden werden. Damit entfällt der Schritt eines Restriktionsverdaus zur Allel-Diskriminierung.

Für den Nachweis des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus wurden die Primer aus der Arbeit von Cohen et al. (1999) übernommen. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen und der Reagenzien konnte im Vergleich zur Originalmethode die Reaktion ohne Hot-Start-Bedingungen durchgeführt werden. Durch die Verwendung von 2 %-igen MetaPhor Agarosegel konnten die DNA-Fragmente mit einer Länge zwischen ca. 298 und ca. 540 bp sehr gut aufgetrennt und die entsprechenden Genotypen eindeutig zugeordnet werden. Dieser Nachweis mit Hilfe eines Agarosegels stellt eine erhebliche Vereinfachung bzw. Verbesserung der Methode von Cohen et al. (1999) dar. Cohen et al. (1999) markierten den Antisense-Primer radioaktiv und detektierten die DNA-Banden autoradiographisch. Dies erweist sich als sehr zeit- und kostenintensiv und ist zur Routineanwendung wenig geeignet. Zudem besteht durch die radioaktive Strahlung eine erhöhte

Gesundheitsgefährdung und es sind besondere Schutzvorkehrungen notwendig.

Zum Nachweis der Allele des DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus gelang die Auftrennung der sich nur um 12 bp unterscheidenden DNA-Fragmente mit dem 2 %-igem MetaPhor Agarosegel gut. Die MetaPhor Agarose zeichnet sich, aufgrund ihrer Struktur, im Vergleich zur sonst eingesetzten PeqGold Agarose durch eine sehr gute Auftrennung von DNA-Fragmenten, die sich nur geringfügig in der Länge unterscheiden, aus. Im Vergleich zur Originalmethode (Catalano et al., 1993) wurde hier auf den Einsatz eines Polyacrylamidgels verzichtet. Das zur Herstellung eines Polyacrylamidgels notwendige Acrylamid besitzt karzinogene und neurotoxische Eigenschaften.

Auch die sich um 13 bp unterscheidenden DNA-Fragmente des DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus ließen sich mit dem 2 %-igem MetaPhor Agarosegel und den gewählten Laufbedingungen eindeutig auftrennen. Homo- und Heteroduplices (4-Banden Muster) bei heterozygoten Personen, wie sie in der Originalpublikation in einer Laufhöhe von etwa 350 bis 450 bp auftraten (Nöthen et al., 1994), konnten durch die in dieser Arbeit gewählten Reagenzien und Reaktionsbedingungen vermieden werden. Auch der Umgang mit Acrylamid, der nach der Methode von Nöthen et al. (1994) durch die Herstellung eines 10 %-igen Polyacrylamidgels (Acrylamid:Bisacrylamid=49:1) notwendig ist, konnte durch die Agarose-Gelelektrophorese unterbleiben. Die hier etablierte Methode stellt somit eine Verbesserung der Originalmethode von Nöthen et al. (1994) dar.

Methoden zum Nachweis der Polymorphismen im HTT-Gen

Auch zum Nachweis der Genotypen der HTT-Polymorphismen (HTTLPR Polymorphismus und HTT-VNTR Polymorphismus) war nur eine sich an die PCR anschließende Gelelektrophorese notwendig um die Genotypen zu identifizieren, da die Längenunterschiede der entstehenden PCR-Produkte (44 bp beim HTTLPR Polymorphismus und 16-17 bp oder ein Vielfaches davon beim HTT-VNTR Polymorphismus) ausreichend groß waren.

Für die hier etablierten Nachweismethoden wurden die Primer aus den Veröffentlichungen von Heils et al. (1996) und Ogilvie et al. (1996) entnommen. Neben der bereits oben erwähnten Überprüfung der Spezifität der Primer für die zu amplifizierende DNA-Sequenz (BLAST-Suche), wurden im PCR-Design-Programm NukWork die Längen der PCR-Produkte für die einzelnen Allele berechnet. Die Länge der in der Gelelektrophorese nachgewiesenen Banden entsprachen den theoretisch berechneten. Dies trifft auch für PCR Produkte bzw. Restriktionsfragmente aller im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methoden zu.

Die ausreichende Auftrennung aller Banden wurde in beiden Nachweis-Methoden durch den Einsatz von PeqGold Agarosegelen (1,5 % bzw. 2 %) erreicht.

Methoden zum Nachweis des DRD2 C ins/del Polymorphismus, des DRD2 Taq I Polymorphismus und des HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus

Zum Nachweis des DRD2 C ins/del Polymorphismus, des DRD2 Taq I Polymorphismus und des HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus wurden Methoden etabliert, bei denen zur Unterscheidung der Allele ein Restriktionsverdau der Gelelektrophorese vorgeschaltet ist. Einzelbasensubstitutionen (SNPs) oder Insertionen/Deletionen einzelner Basen können Schnittstellen für Restriktionsenzyme schaffen oder löschen (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus). Durch Einsatz eines geeigneten Restriktionsenzym wird entweder nur die Wildtyp-Sequenz oder die mutierte Sequenz geschnitten.

Bei der RFLP-Analyse kann eine unvollständige DNA-Restriktion in der Gelelektrophorese das Vorliegen einer Heterozygotie vortäuschen. Aus diesem Grund wurden bei jedem enzymatischen Verdau neben den Patienten-Proben auch Kontrollproben für das Wildtyp-Allel und mutierte Allel sowie Leerkontrollen eingesetzt. Durch die Kontrollproben kann die korrekte und vollständige Restriktion überprüft werden, durch die Leerkontrolle mögliche amplifizierte Nebenprodukte, die die Auswertung der Restriktionsfragmente im Gellauf stören könnten. Dies gilt auch für die Validierung der oben genannten LightCycler Methoden mittels RFLP-Analyse.

Zum Nachweis des DRD2 -141C Ins/Del Polymorphismus wurden die Primer aus der Arbeit von Arinami et al. (1997) übernommen. Zum Restriktionsverdau wurde das gleiche Enzym (BstN I) verwendet.

Dagegen wurden die Primer aus der Arbeit von Grandy et al. (1989) zum Nachweis des DRD2 Taq I Polymorphismus erheblich modifiziert. Der Vorwärtsprimer (DRD2/Taq-F) wurde am 5'-Ende um die Sequenz CCGTCG verkürzt und am 3'-Ende um A verlängert. Der Rückwärtsprimer (DRD2/Taq-R) wurde an seinem 5'-Ende um die Sequenz CCGTCGA verkürzt und an seinem 3'-Ende um ACC verlängert. Die Fehlbande, die bei der Originalmethode im Gellauf bei 650 bp auftrat, konnte dadurch vermieden werden.

Die Allele des HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus konnten durch Einsatz des Enzyms BsrD I einer RFLP-Analyse unterzogen werden. Das Enzym BsrD I schneidet die Wildtyp-Sequenz (G/Cys) und lässt das mutierte Allel (C/Ser) unverdaut. Der Einsatz eines Mismatch-Primers, wie er in der Methode nach Lappalainen et al. (1995) verwendet wurde, um eine Erkennungssequenz für das Enzym Hinf I zu schaffen, ist damit überflüssig. In die Sequenz eines Mismatch-Primers ist eine Base eingebaut, die nicht zum entsprechenden DNA-Strang komplementär ist. Dadurch entsteht nach der Elongation entweder bei Vorliegen des Wildtyp-Allels oder bei Vorliegen des mutierten Allels eine neue Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym. Der Nachteil eines Mismatch-Primers liegt jedoch darin, dass sich dieser schlechter an die DNA anlagern kann und sich Sensitivität und Ausbeute der PCR dadurch möglicherweise verringern. Im Vergleich zur Originalmethode (Lappalainen et al., 1995) wurde hier auch auf den Einsatz eines Polyacrylamidgels verzichtet, da das zur Herstellung eines Polyacrylamidgels notwendige Acrylamid karzinogene und neurotoxische Eigenschaften besitzt. Die im Rahmen dieser Arbeit angewandte Methode stellt somit eine

Optimierung der Originalmethode dar.

Als letzte der etablierten Methoden am Thermocycler sei noch die zum Nachweis des DRD2 Ser311Cys Polymorphismus erwähnt. Es handelt sich dabei um eine sogenannte allelspezifische PCR. Der Vorwärtsprimer und die sequenzspezifischen Rückwärtsprimer sind aus der Arbeit von Ito et al. (1993) entnommen. Die PCR-Bedingungen und Reagenzien wurden so gewählt, dass die Ansätze zum Nachweis des Wildtyp-Allels und des mutierten Allels in einem gemeinsamen PCR-Lauf amplifiziert werden konnten (gleiches PCR-Programm). Dies ermöglicht den Nachweis des Genotyps in der Hälfte der Zeit, die für eine gewöhnliche sequenzspezifische PCR notwendig wäre (meist separate PCR-Läufe für die Amplifikation eines jeden der beiden Allele notwendig). Allerdings treten in der hier etablierten Nachweismethode, besonders in den Ansätzen zum Nachweis des Cys-Allels und der Leerkontrolle, Störbanden auf, die auf Primer-Dimere zurückzuführen sind. Primer-Dimere entstehen durch ein Annealing der Primer an ihrem 3'-Ende. Jeder Primer fungiert dann für den anderen als DNA-Matrize und wird auch selbst elongiert. Die im Rahmen der Methode zum Nachweis des DRD2 Ser311Cys Polymorphismus aufgetretenen Primer-Dimere stören jedoch die Auswertung des Genotyps im Gellauf nicht.

Schlussfolgerung

Mit allen im Rahmen dieser Arbeit entwickelten bzw. optimierten Genotypisierungs-Methoden ist ein spezifischer Nachweis der untersuchten Polymorphismen möglich. Die Methoden am LightCycler stellen Neuentwicklungen dar, die eine valide, besonders schnelle und effiziente Genotypisierung erlauben. Die Methoden am Thermocycler wurden optimiert und sind so für die Genotypisierung im Rahmen der pharmakogenetischen Studie gut geeignet.

5.2 Diskussion der Studienergebnisse

Ziel der prospektiven, im Bezug auf den Genotyp doppelblind angelegten Diagnostikstudie war es, die Assoziation zwischen dem genetischen Status und der Effektivität bzw. Sicherheit einer Behandlung mit Antidepressiva und Antipsychotika zu untersuchen. Dazu wurden psychiatrische Patienten hinsichtlich verschiedener Polymorphismen in Genen des serotonergen und dopaminergen Systems, sowie in Strukturen des Arzneistoffmetabolismus und Arzneistofftransportes genotypisiert.

Schwerpunkt der Arbeit war die Untersuchung der pharmakodynamischen Variabilität der Arzneimittelwirkungen und -nebenwirkungen.

In der Patientenpopulation mit depressiver Episode wurde die Assoziation zwischen dem:

- *HTTLPR Polymorphismus*
- *HTT-VNTR Polymorphismus*
- *HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus*
- *HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus*

und der Therapieresponse bzw. der Aufenthaltsdauer und den Nebenwirkungen unter einer antidepressiven Therapie untersucht (Kandidaten-Gen-Ansatz). Da für den letztgenannten Polymorphismus zur Auswertung der 109 depressiven Patienten bereits heterozygote Patienten und Homozygote für das mutierte Allel zusammengefasst wurden und diese Gruppe sehr klein war (n=15), wurde die Auswertung in den Subpopulationen (Patienten, die mit HTT-blockierenden Antidepressiva bzw. Mirtazapin behandelt wurden) nicht weiter verfolgt.

In der Population der Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis wurde die Assoziation zwischen dem:

- *DRD2 C ins/del Polymorphismus*
- *DRD2 Taq I Polymorphismus*
- *DRD2 Ser311Cys Polymorphismus*
- *DRD3 Ser9Gly Polymorphismus*
- *DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus*
- *DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus*
- *DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus*
- *HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus*
- *HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus*
- *HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus*

und der Therapieresponse bzw. der Aufenthaltsdauer und den Nebenwirkungen unter einer antipsychotischen Therapie untersucht.

Bei den Patienten mit Olanzapin-Therapie beschränkte sich die Untersuchung auf den *DRD3 Ser9Gly Polymorphismus*, den *HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus* und den *MDR1 C3435T Polymorphismus*, da dieses Antipsychotikum eine besonders hohe Affinität zu den beiden genannten Rezeptoren besitzt (siehe Tabelle 5) und ein Substrat des P-Glykoproteins ist (Wang et al. 2004).

Bei Patienten, die mit Antidepressiva und/oder Antipsychotika behandelt wurden, die über das CYP1A2 bzw. CYP2C19 verstoffwechselt werden, wurden die Auswirkungen des *CYP1A2*1F Polymorphismus* bzw. der *CYP2C19 Metabolisierungskapazität* auf die Psychopharmakotherapie untersucht.

Im folgenden werden die erzielten Ergebnisse dargestellt und diskutiert.

5.2.1 Ergebnisse die eine Assoziation zwischen Genotyp und Nebenwirkungen oder Response zeigen

5.2.1.1 *HTT-Polymorphismen und Nebenwirkungen unter der Therapie mit Antidepressiva*

Die Behandlung depressiver Erkrankungen beruht in erster Linie auf der Gabe wirksamer Arzneistoffe, die allerdings nicht selten mit erheblichen Nebenwirkungen assoziiert ist. Einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1998 zufolge, kommt es in den USA trotz korrekt angewandter Arzneimitteltherapie in schätzungsweise 2,2 Millionen Fällen zu schweren Arzneimittelnebenwirkungen mit etwa 106.000 Todesfällen. Die jährlichen Kosten hierfür belaufen sich auf etwa 4,3 Milliarden US \$ (Lazarou et al., 1998). Ein beträchtlicher Anteil dieser Kosten und arzneimittelbedingten Nebenwirkungen ist vermutlich auf die Psychopharmakotherapie zurückzuführen.

Bis heute ist noch nicht geklärt, warum bei manchen Patienten unter einer antidepressiven Therapie Nebenwirkungen auftreten und bei anderen nicht.

Der HTT ist ein für Serotonin hochaffines Transportprotein. Er befindet sich in der Plasmamembran der präsynaptischen Terminale serotonerger Neurone und ist verantwortlich für die Natrium-abhängige Wiederaufnahme von Serotonin in die präsynaptische Nervenendigung und damit für die Terminierung einer serotonergen Neurotransmission (Ogilvie et al., 1996; Heils et al., 1997). Es wird vermutet, dass die Erhöhung des Serotoninspiegels im synaptischen Spalt durch Antidepressiva und die damit verbundenen adaptiven Veränderungen für die antidepressive Wirkung verantwortlich sind (Schafer, 1999). Erhöhte Serotoninspiegel können aber auch zu verschiedenen Nebenwirkungen, wie Schlafstörungen, innere Unruhe, Agitiertheit oder sexuellen Funktionsstörungen, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Appetitminderung, durch Aktivierung zentraler und peripherer Serotoninrezeptoren führen (siehe auch Tabelle 2). Da sowohl der HTTLPR Polymorphismus als auch der HTT-VNTR Polymorphismus die Expression des HTT beeinflusst (Heils et al., 1996 und 1997; Lesch et al., 1994; Fiskerstrand et al., 1999), könnten sich diese Polymorphismen theoretisch auch auf das Auftreten von Nebenwirkungen unter einer antidepressiven Therapie auswirken.

Polymorphismen im HTT und Nebenwirkungen

In der Population der 109 Patienten mit depressiver Episode hatten Patienten mit dem hoch exprimierenden 2.12/2.12-Genotyp des HTT-VNTR Polymorphismus signifikant weniger Nebenwirkung (0 %), als heterozygote (20,0 %) und solche mit dem niedrig exprimierenden 2.10/2.10-Genotyp (36,6 %) ($p=0,004$; Fisher-Exact-Test). Dem entsprechend zeigte sich auch, dass Patienten mit dem höher exprimierenden l/l-Genotyp des HTTLPR Polymorphismus und dem l/s-Genotyp seltener unter Nebenwirkungen litten (21,3 % bzw. 20,0 % Nebenwirkungen), als Patienten mit dem niedrig exprimierenden s/s-Genotyp (35,3 % Nebenwirkungen). Der Unterschied zwischen den Genotypen des HTTLPR Polymorphismus war allerdings nicht statistisch signifikant

($p=0,439$; Fisher-Exact-Test).

Polymorphismen im HTT und Nebenwirkungen bei Patienten, die mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden

Für SSRIs, Venlafaxin und TCAs stellt der HTT eine zentrale Zielstruktur dar. Aufgrund des zum Mirtazapin unterschiedlichen pharmakologischen Angriffspunktes, wurden 44 Patienten, die mit HTT-blockierenden Antidepressiva jedoch nicht mit Mirtazapin behandelt wurden, getrennt ausgewertet.

Bei diesen Patienten zeigte sich nicht nur zwischen dem HTT-VNTR, sondern auch zwischen dem HTTLPR Polymorphismus und den Nebenwirkungen nach DOTES eine signifikante Assoziation. Keiner der Patienten mit dem l/l-Genotyp des HTTLPR Polymorphismus, jedoch 40,0 % der Heterozygoten und 50,0 % der Homozygoten für das s-Allel hatten Nebenwirkungen ($p=0,002$; Fisher-Exact-Test). Den HTT-VNTR Polymorphismus betreffend, zeigten Patienten mit dem niedrig exprimierenden 2.10/2.10-Genotyp mehr als 4-mal häufiger (62,5 %) Nebenwirkungen, als Heterozygote (13,3 %). Für keinen der für das 2.12-Allel homozygoten Patienten wurden Nebenwirkungen nach DOTES festgestellt ($p=0,004$; Fisher-Exact-Test).

Polymorphismen im HTT und Nebenwirkungen bei Patienten, die mit Mirtazapin behandelt wurden

Ein Großteil der 109 depressiven Patienten ($n=65$) wurde mit Mirtazapin therapiert, dessen primärer pharmakologischer Angriffspunkt nicht der HTT ist. Mirtazapin blockiert α_2 -Autorezeptoren auf präsynaptischen NA-Neuronen. Die dadurch erhöhte NA-Freisetzung führt zur verstärkten Stimulation postsynaptischer 5-HT-Neurone, die wiederum verstärkt 5-HT freisetzen (Van Praag et al., 1995; Puzantian, 1998; Antilla et al., 2001).

Bei den 65 mit Mirtazapin behandelten Patienten zeigte sich keine plausible Assoziation zwischen den beiden Polymorphismen im HTT und dem Auftreten von Nebenwirkungen. Hinsichtlich des HTTLPR Polymorphismus ergab sich zwar ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Genotypgruppen und der Nebenwirkungshäufigkeit, dieser scheint allerdings zufällig zu sein, da heterozygote Patienten deutlich weniger Nebenwirkungen (4 %) hatten, als homozygote für beide Allele (l/l-Genotyp: 31,3 % und s/s-Genotyp 20,0 %) ($p=0,027$; Fisher-Exact-Test). Das Ergebnis ist unter funktionellen Gesichtspunkten (Expressionsbeeinflussung durch den Polymorphismus) nicht erklärbar.

Kombinierte Effekte beider Polymorphismen

Je niedriger die HTT-Expression ist, umso leichter könnte theoretisch die HT-Rückaufnahme durch Blockade des HTT mittels Antidepressiva verhindert werden. Die Folge wären erhöhte synaptische 5-HT-Konzentrationen, die wiederum, über zentrale und periphere Serotoninrezeptoren vermittelt, zu vermehrten, vor allem serotonergen Nebenwirkungen, führen könnten.

Basierend auf den funktionellen Auswirkungen der beiden Polymorphismen im HTT wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit HTT-Risiko-Gruppen bezüglich des theoretischen

Nebenwirkungsrisikos definiert.

In einer in vitro Studie wurde gezeigt, dass die transkriptionelle Aktivität der langen (l) Form des HTTLPR Polymorphismus mehr als doppelt so hoch ist, wie die der kurzen (s) Variante (Lesch et al., 1996). Dem entsprechend berichteten Heils et al. (1996) von einer 1,9 – 2,2-fach höheren 5-HT Rückaufnahme in Zellen, die homozygot für die l-Allelvariante waren, im Vergleich zu solchen Zellen die ein oder zwei s-Allele aufwiesen. Das Nebenwirkungsrisiko der für die l-Allelvariante homozygoten Patienten wurde deshalb im Modell der HTT-Risiko-Gruppen als niedrig eingestuft. Fishkerstrand et al. (1999) konnten weiterhin in Embryo-Stammzellen nachweisen, dass die VNTR-Region im HTT-Gen Transkriptionsfaktoren bindet und dadurch die Genexpression reguliert. Genabschnitte mit der 12-fachen Wiederholung zeigten unter den Studienbedingungen eine höhere Enhancer-Aktivität (und damit höhere Genexpression) als solche mit 10-facher Wiederholung. Um für das Modell der HTT-Risiko-Gruppen eine möglichst hohe Vorhersage der Nebenwirkungshäufigkeit zu erreichen, wurde allen Patienten mit mindestens einem 2.12-Allel ein niedriges Risiko für Nebenwirkungen zugeordnet.

Aus den kombinierten Genotypen beider Polymorphismen wurden, wie in Kapitel 4.2.4.3 und Tabelle 47 beschrieben, die High-Risk, Medium-Risk, und Low-Risk Gruppen definiert.

Bei den 44 depressiven Patienten, die vorwiegend mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden, zeigte sich eine hochsignifikante Assoziation zwischen der HTT-Risiko-Gruppe und den auftretenden Nebenwirkungen ($p=0,00018$; Fisher-Exact-Test). Keiner der Low-Risk Patienten, jedoch 13,3 % der Medium-Risk Patienten und sogar 62,5 % der High-Risk Patienten zeigten mäßige bis deutliche Nebenwirkungen nach der verwendeten DOTES-Skala. Es liegt somit eine starke Korrelation zwischen den definierten Risikogruppen und der Prävalenz von Nebenwirkungen, bei Patienten, die vorwiegend mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden, vor.

Keine Assoziation zeigte sich dagegen bei den mit Mirtazapin behandelten depressiven Patienten. Patienten aus der Low-Risk Gruppe hatten sogar die höchste Nebenwirkungshäufigkeit (siehe auch Abbildung 33).

Der Unterschied in der Nebenwirkungshäufigkeit zwischen den definierten HTT-Risiko-Gruppen blieb in der Population aller 109 depressiven Patienten statistisch signifikant ($p=0,014$; Fisher-Exact-Test).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Nebenwirkungshäufigkeit unter einer Therapie mit vorwiegend HTT-blockierenden Antidepressiva und dem HTT-VNTR Polymorphismus, dem HTTLPR Polymorphismus und definierten HTT-Risiko-Gruppen gezeigt werden.

Die Ergebnisse stimmen mit den kürzlich veröffentlichten Resultaten von Murphy et al. (2004) überein. Die Arbeitsgruppe konnte bei Patienten mit einem oder zwei s-Allelen des HTTLPR Polymorphismus, also den niedriger exprimierenden Genotypen, häufiger durch Nebenwirkungen bedingte Therapieabbrüche nachweisen, wenn Patienten mit Paroxetin (SSRI mit HTT-

blockierender Wirkung) behandelt wurden, nicht jedoch wenn Patienten mit Mirtazapin therapiert wurden. Auch Perlis et al. (2003) zeigten, dass Patienten unter Fluoxetin-Therapie (SSRI mit HTT-blockierender Wirkung) mit dem s/s-Genotyp des HTTLPR Polymorphismus signifikant häufiger unter Schlaflosigkeit und Erregtheit litten, als andere. Diese beiden Nebenwirkungen werden typischerweise durch hohe Serotonin-Spiegel verursacht (siehe auch Tabelle 2).

Die negativen Ergebnisse in der Population der mit Mirtazapin behandelten Patienten könnten vor allem auf den besonderen pharmakologischen Wirkmechanismus von Mirtazapin zurückzuführen sein. Möglicherweise beeinflussen die beiden Polymorphismen im HTT nur die Nebenwirkungshäufigkeit unter der Therapie mit Antidepressiva, die direkt den HTT blockieren.

Die Limitationen der hier vorliegenden Untersuchung liegen vor allem in der Polypharmakotherapie und der Beurteilung der Nebenwirkungen. Die 109 depressiven Patienten erhielten zum Teil neben ihrer antidepressiven Therapie andere Psychopharmaka, wie Sedativa und Antipsychotika (siehe Tabelle 42), die selbst auch Nebenwirkungen verursachen können. Eine Unterscheidung ob die aufgetretenen Nebenwirkungen von der antidepressiven Therapie oder der psychotropen Komedikation kommen, ist anhand der abgewandelten DOTES-Beurteilungsskala nicht möglich. Ferner ergibt sich durch den Einschluss von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen aus dem depressiven Formenkreis eine inhomogene Patientenpopulation. Besonders die Gruppe der Patienten, die mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurde ist durch die Vielzahl der angewandten Antidepressiva inhomogen. Die hier vorliegende Population depressiver Patienten (n=109) und besonders die Subpopulationen (Patienten mit HTT-blockierenden Antidepressiva: n=44 und Patienten mit Mirtazapin: n=65) sind relativ klein. Die Aussagekraft der erzielten Ergebnisse ist dadurch begrenzt. Größere Studien mit einer genaueren Beurteilung der Nebenwirkungen sind notwendig, um die hier erzielten Ergebnisse zu verifizieren.

Allerdings könnten die im Rahmen dieser Studie unter natürlichen klinischen Bedingungen gefundenen Effekte gerade auch für die klinische Praxis relevant sein. Sollten sich die hier erzielten Ergebnisse in weiteren Studien bestätigen, könnten in Zukunft, durch eine prätherapeutische Bestimmung der HTT-Risiko-Gruppe bzw. des Genotyps der beiden HTT-Polymorphismen, Patienten identifiziert werden, die ein erhöhtes Risiko für Nebenwirkungen haben, wenn sie mit Antidepressiva therapiert werden, die eine direkte Hemmung des HTT verursachen.

5.2.1.2 DRD4 48 bp Polymorphismus und Gewichtszunahme unter der Therapie mit Antipsychotika

Eine bedeutende Nebenwirkung, die unter der Therapie mit Antipsychotika auftreten kann, ist die Gewichtszunahme. Diese kann in Einzelfällen bis zu 25 kg oder mehr betragen (Bridler et al., 2003). Eine mögliche Gewichtszunahme beeinflusst nicht nur die Compliance der Patienten negativ, mit der Gefahr einer Unterbrechung oder Beendigung der Medikamenteneinnahme, und damit einer Verschlechterung der psychotischen Symptome, sondern darüber hinaus ergeben sich auch potentiell die Gesundheitsrisiken einer Adipositas, wie z. B. erhöhte kardiovaskuläre

Morbidität und Mortalität (Herzinfarkt, Schlaganfall). Anhand der Daten der Framingham-Studie, einer großen Untersuchung zur kardiovaskulären Mortalität und Morbidität, zeigte Sussman (2001) auf, dass theoretisch Clozapin zwar 492 Selbstmorde in einer Population von 100.000 schizophrenen Patienten verhindert, jedoch bei einer angenommenen Gewichtszunahme von 10 kg, auch 416 Todesfälle durch diese Gewichtszunahme verursacht werden. Der Nettoeffekt von Clozapin auf die Mortalität insgesamt wird dadurch erheblich reduziert.

Bisher ist relativ wenig über die zugrunde liegenden Mechanismen einer Gewichtszunahme durch Antipsychotika bekannt. Offensichtlich stören Antipsychotika das Gleichgewicht zwischen Energieaufnahme und -verbrauch. Komplexe neuronale Systeme treten durch Neurotransmitter, Peptide, Hormone und andere Metaboliten innerhalb spezifischer Hirnareale (z. B. Hypothalamus, Hirnstamm, limbische und kortikale Strukturen) in Wechselwirkung, um die energetische Homöostase aufrecht zu erhalten (Berthoud, 2002). Monoamine sind bezüglich der Energie-Homöostase von besonderem Interesse, da sie in vielen Arealen des ZNS als Neurotransmitter vorkommen und mit den Systemen, die das Körpergewicht steuern, interagieren (Stahl, 1998). Auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht bekannt sind, gibt es Hinweise, dass Dopamin bzw. das dopaminerge System an der Steuerung des Essverhaltens beteiligt ist (Berridge, 1996; Martel et al, 1996). Stoffe die die dopaminerge Neurotransmission erhöhen, wie Cocain und andere Psychostimulantien, führen zu einem verringerten Appetit und Gewichtsverlust. Eine verminderte dopaminerge Funktion im ZNS scheint eine Rolle für unphysiologisch hohe Nahrungsaufnahme zu spielen (Poston et al., 1998) und besonders Antipsychotika könnten durch eine Dopaminrezeptorblockade eine dopaminerge Unterfunktion verstärken oder hervorrufen. So kann Clozapin, ein DRD4-Antagonist mit hoher Affinität zu diesem Rezeptor (Van Tol et al., 1991) eine erhebliche Gewichtszunahme verursachen (durchschnittlich 4,45 kg nach einer 10-wöchigen Behandlung; Allison et al., 1999). Nöthen et al. (1994) berichteten von einem Patienten mit genetisch bedingtem funktionslosem D4-Rezeptorprotein (Homozygot für die Deletion des DRD4 13bp Deletionspolymorphismus). Der Patient war extrem Adipös und hatte einen BMI von 37 kg/m². Der DRD4 scheint somit besonders geeignet, um die Rolle des dopaminergen Systems bei der Gewichtszunahme unter einer Therapie mit Antipsychotika zu untersuchen.

Da der DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus die Funktionalität des DRD4 beeinflusst (Van Tol et al., 1992; Ashigari et al., 1994), wurde in der hier vorliegenden Studie die Assoziation zwischen diesem Polymorphismus und der Gewichtszunahme unter einer Therapie mit Antipsychotika bei Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis untersucht.

Patienten mit einem oder zwei langen Allelen (≥ 7 -fache Wiederholung des 48 bp langen DNA-Abschnittes) des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus zeigten durchschnittlich eine signifikant höhere Zunahme des BMI (Zunahme von 0,89 kg/m²) 4 Wochen nach der stationären Aufnahme, als Patienten mit zwei kurzen Allelen (< 7 -fache Wiederholung des 48 bp langen DNA-Abschnittes) (Zunahme von 0,38 kg/m²) ($p=0,003$; Mann-Whitney-U-Test). Entsprechend war auch die absolute Gewichtszunahme bei den Patienten mit einem oder zwei langen Allelen nach der 4-

wöchigen Antipsychotika-Therapie signifikant höher (Zunahme um durchschnittlich 2,69 kg) als bei den anderen Patienten (Zunahme um durchschnittlich 1,14 kg) ($p=0,004$; Mann-Whitney-U-Test).

Interessanterweise konnte in einer Subgruppenauswertung eine signifikante Assoziation zwischen dem DRD4 48bp Wiederholungspolymorphismus und der Gewichtszunahme bei Männern, nicht jedoch bei Frauen gezeigt werden. Bei letzteren war der Unterschied zwischen den Genotypgruppen nicht signifikant ($p=0,130$; Fisher-Exact-Test), jedoch hatten auch die Patientinnen mit mindestens einem L-Allel eine größere Zunahme des BMI nach 4-wöchiger Antipsychotika-Therapie als andere (siehe auch Abbildung 36).

Dies ist nach meinem Wissen die erste pharmakogenetische Studie, in der eine signifikante Assoziation zwischen dem DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und der Gewichtszunahme unter einer Therapie mit Antipsychotika gezeigt werden konnte.

Lediglich Rietschel et al. (1996) untersuchten bisher die Assoziation zwischen dem DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und zahlreichen Nebenwirkungen unter einer Therapie mit Clozapin, darunter auch die Gewichtszunahme. Anhand der retrospektiven Datensammlung aus Krankenakten über einen Zeitraum von 16 Jahren konnte jedoch kein Zusammenhang festgestellt werden. Da es sich bei der Untersuchung von Rietschel et al. (1996) lediglich um eine retrospektive Auswertung handelt, sind die Ergebnisse nicht mit den aus der hier vorliegenden prospektiven Studie vergleichbar. Aufgrund methodischer Limitationen schlossen die Autoren, trotz der negativen Ergebnisse, einen Einfluss des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus auf die Nebenwirkungen, und somit auf die Gewichtszunahme, nicht aus.

Auch verschiedene nicht-genetische Faktoren scheinen eine Gewichtszunahme zu beeinflussen. Klinische Studien haben gezeigt, dass zwischen dem Alter, Rauchen oder dem Ausgangskörpergewicht und der Gewichtszunahme ein Zusammenhang besteht. Patienten mit vor der Behandlung niedrigem BMI oder Körpergewicht zeigten unter Therapie mit Clozapin, Olanzapin oder Risperidon eine wesentlich stärkere Gewichtszunahme, als initial schwere Patienten (Basson et al., 2001; Jones et al., 2001). Es ist weiterhin bekannt, dass zwischen Rauchen und einer Gewichtszunahme ein inverser Zusammenhang besteht (Li et al., 2000; Frankenburg et al., 1998), während niedriges Lebensalter mit einer höheren Gewichtszunahme zu korrelieren scheint (Basson et al., 2001; Jones et al., 2001). Im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchung zeigte sich zwischen den Genotypgruppen des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus kein signifikanter Unterschied hinsichtlich dem Raucherstatus, dem Alter und dem Körpergewicht zum Zeitpunkt der Aufnahme (siehe auch Tabelle 56). Eine wesentliche Beeinflussung der Ergebnisse durch diese Confounder kann somit ausgeschlossen werden. Der durchschnittliche Schweregrad der Erkrankungen (CGI 1) zum Zeitpunkt der Aufnahme wich in der Genotyp-Gruppe 1 nicht signifikant von dem der Genotyp-Gruppe 2 ab.

Dennoch muss auf einige Limitationen der Untersuchung hingewiesen werden.

Die Patienten erhielten eine ihrem Krankheitszustand entsprechende antipsychotische Therapie, die aus vielen verschiedenen Antipsychotika in unterschiedlichen Dosierungen zusammengesetzt

war (Mehrfachverordnungen und nicht antipsychotische Komedikation waren möglich; siehe auch Tabelle 53). Eine Gewichtszunahme ist nicht nur von der individuellen Prädisposition abhängig, sondern auch vom Antipsychotikum selbst. Nach einer Meta-Analyse von Allison et al. (1999), führt z. B. eine 10-wöchige Behandlung mit Clozapin zur stärksten Gewichtszunahme (durchschnittlich 4,45 kg) gefolgt von Olanzapin (4,15 kg), während es unter einer Therapie mit Ziprasidon im selben Zeitraum nur zu einer Gewichtszunahme um durchschnittlich 0,04 kg kommt. Andere Antipsychotika liegen zwischen diesen Extremen. Die Verordnungshäufigkeit der einzelnen Antipsychotika ist in Abbildung 37, getrennt nach den beiden Genotyp-Gruppen, aufgeführt. Die Unterschiede zwischen den beiden Genotyp-Gruppen können potentiell die Gewichtszunahme beeinflussen, genauso wie die Komedikation der Patienten. Ferner erhielten 48 % der Patienten bereits vor dem Studieneinschluss eine antipsychotische Medikation. Ein Einfluss der vorangegangenen Therapie auf die im Rahmen dieser Untersuchung erzielten Ergebnisse kann nicht ausgeschlossen werden. Der Anteil der Patienten, der bereits vor Studienbeginn antipsychotisch behandelt wurde, wich jedoch in den beiden Genotypgruppen nicht signifikant voneinander ab (siehe Tabelle 56).

Eine Gewichtszunahme ist auch von der Energiezufuhr und der körperlichen Tätigkeit abhängig. Standardisierte Mahlzeiten wurden jedoch im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchung nicht vorgegeben, ebenso wurde die körperliche Bewegung der Patienten nicht dokumentiert.

Wie bereits oben beschrieben, konnte in einer Subgruppenauswertung eine signifikante Assoziation zwischen dem DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und der Gewichtszunahme bei männlichen Patienten, nicht jedoch bei Frauen nachgewiesen werden. In der Literatur gibt es Hinweise, dass Frauen generell ein geringeres Risiko für eine Gewichtszunahme unter einer Therapie mit atypischen Antipsychotika haben könnten, als Männer (Basson et al., 2001; Briffa et al., 1998; Ratzoni et al., 2002). Dem entsprechend könnte auch die Auswirkung des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus auf die Gewichtszunahme bei Frauen geringer ausfallen. Es wird angenommen, dass für die geschlechtsspezifischen Unterschiede vor allem hormonelle Unterschiede und die Interaktion der Hormone mit Neurotransmitter-Systemen eine Rolle spielen (Halbreich et al., 2003). Unterschiede in der Metabolisierung der Antipsychotika, aber auch das figurbewusstere Verhalten von Frauen könnten weitere Einflussfaktoren sein.

Möglicherweise könnte anhand einer größeren Population weiblicher Patienten ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und der Antipsychotika-induzierten Gewichtszunahme bei Frauen gezeigt werden.

Weitere Studien, auch über einen längeren Beobachtungszeitraum hinweg, sind notwendig um alle in der hier vorliegenden Untersuchung erzielten Ergebnisse zu verifizieren. Sollte sich ein Zusammenhang zwischen dem DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und einer Antipsychotika-induzierten Gewichtszunahme bestätigen, könnte dies von großem praktischen Nutzen sein. Patienten mit hohem Risiko für eine Gewichtszunahme könnten vor Beginn ihrer Therapie identifiziert werden und mit Antipsychotika behandelt werden, von denen bekannt ist, dass

sie im Vergleich zu anderen Substanzen nur eine geringe Gewichtszunahme verursachen. Zudem könnte bei solchen Risiko-Patienten einer Gewichtszunahme mit einer gezielten Diät entgegengewirkt werden. Eine Aufklärung der Patienten über die Möglichkeit einer starken Gewichtszunahme vor der Therapie würde möglicherweise die Compliance fördern.

Untersuchung zum HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus

Auch wenn die Untersuchung zum HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus negativ ausfiel soll sie hier kurz erläutert werden.

Da Knock-out Mäuse ohne den HT_{2C}-Rezeptor in tierexperimentellen Studien eine erhöhte Futteraufnahme zeigten und eine Obesitas entwickelten, wird eine Blockade dieses Rezeptors mit der Entstehung von Übergewicht in Verbindung gebracht (Tecott et al., 1995). In der Literatur gibt es auch Hinweise, dass die Blockade zentraler HT_{2C}-Rezeptoren durch Antipsychotika bei der Entstehung von Übergewicht eine Rolle spielen könnte (Rietschel et al. 1997). Deshalb wurde in der Population der Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis auch die Assoziation zwischen dem HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus und einer durch Antipsychotika induzierten Gewichtszunahme untersucht.

Zwischen den verschiedenen Genotypgruppen konnte jedoch kein Unterschied in der Erhöhung des BMI nach 4 Wochen festgestellt werden ($p > 0,05$; Mann-Whitney-U-Test). Dieses Ergebnis stimmt mit den bisherigen negativen Resultaten aus der Literatur zu diesem Polymorphismus überein (Rietschel et al., 1997, Basile et al., 2001a). Der HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus scheint demzufolge nicht mit einer Antipsychotika-induzierten Gewichtszunahme assoziiert zu sein. Dass jedoch andere Variationen im Gen des HT_{2C}-Rezeptors mit einer Antipsychotika-induzierten Gewichtszunahme assoziiert sein könnten, zeigen Daten aus zahlreichen anderen Studien zum HT_{2C} -759 C/T Polymorphismus (Reynolds et al. 2002, Reynolds et al., 2003; Ellingrod, et al., 2005; Templeman et al., 2005).

5.2.1.3 DRD3 Ser9Gly Polymorphismus, HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus, MDR1 C3435T Polymorphismus und Olanzapin-Response

49 (34,5 %) der 142 Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis wurden mit dem atypischen Antipsychotikum Olanzapin behandelt (siehe auch Abbildung 34). Olanzapin zeigt eine hohe Affinität zum DRD3 und HT_{2A}-Rezeptor (siehe Tabelle 5) und ist Substrat des P-Glykoproteins (Wang et al., 2004). Polymorphismen in diesen Strukturen, die die Funktionalität beeinflussen (DRD3 Ser9Gly Polymorphismus, HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus, MDR1 C3435T Polymorphismus) können somit möglicherweise mit der Wirksamkeit einer Olanzapin-Therapie assoziiert sein.

CGI 2 versus PDS-P

Bei den Untersuchungen zu jedem der drei Polymorphismen zeigten sich diskrepante Ergebnisse hinsichtlich der beiden Response-Kriterien CGI 2 und PDS-P.

Der CGI ist eine Fremdbeurteilungsskala mit Hilfe derer der Arzt, aus seiner Erfahrung heraus, das Ansprechen des Patienten auf die Therapie beurteilen soll. Für den CGI sprechen die Kürze, die Einfachheit der Anwendung und die hohe Augenscheinvalidität. Dies verleitet jedoch auch zu subjektiven Interpretationen durch den Arzt, die eventuell zu weitreichend sein können. Auch die alleinige Beurteilung der pharmakotherapeutischen Wirksamkeit gelingt nicht immer. Der Selbstbeurteilungs-Score PDS hingegen erfasst das Ausmaß der subjektiven Beeinträchtigung des Patienten, da er von diesem selbst ausgefüllt wird. Besonders schizophrene Patienten verleugnen häufig ihre Erkrankung bzw. haben eine geringe Krankheitseinsicht und können ihren Krankheitszustand deutlich anders als der Arzt bewerten. Beide Beurteilungs-Scores stellen zwar in ihrer Reliabilität und Validität gesicherte Instrumente zur Messung psychopathologischer Veränderungen dar, können jedoch in der Beurteilung einer Response unter Umständen deutlich voneinander abweichen.

In der Population der mit Olanzapin behandelten Patienten korrelierte der CGI 2-Wert nach 4-wöchiger Behandlung schwach mit der Differenz zwischen dem PDS-P nach 4 Wochen und dem PDS-P zum Aufnahmezeitpunkt (entspricht Rückgang oder Zunahme der psychotischen Symptome) (Spearman $r_s=0,489$; $p=0,002$). Durch Dichotomisierung in Responder und Nicht-Responder (Transformieren der ordinalskalierten Ausprägungen CGI 2 bzw. Rückgang des PDS-P in nominale Ausprägungen) können die Ergebnisse hinsichtlich der beiden Response-Kriterien noch weiter voneinander abweichen. Ein negatives Ergebnis aus einer Auswertung mit dem einen Response-Kriterium schließt somit nicht unbedingt ein positives Ergebnis mit dem anderen Response-Kriterium aus. Insgesamt scheint die Response nach PDS-P wesentlich strenger ausgelegt zu sein (42,1 % Responder), als die Response nach CGI 2 (61,7 % Responder). Auch in anderen pharmakogenetischen Studien wurden bereits divergente Ergebnisse für verschiedene Messgrößen der Response berichtet. Durham et al. (2003) konnten ein signifikant schnelleres Ansprechen auf eine Therapie mit Sertralin bei Patienten mit dem I/I-Genotyp bezüglich des HTTLPR-Polymorphismus nachweisen, wenn der CGI 1 (Schweregrad der Erkrankung) als Response-Kriterium ausgewertet wurde (Response: CGI 1 \leq 2). Ähnliche Ergebnisse, jedoch keine statistisch signifikanten, wurden erzielt, wenn der HAM-D (Response: HAMD-Reduktion \geq 50 %) ausgewertet wurde. Die Autoren gaben unterschiedliche „Rater-Trainings“ als eine der möglichen Ursachen für die Diskrepanz an.

DRD3 Ser9Gly Polymorphismus

Zwischen dem DRD3 Ser9Gly Polymorphismus und der Response nach dem Kriterium PDS-P konnte eine signifikante Assoziation gezeigt werden ($p=0,003$; Fisher-Exact-Test). Patienten mit dem Ser/Ser-Genotyp sprachen wesentlich schlechter an (19,0 %), als Heterozygote (64,3 %) oder solche mit dem Gly/Gly-Genotyp (100 %). Möglicherweise stellt das Vorhandensein von mindestens

einem Gly-Allel einen Prädiktor für ein gutes Ansprechen auf eine Therapie mit Olanzapin dar. Die Odds Ratio (Gly/Gly-Genotyp und Ser/Gly-Genotyp versus Ser/Ser-Genotyp) bezüglich der Response beträgt 10,20 (95 % CI 2,34-44,4).

Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten aus bisherigen pharmakogenetischen Studien überein. In einer Metaanalyse von Jönsson et al. (2003) sprachen Patienten, die mit Clozapin, einem wie Olanzapin atypischen Antipsychotikum, therapiert wurden, besser an, wenn sie ein Gly-Allel oder den Gly/Gly-Genotyp aufwiesen. Die Ergebnisse aus der Metaanalyse sind jedoch sehr vorsichtig zu interpretieren, da die eingeschlossenen Studien sehr heterogen waren. Möglicherweise spielt aber der DRD3 Ser9Gly Polymorphismus eine wichtige Rolle bei der Variabilität der Wirkung von atypischen Antipsychotika. Weiterführende Studien sind unbedingt notwendig, um dies zu evaluieren.

Eine Assoziation zwischen dem DRD3 Ser9Gly Polymorphismus und der Therapie-Response konnte im Rahmen der hier vorliegenden Studie durch die Auswertung nach CGI 2 nicht verifiziert werden.

HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus

Bei der Auswertung des HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus zeigte sich, dass Patienten mit dem G/G-Genotyp mehr als doppelt so häufig auf die Therapie mit Olanzapin ansprachen (72,7 %), als andere Patienten (29,6 %), wenn der PDS-P als Auswertungskriterium verwendet wurde. Der Unterschied war statistisch signifikant (p=0,024; Fisher-Exact-Test). Allerdings erhielten die Patienten mit dem G/G-Genotyp auch signifikant höhere durchschnittliche Tagesdosen Olanzapin als andere. Das bessere Ansprechen dieser Patienten kann womöglich auf die höheren Olanzapin-Dosen zurückzuführen sein.

Das oben beschriebene Ergebnis steht auch im Widerspruch zu einer Studie von Ellingrod et al. (2003), in der über eine tendenziell bessere Reduktion der Negativsymptomatik von Olanzapin-behandelten Patienten mit dem A/A-Genotyp berichtet wurde (p=0,054). Da zwischen dem HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus und dem HT_{2A} T102C Polymorphismus ein Kopplungsungleichgewicht besteht (Kouzmenko et al., 1999) und das 102T-Allel mit dem -1438 A-Allel gekoppelt ist, widersprechen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse auch denen aus einer weiteren Studie von Ellingrod et al. (2002). Die Arbeitsgruppe berichtete, dass bei Olanzapin behandelten Patienten mit dem T/T-Genotyp nach 6-wöchiger Therapie eine tendenziell bessere Reduktion der Negativsymptomatik erzielt werden konnte, als bei anderen Patienten (p=0,063). Da in den beiden Untersuchungen von Ellingrod et al. (n=41) und in der hier vorliegenden Studie (n=38; von 11 der 49 Patienten konnte zu Tag 28 kein PDS-P erhoben werden) nur relativ kleine Patientenzahlen untersucht wurden, kann abschließend nicht geklärt werden, ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen dem Genotyp des HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus und einem Ansprechen auf eine Therapie mit Olanzapin besteht und welches Allel bzw. welcher Genotyp mit einem besseren Ansprechen auf eine Olanzapin-Therapie verknüpft ist. Weiterführende Studien sind dazu erforderlich.

Mit dem CGI 2 als Auswertungskriterium für die Response konnte in der hier vorliegenden Untersuchung kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Genotyp des HT_{2A}-1438 G/A Polymorphismus und einem Ansprechen auf eine Therapie mit Olanzapin gezeigt werden ($p=0,343$; Fisher-Exact-Test). Patienten mit dem G/G-Genotyp sprachen allerdings auch hier häufiger an (73,3 % Responder) als andere Patienten (56,3 % Responder).

MDR1 C3435T Polymorphismus

Wie bereits oben erwähnt ist Olanzapin ein Substrat des P-Glykoproteins (Wang et al., 2004). Durch das P-Glykoprotein wird Olanzapin über die Blut-Hirn-Schranke aus dem ZNS ins Blut zurücktransportiert. Die Expression des P-Glykoproteins hat somit einen unmittelbaren Einfluss auf die Konzentration im ZNS, dem Wirkort von Olanzapin. Das P-Glykoprotein ist ein Produkt des MDR1-Gens, das den sogenannten MDR1 C3435T Polymorphismus aufweist. Homozygote Träger des T-Allels zeigten eine signifikant niedrigere Expression des P-Glykoproteins (Hoffmeyer et al., 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Ansprechen auf eine Olanzapin-Therapie, mit dem Genotyp des MDR1 C3435T Polymorphismus assoziiert ist. Dabei wurden Träger des niedrig exprimierenden T/T-Genotyps mit allen anderen Patienten verglichen.

Patienten, die homozygot für das niedrig exprimierende T-Allel waren, sprachen signifikant häufiger nach CGI 2 an (86,7 %), als andere Patienten (50,0 %) ($p=0,024$; Fisher-Exact-Test). Patienten mit dem T/T-Genotyp können theoretisch, aufgrund der niedrigeren Expression des P-Glykoproteins, höhere Wirkstoffkonzentrationen am Wirkort im ZNS erreichen und somit besser auf die Behandlung mit Olanzapin ansprechen. Die durchschnittlichen Tagesdosen von Olanzapin unterschieden sich zwischen den beiden Genotyp-Gruppen nicht signifikant. Es wurden jedoch keine Olanzapin-Plasmaspiegel gemessen, die direkt die Response beeinflussen könnten. Weiterführende Studien sind notwendig, um das oben beschriebene Resultat zu verifizieren.

Die Untersuchung mit dem Auswertungsparameter PDS-P lieferte einen Trend in die gleiche Richtung wie beim CGI 2. 54,5 % der Patienten mit dem niedrig exprimierenden T/T-Genotyp, jedoch nur 37,0 % der anderen Patienten sprachen auf die Therapie mit Olanzapin an. Der Unterschied zwischen den Genotypen war allerdings nicht statistisch signifikant ($p=0,227$; Fisher-Exact-Test).

Bisher wurden keine Studien publiziert, in denen eine Assoziation zwischen dem MDR1 C3435T Polymorphismus und dem Ansprechen auf eine Therapie mit Olanzapin untersucht wurde. Das MDR1-Gen stellt jedoch ein interessantes Kandidaten-Gen für weiterführende pharmakogenetische Studien dar.

Nach den Daten der hier vorliegenden Studie und besonders aufgrund der Diskrepanz der erzielten Ergebnisse zu den beiden Response-Kriterien, kann auf der Basis des pharmakogenetischen Status hinsichtlich der 3 untersuchten Polymorphismen keine Vorhersage des Ansprechens auf eine Olanzapin-Therapie erfolgen. Die Confounder Alter, Geschlecht und Schwere der Erkrankung zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie unterschieden sich zwischen den einzelnen Genotyp-

Gruppen eines jeden Polymorphismus nicht signifikant. Da für eine Reihe von Antipsychotika, darunter auch Olanzapin, bei Rauchern klinisch relevante Wirkungsverminderungen beschrieben wurden (Özdemir et al., 2001, Carrillio et al., 2003), wurde im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchung überprüft, ob der Anteil der Raucher sich in den einzelnen Genotypgruppen eines jeden der 3 Polymorphismen unterschied. Es konnten jedoch keine signifikanten Differenzen gefunden werden. Die Limitation der hier vorliegenden Untersuchung liegt vor allem in der kleinen Patientenzahl. Die Aussagekraft der Ergebnisse ist dadurch stark eingeschränkt. Ferner wurden nur 46,9 % der 49 Patienten mit Olanzapin als Monotherapie behandelt. Neben der antipsychotischen Therapie mit Olanzapin war zudem, den klinischen Erfordernissen entsprechend, die gleichzeitige Gabe von weiteren antipsychotisch wirkenden Arzneistoffen, sowie die Gabe von Antidepressiva und anderen Psychopharmaka, wie Sedativa, möglich. Auch diese Komedikation kann die Therapieresponse erheblich beeinflussen. Der Einschluss von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis in die hier vorliegende Auswertung führt zu einer inhomogenen Patientenpopulation. Hinsichtlich der Schweregrade der Erkrankungen zum Aufnahmezeitpunkt (CGI 1) unterschieden sich die Patienten in den einzelnen Genotyp-Gruppen jedoch nicht signifikant.

Aufgrund der zahlreichen Limitationen können die im Rahmen dieser Untersuchung erzielten Ergebnisse nur als Basis für weiterführende Untersuchungen dienen.

5.2.2 Ergebnisse die keine Assoziation zwischen Genotyp und Response oder Nebenwirkungen zeigen

5.2.2.1 Polymorphismen im serotonergen System und Ansprechen auf eine antidepressive Therapie

Neben anderen Therapieoptionen ist besonders die Anwendung von Antidepressiva ein Eckpfeiler zur Behandlung von Patienten mit depressiven Erkrankungen. Trotz der zum Teil unterschiedlichen Angriffspunkte führt die Gabe von Antidepressiva akut zu einer Erhöhung der Neurotransmitter Serotonin und/oder Noradrenalin im synaptischen Spalt (Schildkraut, 1965; Coppen, 1969). Das serotonerge System scheint nach dem heutigen Erkenntnisstand eine entscheidende Rolle in der Wirkungsweise von antidepressiv wirkenden Arzneistoffen zu spielen. Allerdings sprechen etwa 30-50 % aller Patienten nicht oder nur ungenügend auf ihre Psychopharmakotherapie an (Doris et al., 1999, Evans, 2003). Theoretisch könnten Polymorphismen im serotonergen System, die eine funktionelle Auswirkung haben, die Wirksamkeit einer Therapie mit Antidepressiva beeinflussen.

Sowohl bei den depressiven Patienten insgesamt, als auch bei den depressiven Patienten die mit Mirtazapin oder vorwiegend mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden, zeigte sich zwischen keinem der untersuchten Polymorphismen im serotonergen System (HTTLPR Polymorphismus, HTT-VNTR Polymorphismus, HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus bzw. HT_{2A} His452Tyr

Polymorphismus) und dem Ansprechen auf die antidepressive Therapie bzw. der Aufenthaltsdauer eine signifikante Assoziation ($p > 0,05$; Fisher-Exact-Test).

Nach den im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen scheint somit die Vorhersage der therapeutischen Wirksamkeit einer antidepressiven Therapie basierend auf der Genotypisierung der oben genannten Polymorphismen nicht möglich.

HTTLPR Polymorphismus

Der HTT stellt die Zielstruktur für zahlreiche Antidepressiva dar. Besonders SSRIs blockieren selektiv den HTT. In zahlreichen pharmakogenetischen Studien wurde daher die Assoziation zwischen dem HTTLPR Polymorphismus und dem Ansprechen auf eine Therapie mit SSRIs (Fluvoxamin, Fluoxetin, Paroxetin) untersucht (Smeraldi et al., 1998; Zanardi et al., 2000; Zanardi et al., 2001; Pollock et al., 2000; Arias et al., 2001; Rausch et al., 2002; Durham et al., 2004). In diesen Studien an kaukasischen Populationen konnte ein besseres und/oder schnelleres Ansprechen bei Trägern des l-Allels oder l/l-Genotyps auf die Therapie mit verschiedenen SSRIs gezeigt werden. Neurochemisch wird dies durch eine stärkere Selbstinhibition serotonerger Neurone bei Patienten mit dem s-Allel des HTTLPR Polymorphismus erklärt. Die 5-HT erhöhende Wirkung von SSRIs wird durch das negative Feedback aufgrund einer 5-HT vermittelten Aktivierung inhibitorischer somatodentritischer HT_{1A} -Autorezeptoren limitiert. Der stärkere Anstieg von extrazellulärem 5-HT in somatodentritischen Bereichen bei Patienten mit dem s-Allel führt somit zu einer verstärkten Selbstinhibition (Zanardi et al., 2000). Dem entsprechend konnten Smeraldi et al. (1998) zeigen, dass Unterschiede hinsichtlich der Response auf Fluvoxamin zwischen den HTTLPR-Genotypgruppen durch zusätzliche Gabe von Pindolol, einem HT_{1A} -Rezeptor-Antagonisten, aufgehoben werden können. Eine weitere Erklärung für das bessere Ansprechen von Patienten mit einem oder zwei l-Allelen wurde von Whale et al. (2000) vorgeschlagen: durch die größere Anzahl an exprimierten HTT ist eine stärkere Modulation der serotonergen Neurotransmission und damit eine verbesserte Wirksamkeit möglich. Auch Studien mit einem gegenteiligen Ergebnis zu den oben genannten Resultaten sind publiziert (Kim et al., 2000, Yoshida et al., 2002). In der erstgenannten sprachen koreanische depressive Patienten, die homozygot für das s-Allel waren besser auf die Therapie mit Fluoxetin oder Paroxetin an. In der zweitgenannten respondierten japanische Patienten mit einem s-Allel besser auf ihre Therapie mit Fluvoxamin. Besonders die ethnischen Unterschiede in den Studienpopulationen und den damit verbundenen Unterschieden in der Allelfrequenz (Kaukasier: l-Allel = 54,7%, Asiaten: l-Allel = 20,3 %) könnten eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sein (Serretti et al., 2005). Allerdings zeigten Yu et al. (2002) und Lee et al. (2004) in asiatischen Studienpopulationen ein besseres Ansprechen auf eine Therapie mit Fluvoxamin bei Patienten mit dem l/l-Genotyp bzw. eine bessere Langzeit-Response bei Patienten mit einem oder zwei l-Allelen. Die Ergebnisse aus Untersuchungen an asiatischen Patientenpopulationen sind somit, möglicherweise aufgrund verschiedener Studiendesigns, inkonsistent. In der Arbeit von Pollock et al. (2000) konnte ein schnelleres Ansprechen von Patienten mit dem l/l-Genotyp auf eine Therapie mit Paroxetin nachgewiesen

werden, jedoch kein schnelleres Ansprechen von Patienten mit dem I/I-Genotyp, die mit Nortriptylin, einem TCA, behandelt wurden. Der HTTLPR Polymorphismus stellt somit möglicherweise einen spezifischen Prädiktor für die Effektivität einer Therapie mit SSRIs dar. Das Ergebnis aus einer Studie von Murphy et al. (2004) stützt diese Hypothese. Geriatrische depressive Patienten mit einem oder zwei s-Allelen sprachen nach 28 Tagen signifikant schlechter auf eine Therapie mit Paroxetin an als andere. Bei Patienten, die mit Mirtazapin therapiert wurden konnte kein Unterschied zwischen den Genotypgruppen hinsichtlich der Response beobachtet werden.

In der hier vorliegenden Untersuchung an depressiven Patienten konnte womöglich keine Assoziation zwischen dem HTTLPR Polymorphismus und der Therapieresponse festgestellt werden, da ein Großteil der Patienten nicht mit SSRIs behandelt wurde. Selbst in der Subgruppenauswertung an Patienten, die mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden, scheint die Heterogenität der Medikation zu groß, um einen Effekt des HTTLPR Polymorphismus auf die Variabilität der Therapieresponse aufzeigen zu können. Eine weitere Auswertung von Patienten, die mit SSRIs behandelt wurden erfolgte im Rahmen dieser Studie nicht, da die Patientenzahl dann sehr klein wäre, zudem nur wenige Patienten eine Monotherapie mit SSRIs bekamen, und für die Therapie mit SSRIs keine festen Dosierungsschemata vorgeschrieben waren. Da der HTTLPR Polymorphismus nur mit etwa 5-7 % zur Variabilität der Response auf eine Therapie mit SSRIs beiträgt (Smeraldi et al., 1998; Yu et al., 2002) muss der Einfluss weiterer Polymorphismen in Betracht gezogen werden. Die Limitation der Aussagekraft der hier vorliegenden Studie ist ferner durch die Begleiterkrankungen der depressiven Patienten sowie die entsprechende Komedikation bedingt. Die Allelfrequenzen der 109 untersuchten depressiven Patienten (I-Allel=63,8 %; 95 % CI 57,2-69,9) entsprechen denen aus anderen kaukasischen Studienpopulationen (I-Allel=54,7 %; Serretti et al, 2005) und unterscheiden sich von der Allelhäufigkeit in einer asiatischen Population deutlich (I-Allel=20,3 %; Serretti et al, 2005).

HTT-VNTR Polymorphismus

Im Vergleich zum HTTLPR Polymorphismus wurden zum HTT-VNTR Polymorphismus bisher nur wenig pharmakogenetische Studien publiziert. Allerdings beeinflusst dieser Polymorphismus wie der HTTLPR Polymorphismus die Expression des HTT (Fiskerstrand et al., 1999; MacKenzie et al., 1999) und kann somit theoretisch zur Variabilität der Effektivität einer Therapie mit SSRIs oder Antidepressiva beitragen. Kim et al. (2000) berichteten, dass Patienten die homozygot für die 12-fache Wiederholung (hoch exprimierend) waren, besser auf eine Therapie mit SSRIs ansprechen als Patienten mit den anderen Allel-Kombinationen. Dagegen konnte in einer anderen Studie kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem HTT-VNTR Polymorphismus und dem Ansprechen auf eine Therapie mit Fluvoxamin festgestellt werden (Ito et al., 2002).

Die im Rahmen der hier vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse können aufgrund der heterogenen Studienmedikation (verschiedene Klassen von Antidepressiva) und aufgrund ethnischer Unterschiede (Kaukasier versus Asiaten) nicht mit den Resultaten von Kim et al. (2000) und Ito et al. (2002) verglichen werden. Aufgrund der heterogenen Studienmedikation und bereits

oben beschriebener Limitationen der Studie (Begleiterkrankungen der depressiven Patienten sowie entsprechende Komedikation), kann durch die im Rahmen der hier vorliegenden Studie erzielten negativen Ergebnisse jedoch ein Beitrag des HTT-VNTR Polymorphismus zur Variabilität einer Therapie mit SSRIs in einer kaukasischen Population nicht ausgeschlossen werden.

HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus und HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus

Die bisher zum HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus bzw. dem im Kopplungsungleichgewicht befindlichen HT_{2A} T102C Polymorphismus (siehe Kapitel 1.4.2.1) durchgeführten pharmakogenetischen Studien zeigten konträre Ergebnisse. Cusin et al. (2002) konnten keinen Einfluss des HT_{2A} T102C Polymorphismus auf das Ansprechen auf eine antidepressive Therapie mit den SSRIs Fluvoxamin und Paroxetin nach 6 Wochen bei 443 stationären Patienten, mit Major Depression oder bipolaren depressiven Erkrankungen feststellen. Dem entsprechend war auch das Ergebnis aus einer Untersuchung von Sato et al. (2002) negativ. Eine andere Gruppe (Minov et al., 2001) zeigte hingegen an 173 Patienten, dass das Vorhandensein eines oder zweier C-Allele mit einem besseren Ansprechen auf eine antidepressive Therapie verknüpft ist. Die Untersuchung von Minov et al. (2001) zeigte weiterhin keine Assoziation des HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus mit dem Ansprechen auf eine antidepressive Therapie. Insgesamt scheint der HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus bzw. der im Kopplungsungleichgewicht befindliche HT_{2A} T102C Polymorphismus, sowie der HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus keine entscheidende Rolle für der Variabilität einer antidepressiven Therapie zu spielen. Die aus der hier vorliegenden Untersuchung stammenden negativen Ergebnisse stimmen damit überein.

Aufenthaltsdauer

Die Aufenthaltsdauer kann theoretisch Aufschluss über die Schnelligkeit des Ansprechens auf eine Therapie geben, da Patienten in der Regel möglichst zeitnah nach ihrer Genesung entlassen werden.

Im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchung korrelierte die Länge der Aufenthaltsdauer schwach mit dem CGI 2-Wert nach 4 Wochen (Spearman $r_s=0,437$; $p<0,001$) oder der Differenz zwischen dem PDS-D nach 4 Wochen und dem PDS-D bei Aufnahme (entspricht Rückgang oder Zunahme der depressiven Gestimmtheit) (Spearman $r_s=0,365$; $p=0,001$). Die beiden Parameter scheinen somit nur schwache Prädiktoren für die Länge des stationären Aufenthaltes zu sein.

Zwischen keinem der im Rahmen der hier vorliegenden Studie untersuchten Polymorphismen im serotonergen System und der Aufenthaltsdauer zeigte sich eine signifikante Assoziation. Die negativen Resultate zur Aufenthaltsdauer stimmen mit den negativen Resultaten zur Response nach CGI 2 und PDS-D überein.

5.2.2.2 Polymorphismen im serotonergen und dopaminergen System und Ansprechen auf eine antipsychotische Therapie

Maßgeblich für die Behandlung einer Erkrankung aus dem schizophrenen Formenkreis ist die Therapie mit Antipsychotika. Trotz der Vielzahl von Arzneistoffen, die zur Behandlung einer Schizophrenie zur Verfügung stehen, sprechen etwa 30-50 % aller Patienten nicht oder nur ungenügend auf ihre Psychopharmakotherapie an (Doris et al., 1999, Evans, 2003). Eine zentrale Stellung in pharmakogenetischen Studien nimmt bisher das dopaminerge Neurotransmittersystem ein, basierend auf der Dopaminhypothese der Schizophrenie (Seeman, 1987, Owen et al., 1978) und den antidopaminergen Eigenschaften von Antipsychotika (Seeman et al., 1975) (siehe auch Tabelle 5). Da vor allem die neueren atypischen Antipsychotika eine hohe Affinität zu serotonergen Rezeptoren haben (siehe Tabelle 5), hat auch das Interesse an Polymorphismen in Serotoninrezeptoren zugenommen.

Trotz der Tatsache, dass sowohl das serotonerge, als auch das dopaminerge System in der Wirkungsweise von Antipsychotika eine bedeutende Rolle spielen, konnte im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchung an 142 Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis zwischen keinem der untersuchten Polymorphismen im dopaminergen System (DRD2 C ins/del Polymorphismus, DRD2 Taq I Polymorphismus, DRD2 Ser311Cys Polymorphismus, DRD3 Ser9Gly Polymorphismus, DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus, DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus, DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus) bzw. im serotonergen System (HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus, HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus und HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus) und dem Ansprechen auf die antipsychotische Therapie oder der Aufenthaltsdauer eine signifikante Assoziation gezeigt werden ($p > 0,05$; Fisher-Exact-Test).

Auch aus bisher publizierten pharmakogenetischen Untersuchungen gibt es meist negative oder widersprüchliche Ergebnisse. Die gegenwärtigen Literaturdaten deuten auf eine mögliche Assoziation zwischen dem DRD2 Taq I Polymorphismus und dem Ansprechen auf eine Therapie mit typischen Antipsychotika, sowie auf eine Assoziation zwischen dem HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus (bzw. HT_{2A} T102C Polymorphismus), dem HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus und dem DRD3 Ser9Gly Polymorphismus und dem Ansprechen auf eine Therapie mit atypischen Antipsychotika bzw. mit Clozapin hin (Steimer et al., 2005b; Wilfert et al., 2005).

Diese Daten konnten jedoch durch die im Rahmen der hier vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Polymorphismen im DRD2

Besonders typische Antipsychotika haben eine hohe DRD2 Affinität und die antipsychotische Potenz dieser Substanzen korreliert mit der Affinität zum DRD2 (Seeman et al., 1975). Pharmakogenetische Untersuchungen zum DRD2 wurden daher auch hauptsächlich mit typischen Antipsychotika als Studienmedikation durchgeführt.

In einer klinischen Studie konnten Suzuki et al. (2000) zeigen, dass Patienten mit mindestens

einem A1-Allel des DRD2 Taq I Polymorphismus signifikant besser auf eine 3-wöchige Therapie mit Nemopramid ansprechen als andere. Bei diesen Patienten zeigte sich eine signifikante Besserung hinsichtlich der BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale) und der Positivsymptomatik, nicht jedoch hinsichtlich der Negativsymptomatik und anderer Symptom-Subgruppen. Die Autoren folgerten, dass womöglich die molekularen Mechanismen, die für eine Besserung der Negativsymptomatik und anderer Symptome verantwortlich sind, unabhängig von einem DRD2-Antagonismus sind, und deshalb keine Assoziation zum DRD2 Taq I Polymorphismus besteht. Dementsprechend zeigte sich, dass Patienten mit zwei A2-Allelen schlechter hinsichtlich der Positivsymptomatik, nicht jedoch hinsichtlich der Negativsymptomatik auf eine 28-tägige Therapie mit Haloperidol ansprechen (Schäfer et al. 2001). Die Unterschiede waren bereits ab Tag 14 signifikant. Dahmen et al. (2001) zeigten ein besseres Ansprechen auf die Therapie mit Amisulprid, einem atypischen Antipsychotikum mit hoher D2 und D3 Rezeptor-Affinität, oder Flupentixol bei gleichzeitigem Vorliegen eines A1-Allels und zweier Ser-Allele bezüglich des DRD3 Ser9Gly Polymorphismus. In zwei weiteren Studien mit dem selektiven D2-Rezeptorantagonist Bromoperidol bzw. mit Chlorpromazin konnten die vorangegangenen Resultate allerdings nicht bestätigt werden (Suzuki et al., 2001b; Wu et al., 2005). Die Daten aus der Literatur deuten darauf hin, dass möglicherweise eine Assoziation zwischen dem DRD2 Taq I Polymorphismus und der Besserung der Positivsymptomatik unter einer Therapie mit typischen Antipsychotika besteht.

Die im Rahmen der hier vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse zum DRD2 Taq I Polymorphismus bestätigen dies nicht. Allerdings konnte durch die Erfassung der Response nach CGI 2 und PDS-P nicht zwischen den verschiedenen Symptomgruppen differenziert werden und damit die Positivsymptomatik nicht gezielt beurteilt werden.

Publizierte Studien zum DRD2 C ins/del Polymorphismus zeigen diskrepante Ergebnisse. In zwei größeren Untersuchungen konnte keine Assoziation zwischen dem DRD2 C ins/del Polymorphismus und dem Ansprechen auf eine antipsychotische Therapie gezeigt werden (Arranz et al., 1998; Ohara et al., 1998). In zwei kleineren Studien konnte bei Patienten ohne Del-Allel ein besseres Ansprechen auf eine Clozapin-Therapie (Malhotra et al., 1998) und eine bessere Reduktion ängstlich-depressiver Symptome unter einer Therapie mit Bromoperidol und Nemopramid (selektive DRD2 Antagonisten) (Suzuki et al., 2001) gefunden werden. Dem entsprechend wiesen Wu et al. (2005) kürzlich ein signifikant besseres Ansprechen von Patienten ohne Del-Allel auf eine 8-wöchige Therapie mit dem typischen Antipsychotikum Chlorpromazin nach. Da das Del-Allel zu einer verminderten Expression (Arinami et al., 1997) und einer verminderten DRD2-Rezeptordichte (Jönsson et al., 1999) führt, ist es theoretisch möglich, dass bei Patienten ohne Del-Allel eine effektivere DRD2-Rezeptorblockade und damit eine bessere Response erzielt werden kann.

Dem entsprechend respondierten in der hier vorliegenden Untersuchung Patienten mit dem ins/ins-Genotyp häufiger nach CGI 2 (60,2 %) als andere Patienten (39,1 %). Der Unterschied zwischen den Genotypgruppen war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,070$; Fisher-Exact-Test). Da sich

in der Untersuchung nach dem Auswertungskriterium PDS-P kein entsprechender Unterschied zeigte, kann der gefundene Trend bezüglich des Auswertungskriteriums CGI 2 auch zufällig sein. In der Population der Patienten mit einer Erkrankung aus dem schizophrener Formenkreis korrelierte der CGI 2-Wert nach 4-wöchiger Behandlung bzw. am letzten Tag des stationären Aufenthaltes kaum nennenswert mit der Differenz zwischen dem PDS-P nach 4 Wochen (bzw. am letzten Tag des stationären Aufenthaltes) und dem PDS-P zum Aufnahmezeitpunkt (entspricht Rückgang oder Zunahme der psychotischen Symptome) (Spearman $r_s=0,154$; $p=0,046$). Durch Dichotomisierung in Responder und Nicht-Responder (Transformieren der ordinalskalierten Ausprägungen CGI 2 bzw. Rückgang des PDS-P in nominale Ausprägungen) können die Ergebnisse hinsichtlich der beiden Response-Kriterien noch weiter voneinander abweichen. Ein negatives Ergebnis aus der Auswertung mit einem Response-Kriterium schließt somit nicht unbedingt ein positives Ergebnis mit dem anderen Response-Kriterium aus. Mögliche Ursachen für diskrepante Ergebnisse nach CGI 2 und PDS-P wurden bereits in Kapitel 5.2.1.3 diskutiert.

Die Ergebnisse aus pharmakogenetischen Studien zur Untersuchung der Assoziation zwischen dem DRD2 Ser311Cys Polymorphismus und der Therapie mit Clozapin oder typischen Antipsychotika waren durchweg negativ (Crawford et al., 1996, Sasaki et al., 1996 Ohara et al., 1996, Jönsson et al., 2003). Lediglich Lane et al. (2004) zeigten an 123 schizophrenen Patienten, dass Träger des Ser/Cys-Genotyps besser auf die Therapie mit Risperidon ansprachen, als solche mit dem Ser/Ser-Genotyp.

Entsprechend den Ergebnissen von Lane et al. (2004) sprachen auch in der hier vorliegenden Untersuchung Patienten mit dem Ser/Cys-Genotyp etwas besser nach CGI 2 auf die antipsychotische Therapie an als solche mit dem Ser/Ser-Genotyp. Der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant ($p=0,233$; Fisher-Exact-Test) und konnte in der Auswertung nach PDS-P nicht gezeigt werden. Die Ergebnisse aus den bisher publizierten pharmakogenetischen Untersuchungen, aber auch aus der hier vorliegenden Studie, sollten mit Vorsicht interpretiert werden, da die niedrige Auftrittshäufigkeit des Cys-Allels die statistische Aussagekraft stark limitiert. Eine mögliche Ursache für die im Rahmen dieser Studie erzielten negativen Resultate zu den Polymorphismen im DRD2 könnte die heterogene Studienmedikation sein. In der hier vorliegenden Untersuchung wurden hauptsächlich atypische Antipsychotika (74,9 % aller verordneten Antipsychotika; 179 von 239) und nur 25,1 % (60 von 239) typische Antipsychotika eingesetzt (jeweils Mehrfachverordnungen pro Patient möglich). Von den typischen Antipsychotika wiederum waren nur etwas weniger als die Hälfte hochpotent (29 von 60), also mit einer hohen Affinität zum DRD2 (siehe auch Abbildung 34). Eine mögliche Assoziation zwischen den DRD2 Polymorphismen und dem Ansprechen auf typische Antipsychotika kann mit einer derartig zusammengesetzten Studienmedikation womöglich nicht nachgewiesen werden. Alle drei Polymorphismen im DRD2 wirken sich entweder auf die Expression oder direkt auf die Funktionalität des DRD2-Rezeptors aus und können somit potentiell die Therapie mit Antipsychotika beeinflussen. Möglicherweise sind aber auch die funktionellen Auswirkungen und damit die Auswirkungen auf die Variabilität einer

Antipsychotika-Therapie zu gering, um in einer Population der Größe, wie in der hier vorliegenden Studie, nachgewiesen werden zu können.

DRD3 Ser9Gly Polymorphismus

Der DRD3 Ser9Gly Polymorphismus wurde bisher in zahlreichen pharmakogenetischen Studien untersucht, mit unterschiedlichen Ergebnissen, die vor allem auf die Heterogenität der Studien zurückzuführen sind. Jönsson et al. (2003) führten daraufhin eine Metaanalyse durch. Insgesamt konnte keine Assoziation zwischen dem Polymorphismus und dem Ansprechen auf eine antipsychotische Therapie nachgewiesen werden. Wurden die Ergebnisse aus Studien mit typischen Antipsychotika und solchen mit Clozapin getrennt ausgewertet, so zeigte sich, dass Patienten mit den Ser-Allel oder Ser/Ser-Genotyp besser ansprachen, wenn sie mit typischen Antipsychotika behandelt wurden, während mit Clozapin behandelte Patienten ein besseres Ansprechen zeigten wenn sie Träger eines oder zweier Gly-Allele waren. Diese Ergebnisse müssen jedoch aufgrund der großen Heterogenität der eingeschlossenen Studien mit Vorsicht interpretiert werden. In einer weiteren Studie mit verschiedenen atypischen Antipsychotika konnten Szekeres et al. (2003) eine Assoziation zwischen Non-Response und dem Ser-Allel bzw. dem Ser/Ser-Genotyp zeigen. Dagegen fanden Lane et al. (2005) eine signifikant bessere Reduktion negativer Symptome unter der Therapie mit Risperidon bei Patienten mit dem Ser/Ser-Genotyp oder dem Ser/Gly-Genotyp als bei Homozygoten für das Gly-Allel. Es bleibt letztendlich unklar, ob und welche Rolle der DRD3 Ser9Gly Polymorphismus bei der Variabilität des Ansprechens auf eine antipsychotische Therapie spielt.

Vor dem Hintergrund, dass in der hier vorliegenden Studie vor allem atypische Antipsychotika eingesetzt wurden, entspricht das Ergebnis bezüglich des Auswertungskriteriums PDS-P dem aus der Meta-Analyse von Jönsson et al. (2003) und dem aus der Studie von Szekeres et al. (2003). Patienten mit dem Ser/Ser-Genotyp sprachen nach PDS-P schlechter an (37,7 % Responder) als heterozygote Patienten (57,1 % Responder) und Homozygote für das Gly-Allel (55,6 % Responder) ($p=0,146$; Fisher-Exact-Test). Der Unterschied zwischen den Genotypen war auch nicht statistisch signifikant, wenn man Ser/Ser-Genotyp-Träger mit allen anderen verglich und den Fisher-Exact-Test anwendete ($p=0,074$; Fisher-Exact-Test). Wurde jedoch der χ^2 -Test angewandt (möglich, da in der 2x2-Felder-Tabelle keine Zelle eine erwartete Häufigkeit kleiner 5 hat), so zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der Responder ($p=0,047$; OR=2,22 für Gly/Gly-Genotyp und Gly/Ser-Genotyp versus Ser/Ser-Genotyp; 95 % CI 1,01-4,882). Da der Fisher-Exact-Test exaktere Werte liefert und die Signifikanz nach dem χ^2 -Test grenzwertig ist, muss das Ergebnis allerdings vorsichtig interpretiert werden. Weiterführende Untersuchungen an größeren Patientenpopulationen sind notwendig, um das Ergebnis zu verifizieren. Da in Bindungsstudien für den Ser/Ser-Genotyp die niedrigste Bindung eines DRD3-selektiven Liganden gezeigt wurde (Lundstrom et al., 1996), könnten möglicherweise auch Antipsychotika bei Ser-homozygoten Patienten schlechter binden, mit der Folge einer schlechteren Response.

Nach dem Auswertungskriterium CGI 2 konnte das Resultat zum PDS-P allerdings nicht bestätigt

werden. Patienten mit dem Ser/Ser-Genotyp sprachen sogar am häufigsten (58,8 %) auf die Therapie an (Ser/Gly-Genotyp 56,1 %; Gly/Gly-Genotyp 45,5 %; $p=0,726$; Fisher-Exact-Test). Das oben aufgeführte Ergebnis zum PDS-P kann somit zufällig sein. Wie bereits oben in der Diskussion der Ergebnisse zu den DRD2 Polymorphismen aufgeführt, schließt jedoch ein negatives Ergebnis bezüglich der Auswertung des CGI 2 nicht unbedingt ein positives Ergebnis zum PDS-P aus.

Es konnte in vitro gezeigt werden, dass sowohl atypische als auch typische Antipsychotika den DRD3 blockieren (Schwartz et al., 2000). Bemerkenswert ist vor allem die Erkenntnis, dass atypische Antipsychotika eine hohe Bindungsaffinität zu DRD3 Rezeptoren im präfrontalen Cortex zeigen, während Haloperidol als typisches Antipsychotikum vor allem DRD3 im Nucleus caudatus und Striatum blockiert (Kovacs et al., 2001). Da eine Unterfunktion im präfrontalen Cortex mit der Ätiologie der Negativsymptomatik einer Schizophrenie in Verbindung gebracht wird, könnte die hohe Affinität von atypischen Antipsychotika zu DRD3 in diesen Hirnarealen eine Ursache für die bessere Wirksamkeit von atypischen Antipsychotika im Vergleich zu typischen bezüglich der Negativsymptomatik sein. Vor diesem Hintergrund sind vor allem die Ergebnisse von Lane et al. (2005) interessant, die eine Assoziation zwischen dem DRD3 Ser9Gly Polymorphismus und der Besserung der Negativsymptomatik, nicht jedoch der Positivsymptomatik unter einer Therapie mit Risperidon zeigen. Auch die diskrepanten Ergebnisse aus der Meta-Analyse von Jönsson et al. (2003) zwischen typischen und atypischen Antipsychotika könnten zumindest teilweise auf die unterschiedlichen Bindungscharakteristiken dieser Substanzen zurückzuführen sein.

Da im Rahmen der hier vorliegenden Studie durch Verwendung des CGI 2 und PDS-P als Parameter für die Response keine Aussagen zur Negativsymptomatik gemacht werden können, sind die Ergebnisse nicht mit denen von Lane et al. (2005) vergleichbar.

Polymorphismen im DRD4

Der DRD4 ist für pharmakogenetische Untersuchungen von besonderem Interesse, da er in hoher Dichte vor allem im mesolimbischen und mesokortikalen System vorkommt. Beides sind Hirnareale, die mit der Ätiologie der Schizophrenie in Verbindung gebracht werden (Owen et al., 1978; Lewis et al., 2000; Leucht et al., 2005). Clozapin hat eine um etwa 10-fach höhere Affinität zum DRD4 als zum DRD2 oder DRD3, und es wird angenommen, dass der Antagonismus am DRD4 wesentlich zur Wirksamkeit von Clozapin beiträgt (Van Tol et al., 2001). Deshalb wurde in bisher durchgeführten pharmakogenetischen Untersuchungen hauptsächlich Clozapin als Studienmedikation eingesetzt. Diese zeigten entweder keine signifikante Assoziation des DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus (Rietschel et al., 1996) und des DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus (Rietschel et al., 1996; Kohn et al., 1997) mit der Therapieresponse oder meist negative Ergebnisse hinsichtlich des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus (Ohara et al., 1996; Saiki et al., 1993; Shaikh et al., 1995; Rao et al., 1994; Rietschel et al., 1996; Kohn et al., 1997; Zalsman et al., 2003; Kaiser et al., 2000; Hwu et al., 1998). Lediglich in der zuletzt zitierten Studie konnte ein besseres Ansprechen von Patienten, die homozygot für die 4-fache Wiederholung des 48 bp langen DNA-Abschnittes waren, im Vergleich zu solchen, die mindestens eine 2-fache

Wiederholung aufwies, gezeigt werden. Dieser Unterschied blieb in einer Subgruppenauswertung der männlichen Patienten bestehen, während bei den Frauen kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Genotyp-Gruppen bestand. Da es sich bei dieser Untersuchung um eine retrospektive Auswertung handelt, müssen die Daten mit Vorsicht interpretiert werden. Insgesamt sprechen die zahlreichen negativen Ergebnisse nicht für einen Zusammenhang zwischen dem DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und dem Ansprechen auf eine antipsychotische Therapie. Einem weiteren Studienergebnis zu Folge, könnte der DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus jedoch das individuelle Ansprechen auf verschiedene Klassen von Antipsychotika beeinflussen. In der Untersuchung von Cohen et al. (1999b) waren Patienten, die gut auf typische Antipsychotika ansprachen, signifikant weniger häufig Träger des Allels mit der 7-fachen Wiederholung, als Patienten, die auf Clozapin ansprachen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten negativen Ergebnisse bezüglich der Assoziation zwischen Polymorphismen im DRD4 und der Therapieresponse bestätigen die Resultate aus bisherigen pharmakogenetischen Untersuchungen. Die Ergebnisse sind jedoch nicht völlig vergleichbar, da in der hier vorliegenden Untersuchung nur ein geringer Anteil der Patienten mit Clozapin (n=22) behandelt wurde bzw. viele verschiedene atypische und typische Antipsychotika eingesetzt wurden. Eine mögliche Beeinflussung der Clozapin-Therapie kann mit dieser Studienmedikation nicht gezeigt werden. Der DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus beeinflusst zwar die Struktur des Rezeptorproteins, aber es gibt bisher keine Hinweise auf funktionelle Auswirkungen (Catalano et al., 1993). Der Polymorphismus scheint somit nicht oder kaum zur Variabilität der Wirkung von Antipsychotika beizutragen. Dagegen führt die Mutation im ersten Exon des DRD4-Gens (DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus) zu einer Leserasterverschiebung und einem funktionslosen Protein (Nöthen et al., 1994) und könnte sich theoretisch erheblich auf die Therapie mit Antipsychotika auswirken. Das mutierte Allel kommt allerdings nur sehr selten vor. Von den 142 Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis, die in der hier vorliegenden Untersuchung eingeschlossen waren, war keiner homozygot für die Mutation und nur 7 Patienten heterozygot. Möglicherweise ist die statistische Power zu gering, um eine Assoziation zwischen dem DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus und dem Ansprechen auf die antipsychotische Therapie nachweisen zu können. Van Tol et al. (1992) konnten ferner zeigen, dass Clozapin zu der langen Form des DRD4 (D4.7) bezüglich des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus eine 2-fach niedrigere Affinität hat, als zu den kürzeren Formen (D4.2, D4.4). In einer weiteren Untersuchung konnte allerdings nur ein geringer Unterschied in der Bindungsaffinität zwischen den verschiedenen polymorphen Rezeptorformen gezeigt werden (Asghari et al., 1994). Der geringe Unterschied in der Bindungsaffinität könnte einer der Gründe für die negativen Ergebnisse in der hier vorliegenden, aber auch in zahlreichen publizierten Untersuchungen sein. Da Clozapin eine hohe Selektivität für den DRD4 besitzt und der Antagonismus am DRD4 möglicherweise wesentlich zur Wirksamkeit von Clozapin beiträgt, typische Antipsychotika jedoch nur eine geringe relative DRD4-Affinität besitzen, könnten sich die geringen funktionellen Unterschiede zwischen den verschiedenen

polymorphen DRD4-Formen möglicherweise nur auf eine Therapie mit Clozapin auswirken.

Polymorphismen im HT_{2A}-Rezeptor

Zahlreiche pharmakogenetische Studien wurden bisher zum HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus bzw. dem im Kopplungsungleichgewicht befindlichen HT_{2A} T102C Polymorphismus (Kouzmenko et al., 1999) durchgeführt. In der überwiegenden Anzahl der Untersuchungen wurden die Patienten mit Clozapin behandelt. Das G-Allel des HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus ist mit dem C-Allel des HT_{2A}-T102C Polymorphismus gekoppelt (Kouzmenko et al., 1999) und scheint mit einem schlechteren Ansprechen auf eine antipsychotische Therapie assoziiert zu sein (Arranz et al., 1995; Arranz et al., 1998a, Joober et al., 1999a, Ellingrod et al., 2002 und 2003). Allerdings sind auch negative Ergebnisse publiziert (Nöthen et al., 1995, Masellis et al., 1995, Malhotra et al., 1996b, Nimgaonkar et al., 1996; Masellis et al., 1998; Lin et al., 1999). Die unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise auf Unterschiede in der Bewertung der Response, der Dauer der Behandlung, auf unterschiedliche Schweregrade der Erkrankungen oder auf ethnische Unterschiede zurückzuführen. Arranz et al. (1998a) konnten jedoch in einer Metaanalyse, in der auch die Daten aus 4 der oben genannten Studien mit negativem Ergebnis ausgewertet wurden (Nöthen et al., 1995, Masellis et al., 1995, Malhotra et al., 1996b, Nimgaonkar et al., 1996) insgesamt erneut ein schlechteres Ansprechen auf eine Therapie mit Clozapin von Patienten mit einem C-Allel bzw. dem C/C-Genotyp nachweisen. Eine nachfolgend publizierte Studie zeigte ein dazu konträres Resultat. Lane et al. (2002) fanden bei schizophrenen Patienten mit dem C/C-Genotyp eine signifikant stärkere Verbesserung der Negativsymptomatik unter einer 14-tägigen Therapie mit Risperidon, als bei anderen Patienten. Das zur oben genannten Meta-Analyse (Arranz et al., 1998a) konträre Ergebnis wurde von Lane et al. (2002) mit den Unterschieden in Medikation (Risperidon versus Clozapin), Krankheitsstadium (akut erkrankte Patienten versus chronisch kranke Patienten) und Herkunft der Patienten (Asiaten/Chinesen versus überwiegend Kaukasier) begründet. So kommt das C-Allel des HT_{2A} T102C Polymorphismus in der kaukasischen Bevölkerung häufiger vor als in der asiatischen. Eine weitere Studie an einer chinesischen Population zeigte keine Assoziation zwischen dem HT_{2A} T102C Polymorphismus und dem Ansprechen auf eine Therapie mit Clozapin (Lin et al., 1999).

In der oben genannten Meta-Analyse von Arranz et al. (1998a) wurden auch Studien zum HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus zusammengefasst und untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einem Tyr-Allel und mit dem Tyr/Tyr-Genotyp signifikant besser auf eine Therapie mit Clozapin ansprachen, als andere. Masellis et al. (1998) bestätigten in einer weiteren Untersuchung mit Clozapin als Studienmedikation dieses Ergebnis, während von Ellingrod et al. (2002) keine Assoziation in einer mit Olanzapin behandelten Studienpopulation nachgewiesen werden konnte. Obwohl Clozapin, verglichen mit manchen anderen atypischen Antipsychotika eine relativ niedrige

Affinität zum HT_{2A}-Rezeptor hat (siehe Tabelle 5), konnte in zahlreichen Studien eine Assoziation zwischen dem HT_{2A} T102C Polymorphismus bzw. dem HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus und der Response auf eine Therapie mit Clozapin gezeigt werden. Die im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchung erzielten Ergebnisse zu diesen beiden Polymorphismen waren negativ, können jedoch aufgrund der Unterschiede in der Studienmedikation nicht uneingeschränkt mit den Ergebnissen aus der Literatur verglichen werden. Nur eine geringe Anzahl (n=22) der 142 Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis wurde in der hier vorliegenden Untersuchung mit Clozapin behandelt. Dagegen erhielten 43 Patienten Risperidon und 11 Ziprasidon, zwei atypische Antipsychotika mit sehr hoher HT_{2A}-Rezeptoraffinität. Zahlreiche Patienten wurden wiederum mit typischen Antipsychotika behandelt, die eine sehr niedrige Affinität zum HT_{2A}-Rezeptor haben und 34 Patienten erhielten Amisulprid, das kaum an HT_{2A}-Rezeptoren bindet (siehe Tabelle 5). In einer solchen, bezüglich der HT_{2A}-Rezeptor-Affinität der Arzneistoffe heterogen behandelten Population, kann wahrscheinlich eine potentielle Assoziation zwischen dem HT_{2A} T102C Polymorphismus bzw. dem HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus und der Response nicht nachgewiesen werden. Da Ritanserin, ein selektiver HT_{2A}-Rezeptor-Antagonist, therapeutische Effekte hinsichtlich der Negativsymptomatik einer Schizophrenie zeigte (Burnet et al., 1996) könnten Polymorphismen im HT_{2A}-Rezeptor vor allem die Besserung der Negativsymptomatik beeinflussen, wie bereits von Lane et al. (2002) gezeigt. Im Rahmen der hier vorliegenden Studie können jedoch aufgrund der Verwendung des CGI 2 und PDS-P als Parameter für die Response keine Aussagen zur Negativsymptomatik gemacht werden.

Besonders atypische Antipsychotika haben eine hohe Affinität zum HT_{2C}-Rezeptor (siehe Tabelle 5). Pharmakogenetische Studien, die eine Assoziation zwischen dem HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus und der Therapieresponse untersuchen, wurden mit Clozapin oder Olanzapin als Studienmedikation durchgeführt und zeigten nach ersten signifikanten Ergebnissen durch Sodhi et al. (1995) durchweg negative Resultate (Malhotra et al., 1996a; Rietschel et al., 1997; Masellis et al., 1998; Ellingrod et al. 2002). Das bessere Ansprechen von Patienten mit einem oder zwei Ser-Allelen aus der Untersuchung von Sodhi et al. (1995) konnte somit in anderen Studien nicht bestätigt werden.

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich keine Assoziation zwischen dem HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus und dem Ansprechen auf die antipsychotische Therapie. Das Ergebnis kann jedoch nicht mit den oben genannten verglichen werden, da keine monotherapeutische Studie mit Clozapin bzw. Olanzapin vorliegt. Die diskrepanten Ergebnisse der oben aufgeführten pharmakogenetischen Studien zum HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus können möglicherweise auf die Heterogenität bezüglich der Response-Kriterien, auf die Dauer der antipsychotischen Behandlung, auf die Dauer und den Schweregrad der Erkrankungen oder auf ethnische Unterschiede zurückzuführen sein.

Aufenthaltsdauer

Die Aufenthaltsdauer kann theoretisch Aufschluss über die Schnelligkeit des Ansprechens auf eine

Therapie geben, da Patienten in der Regel möglichst zeitnah nach ihrer Genesung entlassen werden. Im Rahmen einer Langzeitstudie wurde gezeigt, dass eine lange stationäre Aufenthaltsdauer mit einem schlechten Ansprechen auf die Therapie korreliert (Strauss et al., 1972).

Im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchung korrelierte die Länge der Aufenthaltsdauer kaum nennenswert mit dem CGI 2-Wert nach 4 Wochen (bzw. am letzten Tag des stationären Aufenthaltes, wenn die Aufenthaltsdauer < 4 Wochen war) (Spearman $r_s=0,187$; $p=0,027$), und nicht mit der Differenz zwischen dem PDS-P nach 4 Wochen (bzw. am letzten Tag des stationären Aufenthaltes) und dem PDS-P bei der Aufnahme (entspricht Rückgang oder Zunahme der psychotischen Symptomatik) (Spearman $r_s=0,053$; $p=0,598$). Der CGI 2-Wert scheint somit nur ein äußerst schwacher Prädiktor, die Differenz des PDS-P kein Prädiktor für die Länge des stationären Aufenthaltes zu sein.

Zwischen keinem der im Rahmen der hier vorliegenden Studie untersuchten Polymorphismen und der stationären Aufenthaltsdauer zeigte sich eine signifikante Assoziation. Die negativen Resultate zur Aufenthaltsdauer stimmen mit denen zur Response nach CGI 2 und PDS-P überein.

5.2.2.3 Polymorphismen im serotonergen und dopaminergen System und Nebenwirkungen unter einer antipsychotischen Therapie

Antipsychotika sind hochwirksame Arzneimittel zur Behandlung schizophrener Erkrankungen, die allerdings auch erhebliche Nebenwirkungen verursachen können. Diese Nebenwirkungen sind zumindest teilweise ein Ergebnis des Antagonismus der Antipsychotika an verschiedenen peripheren und zentralen Rezeptoren (siehe Tabelle 6). Die Blockade von D2-Rezeptoren im nigrostriatalen System kann zu extrapyramidal-motorischen Störungen führen, die von D2-Rezeptoren im tuberoinfundibulären System zu Prolaktinerhöhung, sexuellen Funktionsstörungen und anderen Nebenwirkungen. Neben der Blockade von D2-Rezeptoren, antagonisieren sowohl typische als auch atypische Antipsychotika adrenerge Rezeptoren, muskarinerge Rezeptoren, histaminerge Rezeptoren und serotonerge Rezeptoren und lösen dadurch bestimmte Nebenwirkungen aus (siehe Tabelle 6).

Polymorphismen im serotonergen und dopaminergen System und Nebenwirkungen im Allgemeinen

Die Nebenwirkungen unter der Therapie mit Antipsychotika wurden im Rahmen der vorliegenden Untersuchung anhand einer abgewandelten Form der DOTES-Skala durch den behandelnden Arzt beurteilt. Dabei konnte der Arzt die Nebenwirkungen eines Patienten aufgrund vorgegebener Nebenwirkungssymptome global beurteilen (siehe auch Kapitel 3.2.1.3).

Zwischen keinem der untersuchten Polymorphismen im dopaminergen System (DRD2 C ins/del Polymorphismus, DRD2 Taq I Polymorphismus, DRD2 Ser311Cys Polymorphismus, DRD3 Ser9Gly Polymorphismus, DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus, DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus, DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus) bzw. im serotonergen System (HT_{2A}

-1438 G/A Polymorphismus, HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus und HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus) und den auftretenden Nebenwirkungen unter einer antipsychotischen Therapie zeigte sich in der hier vorliegenden Studie an 142 Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis keine signifikante Assoziation ($p > 0,05$; Fisher-Exact-Test). Aufgrund einer Genotypisierung der genannten Polymorphismen kann somit keine Vorhersage des Nebenwirkungsrisikos unter einer antipsychotischen Therapie erfolgen.

Bisher wurde die Assoziation zwischen verschiedenen Polymorphismen im dopaminergen und serotonergen System und dem globalen Auftreten von Nebenwirkungen unter einer antipsychotischen Therapie nicht im Rahmen pharmakogenetischer Studien untersucht. Die meisten publizierten Studien waren auf die Auswertung spezieller Nebenwirkungen, wie z. B. extrapyramidalmotorische Nebenwirkungen oder die Gewichtszunahme fokussiert. Da spezifische Nebenwirkungen durch die Blockade spezifischer Rezeptoren verursacht werden (siehe Tabelle 6) scheint es eher sinnvoll, Rezeptorpolymorphismen gezielt auf eine Assoziation mit den durch die entsprechende Rezeptorblockade verursachten Nebenwirkungen zu untersuchen. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde jedoch eine globale Beurteilung der Nebenwirkungen verwendet, da die Auswertung spezifischer Nebenwirkungen zu sehr kleinen Fallzahlen geführt hätte, mit der Folge einer geringen statistischen Aussagekraft.

Eine sehr umfassende Untersuchung des Zusammenhangs zwischen drei Polymorphismen im DRD4 (DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus, dem DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus und dem DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus) und dem Auftreten zahlreicher verschiedener Nebenwirkungen bei mit Clozapin behandelten Patienten wurde von Rietschel et al. (1996) publiziert. Es konnte jedoch keine signifikante Assoziation gezeigt werden. Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erzielten negativen Ergebnisse zu diesen drei Polymorphismen im DRD4 bestätigen somit die Ergebnisse von Rietschel et al. (1996).

Polymorphismen im serotonergen und dopaminergen System und EPS

Polymorphismen im DRD2

Akute EPS (extrapyramidalmotorische Symptome) wie Parkinsonismus, Akathisie und Frühdyskinesien, aber auch die häufig irreversible Spätdyskinesie (tardive Dyskinesie) treten (vor allem unter der Therapie mit hochpotenten typischen Antipsychotika) auf, wenn mindestens 75-80 % der D₂-Rezeptoren im nigrostriatalen dopaminergen System blockiert werden (Kapur, 1998). Sehr selten (bei ca. 0,07-0,5 % der behandelten Patienten) tritt das maligne neuroleptische Syndrom auf, das in 20 % der Fälle zum Tod führt. Etwa 5 % aller behandelten Patienten entwickeln in den ersten 5 Behandlungstagen eine Frühdyskinesie, ca. 20 % innerhalb der ersten 72 Tage ein Parkinsonoid und 25 % innerhalb der ersten 73 Tage eine Akathisie (Forth et al., 2001; S. 345). Da Risikofaktoren, wie Alter, Dauer der Therapie mit Antipsychotika, Dosierung der Antipsychotika, weibliches Geschlecht, Rauchen und andere Faktoren nur in geringem Maße die Variabilität einer Antipsychotika induzierten tardiven Dyskinesie (Spätdyskinesie) erklären können, werden genetische Einflüsse als Ursache für die Variabilität diskutiert (Lerer et al., 2002). Zur

Behandlung von EPS wird in der Klinik der Muskarinrezeptor-Antagonist Biperiden eingesetzt.

In der vorliegenden Studie wurde die Gabe von Biperiden als Surrogatparameter für auftretende EPS bei den 142 Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis ausgewertet. Untersucht wurde die Assoziation zwischen 3 Polymorphismen, die die Expression oder Struktur des D2-Rezeptors beeinflussen (DRD2 Taq I Polymorphismus, DRD2 C ins/del Polymorphismus und DRD2 Ser311Cys Polymorphismus, siehe auch Kapitel 1.4.4), und dem Auftreten von EPS unter der Therapie mit Antipsychotika.

Patienten mit dem A1/A1-Genotyp des DRD2 Taq I Polymorphismus hatten ein deutlich höheres Risiko behandlungsbedürftige EPS (Biperiden-Gabe) unter der Therapie mit Antipsychotika zu entwickeln (37,5 %) als Patienten mit anderen Genotypen (A1/A2-Genotyp: 7,1 %; A2/A2-Genotyp: 12,0 %). Der Unterschied zwischen den drei Genotypgruppen erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p=0,072$; Fisher-Exact-Test). Verglichen mit den beiden anderen Genotypen (10,4 %; der Patienten mit EPS) hatten Träger des A1/A1-Genotyps mehr als 3-mal so häufig (37,5 %) EPS entwickelt ($p=0,055$; Fisher-Exact-Test). Da keine statistische Signifikanz erreicht wurde, bleibt unklar, ob ein Träger des A1/A1-Genotyps mit einem höheren Risiko behaftet ist, EPS unter einer antipsychotischen Therapie zu entwickeln.

Da das A1-Allel zu einer erniedrigten Bindungskapazität führt (Pohjalainen et al., 1998), könnten möglicherweise die für die Auslösung von EPS notwendigen 75-80 % der D2-Rezeptoren in den Basalganglien (Kapur, 1998) leichter blockiert werden. In der vorliegenden Studie hatten nur 8 der 142 Patienten den A1/A1-Genotyp. Vermutlich ist die Patientenzahl insgesamt und damit die statistische Power zu gering, um eine signifikante Assoziation zwischen dem DRD2 Taq I Polymorphismus und Antipsychotika-induzierten EPS aufzuzeigen.

Daten aus der Literatur zeigen übereinstimmend erhöhte Prolaktinspiegel (Mihara et al., 2001, Young et al., 2004) und häufigeres Auftreten des malignen neuroleptischen Syndroms (Suzuki et al., 2001) bei Trägern des niedriger exprimierenden A1-Allels, sowie häufigeres Auftreten von Spätdyskinesien bei Patienten, die homozygot für das A1-Allel sind (Chen et al., 1997). Das im Rahmen der hier vorliegenden Untersuchung erzielte Ergebnis stimmt damit überein. Dagegen konnte in zwei kürzlich veröffentlichten Studien keine Assoziation zwischen dem DRD2 Taq I Polymorphismus und Spätdyskinesien bzw. verschiedenen EPS unter einer Antipsychotika-Therapie festgestellt werden (Segman et al., 2003; Kaiser et al., 2002).

Der DRD2 C ins/del Polymorphismus und der DRD2 Ser311Cys Polymorphismus zeigten in der hier vorliegenden Untersuchung keine Assoziation mit dem Auftreten von EPS. Diese negativen Ergebnisse stützen die Ergebnisse aus der Studie von Segman et al. (2003), Chong et al. (2003) und Kaiser et al. (2002). Es ist nach der gegenwärtigen Datenlage somit eher unwahrscheinlich, dass diese beiden Polymorphismen maßgeblich das Auftreten von EPS unter einer antipsychotischen Therapie beeinflussen.

17 (12,0 %) der 142 Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis bekamen während ihres stationären Aufenthaltes Biperiden verabreicht. Diese Fallzahl ist vermutlich zu klein,

um potentielle Effekte der hier untersuchten Polymorphismen auf die Entwicklung von EPS nachweisen zu können. Besonders bezüglich des DRD2 Taq I Polymorphismus könnten womöglich mit Hilfe größerer Patientenzahlen aussagekräftigere Ergebnisse erzielt werden. Ferner stellt die Verwendung des Surrogatparameters Biperiden eine Fehlerquelle dar. Auf das Auftreten von EPS kann vom Arzt auch mit dem Absetzen des Antipsychotikums, einem Wechsel des Antipsychotikums oder einer Dosisreduktion reagiert worden sein und nicht mit Gabe von Biperiden. Mit Biperiden als Auswertungskriterium werden somit womöglich nicht alle Patienten erfasst, die unter Antipsychotika-induzierten EPS leiden. Die Anwendung spezieller Skalen (z. B. AIMS: Abnormaly Involuntary Movement Scale; EPS: Extrapyrämidal Symptom Scale; oder BARS: Barnes Akathisia Rating Scale) zur Beurteilung von EPS würde die Aussagekraft der Ergebnisse im Vergleich zu Auswertungen mit dem Surrogatparameter Biperiden erhöhen. Eine weitere Limitation der hier vorliegenden Untersuchung stellt die Erfassung von EPS innerhalb der ersten 4 Wochen der stationären Behandlung dar, da Patienten auch häufig erst nach längerer antipsychotischer Behandlung EPS entwickeln, wie z. B. die zum Teil irreversiblen Spätdyskinesien.

DRD3 Ser9Gly Polymorphismus

Neben dem DRD2 scheint auch der DRD3 an der Pathogenese von EPS beteiligt zu sein (Woo et al., 2002). Es wurden bisher zahlreiche pharmakogenetische Studien, die einen Zusammenhang zwischen dem DRD3 Ser9Gly Polymorphismus und dem Auftreten von Spätdyskinesien untersuchten, durchgeführt. In einer Meta-Analyse, in die Daten zu 780 Patienten eingingen, konnten Lerer et al. (2002) zeigen, dass das Auftreten von Spätdyskinesien signifikant mit dem Gly-Allel verknüpft ist. Patienten die homozygot für das Gly-Allel waren hatten signifikant höhere Werte nach AIMS als heterozygote Patienten oder Homozygote für das Ser-Allel. Dem entsprechend konnte von Eichhammer et al. (2000) auch festgestellt werden, dass Patienten, die nicht homozygot für das Gly-Allel waren, eine niedrigere Inzidenz einer akuten Akathisie hatten.

Zur Assoziation zwischen dem DRD3 Ser9Gly Polymorphismus und dem Auftreten von EPS unter einer antipsychotischen Therapie wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Untersuchungen durchgeführt.

Polymorphismen in den HT₂-Rezeptoren

Da vermutet wird, dass eine hohe Affinität zu HT₂-Rezeptoren bei gleichzeitiger DRD2-Blockade eine wichtige Rolle für eine niedrige Inzidenz von EPS spielt (Meltzer et al., 1989), wurde bereits in verschiedenen Studien die Assoziation zwischen dem HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus (bzw. HT_{2A} T102C Polymorphismus) bzw. dem HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus und dem Auftreten von EPS untersucht. Tan et al. (2001) und Segman et al. (2001) konnten zeigen, dass das C-Allel bzw. der C/C-Genotyp des HT_{2A} T102C Polymorphismus mit einem häufigeren Auftreten von Spätdyskinesien verknüpft ist. Da das C-Allel, wie in Kapitel 5.2.2.2 bereits beschrieben, mit einem schlechteren Ansprechen auf eine antipsychotische Therapie assoziiert zu sein scheint, vermuteten die Autoren, dass Patienten mit diesem Allel womöglich mit höheren Antipsychotika-Dosen behandelt werden, was wiederum zu einer erhöhten Inzidenz von EPS führt. Die obigen Ergebnisse

konnten allerdings in zwei weiteren Untersuchungen nicht bestätigt werden (Basile et al., 2001b; Herken et al., 2003). Keine Assoziation konnte bislang zwischen dem HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus und Spätdyskinesien gefunden werden (Basile et al., 2001b; Segman et al., 2001). Die Blockade des HT_{2C}-Rezeptors wird als ein weiterer Mechanismus der zu einer niedrigen Inzidenz von EPS unter der Therapie mit atypischen Antipsychotika führt diskutiert (Segman et al. 2000). Der HT_{2C}-Rezeptor interagiert mit der dopaminergen Neurotransmission in den Basalganglien und durch seine Antagonisierung konnte in Versuchen am Tier eine Reduktion dyskinetischer Bewegungen gezeigt werden (Fox et al., 1988). Der Cys23Ser Polymorphismus im HT_{2C}-Rezeptor wurde bereits hinsichtlich einer Assoziation mit den durch Antipsychotika verursachten EPS untersucht. In einer im Jahr 2000 veröffentlichten Studie (Segman et al., 2000) konnte ein schwacher, aber dennoch signifikanter Einfluss des HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus auf die Entwicklung von orofacialen Dyskinesien unter Therapie mit Antipsychotika gezeigt werden. Patienten mit mindestens einem Ser-Allel hatten signifikant häufiger diese Bewegungsstörungen entwickelt. In einer schrittweisen multiplen Regressionsanalyse konnte ferner gezeigt werden, dass neben dem HT_{2C} Cys23Ser-Polymorphismus der DRD3 Ser9Gly Polymorphismus zum Risiko, orofaciale Dyskinesien zu entwickeln, beiträgt.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde eine Assoziation zwischen den verschiedenen Polymorphismen im HT₂-Rezeptor und auftretenden EPS nicht untersucht. Die bereits oben genannten Ergebnisse zu den Nebenwirkungen im Allgemeinen sind nicht auf EPS übertragbar.

Insgesamt konnten im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit keine neuen Erkenntnisse hinsichtlich der Assoziation zwischen den 3 untersuchten DRD2 Polymorphismen und durch Antipsychotika induzierte EPS gewonnen werden. Besonders zum DRD2 Taq I Polymorphismus sollten weiterführende Studien durchgeführt werden. Nach den gegenwärtigen Daten aus der Literatur scheinen vor allem Polymorphismen im HT₂-Rezeptor-Gen und der DRD3 Ser9Gly Polymorphismus mit dem Risiko assoziiert zu sein, unter einer antipsychotischen Therapie EPS zu entwickeln. EPS scheinen durch komplexe Mechanismen ausgelöst zu werden. Dementsprechend ist es wahrscheinlich, dass das Zusammenspiel verschiedener Polymorphismen, sowie anderer Faktoren, wie Umwelteinflüsse und demographische Faktoren das Auftreten von EPS beeinflussen.

5.2.2.4 Polymorphismen im Cytochrom CYP1A2 und Cyp2C19 und Response bzw. Nebenwirkungen

Ein Paradigma der Pharmakologie besagt, dass die Konzentration eines Arzneistoffes am spezifischen Rezeptor bzw. Target für das Ausmaß der Wirkung, aber auch der möglichen Nebenwirkungen entscheidend ist (Preskorn et al., 1993).

Cytochrome sind am oxidativen Abbau zahlreicher Psychopharmaka beteiligt (siehe Tabelle 7). Hohe Metabolisierungskapazitäten können bei Gabe konventioneller Arzneistoffdosen zu niedrigen Serumspiegeln und verminderter Wirkung führen, niedrige Metabolisierungskapazitäten zu hohen Plasmaspiegeln und verstärkt auftretenden Nebenwirkungen. Im Rahmen dieser pharmako-

genetischen Studie wurde die Assoziation zwischen Polymorphismen im CYP1A2-Gen und CYP2C19-Gen und der Response bzw. den Nebenwirkungen unter einer Therapie mit CYP2C19- bzw. CYP1A2-abhängigen Antidepressiva und Antipsychotika untersucht.

Die Untersuchung der pharmakokinetischen Variabilität war nicht Schwerpunkt dieser Arbeit und soll hier nur kurz dargestellt werden.

CYP2C19

Citalopram und Escitalopram werden hauptsächlich über das CYP2C19 abgebaut (Holmgreen et al., 2004; Bertilsson et al., 1997). Auch für Olanzapin (Scordo et al., 2002), Clozapin (Scordo et al., 2002; Prior et al., 2003) und Moclobemid (Bertilsson et al., 1997; Gram et al., 1995) liegen Daten vor, die eine Beteiligung dieses Enzyms am Abbau der genannten Arzneistoffe stützen (siehe auch Tabelle 58).

Patienten aus der Studienpopulation, die mit diesen CYP2C19 abhängigen Arzneistoffen behandelt wurden (n=160), wurden basierend auf der Anzahl ihrer funktionellen Allele in EM (=extensive metabolizer, 2 funktionelle Allele), IM (=intermediate metabolizer, 1 funktionelles Allel) und PM (=poor metabolizer; kein funktionelles Allel) eingeteilt (nach Steimer et al., 2004; Steimer 2005a; Brockmöller et al., 2000) (siehe auch Kapitel 4.2.9.2). Die Genotypisierung der CYP2C19 *2, *3 und *4 Polymorphismen, die dazu durchgeführt wurde, ermöglicht den Nachweis von ca. 91 % aller defekten Allele in der kaukasischen Bevölkerung (Ferguson et al., 1998).

Zwischen dem Metabolisierungsstatus hinsichtlich des CYP2C19 und der Response bzw. den auftretenden Nebenwirkungen unter der Therapie mit den CYP2C19 abhängigen Arzneistoffen konnte keine Assoziation gezeigt werden. PM (62,5 % Responder) sprachen zwar im Vergleich zu IM (40,0 % Responder) und EM (54,7 % Responder) etwas besser auf die Therapie an, der Unterschied war allerdings nicht statistisch signifikant (p=0,218; Fisher-Exact-Test). Die Anzahl der PM (n=8) war in der Patientenpopulation mit CYP2C19-abhängigen Medikamenten gering (5,1 %), entsprach aber der Häufigkeit von PM in anderen pharmakogenetischen Studien (Ferguson et al., 1998).

Eine Arbeitsgruppe (Grasmäder et al., 2004) konnte kürzlich zeigen, dass bei EM bezüglich der CYP2C19-Metabolisierungskapazität die dosiskorrigierten Plasmaspiegel neuerer Antidepressiva signifikant niedriger waren, als die mittleren dosiskorrigierten Plasmaspiegel für die entsprechenden Antidepressiva bei allen Patienten. Da die neueren Antidepressiva eine große therapeutische Breite haben, beeinflusste die CYP2C19-Metabolisierungskapazität jedoch nicht die Nebenwirkungen oder die Response. Entsprechende Daten zu Antipsychotika liegen in der Literatur nicht vor. Dagegen konnten Steimer et al. (2004 und 2005a) in einer prospektiven, verblindeten Zweicenter-Studie mit einer kombinierten Testung der CYP2C19- und CYP2D6-Metabolisierungskapazität bei Patienten, die mit dem Antidepressivum Amitriptylin therapiert wurden, eine hochsignifikante Korrelation zwischen den Metabolisierungskapazitäten und den Amitriptylin/Nortriptylinspiegeln bzw. den auftretenden Nebenwirkungen nachweisen. Nach Bestätigung in weiteren Studien könnten durch die kombinierte Testung Patienten mit einem niedrigen Risiko für Nebenwirkungen

unter einer Therapie mit Amitriptylin identifiziert werden. Dies würde erheblich zur Sicherheit einer Amitriptylin-Therapie beitragen und könnte möglicherweise zur Individualisierung einer antidepressiven Therapie eingesetzt werden.

CYP1A2

Die in der Studie verabreichten psychotropen Arzneistoffe Clozapin (Scordo et al., 2002; Prior et al., 2003; Zullino et al., 2002), Olanzapin (Scordo et al., 2003; Zullino et al., 2002), Haloperidol (Scordo et al., 2003) und Mirtazapin (Antilla et al., 2001; Störmer et al., 2000) werden über das Cytochrom CYP1A2 zu inaktiven Metaboliten abgebaut (siehe auch Tabelle 58). Der CYP1A2*1F Polymorphismus beeinflusst die Induzierbarkeit des Enzyms durch Tabakrauch (Nakajima et al., 1999, Sachse et al., 1999). Der A/A-Genotyp stellt den hoch induzierbaren Genotyp dar und kann bei Rauchern zu verminderten Blutspiegeln führen. Selbst bei hohen Tagesdosen CYP1A2-abhängiger Arzneistoffe kann es dann bei Vorliegen der hoch-induzierbaren Enzymform zu steady-state Blutspiegeln unterhalb der minimalen therapeutischen Konzentration kommen (Özdemir et al. 2001; Eap et al., 2004).

Bei Patienten aus der Studienpopulation, die mit den oben genannten CYP1A2 abhängigen Medikamenten therapiert wurden (n=188), konnte keine Assoziation zwischen dem CYP1A2*1F Polymorphismus und der Response nach CGI 2 oder den Nebenwirkungen nach DOTES gezeigt werden ($p > 0,05$; Fisher-Exact-Test). Dies trifft sowohl für alle Patienten mit CYP1A2-abhängigen Medikamenten zu, als auch für die Raucher mit CYP1A2-abhängigen Medikamenten (n=82).

Eine mögliche Ursache für das Fehlen einer Korrelation zwischen dem CYP1A2*1F Polymorphismus und der Therapieresponse bzw. den auftretenden Nebenwirkungen könnten weitere, die Induzierbarkeit beeinflussende Polymorphismen im CYP1A2-Gen darstellen. So beschrieben Nakajima et al., (1999) einen Polymorphismus, der bei Vorliegen der Mutation, zu einer signifikanten Verringerung der Induzierbarkeit des CYP1A2 durch Tabakrauch führt. Somit lässt sich nicht alleine aufgrund des CYP1A2*1F Polymorphismus die Induzierbarkeit ableiten.

Die Untersuchungen zu den beiden Polymorphismen weisen methodische Limitationen auf, die die Ergebnisse erheblich beeinflussen können. Die Patienten wurden, den klinischen Erfordernissen entsprechend, mit den notwendigen Medikamenten behandelt. Somit wurden die über die Enzyme CYP2C19 und CYP1A2 abgebauten Arzneistoffe meist mit anderen psychotropen Arzneistoffen kombiniert eingesetzt. Die Response bzw. die aufgetretenen Nebenwirkungen können auch durch die entsprechende „Komedikation“ beeinflusst worden sein. Ferner wurden die Dosierung der Arzneimittel, Körpergewicht, Geschlecht und Alter der Patienten in der Auswertung nicht berücksichtigt. Dies sind alles Faktoren, die die Plasmaspiegel und damit die Response oder die auftretenden Nebenwirkungen beeinflussen können. Eine weitere Limitation der hier vorliegenden Untersuchungen ist die Tatsache, dass die oben genannten Arzneistoffe, die in die Auswertung eingingen, auch durch weitere Enzyme, wie z.B. CYP2D6 und CYP3A4 metabolisiert werden und der Abbau auch noch durch die gleichzeitige Gabe von Enzyminduktoren und Enzyminhibitoren

beeinflusst werden kann. Der Einfluss eines einzelnen Cytochroms kann dadurch überlagert werden. Polymorphismen in Cytochromen oder anderen Enzymen sollen sich nach Literaturangaben erst dann relevant auf die Verstoffwechslung auswirken, wenn mindestens 30 Prozent der Dosis eines Medikaments durch das entsprechende Enzym metabolisiert wird (Schwab et al., 2002). Für die oben dargestellten Arzneistoffe sprechen zwar die Literaturdaten für eine Beteiligung des CYP2C19 bzw. CYP1A2 am Abbau, jedoch liegen keine Daten zum genauen prozentualen Anteil der Enzyme an der Verstoffwechslung vor.

Weiterführende Studien, mit adäquatem Studiendesign sind notwendig, um den Einfluss der Metabolisierungskapazität der Cytochrome CYP2C19 und CYP1A2 auf eine Therapie mit Antidepressiva oder Antipsychotika genauer zu evaluieren.

5.2.3 Besonderheiten sowie Limitationen der Studie und Ausblick

Bei der hier vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive, in Bezug auf den Genotyp doppelblind angelegte Diagnostikstudie. Es wurden alle Patienten eingeschlossen, die in die Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar zur Behandlung eingewiesen wurden und bestimmte Einschlusskriterien erfüllten (siehe Kapitel 3.2.1). Dadurch ergibt sich eine „natürliche“ Patientenpopulation, die allerdings hinsichtlich demographischer Daten (siehe Kapitel 4.2.2), den Krankheitsdiagnosen (siehe Tabelle 41), sowie der Medikation (siehe Abbildung 29 und Tabelle 42, sowie Abbildung 34 und Tabelle 51) sehr heterogen ist. Ergebnisse, die in einer solchen „natürlichen“ Patientenpopulation erzielt werden, könnten womöglich von besonderer Bedeutung sein, weil sie gerade auch unter klinischen Bedingungen zutreffen könnten. Im Gegensatz dazu sind Ergebnisse aus Untersuchungen an einer bestimmten, streng definierten Patientenpopulation oft nicht auf den klinischen Alltag übertragbar, oder strenggenommen nur auf solche Patienten, die die selben Kriterien erfüllen, wie die entsprechende Studienpopulation.

Dennoch wird immer wieder gefordert, durch Standards für pharmakogenetische Studien, möglichst viele Störgrößen (Confounder) auszuschalten (Rietschel et al., 1999). Durch eine Standardisierung könnten verschiedene Studien wesentlich besser miteinander verglichen werden und durch die Ausschaltung von Störgrößen die tatsächliche Assoziation der untersuchten Polymorphismen mit der Zielgröße (z. B. Response oder Nebenwirkungen) deutlicher dargestellt werden. Dies scheint vor allem vor dem Hintergrund sinnvoll, dass die zahlreichen bisher durchgeführten pharmakogenetischen Studien konträre (möglicherweise durch die Studienheterogenität bedingt) und oft negative Ergebnisse erzielten.

Im Rahmen der hier vorliegenden Studie wurden in jeder der untersuchten Subpopulationen die Störgrößen Geschlecht, Alter oder Schwere der Erkrankung zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie untersucht. Da jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der 3 Störgrößen zwischen den Genotypgruppen eines jeden einzelnen Polymorphismus nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass die erzielten Studienergebnisse davon nicht wesentlich beeinflusst werden.

Weiterhin wurden die in den Subpopulationen vorliegenden Genotypfrequenzen mit denen aus bereits publizierten Untersuchungen verglichen. Bei biallelischen Polymorphismen wurde das Vorliegen des genetischen Gleichgewichts nach Hardy-Weinberg überprüft. Da es keine signifikanten Abweichungen vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht gab und die in den Subpopulationen festgestellten Allel- bzw. Genotypfrequenzen denen aus bisherigen Studien entsprachen, kann davon ausgegangen werden, dass die im Rahmen der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse nicht durch Selektion bestimmter Genotypen bedingt sind.

Viele der hier erzielten Ergebnisse waren negativ und entsprachen damit oft den Ergebnissen aus bisherigen pharmakogenetischen Studien. Möglicherweise war aber auch die Power der hier vorliegenden Untersuchung teilweise nicht ausreichend, um kleine Effekte eines einzelnen Polymorphismus nachweisen zu können. Eine Power-Analyse wurde vor dem Start der Studie nicht durchgeführt, da keine Effektgröße bekannt war (Unterschiede in der Response bzw. den auftretenden Nebenwirkungen zwischen den einzelnen Genotypen in einer natürlichen psychiatrischen Population sind bisher unbekannt) und unterschiedliche Stichprobengrößen für jeden der untersuchten Polymorphismen notwendig gewesen wären. Eine retrospektive Power-Analyse wird in der Literatur kritisch gesehen (Thomas, 1997). Die hier vorliegende Untersuchung kann als Pilotstudie dienen und möglicherweise für weiterführende Studien zur Power-Analyse herangezogen werden (Effektgrößenabschätzung).

Die aus der Studie resultierenden Ergebnisse sollten als vorläufig betrachtet werden, die in weiteren Studien bestätigt werden müssen. Da keine Bonferroni-Korrektur aufgrund multipler Testung durchgeführt wurde haben die Ergebnisse streng genommen explorativen Charakter.

Da Antidepressiva und vor allem Antipsychotika komplexe Rezeptorbindungsprofile oder mehrere Targets haben, liegt es nahe, dass eher viele Polymorphismen (aus Strukturen der Pharmakodynamik und Pharmakokinetik) zusammen das Ansprechen auf die Therapie und die auftretenden Nebenwirkungen beeinflussen. Arranz et al. (2000) publizierten bisher den umfassendsten Versuch eines pharmakogenetischen Screenings von Rezeptorpolymorphismen. Eine Kombination von 6 der 19 untersuchten Polymorphismen konnte mit einem positiven Vorhersagewert von 76,9 % (95,9 % Sensitivität, 38,3 % Spezifität) die Wirksamkeit einer Therapie mit Clozapin vorhersagen. Allerdings scheiterte der Versuch einer anderen Gruppe das Ergebnis zu bestätigen (Schumacher et al., 2000). Weitere Studien sind hier notwendig um Klarheit zu schaffen.

Da sowohl die antidepressive als auch die antipsychotische Wirkung der Antidepressiva und Antipsychotika nicht zeitgleich mit der Rezeptorblockade, sondern mit deutlicher Latenz einsetzt, scheinen an der Wirkung dieser Psychopharmaka auch sekundäre Signaltransduktionsmechanismen und Veränderungen der Genexpression beteiligt zu sein (Altar, 1999). Strukturen aus diesen Systemen, bzw. Polymorphismen in den entsprechenden Genen, stellen neue „Kandidaten“ für Assoziationsstudien dar (Kandidatengen-Ansatz).

Der potentielle klinische Nutzen einer genetisch determinierten Individualisierung der Arzneimitteltherapie ist sehr groß. Durch eine individualisierte Psychopharmakotherapie könnten

erhebliche Fortschritte in der Behandlung depressiver und schizophrener Patienten erzielt werden. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt scheint es jedoch eher unwahrscheinlich, dass in naher Zukunft, auf Basis der bekannten genetischen Daten eines Patienten, eine maßgeschneiderte Pharmakotherapie möglich ist.

6 Zusammenfassung

Die Behandlung von depressiven Erkrankungen und Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis wird in der Zukunft eine der größten Herausforderungen für das Gesundheitswesen darstellen. Etwa 1 % der Bevölkerung leidet an einer schizophrenen Psychose und Prognosen zufolge wird die schwere Depression (Major Depression) bis zum Jahr 2020 den 2. Rang nach der ischämischen Herzerkrankung in der DALY-Statistik (verlorene Lebensjahre durch schwerwiegende Behinderung oder Tod) einnehmen. Die Pharmakotherapie stellt einen Eckpfeiler für die Behandlung der oben genannten psychiatrischen Erkrankungen dar. Allerdings sprechen etwa 30-50 % aller Patienten mit affektiven oder schizophrenen Erkrankungen nicht oder nur ungenügend auf ihre primäre Pharmakotherapie an, oder leiden an zum Teil schwerwiegenden Nebenwirkungen. Es wird geschätzt, dass etwa 20-95 % der Variabilität der Arzneimittelwirkungen und Nebenwirkungen durch Variation in den Genen verursacht wird. Große Erwartungen werden in das relativ junge Forschungsfeld der Pharmakogenetik gesetzt, das sich mit dem Einfluss genetischer Variabilität auf die Pharmakotherapie beschäftigt. Neue Genotypisierungsmethoden und die Zunahme der Kenntnisse auf dem Gebiet der Pharmakogenetik könnten es in Zukunft realisierbar machen, nach Genotypisierung der Patienten vor ihrer initialen Therapie die individuell effektivsten Arzneimittel mit den geringsten Nebenwirkungen auszuwählen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine prospektive, in Bezug auf den Genotyp doppelblind angelegte Studie durchgeführt, um die Assoziation zwischen insgesamt 18 Polymorphismen in Kandidatengenen und der Effektivität bzw. Sicherheit einer Therapie mit Antidepressiva und Antipsychotika zu untersuchen.

Dazu wurden auf Fluoreszenz basierende Genotypisierungsmethoden am LightCycler neu entwickelt und bereits publizierte konventionelle Methoden am Thermocycler optimiert. Durch die Methoden ist eine schnelle, zuverlässige und spezifische Bestimmung pharmakogenetisch relevanter Polymorphismen möglich. Die Methoden am LightCycler haben gegenüber konventionellen Methoden den Vorteil einer geringeren Kontaminationsgefahr, da keine zusätzlichen Arbeitsschritte wie Restriktionsverdau oder Gelelektrophorese notwendig sind. Toxische Reagenzien wie Ethidiumbromid oder Acrylamid zur Sichtbarmachung von Gelbanden bzw. zur Gelherstellung können vermieden werden. Die Methoden am LightCycler sind schnell in der Durchführung, erlauben also einen hohen Probendurchsatz bei relativ geringem Zeitaufwand. Sie eignen sich für die Durchführung größerer epidemiologischer Studien, aber auch für den Einsatz in der klinischen Routinediagnostik, da aufgrund der kurzen Durchführungszeit eine schnelle klinische Intervention, basierend auf den Genotypisierungsergebnissen, erfolgen könnte.

Sowohl bei den depressiven Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden, insgesamt, als auch bei den depressiven Patienten, die mit Mirtazapin oder mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden, zeigte sich zwischen keinem der untersuchten Polymorphismen im serotonergen System (HTTLPR Polymorphismus, HTT-VNTR Polymorphismus, HT_{2A}

-1438 G/A Polymorphismus bzw. HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus) und dem Ansprechen (CGI 2, PDS-D) auf die antidepressive Therapie eine signifikante Assoziation. Ebenso konnte zwischen keinem der untersuchten Polymorphismen im dopaminergen System (DRD2 C ins/del Polymorphismus, DRD2 Taq I Polymorphismus, DRD2 Ser311Cys Polymorphismus, DRD3 Ser9Gly Polymorphismus, DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus, DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus, DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus) bzw. im serotonergen System (HT_{2A} -1438 G/A Polymorphismus, HT_{2A} His452Tyr Polymorphismus und HT_{2C} Cys23Ser Polymorphismus) und dem Ansprechen auf die antipsychotische Therapie bzw. den Nebenwirkungen unter der antipsychotischen Therapie in der Population der Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis eine signifikante Assoziation gefunden werden. Aus dem genetischen Status bezüglich der oben genannten Polymorphismen lässt sich somit kein für klinische Zwecke hinreichender Prädiktor für die Wirksamkeit von Antidepressiva, sowie kein hinreichender Prädiktor für die Wirksamkeit und Sicherheit von Antipsychotika ableiten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die Assoziation zwischen der Metabolisierungskapazität des CYP2C19 sowie die Assoziation zwischen dem CYP1A2*1F Polymorphismus und der Wirksamkeit und Sicherheit einer Therapie mit Antidepressiva bzw. Antipsychotika, die über diese Enzyme abgebaut werden, untersucht. Sowohl die Ergebnisse zur CYP2C19 Metabolisierungskapazität, als auch zum CYP1A2*1F Polymorphismus waren negativ. Die Untersuchungen zu den beiden Cytochromen wiesen jedoch methodische Limitationen auf, die die Ergebnisse erheblich beeinflussen können. Weiterführende, monotherapeutische Studien mit festen Dosierschemata sollten durchgeführt werden, in denen der kombinierte Einfluss aller am Abbau der entsprechenden Arzneistoffe beteiligten Enzyme untersucht wird. Die zur Genotypisierung der CYP2C19 Polymorphismen und des CYP1A2*1F Polymorphismus am LightCycler etablierten Methoden sind bestens für eine schnelle, spezifische und effiziente Genotypisierung im Rahmen großer pharmakogenetischer Untersuchungen geeignet.

49 der 142 Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis wurden innerhalb der ersten 4 Wochen der stationären Behandlung mit Olanzapin therapiert. Olanzapin hat eine relativ hohe Affinität zum D3-Rezeptor, dem HT_{2A}-Rezeptor und ist ein Substrat des P-Glykoproteins, das durch das MDR1-Gen codiert wird. Zwischen drei Polymorphismen in diesen Strukturen (DRD3 Ser9Gly Polymorphismus, HT_{2A} -1438G/A Polymorphismus und MDR1 C3435T Polymorphismus) und dem Ansprechen auf die Therapie mit Olanzapin konnte eine signifikante Assoziation gezeigt werden. Die Assoziationen waren jedoch bezüglich beider Auswertungskriterien (Response nach CGI 2 und PDS-P) nicht konsistent. Die Ergebnisse sind mit großer Vorsicht zu interpretieren und müssen in weiteren Studien überprüft bzw. bestätigt werden.

Unter der Behandlung mit Antipsychotika kann es zu sogenannten extrapyramidalmotorischen Symptomen (EPS), wie Parkinsonismus, Akathisie oder Spätdyskinesien kommen. Da eine Blockade von D2-Rezeptoren im nigrostriatalen System für diese Nebenwirkungen verantwortlich gemacht wird, wurde die Assoziation zwischen drei Polymorphismen im D2-Rezeptorgen (DRD2

Taq I Polymorphismus, DRD2 C ins/del Polymorphismus und DRD2 Ser311Cys Polymorphismus) und den auftretenden EPS unter der Therapie mit Antipsychotika bei Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis untersucht. Ausgewertet wurde dabei die Gabe von Biperiden, einem Muscarinrezeptor-Antagonisten, der zur Behandlung von EPS eingesetzt wird. Lediglich der DRD2 Taq I Polymorphismus zeigte einen Trend ($p < 0,1$) bezüglich einer Assoziation mit den aufgetretenen EPS. Patienten mit dem schwächer exprimierenden A1/A1-Genotyp hatten mehr als 3-mal häufiger behandlungsbedürftige EPS als andere. Dies ist plausibel, da durch die geringere Expression bei Vorliegen des A1/A1-Genotyps leichter 75-80 % der D2-Rezeptoren in den Basalganglien blockiert werden können, die zur Auslösung von EPS notwendig sind. Das Ergebnis stimmt auch mit bisher publizierten Daten überein und sollte in weiterführenden Studien bestätigt werden. Da nur 8 Patienten den A1/A1-Genotyp hatten, war die hier untersuchte Population vermutlich zu klein um eine signifikante Assoziation aufzuzeigen.

Eine signifikante Assoziation in der Population der Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis konnte zwischen dem DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und der Gewichtszunahme bzw. der Zunahme des BMI unter der antipsychotischen Therapie nachgewiesen werden. Patienten mit mindestens einem L-Allel hatten eine signifikant stärkere Zunahme des BMI nach 4-wöchiger antipsychotischer Behandlung als andere. Das Ergebnis blieb in einer Subgruppenauswertung für Männer signifikant, nicht jedoch in der Auswertung der weiblichen Patienten, wobei Patientinnen mit mindestens einem L-Allel ebenso eine größere Zunahme des BMI nach 4-wöchiger Antipsychotika-Therapie zeigten als andere Patientinnen. Der Unterschied zwischen den Geschlechtern könnte möglicherweise auf hormonelle Unterschiede zurückzuführen sein. Die hier vorliegende Studie ist die erste pharmakogenetische Studie, in der eine signifikante Assoziation zwischen einem Polymorphismus im dopaminergen System und der Antipsychotika-induzierten Gewichtszunahme gezeigt werden konnte. Da das dopaminerge System bei der Entstehung von Übergewicht eine Rolle spielt, Antipsychotika den DRD4 blockieren und unter einer Antipsychotika-Therapie deutliche Gewichtszunahmen beobachtet werden, ist das Resultat plausibel und könnte für die zukünftige Therapie mit Antipsychotika eine erhebliche Rolle spielen. Weitere Studien sind jedoch notwendig um das Ergebnis zu verifizieren.

Ein Ergebnis, dass nach Bestätigung in weiterführenden Studien die Therapie mit Antidepressiva erheblich beeinflussen könnte, wurde in der Studienpopulation der depressiven Patienten erzielt. Bei Patienten, die vorwiegend mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden, konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem HTTLPR Polymorphismus bzw. dem HTT-VNTR Polymorphismus und den auftretenden Nebenwirkungen gezeigt werden. Basierend auf den funktionellen Auswirkungen (Expressionsbeeinflussung) dieser beiden Polymorphismen wurden HTT-Risiko-Gruppen definiert (Gruppen mit hohem, mittlerem und niedrigem Risiko für Nebenwirkungen). Es zeigte sich eine starke Korrelation zwischen den definierten Risikogruppen und der Prävalenz von Nebenwirkungen, wenn Patienten mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden. Keine Assoziation zwischen dem HTTLPR Polymorphismus bzw. dem HTT-

VNTR Polymorphismus und Nebenwirkungen konnte jedoch bei Patienten, die mit Mirtazapin behandelt wurden, gefunden werden. Dem entsprechend zeigte sich auch keine Korrelation zwischen den definierten Risikogruppen und der Prävalenz von Nebenwirkungen in dieser Patientenpopulation. Der besondere Wirkmechanismus von Mirtazapin (Mirtazapin blockiert nicht den HTT) kann einer der Gründe für die negativen Ergebnisse sein. Die Resultate bestätigen und erweitern die Ergebnisse aus einer anderen pharmakogenetischen Studie, in der eine Assoziation zwischen dem HTTLPR Polymorphismus und nebenwirkungsbedingten Therapieabbrüchen bei mit Paroxetin behandelten Patienten, nicht jedoch bei mit Mirtazapin behandelten Patienten, nachgewiesen werden konnte.

Insgesamt konnten im Rahmen der hier vorliegenden Studie zwischen einigen der untersuchten Polymorphismen und dem klinischen Erfolg der Arzneimitteltherapie oder dem Nebenwirkungsrisiko neue, bisher nicht beschriebene und teilweise hoch signifikante Assoziationen gezeigt werden. Nach Bestätigung der Resultate in weiteren Studien könnten diese Erkenntnisse womöglich zur Optimierung einer Psychopharmakotherapie eingesetzt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit können somit als Teil eines pharmakogenetischen Puzzles angesehen werden, das durch weitere Untersuchungen vervollständigt werden muss, um in Zukunft eine individualisierte, dem Genotyp-Status angepasste Psychopharmakotherapie zu ermöglichen.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Genetische Beeinflussung der Pharmakotherapie	18
Abbildung 2:	Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Bestimmung des Genotyps	35
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Ablaufs einer PCR	37
Abbildung 4:	Schematische Darstellung des FRET-Prozesses.....	40
Abbildung 5:	Schmelzkurven zur Darstellung des CYP1A2*1F Polymorphismus.....	71
Abbildung 6:	Gelelektrophorese zur Darstellung des CYP1A2*1F Polymorphismus.....	71
Abbildung 7:	Schmelzkurven zur Darstellung des CYP2C19 *2, *3 und *4 Polymorphismus.....	73
Abbildung 8:	Gelelektrophorese zur Darstellung des CYP2C19*2 Polymorphismus.....	74
Abbildung 9:	Gelelektrophorese zur Darstellung des CYP2C19*3 Polymorphismus.....	74
Abbildung 10:	Gelelektrophorese zur Darstellung des CYP2C19*4 Polymorphismus.....	74
Abbildung 11:	Schmelzkurven zur Darstellung des CYP2D6*9 Polymorphismus.....	75
Abbildung 12:	Schmelzkurven zur Darstellung des DRD3 Ser9Gly Polymorphismus	76
Abbildung 13:	Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD3 Ser9Gly Polymorphismus.	76
Abbildung 14:	Schmelzkurven zur Darstellung des HT _{2A} -1438 G/A und HT _{2A} His452Tyr Polymorphismus	78
Abbildung 15:	Gelelektrophorese zur Darstellung des HT _{2A} -1438 G/A Polymorphismus	79
Abbildung 16:	Gelelektrophorese zur Darstellung des HT _{2A} His452Tyr Polymorphismus.	79
Abbildung 17:	Schmelzkurven zur Darstellung des MDR1 C3435T Polymorphismus	80
Abbildung 18:	Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD2 -141C Ins/Del Polymorphismus....	81
Abbildung 19:	Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD2 TaqI Polymorphismus	82
Abbildung 20:	Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD2 Ser311Cys Polymorphismus.....	82
Abbildung 21:	Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD4 12 bp Wiederholungs- polymorphismus.....	84
Abbildung 22:	Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD4 48 bp Wiederholungs- polymorphismus.....	84
Abbildung 23:	Gelelektrophorese zur Darstellung des DRD4 13 bp Deletionspolymorphismus...	85
Abbildung 24:	Gelelektrophorese zur Darstellung des HT _{2C} Cys23Ser Polymorphismus.....	87
Abbildung 25:	Gelelektrophorese zur Darstellung des HTTLPR Polymorphismus	88
Abbildung 26:	Gelelektrophorese zur Darstellung des HTT-VNTR Polymorphismus	88
Abbildung 27:	Diagnosen nach ICD-10	90
Abbildung 28:	Die untersuchten Patientenpopulationen.....	91
Abbildung 29:	Antidepressive Medikation der Patienten mit depressiver Episode.....	92
Abbildung 30:	HTT-VNTR Genotyp und Prävalenz von Nebenwirkungen bei Patienten mit depressiver Episode	97

Abbildung 31: HTT-Risiko-Gruppe und Prävalenz von Nebenwirkungen bei Patienten mit depressiver Episode	98
Abbildung 32: HTT-VNTR und HTTLPR Polymorphismus und Prävalenz von Nebenwirkungen bei Patienten die mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden	101
Abbildung 33: HTT-Risiko-Gruppe und Prävalenz von Nebenwirkungen bei Patienten die mit HTT-blockierenden Antidepressiva oder mit Mirtazapin behandelt wurden	102
Abbildung 34: Antipsychotische Medikation der Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis	105
Abbildung 35: DRD2 TaqI Polymorphismus und Auftreten von EPS die mit Biperiden behandelt wurden	109
Abbildung 36: DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und Zunahme des BMI	113
Abbildung 37: Anwendungshäufigkeit der verschiedenen Antipsychotika in den beiden Genotypgruppen des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus	114
Abbildung 38: DRD3 Ser9Gly Polymorphismus und Olanzapin-Response	116
Abbildung 39: HT _{2A} -1438 G/A Polymorphismus und Olanzapin-Response	117
Abbildung 40: MDR1 C3435T Polymorphismus und Olanzapin-Response	118
Abbildung 41: CYP1A2*1F Polymorphismus und Nebenwirkungen	121

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nebenwirkungen durch Blockade verschiedener Rezeptoren	11
Tabelle 2: Typische Symptome bei der Hemmung der Rückaufnahme von 5-HT und NA	11
Tabelle 3: Schizophrene Positiv- und Negativsymptomatik	14
Tabelle 4: Dopaminerge Systeme	16
Tabelle 5: Inhibitionskonstanten von atypischen Antipsychotika und Haloperidol	16
Tabelle 6: Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Antipsychotika	17
Tabelle 7: Substrate des CYP1A2 und CYP2C19	26
Tabelle 8: Reagenzien	30
Tabelle 9: Primer und Hybridisierungssonden	30
Tabelle 10: Polymerasen, Restriktionsenzyme und Puffer	30
Tabelle 11: Geräte und Laborausrüstung	31
Tabelle 12: Verwendete Restriktionsenzyme	40
Tabelle 13: Verwendete Primer	44
Tabelle 14: Verwendete Sonden	47
Tabelle 15: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des CYP1A2 *1F Polymorphismus	50
Tabelle 16: Stammlösung für den enzymatischen Verdau mit BstN I	51

Tabelle 17: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des CYP2C19*2 Polymorphismus	52
Tabelle 18: Stammlösung für den enzymatischen Verdau mit Hinf I.....	53
Tabelle 19: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des CYP2C19*4 Polymorphismus	54
Tabelle 20: Stammlösung für den enzymatischen Verdau mit Pst I.....	55
Tabelle 21: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des CYP2D6*9 Polymorphismus	56
Tabelle 22: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des DRD2 -141C Ins/Del Polymorphismus	57
Tabelle 23: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des DRD2 TaqI Polymorphismus	59
Tabelle 24: Stammlösung für den enzymatischen Verdau mit TaqI.....	59
Tabelle 25: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des Ser-Allels des DRD2 Ser311Cys Polymorphismus.....	60
Tabelle 26: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des DRD3 Ser9Gly Polymorphismus	61
Tabelle 27: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des DRD4 12 bp Wiederholungspolymorphismus.....	62
Tabelle 28: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus.....	63
Tabelle 29: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des HT _{2A} -1438 G/A Polymorphismus	65
Tabelle 30: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des HT _{2A} His452Tyr Polymorphismus	66
Tabelle 31: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des HT _{2C} Cys23Ser Polymorphismus	67
Tabelle 32: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des HTTLPR Polymorphismus	68
Tabelle 33: Stammlösung für die PCR am Thermocycler zum Nachweis des HTT-VNTR Polymorphismus	69
Tabelle 34: Stammlösung für die PCR am LightCycler zum Nachweis des MDR1 C3435T Polymorphismus	70
Tabelle 35: Schmelzkurvenmaxima der verschiedenen CYP2C19 Allele	72
Tabelle 36: Länge der Restriktionsfragmente aus dem enzymatischen Verdau zum Nachweis der CYP2C19 Polymorphismen.....	74
Tabelle 37: Schmelzkurvenmaxima der Allele des HT _{2A} -1438 G/A und HT _{2A} His452Tyr Polymorphismus	77

Tabelle 38: Länge der Restriktionsfragmente aus dem enzymatischen Verdau zum Nachweis des HT _{2A} –1438 G/A und HT _{2A} His452Tyr Polymorphismus	78
Tabelle 39: Länge der Restriktionsfragmente aus dem enzymatischen Verdau zum Nachweis des DRD2 –141C ins/del und DRD2 TaqI Polymorphismus	81
Tabelle 40: Länge der Restriktionsfragmente aus dem enzymatischen Verdau zum Nachweis des DRD4 48bp und DRD4 12bp Wiederholungspolymorphismus, sowie des DRD4 13bp Deletionspolymorphismus.....	83
Tabelle 41: Übersicht über die ICD-10 Diagnosen in der gesamten Studienpopulation	90
Tabelle 42: Psychotrope Komedikation der Patienten mit depressiver Episode	93
Tabelle 43: Aufenthaltsdauer der Patienten mit depressiver Episode und Genotyp.....	94
Tabelle 44: CGI 2 Response bei Patienten mit depressiver Episode und Genotyp.....	95
Tabelle 45: PDS-D Response bei Patienten mit depressiver Episode und Genotyp	96
Tabelle 46: Nebenwirkungen bei Patienten mit depressiver Episode und Genotyp	97
Tabelle 47: HTT-Risiko-Gruppen.....	98
Tabelle 48: Ansprechen auf die Therapie mit HTT-blockierenden Antidepressiva nach PDS-D und Genotyp	100
Tabelle 49: Ansprechen auf die Therapie mit HTT-blockierenden Antidepressiva nach CGI 2 und Genotyp	100
Tabelle 50: Nebenwirkungen unter der Therapie mit HTT-blockierenden Antidepressiva und Genotyp.....	101
Tabelle 51: Psychotrope Komedikation der Patienten mit Erkrankungen aus dem schizo phrenen Formenkreis.....	105
Tabelle 52: Extrapiramidalmotorische Symptome und Polymorphismen im DRD2	110
Tabelle 53: Antipsychotische Medikation der 102 Patienten innerhalb der ersten 4 Wochen	111
Tabelle 54: Genotypen des DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und Gruppenzuordnung	112
Tabelle 55: DRD4 48 bp Wiederholungspolymorphismus und BMI	113
Tabelle 56: Patientencharakteristiken der Patienten aus den beiden Genotyp-Gruppen	115
Tabelle 57: HT _{2C} Cys23Ser Polymorphismus und BMI	115
Tabelle 58: Antidepressiva und Antipsychotika, die über CYP1A2 und/oder CYP2C19 verstoffwechselt werden.	120
Tabelle 59: CYP1A2*1F Polymorphismus und Response bzw. Nebenwirkungen.....	121
Tabelle 60: CYP2C19 Metabolisierungskapazität und Response bzw. Nebenwirkungen	123
Tabelle 61: Geschlecht, Alter und CGI 1 zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme bei Patienten mit depressiver Episode und Genotyp.....	206
Tabelle 62: Geschlecht, Alter und CGI 1 zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme bei Patienten die mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden und Genotyp	206

Tabelle 63: PDS-D Response bei den mit Mirtazapin behandelten depressiven Patienten und Genotyp	207
Tabelle 64: CGI 2 Response bei den mit Mirtazapin behandelten depressiven Patienten und Genotyp.....	207
Tabelle 65: Nebenwirkungen bei den mit Mirtazapin behandelten depressiven Patienten und Genotyp.....	208
Tabelle 66: Geschlecht, Alter und CGI 1 zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme bei den mit Mirtazapin behandelten depressiven Patienten und Genotyp	208
Tabelle 67: Aufenthaltsdauer der Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis und Genotyp	209
Tabelle 68: PDS-P Response bei den Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis und Genotyp	210
Tabelle 69: CGI 2 Response bei den Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis und Genotyp	211
Tabelle 70: Nebenwirkungen bei den Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis und Genotyp	211
Tabelle 71: Geschlecht, Alter und CGI 1 zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme bei Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis und Genotyp	212
Tabelle 72: Anteil der Raucher, Geschlecht, Alter und CGI 1 zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme bei Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis, die mit Olanzapin behandelt wurden und Genotyp.....	214

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Acc.No.	Accession Number
AIMS	Abnormal Involuntary Movement Scale
Ala	Alanin
Anch	Anchorsonde
Bbv	Bacillus brevis
BDNF	Brain Derived Neurotropic Factor
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
Bsr	Bacillus stearothermophilus
C	Cytosin
CI	Konfidenzintervall

CGI	Clinical Global Impression
CHO	Chinesische Hamster Ovarial (Zellen)
CREB	Cyclo-AMP Responsive Element Binding protein
CYP1A2	Cytochrom P450 1A2
CYP2C19	Cytochrom P450 2C19
CYP2D6	Cytochrom P450 2D6
Cys	Cystein
°C	Grad Celsius
DALY	Disability Adjusted Life Years, verlorene Lebensjahre durch schwerwiegende Behinderung oder Tod
Del	Deletion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotid triphosphat
DOTES	Dosage Record and Treatment Emergent Symptom Scale
DRD2	D2-Rezeptor
DRD3	D3-Rezeptor
DRD4	D4-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Extensive Metabolizer
EPS	Extrapyramidalmotorische Symptome
F2	Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis nach ICD-10
F3	Affektive Erkrankungen nach ICD-10
Fx	Andere psychische- oder Verhaltensstörungen nach ICD-10
FRET	Fluoreszenz Energy Transfer
G	Guanin
Gly	Glycin
H	Histamin
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
Hae	Haemophilus aegypticus
Het	Heterozygot
HHN	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse
His	Histidin
5-HT/HT	5-Hydroxy-Tryptamin; Serotonin
HTT	Serotonintransporter
HTTLPR	Serotonintransporter Length Polymorphic Region
HTT-VNTR	Serotonin Transporter Variable Number of Tandem Repeats
ICD	International statistical Classification of Diseases and related health problems

IM	Intermediate Metabolizer
kbp	Kilobasenpaare
Ins	Insertion
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
K_i	Inhibitionskonstante
LC	LightCycler
LK	Leerkontrolle
LOCF	Last Observation Carried Forward
LSD	Lysergsäurediethylamid
M	Muskarin
m	männlich
MAO	Monoaminoxidase
MDR	Multi Drug Resistance
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Msp	Moraxella species
MT	Mutiertes Allel
m/V	Masse pro Volumen
μ l	Mikroliter
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NW(s)	Nebenwirkung(en)
nmol/l	Nanomol pro Liter
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-S	Paranoid-Depressivitäts-Skala
PDS-P	Paranoid-Depressivitäts-Skala, Paranoid-Skala
PDS-D	Paranoid-Depressivitäts-Skala, Depressivitäts-Skala
PM	Poor metabolizer
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
r_s	Spearman Korrelationskoeffizient
s	Sekunde

Sens	Sensorsonde
Ser	Serin
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SNRI	Selective Noradrenalin Reuptake Inhibitor
SSNRI	Selective Serotonin Noradrenalin Reuptake Inhibitor
SSRI	Selective Serotonin Reuptake Inhibitor
T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCA	Trizyklisches Antidepressivum
T _m	Schmelztemperatur
Tyr	Tyrosin
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
UV	Ultraviolett
V	Volt
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
w	Weiblich
Wdh	Wiederholung
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp Allel
ZNS	Zentralnervensystem

10 Literaturverzeichnis

- Allison DB, Mentore JL, Heo M, Chander LP, Cappelleri JC, Infante M, et al. Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 1686-96.
- Altar CA. Neurotrophins and depression. *TiPS* 1999; 20: 59-61.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-10.
- Benkert O, Hippus H, Anghelescu I, Davis E, Gründer G, Lange-Aschfeldt C, et al. Kompendium der Psychiatrischen Pharmakotherapie. 2. überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2000.
- Anttila SA, Leinonen EV. A review of the pharmacological and clinical profile of mirtazapine. *CNS Drug Rev* 2001; 72: 49-64.
- Arias B, Catalan R, Gasto R, Imaz ML, Gutierrez B, Pintor L. Genetic variability in the promotor region of the serotonin transporter gene is associated with clinical remission of major depression after long term treatment with citalopram. *World J Biol Psychiatry* 2001; 29 [Abstract].
- Arinami T, Gao M, Toru H, Toru M. A functional polymorphism in the promotor region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 577-82.
- Arndt JT, Skarsfeldt T. Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? *Neuropsychopharmacology* 1998; 18: 63-101.
- Arranz MJ, Collier DA, Monsheer S, Ball D, Roberts G, Price J, et al. Association between clozapine response and allelic variation in 5-HT_{2A} receptor gene. *Lancet* 1995; 3462: 81-2.
- Arranz MJ, Bolonna AA, Munro J, Curtis CJ, Collier DA, Kerwin RW. The serotonin transporter and clozapine response. *Mol Psychiatry* 2000; 5: 124-5.
- Arranz MJ, Collier DA, Munro J, Sham P, Kirov G, Sodhi M, et al. Analysis of a structural polymorphism in the 5-HT_{2A} receptor and clinical response to clozapine. *Neurosci Lett* 1996; 217: 177-8.
- Arranz MJ, Li T, Munro J, Liu X, Murray R, Collier DA, et al. Lack of association between a polymorphism in the promotor region of the dopamine 2 receptor gene and clozapine response. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 481-4.

- Arranz MJ, Munro J, Sham P, Kirov G, Murray RM, Collier DA, et al. Meta-analysis of studies on genetic variation in 5-HT_{2A} receptors and clozapine response. *Schizophrenia Res* 1998a; 32: 93-99.
- Arranz MJ, Munro J, Owen MJ, Spurlock G, Sham PC, Zhao J, et al. Evidence for association between polymorphisms in the promotor and coding regions of the 5-HT_{2A} receptor gene and response to clozapine. *Mol Psychiatry* 1998b; 3: 61-6.
- Arranz MJ, Munro J, Birkett J, Bolona A, Mancama D, Sodhi M, et al. Pharmacogenetic prediction of clozapine response. *Lancet* 2000; 355: 1615-16.
- Arranz MJ, Munro J, Osborne S, Collier DA, Kerwin RW. Applications of pharmacogenetics in psychiatry: personalisation of treatment. *Exp Opin Pharmacother* 2001; 4: 537-42.
- Ashigari V, Schoots O, van Kats S, Ohara K, Jovanovic V, Guan HC, et al. Dopamine D4 receptor repeat: analysis of different native and mutant forms of the human and rat genes. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 364-73.
- Banarjee SP, Kung LS, Riggi SJ, Chanda SK. Development of beta-adrenergic receptor subsensitivity by antidepressants. *Nature* 1977; 268: 455-56.
- Basile VS, Masellis M, McIntyre RS, Meltzer HY, Liebermann JA, Kennedy JL. Genetic dissection of atypical antipsychotic-induced weight gain: novel preliminary data on the pharmacogenetic puzzle. *J Clin Psychiatry* 2001a; 62: 45-66.
- Basile VS, Özdemir V, Masellis M, Meltzer HY, Lieberman JA, Potkin SG, et al. Lack of association between serotonin-2A receptor gene (HTR2A) polymorphisms and tardive dyskinesia in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001b; 6: 230-4.
- Basile VS, Masellis M, Potkin S, Kennedy JL. Pharmacogenomics in schizophrenia: the quest for individualized therapy. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 2517-30.
- Basile VS, Özdemir V, Masellis M, Walker ML, Meltzer HY, Lieberman JA, et al. A functional polymorphism of the cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) gene: association with tardive dyskinesia in schizophrenia. *Mol Psychiatr* 2000; 5: 410-17.
- Basson BR, Kinon BJ, Taylor CC, Szymanski KA, Gilmore JA, Tollefson GD. Factors influencing acute weight change in patients with schizophrenia treated with olanzapine, haloperidol, or risperidone. *J Clin Psychiatry* 2001; 62: 231-8.
- Battersby S, Ogilvie AD, Smith CA, Blackwood DH, Muir WJ, Quinn JP, Fink G, Goodwin GM, Harmar AJ. Structure of a variable number tandem repeat of the serotonin transporter gene and association with affective disorder. *Psychiatr Genet* 1996; 6: 177-81.

- Bernard PS, Reiser A, Pritham GH. Mutation detection by fluorescent hybridization probe melting curves. In: Rapid cycle real-time PCR. Meurer S, Wittwer C, Nakagawara KI (Eds.). Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag 2001: 11-9.
- Berrettini WH. Are schizophrenic and bipolar disorders related? Review of family and molecular studies. *Biol Psychiatry* 2000; 48: 531-8.
- Berridge KC. Food reward: brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev* 1996; 20: 1-25.
- Berthoud HR. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neurosci Biobehav* 2002; 26: 393-428.
- Bertilsson L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Int Clin Psychopharmacol* 1986; 1: 192-209.
- Bertilsson L, Dahl ML, Tybring G. Pharmacogenetics of antidepressants: clinical aspects. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 1997; 391: 14-21.
- Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, Kolachana BS, de Bartolomei A, et al. Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2569-74.
- Bridler R, Umbricht D. Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenia. *Swiss Med WKLY* 2003; 133: 63-76.
- Briffa D, Meehan T. Weight changes during clozapine treatment. *Aust NZ J Psychiatry* 1998; 32: 718-721.
- Brockmüller J, Kirchheiner J, Meisel C, Roots I. Pharmacogenetic diagnosis of cytochrome P450 polymorphisms in clinical drug development and in drug treatment. *Pharmacogenomics* 2000; 1: 125-51.
- Broly F, Meyer UA. Debrisoquine oxidation polymorphism: phenotypic consequences of a 3-base-pair deletion in exon 5 of the CYP2D6 gene. *Pharmacogenetics* 1993; 3: 123-30.
- Buckland PR, O'Donovan MC, McGuffin P. Clozapine and sulpiride up-regulate dopamine D3 receptor mRNA levels. *Neuropsychopharmacol* 1993; 32: 901-7.
- Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ. 5-HT1A and 5-HT2A receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1996; 15: 442-455.

- Butler MA, Iwasaki M, Guengerich FP, Kadlubar FF. Human cytochrome P-450PA (P450IA2), the phenacetin demethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7696-700.
- Cargill M, Daley GQ. Mining for SNPs: putting the common variants-common disease hypothesis to the test. *Pharmacogenomics* 2000; 1: 27-37.
- Carrillo JA, Herraiz AG, Ramos SI, Gervasini G, Vizcaino S, Benitez J. Role of the smoking induced cytochrome P450 (CYP)1A2 and polymorphic CYP2D6 in steady-state concentration of olanzapine. *J Clin Psychopharmacol* 2003; 23: 119-127.
- Catalano M, Nobile M, Novelli E, Nöthen M, Smeraldi E. Distribution of a novel mutation in the first exon of the human dopamine D4 receptor gene in psychotic patients. *Biol Psychiatry* 1993; 34: 459-64.
- Chen CH, Wei FC, Koong FJ, Hsaio KJ. Association of dopamine D2 receptor gene and tardive dyskinesia in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1997; 41: 827-9.
- Chong SA, Tan EC, Tan CH, Mythily NN, Chan YH. Polymorphisms of dopamine receptors and tardive dyskinesia among Chinese patients with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2003; 116: 51-4.
- Cohen BM, Ennulat DJ, Centorrino F, Matthyse S, Konieczna H, Chu HM, Cherkerzian S. Polymorphisms of the dopamine D4 receptor and response to antipsychotic drugs. *Psychopharmacology* 1999; 141: 6-10.
- Coppen, AJ. Biochemical aspects of depression. *Int Psychiatry Clin* 1969; 6: 53-81.
- Coukell A, Spencer C, Benfield P. Amisulpride. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of schizophrenia. *CNS Drugs* 1996; 6: 237-56.
- Cowen PJ. Psychopharmacology of 5-HT1A-Receptors. *Nucl Med Biol* 2000; 27: 437-39.
- Crawford F, Hoyne J, Cai X, Osborne A, Poston D, Zaglul J, et al. Dopamine DRD2/Cys311 is not associated with chronic schizophrenia. *Am J Med Genet* 1996; 67: 483-84.
- Cravchik A, Sibley DR, Gejman PV. Functional analysis of the human D2 receptor missense variants. *J Biol Chem* 1996; 271: 260-263.
- Cummings JL. The neuroanatomy of depression. *J Clin Psychiatry* 1993; 54: 14-20.

- Cusin C, Serreti A, Zanardi R, Lattuada E, Rossini D, Lilli R, et al. Influence of monoamine oxidase a and serotonin receptor 2A polymorphisms on SSRI antidepressant activity. *Int J Neuropsychopharmacology* 2002; 5: 27-36.
- Dahmen N, Müller MJ, Germeyer S, Rujescu D, Angheliescu I, Hiemke C, et al. Genetic polymorphisms of the dopamine D2 and D3 receptor and neuroleptic drug effects in schizophrenic patients. *Schizophr Res* 2001; 49: 223-5.
- De Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-Mephenytoin metabolism in humans. *J Biol Chem* 1994a; 269: 15419-22.
- De Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K, Goldstein JA. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-Mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol* 1994b; 46: 594-8.
- Dieffenbach CW, Lowe TM, Dveksler GS. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl* 1993; 3: 30-7.
- Dinan TG. Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model. *Br J Psychiatry* 1994; 164: 365-71.
- Doris A, Ebmeier K, Shajahan P. Depressive illness. *Lancet* 1999; 354: 1369-75.
- Durany N, Thome J, Palomo A, Foley P, Riederer P, Cruz-Sanchez FF. Homozygosity at the dopamine D3 receptor gene in schizophrenic patients. *Neurosci Lett* 1996; 220: 151-54.
- Durham LK, Webb SM, Milos PM, Clary CM, Seymour AB. The serotonin transporter polymorphism, 5-HTTLPR, is associated with faster response time to sertraline in an elderly population with major depressive disorder. *Psychopharmacology* 2004; 174: 525-9.
- Eap CB, Bender S, Sirot EJ, Cucchia G, Jonzier-Perey M, Baumann P, et al. Nonresponse to clozapine and ultrarapid CYP1A2 activity: clinical data and analysis of CYP1A2 gene. *J Clin Psychopharmacol* 2004; 24: 214-9.
- Eichhammer P, Albus M, Borrmann-Hassenbach M, Schoeler A, Putzhammer A, Frick U, et al. Association of dopamine D3-receptor gene variants with neuroleptic induced akathisia in schizophrenic patients: a generalization of Steen's study on DRD3 and tardive dyskinesia. *Am J Med Genet* 2000; 96: 187-91.
- Eichhammer P, Langguth B, Wiegand R, Kharraz A, Frick U, Hajak G. Allelic variation in the serotonin transporter promoter affects neuromodulatory effects of a selective serotonin transporter reuptake inhibitor (SSRI). *Psychopharmacology* 2003; 166: 294-7.

- Eison AS, Mullins UL. Regulation of central 5-HT_{2A} receptors: a review of in vivo studies. *Behav Brain Res* 1996; 73: 177-81.
- Ellingrod VL, Perry PJ, Ringold JC, Lund BC, Bever-Stille K, Fleming F, et al. Weight gain associated with the -759 C/T polymorphism of the 5HT_{2C} receptor and olanzapine. *Am J Med Genet* 2005; 134B: 76-78.
- Ellingrod VL, Lund BC, Miller D, Fleming F, Perry PJ, Holman TL, et al. 5-HT_{2A} receptor promotor polymorphism -1438 G/A and negative symptom response to Olanzapine in schizophrenia. *Psychopharmacol Bull* 2003; 37: 109-12.
- Ellingrod VL, Perry PJ, Lund BC, Bever-Stille K, Fleming F, Holman TL et al. 5HT_{2A} and 5HT_{2C} receptor polymorphisms and predicting clinical response to olanzapine in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 2002; 22: 622-4.
- Erdmann J, Shimron-Abarbanell D, Rietschel M, Albus M, Maier W, Körner J, et al. Systematic screening for mutations in the human serotonin-2A (5-HT_{2A}) receptor gene: identification of two naturally occurring receptor variants and association analysis in schizophrenia. *Hum Genet* 1996; 97: 614-19.
- Evans DAP, Manley KA, McKusick VA. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J* 1960; 2: 485-91.
- Evans WE. Pharmacogenomics: marshalling the human genome to individualize drug therapy. *Gut* 2003; 52 (Suppl. II): 10-18.
- Fei Z, Smith LM. Analysis of single nucleotide polymorphisms by primer extension and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000; 14: 950-59.
- Ferguson RJ, de Morais SM, Benhamou S, Bouchardy C, Blaisdell J, Ibeanu G, et al. A new genetic defect in human CYP2C19: mutation of the initiation codon is responsible for poor metabolism of S-mephenytoin. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 356-61.
- Fiskerstrand CE, Lovejoy EA, Quinn JP. An intronic polymorphic domain often associated with susceptibility to affective disorders has allele dependent differential enhancer activity in embryonic stem cells. *FEBS Lett* 1999; 458: 171-74.
- Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag, 2001.
- Fox SH, Moser B, Brotchie M. Behavioral effects of 5-HT_{2C} receptor antagonism in the substantia nigra zona reticulata of the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 1998; 151: 35-49.

- Frankenburg FR, Zanarini MC, Kando J, Centorrino F. Clozapine and body mass change. *Biol Psychiatry* 1998; **43**: 520-524.
- Freedman R. Schizophrenia. *New Engl J Medicine* 2003; **349**: 1738-49.
- Gabig M, Wegrzyn G. An introduction to DNA chips: principles, technology, applications and analysis. *Acta Biochim Pol* 2001; **48**: 615-22.
- Gaikovitch EA, Cascorbi I, Mrozikiewicz M, Brockmöller J, Frötschl R, Köpke K, et al. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2003; **59**: 303-12.
- Gharidian AM, Choiunard G, Annable L. Sexual dysfunction and plasma prolactin levels in neuroleptic-treated schizophrenic outpatients. *J Nerv Ment Dis* 1982; **170**: 463-7.
- Gleiter CH, Volz HP, Möller HJ. Serotonin-Wiederaufnahmehemmer. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., 1999.
- Glennon RA, Titeler JD, McKenney. Evidence for 5-HT₂ involvement in the mechanism of action of hallucinogenic agents. *Life Sci* 1984; **35**: 2502-11.
- Gram LF, Guentert TW, Grange S, Vistisen K, Brosen K. Moclobemide, a substrate of CYP2C19 and an inhibitor of CYP2C19, CYP2D6 and CYP1A2: a panel study. *Clin Pharmacol Ther* 1995; **57**: 670-77.
- Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni M, Makam H, et al. The human dopamine D₂ receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP. *Am J Hum Genet* 1989; **45**: 778-85.
- Grandy DK, Zhang Y, Civelli O. PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. *Hum Mol Genet* 1993; **2**: 2197.
- Grauer MT, Uhr M. P-glycoprotein reduces the ability of amitriptyline metabolites to cross the blood-brain barrier in mice after a 10-day administration of amitriptyline. *J Psychopharmacol* 2004; **18**: 66-74.
- Grasmäder K, Verwohlt PL, Rietschel M, Dragicevic A, Müller M, Hiemke C, et al. Impact of polymorphisms of cytochrome-P450 isoenzymes 2C9, 2C19 and 2D6 on plasma concentrations and clinical effects of antidepressants in a naturalistic clinical setting. *Eur J Clin Pharmacol* 2004; **60**: 329-336.
- Green B. Focus on aripiprazol. *Curr Med Res Opin* 2004; **20**: 207-13.

- Guy W. Dosage Record and Treatment Emergent Symptoms Scale (DOTES). Hrsg.: Rockville, MD, U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Alcohol, Drug Abuse, and Mental Health Administration, NIMH Psychopharmacology research Branch, Division of Extramural Research Programs: ECDEU Assessment Manual for Psychopharmacology-Revised DHEW Publ No ADM 76-338, 1976: 223-44.
- Halbreich U, Kahn LS. Hormonal aspects of schizophrenias: an overview. *Psychoneuroendocrinol* 2003; 28: 1-16.
- Harrison PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 1999; 122: 593-624.
- Hazelwood LA, Sanders-Bush E. His452Tyr polymorphism in the human 5-HT_{2A} receptor destabilizes the signaling conformation. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 1293-300.
- Heils A, Teufel A, Petri S, Stöber G, Riederer P, Bengel D, et al. Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 1996; 66: 2621-24.
- Herken H, Erdal ME, Boke O, Savas HA. Tardive dyskinesia is not associated with the polymorphisms of 5-HT_{2A} receptor gene, serotonin transporter gene and catechol-o-methyltransferase gene. *Eur Psychiatry* 2003; 18: 77-81.
- Herz MI, Liberman RP, Marder SR, McGlashan TH, Wyatt RJ, Wang P. Practice guideline for the treatment of patients with schizophrenia. *AM J Psychiatry* 1997; 154 (4 Suppl.): 1-63.
- Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3473-8.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus Aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci* 1991; 88: 7276-80.
- Holmgren P, Carlsson B, Zackrisson AL, Lindblom B, Dahl ML, Scordo MG, et al. Enantioselective analysis of citalopram and its metabolites in postmortem blood and genotyping for CYP2D6 and CYP2C19. *J Anal Toxicol* 2004; 28: 94-104.
- Hwu HG, Hong CJ, Lee YL, Lee PC, Lee SF. Dopamine D₄ receptor gene polymorphisms and neuroleptic response in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1998; 44: 483-7.

- Ibeanu GC, Blaisdell J, Ferguson RJ, Ghanayem BI, Brosen K, Benhamou S, et al. A novel transversion in the intron 5 donor splice junction of CYP2C19 and a sequence polymorphism in exon 3 contribute to the poor metabolizer phenotype for the anticonvulsant drug S-mephenytoin. *J Pharmacol Experimental Therapeutics* 1999; 290: 635-40.
- Ito K, Yoshida K, Sato K, Takahashi H, Kamata M, Higuchi H, et al. A variable number of tandem repeats in the serotonin transporter gene does not affect the antidepressant response to fluvoxamine. *Psychiatry Res* 2002; 111: 235-39.
- Itokawa M, Arinami T, Futamura N, Hamaguchi H, Toru M. A structural polymorphism of human dopamine D2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 1369-75.
- Iversen L. Which D4 do you have? *Nature* 1992; 358: 109.
- Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1991; 148: 1301-8.
- Jönsson EG, Flyckt L, Burgert E, Croq MA, Forslund K, Mattila-Evenden M, et al. Dopamine D3 receptor gene Ser9Gly variant and schizophrenia: association study and meta-analysis. *Psychiatric Genetics* 2003; 13: 1-12.
- Jönsson EG, Sillen A, Vares M, Ekholm B, Terenius L, Sedvall GC. Dopamine D2 receptor gene Ser311Cys variant and schizophrenia: association study and meta-analysis. *Am J Med Genet* 2003b; 119B: 28-34.
- Jönsson EG, Nöthen MM, Grünhage F, Farde L, Nakashima Y, Propping P, et al. Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 1999; 4: 290-296.
- Jones B, Basson BR, Walker DJ, Crawford AM, Kinon BJ. Weight change and atypical antipsychotic treatment in patients with schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 2001; 62: 41-44.
- Joober R, Benkelfat C, Brisebois K, Toulouse A, Turecki G, Lal S, et al. T102C polymorphism in the 5HT2A gene and schizophrenia: relation to phenotype and drug response variability. *J Psychiatry Neurosci* 1999; 24: 141-6.
- Joober R, Toulouse A, Benkelfat C, Lal S, Bloom D, Labelle A, et al. DRD3 and DAT1 genes in schizophrenia: an association study. *J Psychiatr Res* 2000; 34: 285-91.
- Kaiser R, Konneker M, Henneken M, Dettling M, Müller-Oerlinghausen B, Roots I, et al. Dopamine D4 receptor 48-bp repeat polymorphism: no association with response to antipsychotic treatment, but association with catatonic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2000; 5: 418-24.

- Kaiser R, Tremblay PB, Klufmüller F, Roots I, Brockmüller J. Relationship between adverse effects of antipsychotic treatment and dopamine D2 receptor polymorphisms in patients with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 696-705.
- Kalow W, Tang BW. Caffeine as a metabolic probe: exploration of the enzyme-inducing effect of cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther* 1991; 49: 44-48.
- Kalow W, Tang BK, Endenyi I. Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics* 1998; 8: 283-9.
- Kapur S, Remington G. Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1996; 153: 466-76.
- Kapur S, Seeman P. Does fast dissociation from the dopamine D(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics?: a new hypothesis. *Am J Psychiatry* 2001; 158: 360-9.
- Kapur S. A new framework for investigating antipsychotic action in humans: lessons from PET imaging. *Mol Psychiatr* 1998; 3: 135-40.
- Kaufmann MJ, Hartig PR, Hoffman BJ. Serotonin 5-HT_{2C} receptor stimulates cyclic GMP formation in choroid plexus. *J Neurochem* 1995; 64: 199-205.
- Kim DK, Lim SW, Lee S, Sohn SE, Kim S, Hahn CG, et al. Serotonin transporter gene polymorphism and antidepressant response. *Neuroreport*. 2000; 11: 215-9.
- Kirchheimer J, Brosen K, Dahl ML, Gram LF, Kaspers S, Roots I, et al. Cyp2D6 and Cyp2C19 genotype-based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. *Acta Psychiatr Scand* 2001; 104: 173-92.
- Kishida I, Kawanishi C, Furuno T, Matsumura T, Hasegawa H, Sugiyama N, et al. Lack of association in Japanese patients between neuroleptic malignant syndrome and the TaqI A polymorphism of the dopamine D2 receptor gene. *Psychiatr Genet* 2003; 13: 55-7.
- Kohn Y, Ebstein RP, Heresco-Levy U, Shapira B, Nemanov L, Gritsenko I, et al. Dopamine D4 receptor gene polymorphisms: relation to ethnicity, no association with schizophrenia and response to clozapine in Israeli subjects. *European Neuropsychopharmacology* 1997; 7: 39-43.
- Kouzmenko AP, Scaffidi A, Pereira AM, Hayes WL, Copolov DL, Dean B. No correlation between A(-1438)G polymorphism in 5-HT_{2A} receptor gene promoter and the density of frontal cortical 5-HT_{2A} receptors in schizophrenia. *Hum Hered* 1999; 49: 103-5.
- Kovacs KJ, Csejtei M, Laszlovszky I. Double activity imaging reveals distinct cellular targets of haloperidol, clozapine and dopamine D3 receptor selective RGH-1756. *Neuropsychopharmacology* 2001; 40: 383-393.

- Koyama E, Chiba K, Tani M, Ishizaki T. Reappraisal of human CYP isoforms involved in imipramine N-demethylation and 2-hydroxylation: a study using microsomes obtained from putative extensive and poor metabolizers of S-mephenytoin and eleven recombinant human CYPs. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281: 1199-210.
- Landt O. Selection of hybridization probes for real-time quantification and genetic analysis. In: *Rapid cycle real-time PCR*. Meurer S, Wittwer C, Nakagawara KI (Eds.). Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag 2001: 35-41.
- Lane HY, Chang YC, Chiu CC, Chen MS, Hsieh MS, Chang MD. Association of risperidone treatment response with a polymorphism in the 5-HT_{2A} receptor gene. *Am J Psychiatry*. 2002; 159: 1593-5.
- Lane HY, Lee CC, Chang YC, Lu CT, Huang CH, Chang WH. Effects of dopamine D₂ receptor Ser311Cys polymorphism and clinical factors on risperidone efficacy for positive and negative symptoms and social function. *Int J Neuropsychopharmacol* 2004; 12: 1-10.
- Lang NP, Butler MA, Massengill J. Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 675-82.
- Lannfelt L, Sokoloff P, Matres MP, Pilon C, Giros B, Johnson E, et al. Amino acid substitution in the dopamine D₃ receptor as a useful polymorphism for investigating psychiatric disorders. *Psychiatr Genet* 1992; 2: 249-56.
- Lappalainen J, Zhang L, Dean M, Oz M, Ozaki N, Yu DH, et al. Identification, expression, and pharmacology of a Cys23-Ser23 substitution in the human 5-HT_{2C} receptor gene (HTR_{2C}). *Genomics* 1995; 27: 274-79.
- Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998; 279: 1200-5.
- Lee MS, Lee HY, Lee HJ, Ryu SH. Serotonin transporter promoter gene polymorphism and long-term outcome of antidepressants treatment. *Psychiatric Genet* 2004; 14: 111-115.
- Lerer B, Segman RH, Fangerau H, Daly AK, Basile VS, Cavallaro R, et al. Pharmacogenetics of tardive dyskinesia: combined analysis of 780 patients supports association with dopamine D₃ receptor gene Ser9Gly polymorphism. *Neuropsychopharmacology* 2002; 27: 105-19.
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996; 274: 1527-31.

- Leucht S, Kissling W. Übersicht zu Aripiprazol – Das neueste “atypische” Antipsychotikum. *MMW-Fortschr Med Originalien* 2005; 147: 69-76.
- Leucht S, Pietschel-Walz G, Abraham D, Kissling W. Efficacy and extrapyramidal side effects of the new antipsychotics olanzapine, quetiapine, risperidone and sertindole compared to conventional antipsychotics and placebo. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Schizophr Res* 1999; 35: 51-68.
- Levitan RD, Masellis M, Lam RW, Muglia P, Basile VS, Jain U, et al. Childhood inattention and dysphoria and adult obesity associated with the dopamine D4 receptor gene in overeating women with seasonal affective disorder. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 179-86.
- Lewis DA, Liebermann JA. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 2000; 28: 325-34.
- Levy G, Ebling WF, Forrest A. Concentration- or effect-controlled clinical trials with sparse data. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 56: 1-8.
- Li MD, Parker SL, Kane JK. Regulation of feeding-associated peptides and receptors by nicotine. *Mol Neurobiol* 2000; 22: 143-165.
- Li T, Arranz M, Aitchison KJ, Bryant C, Liu X, Kerwin RW, et al. Case-control, haplotype relative risk and transmission disequilibrium analysis of a dopamine D2 receptor functional promoter polymorphism in schizophrenia. *Schizophr Res* 1998; 27: 87-92.
- Lin CH, Tsai SJ, Yu YW, Song HL, Tu PC, Sim PC, et al. No evidence for association of serotonin-2A receptor variant (102T/C) with schizophrenia or clozapine response in a chinese population. *Neuroreport* 1999; 10: 57-60.
- Lundstrom K, Turpin MP. Proposed schizophrenia-related gene polymorphism: expression of the Ser9Gly mutant human dopamine D3 receptor with the Semliki Forest virus system. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225: 1068-72.
- Lung FW, Tzeng DS, Shu BC. Ethnic heterogeneity in allele variation in the DRD4 gene in schizophrenia. *Schizophr Res* 2002; 57: 239-45.
- Lyamichev V, Mast AL, Hall JG, Prudent JR, Kaiser MW, Takova T, et al. Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 292-6.
- MacKenzie A, Quinn J. A serotonin transporter gene intron 2 polymorphic region, correlated with affective disorders, has allele-dependent differential enhancer-like properties in the mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 15251-5.

- Malhotra AK, Buchanan RA, Picken L, Pickar D, Goldman D. Allelic variation in the promotor region of the dopamine D2 receptor gene influences the antipsychotic response to clozapine. *Am J Med Genet* 1998; *81*: 477-8.
- Malhotra AK, Goldman D, Ozaki N, Rooney W, Clifton A, Buchnan R, et al. Clozapine response and the 5HT2C Cys23Ser polymorphism. *Neuroreport* 1996a; *7*: 2100-2.
- Malhotra AK, Goldman D, Ozaki N, Breier A, Buchanan R, Pickar D. Lack of association between polymorphisms in the 5-HT2A receptor gene and the antipsychotic response to clozapine. *Am J Psychiatry* 1996b; *153*: 1092-4.
- Marez D, Legrand M, Sabbagh N, Guidice JM, Spire C, Lafitte JJ, et al. Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. *Pharmacogenetics* 1997; *7*: 193-202.
- Martel P, Fantino M. Mesolimbic dopaminergic system activity as a function of food reward: a microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav* 1996; *53*: 221-226.
- Masellis M, Basile V, Meltzer HY, Lieberman JA, Sevy S, Macciardi FM, et al. Serotonin subtype 2 receptor genes and clinical response to clozapine in schizophrenia patients. *Neuropsychopharmacology* 1998; *19*: 123-32.
- Masellis M, Paterson AD, Badri F, Liebermann JA, Meltzer HY, Cavazzoni P, et al. Genetic variation of 5-HT2A receptor and response to clozapine. *Lancet*. 1995; *346*: 1108.
- McGall GH, Christians FC. High-density genchip oligonucleotide probe arrays. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2002; *77*: 21-42.
- McGuffin P, Katz R. The genetics of depression and manic-depressive disorder. *Br J Psychiatry* 1989; *155*: 294-304.
- McGuffin P, Owen MJ, Farmer AE. Genetic basis of schizophrenia. *Lancet* 1995; *346*: 678-82.
- Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC. The ratios of serotonin₂ and dopamine₂ affinities differentiate atypical and typical antipsychotic drugs. *Psychopharmacol Bull* 1989; *25*: 390-2.
- Mihara K, Suzuki A, Kondo T, Yasui-Furukori N, Ono S, Otani K, et al. Relationship between TaqI A dopamine D2 receptor (DRD2) polymorphism and prolactin response to bromoperidol. *Am J Med Genet* 2001; *105*: 271-4.
- Minov C, Baghai TC, Schule C, Zwanzger P, Schwarz MJ, Zill P, et al. Serotonin-2A-receptor and transporter polymorphisms: lack of association in patients with major depression. *Neurosci Lett* 2001; *303*: 119-22.
- Möller HJ, Laux G, Deister A. *Psychiatrie 1*. Stuttgart: Hippokrates-Verlag, 1995.

- Murphy GM, Hollander SB, Rodrigues HE, Kremer C, Schatzberg AF. Effects of the serotonin transporter gene promoter polymorphism on mirtazapine and paroxetine efficacy and adverse events in geriatric major depression. *Arch Gen Psychiatry* 2004; *61*: 1163-1169.
- Murphy GM, Kremer C, Rodrigues HE, Schatzberg AF. Pharmacogenetics of antidepressant medication intolerance. *Am J Psychiatry*. 2003; *160*: 1830-35.
- Murray CJ, Lopez AD. Global mortality disability and the contribution of risk factors: global burden of disease study. *Lancet* 1997; *348*: 1436-48.
- Musselman DL, Nemeroff CB. Depression and endocrine disorders: focus on the thyroid and adrenal system. *Br J Psychiatry Suppl* 1996; *30*: 123-8.
- Naber D, Lambert M, Krausz M, Haasen C, Pickar D. Atypical antipsychotics in the treatment of schizophrenic patients. 1. Auflage. Bremen: Uni-Med Science, 2002.
- Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Kinoshita M, Funayama M, Kamataki T. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *J Biochem* 1999; *125*: 803-8.
- National Institute of Mental Health. Clinical Global Impression. Hrsg.: Collegium Internationale Psychiatriae Scalarum: Internationale Skalen für Psychiatrie. 4. Auflage. Göttingen: Beltz-Test GmbH, 1996; 147-49.
- Nauck M, Stein U, von Karger S, März W, Wieland H. Rapid detection of the C3435T polymorphism of multidrug resistance gene 1 using fluorogenic hybridisation probes. *Clin Chem* 2000; *12*: 1995-97.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; *17*: 2503-16.
- Nibuya M, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J Neurosci* 1996; *16*: 2365-72.
- Nimgaonkar VL, Zhang XR, Brar JS, DeLeo M, Ganguli R. 5-HT₂ receptor gene locus: association with schizophrenia or treatment response not detected. *Psychiatr Genet* 1996; *6*: 23-7.
- Noble EB. The D2 dopamine receptor gene: A review of association studies in alcoholism and phenotypes. *Alcohol* 1998; *16*: 33-45.

- Nöthen MM, Cichon S, Hemmer S, Hebebrand J, Remschmidt H, Lehmkuhl G, et al. Human dopamine D4 receptor gene: frequent occurrence of a null allele and observation of homozygosity. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 2207-12.
- Nöthen MM, Rietschel M, Erdmann J, Oberlander H, Möller HJ, Naber D, et al. Genetic variation of the 5-HT_{2A} receptor and response to clozapine. *Lancet* 1995; 346: 908-9.
- Ogilvie AD, Battersby S, Bubb VJ, Fink G, Harmar AJ, Goodwin GM, et al. Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *Lancet* 1996; 347: 731-33.
- Ohara K, Nagai M, Tani K, Nakamura Y, Ino A, Ohara K. Functional polymorphism of -141C Ins/Del in the dopamine D2 receptor gene promoter and schizophrenia. *Psychiatry Res* 1998; 81: 117-23.
- Ohara K, Nakamura Y, Xie DW, Ishigaki T, Deng ZL, Tani K, et al. Polymorphisms of dopamine D2-like (D₂, D₃, and D₄) receptors in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1996; 40: 1209-17.
- Olney JW, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1995; 52: 998-1007.
- Owen F, Cross AJ, Crow TJ, Londgen A, Poulter M, Riley GJ. Increased dopamin-receptor sensitivity in schizophrenia. *Lancet* 1978; 2: 223-25.
- Özdemir V, Kalow W, Okey AB, Lam MSM, Albers LJ, Reist C. Treatment-resistance to clozapine in association with ultrarapid CYP1A2 activity and the C->A polymorphism in intron 1 of the CYP1A2 Gene: effect of grapefruit juice and low-dose fluvoxamine. *J Clin Psychopharmacol* 2001; 21: 603-7.
- Ozaki N, Manji H, Lubierman V, Lu SJ, Lappalainen J, Rosenthal NE, et al. A naturally occurring amino acid substitution of the human serotonin 5-HT_{2A} receptor influences amplitude and timing of intracellular calcium mobilization. *J Neurochem* 1997; 68: 2186-2193.
- Pacheco MA, Jope RS. Phosphoinositol signaling in human brain. *Prog Neurobiol.* 1996; 50: 255-73.
- Parsons BL, Heflich RH. Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations. *Mutat Res* 1997; 387: 97-121.
- Parsons MJ, D'Suozza UM, Arranz MJ, Kerwin RW, Makoff AJ. The -1438 A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity. *Biol Psychiatry* 2004; 56: 406-10.

- Pohjalainen T, Rinne JO, Nargen K, Lehtikoinen P, Anttila K, Syvälahti EKG, et al. The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 1998; 3: 256-60.
- Pollock BG, Ferrell RE, Mulsant BH, Mazumdar S, Miller M, Sweet RA, et al. Allelic variation in the serotonin transporter promoter affects onset of paroxetine treatment response in late-life depression. *Neuropsychopharmacology* 2000; 23: 587-590.
- Popp J, Messner B, Steimer W. High-speed genotyping of CYP1A2*1F mutation with fluorescent hybridisation probes using the LightCycler. *Pharmacogenomics* 2003; 4: 643-6.
- Poston WS, Ericsson M, Linder J, Haddock CK, Hanis CL, Nilsson T, et al. D4 dopamine receptor gene exon III polymorphism and obesity risk. *Eat Weight Disord* 1998; 3: 71-7.
- Preskorn SH, Burke MJ, Fast GA. Therapeutic drug monitoring. Principles and practice. *Psychiatr Clin North Am* 1993; 16: 611-45.
- Prior TI, Baker GB. Interactions between the cytochrome P450 system and the second-generation antipsychotics. *J Psychiatry Neurosci* 2003; 28: 99-112.
- Puzantian T. Mirtazapine, an antidepressant. *Am J Health-Syst Pharm* 1998; 55: 44-49.
- Rao PA, Pickar D, Gejman PV, Ram A, Gershon ES, Gelernter J. Allelic variation in the D4 dopamine receptor (DRD4) gene does not predict response to clozapine. *Arch Gen Psychiatry* 1994; 51: 912-17.
- Ratzoni G, Gothelf D, Brand-Gothelf A, Reidman J, Kikinzon L, Gal G, et al. Weight gain associated with olanzapine and risperidone in adolescent patients: a comparative prospective study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2002; 41: 337-343.
- Rausch JL, Johnson ME, Fei YJ, Li JQ, Shenarkar N, Hobby HM, et al. Initial conditions of serotonin transporter kinetics and genotype: influence on SSRI treatment trial outcome. *Biol Psychiatry* 2002; 51: 723-32.
- Reynolds GP, Zhang ZJ, Zhang XB. Association of antipsychotic induced weight gain with a 5-HT_{2C} receptor gene polymorphism. *Lancet* 2002; 359: 2086-7.
- Reynolds GP, Zhang ZJ, Zhang XB. Polymorphism of the promoter region of the serotonin 5-HT_{2C} receptor gene and clozapine-induced weight gain. *Am J Psychiatry* 2003; 160: 677-9.
- Reynolds GP. What is an atypical antipsychotic? *J Psychopharmacol* 1997; 11: 195-99.
- Rietschel M, Kennedy JL, Macciardi F, Meltzer HY. Application of pharmacogenetics to psychotic disorders: the first consensus conference. *Schizophrenia Res* 1999; 37: 191-6.

- Rietschel M, Krauss H, Müller DJ, Schulze TG, Knapp M, Marwinski K, et al. Dopamine D3 receptor variant and tardive dyskinesia. *Neurosci* 2000; *250*: 31-5.
- Rietschel M, Naber D, Fimmers R, Möller HJ, Propping P, Nöthen MM. Efficacy and side-effects of clozapine not associated with variation in the 5-HT2C receptor. *NeuroReport* 1997; *8*: 1999-2003.
- Rietschel M, Naber D, Oberlander H, Holzbach R, Fimmers R, Eggermann K, et al. Efficacy and side-effects of clozapine: testing for association with allelic variation in the dopamine D4 receptor gene. *Neuropsychopharmacology* 1996; *15*: 491-6.
- Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; *409*: 928-33.
- Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of a C->A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine. *J Clin Pharmacol* 1999; *47*: 445-9.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; *239(4839)*: 487-91.
- Sander T, Ladehoff M, Samochowicz J, Finckh U, Rommelspacher H, Schmidt LG. Lack of an allelic association between polymorphisms of the dopamine D2 receptor gene and alcohol dependence in the German population. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; *23*: 578-81.
- Sanyal S, Van Tol HM. Review the role of dopamine D4 receptors in schizophrenia and antipsychotic action. *J Psychiat Res* 1997; *31*: 219-32.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen B. The neuroendocrinology of stress and ageing: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev* 1985; *7*: 284-301.
- Sasaki T, Macciardi FM, Badri F, Verga M, Meltzer HY, Liebermann J, et al. No evidence for association of dopamine D2 receptor variant (Ser311/Cys311) with major psychosis. *Am J Med Genet* 1996; *67*: 415-7.
- Sato K, Yoshida K, Takahashi H, Ito K, Kamata M, Higuchi H, et al. Association between -1438 G/A promoter polymorphism in the 5-HT2A receptor gene and Fluvoxamine response in Japanese patients with Major Depressive Disorder. *Neuropsychobiology* 2002; *46*: 136-40.
- Schäfer M, Rujescu D, Giegling I, Guntermann A, Erfurth A, Bondy B, et al. Association of short-term response to haloperidol treatment with a polymorphism in the dopamine D2 receptor gene. *Am J Psychiatry* 2001; *158*: 802-4.

- Schafer WR. How do antidepressants Work? Prospects for genetic analysis of drug mechanisms. *Cell* 1999; 98: 551-554.
- Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: A review of supporting evidence. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1965; 7: 524-533.
- Schulze TG, Schumacher J, Müller DJ, Krauss H, Alfter D, Maroldt A, et al. Lack of association between a functional polymorphism of the cytochrome P450 1A2 (CYP1A2) gene and tardive dyskinesia in schizophrenia. *Am J Med Genet* 2001; 105: 498-501.
- Schumacher J, Schulze TG, Wienker TF, Rietschel M, Nöthen MM. Pharmacogenetics of the clozapine response. *Lancet* 2000; 356: 506-7.
- Schutz E, von Ahsen N. Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridisation with and without mismatches. *Biotechniques* 1999; 27(6): 1218-22.
- Schwab M, Marx C, Zanger UM, Eichelbaum M. Pharmakogenetik der Zytochrom-P-450-Enzyme. *Deutsches Ärzteblatt* 2002; 8: 497-504.
- Schwartz JC, Diaz J, Pilon C. Possible implications of the dopamine D3 receptor in schizophrenia and in antipsychotic drug actions. *Brain Res Rev* 2000; 31: 277-287.
- Scordo MG, Spina E. Cytochrome P450 polymorphisms and response to antipsychotic therapy. *Pharmacogenomics* 2002; 3: 1-18.
- Seeman P, Lee T. Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science* 1975; 188: 1217-9.
- Seeman P. Dopamine receptor sequences. Therapeutic levels of neuroleptics occupy D2 receptors, clozapine occupies D4. *Neuropsychopharmacology* 1992; 7: 261-84.
- Seeman P. Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse* 1987; 1: 133-52.
- Segman RH, Heresco-Levy U, Finkel B, Inbar R, Neeman T, Schlafman M, et al. Association between the serotonin 2C receptor gene and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia: additive contribution of 5-HT_{2C}ser and DRD₃gly alleles to susceptibility. *Psychopharmacology* 2000; 152: 408-13.
- Segman RH, Goltser T, Heresco-Levy U, Finkel B, Shalem R, Schlafman M, et al. Association of dopaminergic and serotonergic genes with tardive dyskinesia in patients with chronic schizophrenia. *Pharmacogenomics* 2003; 3: 277-83.

- Segman RH, Heresco-Levy U, Finkel B, Goltser T, Shalem R, Schlafman M, et al. Association between the serotonin 2A receptor gene and tardive dyskinesia in chronic schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2001; 6: 225-9.
- Shaik S, Collier DA, Sham PC, et al. Allelic association between a Ser-9-Gly polymorphism in the dopamine D3 receptor gene and schizophrenia. *Hum Genet* 1996; 97: 714-19.
- Shaikh S, Collier D, Kerwin RW, Pilowsky LS, Grill M, Xu WM, et al. Dopamine D4 receptor subtypes and response to clozapine. *Lancet* 1993; 341: 116.
- Shaikh S, Collier DA, Sham P, Pilowski L, Shamara T, Lin LK, et al. Analysis of clozapine response and polymorphisms of dopamine D4 receptor gene (DRD4) in schizophrenic patients. *Am J Med Genet* 1995; 60: 541-5.
- Skrebuhhova T, Allikmets L, Matto V. 5-HT_{2A} receptors mediate the effects of antidepressants in the elevated plus-maze test but have a partial role in the forced swim test. *Med Sci Res* 1999; 27: 277-280.
- Smeraldi E, Zanardi R, Benedetti F, Di Bella D, Perez J, Catalano M. Polymorphism within the promoter of serotonin transporter gene and antidepressant efficacy of fluvoxamine. *Mol Psychiatry* 1998; 3: 508-11.
- Sodhi MS, Arranz MJ, Curtis D, Ball DM, Sham P, Roberts GW, et al. Association between clozapine response and allelic variation in the 5-HT_{2C} receptor gene. *Neuroreport* 1995; 7: 169-72.
- Spurlock G, Heils A, Holmans P, Williams J, D'Souza UM, Cardno A, et al. A family based association study of T102C polymorphism in HT_{2A} and schizophrenia plus identification of new polymorphisms in the promoter. *Mol Psychiatry* 1998; 3: 42-9.
- Serretti A, Artioli P, Quartesan R. Pharmacogenetics in the treatment of depression: pharmacodynamic studies. *Pharmacogenet Genom* 2005; 15: 61-67.
- Stahl SM. Neuropharmacology of obesity: my receptors made me eat it. *J Clin Psychiatry* 1998; 59: 447-448.
- Steimer W. Psychoactive drugs: pharmacogenetics and therapeutic drug monitoring. *J Lab Med* 2002a; 26: 49-60.
- Steimer W, Potter JM. Pharmacogenetic screening and therapeutic drugs. *Clin Chim Acta* 2002b; 315: 137-55.

- Steimer W, Zöpf K, von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J, 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. *Clin Chem* 2004, *50*: 1623-33
- Steimer W, Zöpf K, von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J, 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. *Clin Chem* 2005a; *51*: 376-85.
- Steimer W, Messner B, Popp J, Leucht S. Pharmacogenetics of drug targets in psychoactive drug therapy. In Wong SHY, Linder MW, Valdes R eds. *Principles of clinical pharmacogenomics and introduction to pharmacoproteomics*. AACCC press, 2005b: 25/1-18.
- Störmer E, von Moltke LL, Shader RI, Greenblatt DJ. Metabolism of the antidepressant mirtazapine in vitro: contribution of cytochromes P-450 1A2, 2D6, and 3A4; *Drug Metabol Dispos* 2000; *28*: 1168-75.
- Stüven T, Griese EU, Kroemer HK, Eichelbaum M, Zanger UM. Rapid Detection of CYP2D6 null alleles by long distance- and multiplex-polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics* 1996; *6*: 417-21.
- Strauss JS, Carpenter WT Jr. The prediction of outcome in schizophrenia: I. Characteristics of outcome. *Arch Gen Psychiatry* 1972; *27*: 739-746.
- Sussman N. Review of atypical antipsychotics and weight gain. *J Clin Psychiatry* 2001; *62*: 5-12.
- Suzuki A, Kondo T, Mihara K, Yasui-Furukori N, Ishida M, Furukori H, et al. The -141 C Ins/Del polymorphism in the dopamine D2 receptor gene promoter region is associated with anxiolytic and antidepressive effects during treatment with dopamine antagonists in schizophrenic patients. *Pharmacogenetics* 2001; *11*: 545-50.
- Suzuki A, Kondo T, Mihara K, Yasui-Furukori N, Otani K, Furukori H, et al. Association between TaqI A dopamine D2 receptor polymorphism and therapeutic response to bromoperidol: a preliminary report. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001; *251*: 57-9.
- Suzuki A, Mihara K, Kondo T, Tanaka O, Nagashima U, Otani K, et al. The relationship between dopamine D2 receptor polymorphism at the TaqI A locus and therapeutic response to nemonpramidine, a selective dopamine antagonist, in schizophrenic patients. *Pharmacogenetics* 2000; *10*: 335-41.
- Szekeres G, Keri S, Juhasz A, Rimanoczy A, Szendi A, Czimmer C, et al. Role of the dopamine D3 receptor (DRD3) and dopamine transporter (DAT) polymorphism in cognitive dysfunctions and therapeutical response to atypical antipsychotics in patients with schizophrenia. *Am J Med Genet* 2004; *124B*:1-5.

- Tan EC, Chong SA, Mahendran R, Dong F, Tan CH. Susceptibility to neuroleptic-induced tardive dyskinesia and the T102C polymorphism in the serotonin type 2A receptor. *Biol Psychiatry* 2001 ; 50 : 144-7.
- Tecott LH, Sun LM, Akana SF. Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2C} receptors. *Nature* 1995; 374: 542-46.
- Templeman LA, Reynolds GP, Arranz B, San L. Polymorphisms of the 5-HT_{2C} receptor and leptin genes are associated with antipsychotic drug-induced weight gain in Caucasian subjects with a first-episode psychosis. *Pharmacogenet Genom* 2005; 15: 195-200.
- Thomas L. Retrospective power analysis. *Conservation Biology* 1997; 11: 276-80.
- Tureki G, Briere R, Dewar K, Antonetti T, Lesage AD, Seguin M, et al. Prediction of level of serotonin 2A receptor binding by serotonin receptor 2A genetic variation in postmortem brain samples from subjects who did or did not commit suicide. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 1456-8.
- Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridisation. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 303-8.
- Tyndale R, Aoyama T, Broly F, Matsunaga T, Inaba T, Kalow W, et al. Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281: possible association with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* 1991; 1: 26-32.
- Uhr M, Grauer MT. abcb1ab P-glycoprotein is involved in the uptake of citalopram and trimipramine into the brain of mice. *J Psychiatr Res* 2003; 37: 179-85.
- Van Praag H, Pinder R, Kremer C. Mirtazapin - ein neues Antidepressivum. *Arzneimitteltherapie* 1995; 12: 385-87.
- Van Tol HH, Bunzow JZ, Guan HC. Cloning of the gene for a human dopamine D₄ receptor with a high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 1991; 350: 610-19.
- Van Tol HH, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, et al. Multiple dopamine D₄ receptor variants in the human population. *Nature* 1992; 358: 149-52.
- Venkatakrishnan K, Greenblatt DJ, van Moltke LL, Schmider J, Harmatz JS, Shader RI. Five distinct human cytochromes mediate amitriptyline N-demethylation in vitro: dominance of CYP2C19 and 3A4. *J Clin Pharmacol* 1998; 38: 112-21.
- Vetulani J. Complex action of antidepressant treatment on central adrenergic system: possible relevance to clinical effects. *Pharmacopsychiatry* 1984; 17: 16-21.
- Vetulani J, Nalepa I. Antidepressants: past, present, future. *Eur J Pharmacol* 2000; 405: 351-63.

- Von Witte B, Harrer G, Kaptan T, Podzuweit H, Schmidt U. Treatment of depressive symptoms with a high concentration hypericum preparation. A multicenter placebo-controlled double-blind study. *Fortschr. Med* 1995; 28: 46-54.
- Wachtel H. Dysbalance of neuronal second messenger function in the aetiology of affective disorders: a pathophysiological concept hypothesising defects beyond first messenger receptors. *J Neural Transm* 1989; 75: 21-29.
- Wang JS, Taylor R, Ruan Y, Donovan JL, Markowitz JS, Lindsay De Vane C. Olanzapine penetration into brain is greater in transgenic Abcb1a P-glycoprotein-deficient mice than FVB1 (wild-type) animals. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 551-7.
- Wilfert B, Zaal R, Brouwers JR. Pharmacogenetics as a tool in the therapy of schizophrenia. *Pharm World Sci* 2005; 27: 20-30.
- Williams J, Spurlock G, McGuffin P, et al. European Multicentre Association Study of Schizophrenia (EMASS) Group. Association between schizophrenia and T102C polymorphism of the 5-hydroxytryptamine type 2A-receptor gene. *Lancet*. 1996; 347: 1294-96.
- Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. *Bio Techniques* 1989; 7: 762-69.
- Wittwer C. Rapid cycle real-time PCR: Methods and applications. In: *Rapid cycle real-time PCR*. Meurer S, Wittwer C, Nakagawara KI (Eds.). Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag 2001: 1-8.
- Woo SI, Kim JW, Rha E, Han SH, Hahn KH, Park CS, et al. Association of the Ser9Gly polymorphism in the dopamine D3 receptor gene with tardive dyskinesia in Korean schizophrenics. *Psychiatry Clin Neurosci* 2002; 56: 469-74.
- World Health Organisation. The ICD-10 classification of mental and behavioural diseases. Clinical descriptions and diagnosis guidelines. Geneva: Switzerland. 1992.
- Wu S, Xing Q, Gao R, Li X, Gu N, et al. Response to chlorpromazine treatment may be associated with polymorphisms of the DRD2 gene in Chinese schizophrenic patients. *Neurosci Lett* 2005; 376: 1-4
- Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Ikeda M, Ozaki N. Effect of DRD2, 5-HT2A, and COMT genes on antipsychotic response to risperidone. *Pharmacogenomics* 2003; 3: 356-61.

- Yoshida K, Ito K, Sato K, Takahashi H, Kamata M, Higuchi H, et al. Influence of the serotonin transporter gene-linked polymorphic region on the antidepressant response to fluvoxamine in Japanese depressed patients. *Progr Neuropsychopharmacology Biol Psych* 2002; 26: 383-86.
- Yoshida K, Naito S, Takahashi H, Sato K, Ito K, Kamata M, et al. Monoamine oxidase: A gene polymorphism, tryptophan hydroxylase gene polymorphism and antidepressant response to fluvoxamine in Japanese patients with major depressive disorder. *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26: 1279-83.
- Yoshida K, Naito S, Takahashi H, Sato K, Ito K, Kamata M, et al. Monoamine oxidase a gene polymorphism, 5-HT_{2A} receptor gene polymorphism and incidence of nausea induced by fluvoxamine. *Neuropsychobiology* 2003; 48: 10-3.
- Young RM, Lawford BR, Barnes M, Burton SC, Ritchie T, Ward WK, et al. Prolactin levels in antipsychotic treatment of patients with schizophrenia carrying the DRD2 A1 allele. *Br J Psychiatry* 2004; 185: 147-51.
- Yu YWY, Tsai SJ, Chen TJ, Lin CH, Hong CJ. Association study of the serotonin transporter promoter polymorphism and symptomatology and antidepressants response in major depressive disorders. *Mol Psychiatry* 2002; 7: 1115-1119.
- Zalsman G, Frisch A, Lev-Ran S, Martin A, Michaelovsky E, Bensason D, et al. DRD4 exon III polymorphism and response to risperidone in Israeli adolescents with schizophrenia: a pilot pharmacogenetic study. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003; 13: 183-5.
- Zanardi R, Benedetti F, Di Bella D, Catalano M, Smeraldi E. Efficacy of paroxetine in depression is influenced by a functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene. *J Clin Psychopharmacol* 2000; 20: 105-7.
- Zanardi R, Serretti A, Rossini D, Franchini L, Cusin C, Lattuada E, et al. Factors affecting fluvoxamine antidepressant activity: influence of pindolol and 5-HTTLPR in delusional and nondelusional depression. *Biol Psychiatry* 2001; 50: 323-30.
- Zerssen D. Paranoid-Depressivitäts-Skala. Hrsg.: Collegium Internationale Psychiatrica Scalarum (CIPS): Internationale Skalen der Psychiatrie. 4. Auflage. Göttingen: Belz-Test GmbH, 1996: 111-117.
- Zhang ZJ, Yao ZJ, Zhang XB, Chen JF, Sun J, Yao H, et al. No association of antipsychotic agent-induced weight gain with a DA receptor gene polymorphism and therapeutic response. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24: 235-40.

Zullino DF, Delessert D, Eap CB, Preisig M, Baumann P. Tobacco and cannabis smoking cessation can lead to intoxication with clozapine or olanzapine. *Int Clin Psychopharmacol* 2002; 17: 141-43.

11 Publikationen und Kongressbeiträge im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Popp J, Leucht S, Heres S, Steimer W. Serotonin transporter polymorphisms and side effects in antidepressant therapy – a pilot study. *Pharmacogenomics* 2006; 7: 159-166.

Popp J, Messner B, Steimer W. High-speed genotyping of CYP1A2*1F mutation with fluorescent hybridization probes using the LightCyclerTM. *Pharmacogenomics* 2003; 4: 643-646.

Steimer W, Zöpf K, von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, **Popp J**, Messner B, Kissling W, Leucht S. 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. *Clin Chem* 2004; 50: 1623-1633.

Steimer W, Zöpf K, von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, **Popp J**, Messner B, Kissling W, Leucht S. 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. *Clin Chem* 2005; 51: 376-385.

Steimer W, **Popp J**, Bachofer J, Müller T, Kissling W, Leucht S: Detection of the D3 Ser9Gly polymorphism with fluorescent hybridization probes using the LightCycler and its association with therapeutic response to olanzapine in psychiatric inpatients. *Clinical Chemistry* 2005; 51: A185-A186. XIX International Congress of Clinical Chemistry 2005, IFCC and 2005 AACC Annual Meeting, Orlando, Florida.

Steimer W, Müller T, **Popp J**, Heres S, Kissling W, Leucht S. Rapid detection of the intermediate metabolizer associated CYP2D6 polymorphisms *9 and *17 with real time PCR. *Therapeutic Drug Monitoring* 2005; 27 (2): 242-243. "9th International Congress of Therapeutic Drug-Monitoring and Clinical Toxicology" vom 23. bis 28. April 2005 in Louisville, Kentucky.

Steimer W, Bachofer J, **Popp J**, Heres S, Kissling W, Leucht S. Intermediate metabolizers and increased risk of adverse events in psychiatric in-patients. An update including all relevant alleles with reduced function and applying gene-dose for analysis. *Therapeutic Drug Monitoring* 2005; 27 (2): 254-255. "9th International Congress of Therapeutic Drug-Monitoring and Clinical Toxicology" vom 23. bis 28. April 2005 in Louisville, Kentucky.

Steimer W, **Popp J**, Zöpf K, von Amelunxen S, Messner B, Pfeiffer H, Kissling W, Leucht S. HT-2A –1438 G/A promotor polymorphism: Fast real time PCR method and lack of association with response or side effects in amitriptyline treated inpatients. *Clin Chem* 2004; 50 (6): A120.

Steimer W, Messner B, **Popp J**, Leucht S. Pharmacogenetics of drug targets in psychoactive drug therapy. In Wong SHY, Linder MW, Valdes R eds. *Principles of clinical pharmacogenomics and introduction to pharmacoproteomics*. AACC press, 2005: 25/1-18.

Ausgezeichnete Kongressbeiträge (Preise/Awards):

„Distinguished Abstract Award“:

Steimer W, Bachofer J, **Popp J**, Messner B, Heres S, Kissling W, Leucht S. Prospective CYP2D6 genotyping in psychiatric inpatients. A preliminary report. Clin Chem 2004; 50 (6): A136. Der Abstract zum Poster wurde anlässlich des „AACC Annual Meetings 2004“ vom 25.-29. Juli in Los Angeles von der „National Academy of Clinical Biochemistry“ (NACB) mit einem „Distinguished Abstract Award“ (einer von 16 Abstracts, die aus etwa 650 ausgewählt wurden) ausgezeichnet.

„Best Poster in TDM“:

Steimer W, **Popp J**, Bachofer J, Müller T, Heres S, Kissling W, Leucht S. The dopamine D4 receptor 48 base pair repeat polymorphism influences antipsychotic induced body weight gain. A preliminary report. Therapeutic Drug Monitoring 2005; 27 (2): 242. Dieser Kongress-Beitrag wurde beim „9th International Congress of Therapeutic Drug-Monitoring and Clinical Toxicology“ vom 23. bis 28. April 2005 in Louisville, Kentucky unter 200 Postern als bester Beitrag in „Therapeutic Drug Monitoring (TDM)“ ausgezeichnet (Best Poster in TDM).

“Molecular Pathology Division Award“:

Steimer W, **Popp J**, Bachofer J, Müller T, Kissling W, Leucht S: Influence of polymorphisms in the HTT gene on the development of side effects under antidepressant therapy. Clinical Chemistry 2005; 51: A185-A185. XIX International Congress of Clinical Chemistry 2005, IFCC and 2005 AACC Annual Meeting, Orlando, Florida. Dieser Kongress-Beitrag wurde mit dem „Molecular Pathology Division Award for Outstanding Contributions to the Field of Molecular Pathology or Pharmacogenetics“ ausgezeichnet.

12 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München unter Anleitung von Herrn PD Dr. Steimer angefertigt.

Für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung, die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge sowie und die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft danke ich Herrn PD Dr. Steimer recht herzlich.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dieter Neumeier für die Möglichkeit der Durchführung der Dissertation an dem von ihm geleiteten Institut.

Herrn PD Dr. Stefan Leucht danke ich insbesondere für die Betreuung der Studie an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Klinikums rechts der Isar, sowie die ständige Hilfsbereitschaft bei medizinischen und klinischen Fragestellungen. Mein Dank für die Studienbetreuung gilt auch Herrn Dr. W. Kissling, Herrn Dr. S. Heres, sowie allen an der Datengenerierung beteiligten Ärzten der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie.

Für die Unterstützung bei der Durchführung des Promotionsverfahrens möchte ich Herrn Prof. Dr. Hrabé de Angelis danken.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner Doktoranden-Kollegin Frau Julia Bachofer und bei meinem Doktoranden-Kollegen Herrn Tobias Müller für ihre Kollegialität, ihre große Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie ihre engagierte Mitarbeit bedanken. Für die ausgezeichnete Unterstützung und die nette Arbeitsatmosphäre im PCR-Labor des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie danke ich Frau Anita Schreiegg, Frau Barbara Wallner und Frau Christine Uhlich. Herrn Dr. Burkhardt Müller danke ich für die Einführung in die PCR-Analytik und die Entwicklung des PCR-Design-Programms NukWork.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Freundin Susanne, die mir bei allen Höhen und Tiefen im Laufe meiner Doktorandenzeit zur Seite standen und die trotzdem mit Liebe dafür sorgten, das ich nicht vergaß, das es noch andere wichtige Dinge im Leben gibt.

Meinen Eltern möchte ich auch ganz besonders dafür danken, dass sie mir die Durchführung der Dissertation überhaupt ermöglicht haben.

13 Anhang

Tabelle 61: Geschlecht, Alter und CGI 1 zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme bei Patienten mit depressiver Episode und Genotyp

HTTLPR	I/I (n=54)	I/s (n=50)	s/s (n=23)
Geschlecht (w)	63,0 %	60,0 %	47,8 %
Alter (Jahre)	50,4 (+/-14,7)	46,7 (+/-17,1)	49,1 (+/-16,2)
CGI 1 Aufnahme	5,83 (+/-0,82)	5,88 (+/-0,92)	5,78 (+/-0,90)
HTT-VNTR	2.10/2.10 (n=47)	2.10/2.12 (n=58)	2.12/2.12 (n=21)
Geschlecht (w)	58,3 %	60,3 %	57,1 %
Alter (Jahre)	47,1 (+/-17,1)	50,2 (+/-15,6)	48,1 (+/-14,2)
CGI 1 Aufnahme	5,69 (+/-0,88)	5,93 (+/-0,90)	5,95 (+/-0,74)
HT _{2A} -1438 G/A	G/G (n=46)	G/A (n=52)	A/A (n=28)
Geschlecht (w)	67,4 %	54,7 %	53,6 %
Alter (Jahre)	48,2 (+/-17,3)	50,5 (+/-14,3)	46,2 (+/-16,7)
CGI 1 Aufnahme	5,65 (+/-0,82)	5,96 (+/-0,76)	5,93 (+/-1,09)
HT _{2A} His452Tyr	His/His (n=105)	His/Tyr und Tyr/Tyr (n=22)	
Geschlecht (w)	59,0 %	59,1 %	
Alter (Jahre)	48,5 (+/-15,4)	48,9 (+/-18,5)	
CGI 1 Aufnahme	5,85 (+/-0,88)	5,86 (+/-0,85)	
HTT-Risk	Low	High	Medium
Geschlecht (w)	61,0 %	59,6 %	55,9 %
Alter (Jahre)	51,5 (+/-13,9)	47,5 (+/-16,3)	47,2 (+/-17,5)
CGI 1 Aufnahme	5,90 (+/-0,83)	5,88 (+/-0,86)	5,71 (+/-0,94)

Tabelle 62: Geschlecht, Alter und CGI 1 zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme bei Patienten die mit HTT-blockierenden Antidepressiva behandelt wurden und Genotyp

HTTLPR	I/I	I/s	s/s
Geschlecht (w)	61,1 %	70,0 %	50,0 %
Alter (Jahre)	50,0 (+/-14,5)	45,5 (+/-16,9)	42,7 (+/-11,5)
CGI 1 Aufnahme	5,78 (+/-0,81)	5,55 (+/-0,89)	5,67 (+/-0,52)

HTT-VNTR	2.10/2.10	2.10/2.12	2.12/2.12
Geschlecht (w)	71,1 %	63,2 %	54,5 %
Alter (Jahre)	43,1 (+/-15,4)	49,9 (+/-15,0)	46,8 (+/-15,8)
CGI 1 Aufnahme	5,50 (+/-0,76)	5,89 (+/-0,94)	5,45 (+/-0,52)
HT _{2A} -1438 G/A	G/G	G/A	A/A
Geschlecht (w)	52,9 %	63,2 %	87,5 %
Alter (Jahre)	45,9 (+/-16,1)	50,1 (+/-12,3)	41,9 (+/-19,5)
CGI 1 Aufnahme	5,41 (+/-0,94)	5,84 (+/-0,60)	5,75 (+/-0,89)
HTT-Risk	Low	High	Medium
Geschlecht (w)	56,3 %	68,8 %	66,7 %
Alter (Jahre)	50,4 (+/-13,7)	46,9 (+/-17,1)	42,4 (+/-14,5)
CGI 1 Aufnahme	5,81 (+/-0,83)	5,63 (+/-0,81)	5,50 (+/-0,80)

Tabelle 63: PDS-D Response bei den mit Mirtazapin behandelten depressiven Patienten und Genotyp

HTTLPR	I/I	I/s	s/s	p
Responder	44,0 % (11 von 25)	47,1 % (8 von 17)	50,0 % (3 von 6)	1,000*
HTT-VNTR	2.10/2.10	2.10/2.12	2.12/2.12	
Responder	41,2 % (7 von 17)	50,0 % (11 von 22)	44,4 % (4 von 9)	0,928*
HT _{2A} -1438 G/A	G/G	G/A	A/A	
Responder	33,3 % (5 von 15)	54,2 % (13 von 24)	44,4 % (4 von 9)	0,473*

*Fisher-Exact-Test

Tabelle 64: CGI 2 Response bei den mit Mirtazapin behandelten depressiven Patienten und Genotyp

HTTLPR	I/I	I/s	s/s	p
Responder	61,3 % (19 von 31)	68,0 % (17 von 25)	77,8 % (7 von 9)	0,680*
HTT-VNTR	2.10/2.10	2.10/2.12	2.12/2.12	
Responder	68,2 % (15 von 22)	67,6 % (23 von 34)	55,6 % (6 von 9)	0,820*
HT _{2A} -1438 G/A	G/G	G/A	A/A	
Responder	60,9 % (14 von 23)	70,0 % (21 von 30)	66,7 % (8 von 12)	0,789*

*Fisher-Exact-Test

Tabelle 65: Nebenwirkungen bei den mit Mirtazapin behandelten depressiven Patienten und Genotyp

HTTLPR	l/l	l/s	s/s	p
Patienten mit NWs	32,3 % (10 von 31)	4,0 % (1 von 25)	22,2 % (2 von 9)	0,020*
HTT-VNTR	2.10/2.10	2.10/2.12	2.12/2.12	
Patienten mit NWs	22,7 % (5 von 22)	23,5 % (8 von 34)	0,0 % (0 von 9)	0,349*
HT _{2A} -1438 G/A	G/G	G/A	A/A	
Patienten mit NWs	17,4 % (4 von 23)	23,3 % (7 von 30)	16,7 % (2 von 12)	0,920*
HTT-Risk-Gruppe	Low	Medium	High	
Patienten mit NWs	31,8 % (7 von 22)	12,9 % (4 von 31)	16,7 % (2 von 12)	0,251*

*Fisher-Exact-Test

Tabelle 66: Geschlecht, Alter und CGI 1 zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme bei den mit Mirtazapin behandelten depressiven Patienten und Genotyp

HTTLPR	l/l	l/s	s/s
Geschlecht (w)	59,4 %	52,0 %	60,0 %
Alter (Jahre)	50,5 (+/-14,9)	49,2 (+/-15,8)	56,5 (+/-15,0)
CGI 1 Aufnahme	5,75 (+/-0,76)	5,92 (+/-0,76)	5,90 (+/-0,88)
HTT-VNTR	2.10/2.10	2.10/2.12	2.12/2.12
Geschlecht (w)	52,2 %	55,9 %	70,0 %
Alter (Jahre)	50,5 (+/-16,7)	51,8 (+/-15,2)	48,9 (+/-12,4)
CGI 1 Aufnahme	5,57 (+/-0,84)	5,97 (+/-0,87)	6,00 (+/-0,67)
HT _{2A} -1438 G/A	G/G	G/A	A/A
Geschlecht (w)	75,0 %	50,0 %	38,5 %
Alter (Jahre)	50,3 (+/-16,7)	53,1 (+/-13,7)	46,8 (+/-15,7)
CGI 1 Aufnahme	5,75 (+/-0,85)	5,93 (+/-0,79)	5,77 (+/-1,01)
HTT-Risk	Low	High	Medium
Geschlecht (w)	56,5 %	61,3 %	46,3 %
Alter (Jahre)	51,0 (+/-14,5)	50,6 (+/-14,9)	51,6 (+/-18,1)
CGI 1 Aufnahme	5,87 (+/-0,76)	5,90 (+/-0,87)	5,62 (+/-0,96)

Tabelle 67: Aufenthaltsdauer der Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis und Genotyp

DRD2 –141C ins/del	ins/ins (n=117)	ins/del und del/del (n=24+1)		p-Wert
Aufenthaltsdauer	58,5 Tage (+/-39,44)	57,3 Tage (+/-41,92)		0,850**
DRD2 TaqI	A1/A1 (n=8)	A1/A2 (n=42)	A2/A2 (n=92)	
Aufenthaltsdauer	66,8 Tage (+/-28,6)	56,6 Tage (+/-46,3)	57,5 Tage (+/-37,4)	0,416*
DRD2 Ser311Cys	Ser/Ser (n=135)	Ser/Cys (n=7)		
Aufenthaltsdauer	58,0 Tage (+/-40,2)	53,0 Tage (+/-28,1)		0,947**
DRD3 Ser9Gly	Ser/Ser (n=71)	Ser/Gly (n=60)	Gly/Gly (n=11)	
Aufenthaltsdauer	59,2 Tage (+/-38,7)	57,5 Tage (+/-42,3)	49,3 Tage (+/-31,5)	0,781*
DRD4 13 bp Del	A1/A1 (n=134)	A1/A2(=del) (n=8)		
Aufenthaltsdauer	56,0 Tage (+/-37,0)	87,75 Tage (+/-67,1)		0,092**
DRD4 12 bp Wdh	2x/2x (n=106)	2x/1x und 1x/1x (n=35+1)		
Aufenthaltsdauer	54,2 Tage (+/-34,0)	64,2 Tage (+/-47,7)		0,265**
DRD4 48 bp Wdh	S/S (n=99)	S/L (n=39)	L/L (n=4)	
Aufenthaltsdauer	60,0 Tage (+/-42,9)	54,6 Tage (+/-31,3)	32,5 Tage (+/-9,9)	0,331*
HT _{2A} –1438 G/A	G/G (n=43)	G/A (n=76)	A/A (n=23)	
Aufenthaltsdauer	52,8 Tage (+/-30,3)	61,7 Tage (+/-43,8)	53,9 Tage (+/-27,9)	0,571*
HT _{2A} His452Tyr	His/His (n=115)	His/Tyr und Tyr/Tyr (n=25+2)		
Aufenthaltsdauer	58,1 Tage (+/-37,1)	56,3 Tage (+/-27,1)		0,666**
HT _{2C} Cys23Ser	Cys/Cys (w; n=55) bzw. Cys (m; n=53)	Cys/Ser (n=21)	Ser/Ser (w; n=2) bzw. Ser (m; n=9)	
Aufenthaltsdauer (w)	57,5 Tage (+/-34,6)	62,0 Tage (+/-57,7)	46,0 Tage (+/-9,9)	0,848*
Aufenthaltsdauer (m)	57,28 Tage (+/-38,9)		54,7 Tage (+/-30,8)	0,914**

*Kruskal-Wallis-Test

**Mann-Whitney-U-Test

Tabelle 68: PDS-P Response bei den Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis und Genotyp

DRD2 –141C ins/del	ins/ins	ins/del und del/del		p-Wert
Responder	45,7 % (37 von 81)	52,4 % (11 von 21)		0,630*
DRD2 TaqI	A1/A1	A1/A2	A2/A2	
Responder	60,0 % (3 von 5)	50,0 % (15 von 30)	44,8 % (30 von 67)	0,736*
DRD2 Ser311Cys	Ser/Ser	Ser/Cys		
Responder	46,9 % (45 von 96)	50,0 % (3 von 6)		1,000*
DRD3 Ser9Gly	Ser/Ser	Ser/Gly	Gly/Gly	
Responder	37,7 % (19 von 51)	57,1 % (24 von 42)	55,6 % (5 von 9)	0,146*
DRD4 13bp Del	A1/A1	A1/A2		
Responder	47,7 % (45 von 95)	42,9 % (3 von 7)		1,000*
DRD4 12bp Wdh	2x/2x	2x/1x		
Responder	48,1 % (37 von 77)	44,4 % (11 von 25)		0,452*
DRD4 48bp Wdh	S/S	S/L	L/L	
Responder	44,9 % (31 von 69)	54,8 % (17 von 31)	0 % (0 von 2)	0,320*
HT _{2A} –1438 G/A	G/G	G/A	A/A	
Responder	60,7 % (17 von 28)	39,7 % (23 von 58)	50,0 % (8 von 16)	0,205*
HT _{2A} His452Tyr	His/His	His/Tyr und Tyr/Tyr		
Responder	46,9 % (38 von 81)	47,6 % (10 von 21)		1,000*
HT _{2C} Cys23Ser	Cys/Cys (w) bzw Cys (m)	Cys/Ser	Ser/Ser (w) bzw. Ser (m)	
Responder (w)	50,0 % (21 von 42)	60,0 % (6 von 10)	100,0 % (2 von 2)	0,496*
Responder (m)	41,5 % (17 von 41)		28,6 % (2 von 7)	0,687*

*Fisher-Exact-Test

Tabelle 69: CGI 2 Response bei den Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis und Genotyp

DRD2 –141C ins/del	ins/ins	ins/del und del/del		p-Wert*
Responder	60,2 % (69 von 113)	39,1 % (9 von 23)		0,070
DRD2 TaqI	A1/A1	A1/A2	A2/A2	
Responder	50,0 % (4 von 8)	63,4 % (26 von 41)	54,0 % (47 von 87)	0,579
DRD2 Ser311Cys	Ser/Ser	Ser/Cys		
Responder	55,4 % (72 von 130)	83,3 % (5 von 6)		0,233
DRD3 Ser9Gly	Ser/Ser	Ser/Gly	Gly/Gly	
Responder	58,8 % (40 von 68)	56,1 % (32 von 57)	45,5 % (5 von 11)	0,726
DRD4 13 bp Del	A1/A1	A1/A2		
Responder	56,3 % (72 von 128)	62,5 % (5 von 8)		1,000
DRD4 12 bp Wdh	2x/2x	2x/1x und 1x/1x		
Responder	57,4 % (58 von 101)	54,3 % (19 von 35)		0,844
DRD4 48 bp Wdh	S/S	S/L	L/L	
Responder	57,4 % (54 von 94)	52,6 % (20 von 38)	75,0 % (3 von 4)	0,699
HT _{2A} –1438 G/A	G/G	G/A	A/A	
Responder	61,0 % (25 von 41)	53,4 % (39 von 73)	59,1 % (13 von 22)	0,728
HT _{2A} His452Tyr	His/His	His/Tyr und Tyr/Tyr		
Responder	57,8 % (63 von 109)	51,9 % (14 von 27)		0,831
HT _{2C} Cys23Ser	Cys/Cys (w) bzw Cys (m)	Cys/Ser	Ser/Ser (w) bzw. Ser (m)	
Responder (w)	58,2 % (32 von 55)	57,1 % (12 von 21)	50,0 % (1 von 2)	1,000
Responder (m)	57,1 % (28 von 49)		44,4 % (4 von 9)	0,365

*Fisher-Exact-Test

Tabelle 70: Nebenwirkungen bei den Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis und Genotyp

DRD2 –141C ins/del	ins/ins	ins/del und del/del		p-Wert*
Patienten mit NWS	31,9 % (37 von 116)	28,0 % (7 von 25)		0,814
DRD2 TaqI	A1/A1	A1/A2	A2/A2	

Patienten mit NWs	37,5 % (3 von 8)	35,7 % (15 von 42)	28,6 % (26 von 91)	0,643
DRD2 Ser311Cys	Ser/Ser	Ser/Cys		
Patienten mit NWs	32,1 % (43 von 134)	14,3 % (1 von 7)		0,435
DRD3 Ser9Gly	Ser/Ser	Ser/Gly	Gly/Gly	
Patienten mit NWs	29,6 % (21 von 71)	30,5 % (18 von 59)	45,5 % (5 von 11)	0,571
DRD4 13 bp Del	A1/A1	A1/A2		
Patienten mit NWs	30,8 % (41 von 133)	37,5 % (3 von 8)		0,705
DRD4 12 bp Wdh	2x/2x	2x/1x und 1x/1x		
Patienten mit NWs	30,5 % (32 von 105)	33,3 % (12 von 36)		0,835
DRD4 48 bp Wdh	S/S	S/L	L/L	
Patienten mit NWs	32,7 % (32 von 98)	30,8 % (12 von 39)	0 % (0 von 4)	0,552
HT _{2A} -1438 G/A	G/G	G/A	A/A	
Patienten mit NWs	35,7 % (15 von 42)	31,6 % (24 von 76)	21,7 % (5 von 23)	0,529
HT _{2A} His452Tyr	His/His	His/Tyr und Tyr/Tyr		
Patienten mit NWs	29,8 % (34 von 114)	37,0 % (10 von 27)		0,493
HT _{2C} Cys23Ser	Cys/Cys (w) bzw Cys (m)	Cys/Ser	Ser/Ser (w) bzw. Ser (m)	
Patienten mit NWs (w)	32,1 % (18 von 56)	23,8 % (5 von 21)	0,0 % (0 von 2)	0,698
Patienten mit NWs (m)	30,2 % (16 von 53)		55,6 % (5 von 9)	0,251

*Fisher-Exact-Test

Tabelle 71: Geschlecht, Alter und CGI 1 zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme bei Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis und Genotyp

DRD2 -141C ins/del	ins/ins	ins/del und del/del	
Geschlecht (w)	52,0 %	48,0 %	
Alter (Jahre)	37,9 (+/-13,6)	34,88 (+/-12,7)	
CGI 1 Aufnahme	5,99 (+/-1,01)	6,00 (+/-1,00)	
DRD2 TaqI	A1/A1	A1/A2	A2/A2
Geschlecht (w)	75,0 %	52,4	55,4
Alter (Jahre)	38,6 (+/-14,5)	35,8 (+/-12,7)	38,0 (+/-13,8)
CGI 1 Aufnahme	5,50 (+/-0,76)	6,00 (+/-1,19)	6,03 (+/-0,93)
DRD2 Ser311Cys	Ser/Ser	Ser/Cys	

Geschlecht (w)	55,6 %	57,1 %	
Alter (Jahre)	37,1 (+/-14,5)	42,3 (+/-15,3)	
CGI 1 Aufnahme	5,99 (+/-1,01)	6,00 (+/-1,00)	
DRD3 Ser9Gly	Ser/Ser	Ser/Gly	Gly/Gly
Geschlecht (w)	59,2 %	50,0 %	63,6 %
Alter (Jahre)	38,0 (+/-13,8)	36,1 (+/-12,8)	40,5 (+/-14,8)
CGI 1 Aufnahme	6,10 (+/-1,05)	5,86 (+/-0,99)	6,00 (+/-0,78)
DRD4 13bp Del	A1/A1	A1/A2	
Geschlecht (w)	55,2 %	62,5 %	
Alter (Jahre)	37,6 (+/-13,6)	33,5 (+/-13,6)	
CGI 1 Aufnahme	5,97 (+/-1,03)	6,38 (+/-0,52)	
DRD4 12bp Wdh	2x/2x	2x/1x	
Geschlecht (w)	55,7 %	57,1 %	
Alter (Jahre)	38,3 (+/-14,0)	34,6 (+/-11,3)	
CGI 1 Aufnahme	5,99 (+/-0,97)	6,00 (+/-1,14)	
DRD4 48bp Wdh	S/S	S/L	L/L
Geschlecht (w)	57,6 %	51,3 %	50,0 %
Alter (Jahre)	37,7 (+/-13,6)	36,3 (+/-12,8)	40,3 (+/-18,0)
CGI 1 Aufnahme	6,04 (+/-0,92)	5,82 (+/-1,23)	6,50 (+/-0,58)
HT _{2A} -1438 G/A	G/G	G/A	A/A
Geschlecht (w)	60,5 %	50,0 %	65,2 %
Alter (Jahre)	37,3 (+/-13,7)	37,3 (+/-13,3)	38,0 (+/-13,9)
CGI 1 Aufnahme	6,02 (+/-0,99)	6,00 (+/-1,08)	5,91 (+/-0,85)
HT _{2A} His452Tyr	His/His	His/Tyr und Tyr/Tyr	
Geschlecht (w)	54,8 %	59,3 %	
Alter (Jahre)	36,3 (+/-12,8)	42,1 (+/-15,2)	
CGI 1 Aufnahme	6,04 (+/-0,94)	5,81 (+/-1,28)	
HT _{2C} Cys23Ser	Cys/Cys	Cys/Ser	Ser/Ser
Geschlecht (w)	51,4 %	91,3 %	20,0 %
Alter (Jahre)	37,22 (+/-13,7)	40,9 (+/-12,8)	31,2 (+/-10,3)
CGI 1 Aufnahme	5,99 (+/-1,01)	6,13 (+/-1,14)	5,70 (+/-0,68)

Tabelle 72: Anteil der Raucher, Geschlecht, Alter und CGI 1 zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme bei Patienten mit Erkrankungen aus dem schizophrenen Formenkreis, die mit Olanzapin behandelt wurden und Genotyp

DRD3 Ser9Gly	Ser/Ser	Ser/Gly	Gly/Gly
Geschlecht (w)	42,3 %	52,6 %	100 %
Alter (Jahre)	33,4 (+/-11,2)	37,8 (+/-15,4)	37,0 (+/-14,0)
CGI 1 Aufnahme	6,08 (+/-1,09)	6,16 (+/-1,21)	6,50 (+/-1,00)
Raucher	42,3 %	47,4 %	75,0 %
HT _{2A} -1438 G/A	G/G	G/A	A/A
Geschlecht (w)	46,7 %	50,0 %	62,5 %
Alter (Jahre)	33,5 (+/-11,6)	33,7 (+/-11,3)	44,8 (+/-18,0)
CGI 1 Aufnahme	6,33 (+/-0,72)	6,04 (+/-0,72)	6,13 (+/-0,99)
Raucher	60,0 %	34,6 %	62,5 %
MDR 1 C3435T	C/C	C/T	T/T
Geschlecht (w)	55,6 %	45,8 %	56,3 %
Alter (Jahre)	30,6 (+/-6,86)	34,8 (+/-13,7)	39,2 (+/-14,3)
CGI 1 Aufnahme	6,22 (+/-0,97)	5,88 (+/-1,30)	6,50 (+/-0,82)
Raucher	44,4 %	45,8 %	50,0 %