



Technische Universität München

Fakultät für Medizin, Lehrstuhl Humangenetik

Max-Planck-Institut für Psychiatrie München



MAX-PLANCK-GESellschaft

SLC6A15 als Biomarker für depressive Störungen und seine Auswirkungen auf den Stresshormonhaushalt

Wiebke Lisanne Knop

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ.-Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Bertram Müller-Myhsok
2. Univ.-Prof. Dr. Thomas A. Meitinger

Die Dissertation wurde am 05.03.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.07.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Einleitung	9
2.1	Depressive Störungen	9
2.2	Biomarker in der Psychiatrie	15
2.2.1	Bildgebung	16
2.2.2	Neuroendokrine Tests	17
2.2.3	Immunsystem	18
2.2.4	Genexpression	19
2.3	Die Rolle von SLC6A15 im zentralen Nervensystem (ZNS)	20
2.4	SLC6A15 und depressive Störungen	21
3	Zielsetzung der Arbeit	24
3.1	SLC6A15-mRNA-Expression in peripherem Blut als Biomarker für Depression	24
3.1.1	MARS: <i>SLC6A15</i> als Biomarker	24
3.1.2	Dex-Suppression: Wirkung von Dex auf <i>SLC6A15</i> -mRNA-Expression	25
3.2	Rs1545843-Genotypabhängige endokrine Regulation	25
3.2.1	MARS: Rs1545843 und HPA-Achsenregulation	25
3.2.2	Dex-Suppression: Rs1545843 und HPA-Achsenregulation	26
4	Material- und Methodenteil	27
4.1	Etablierung der RT-qPCR bei MARS- und Dex-Suppression-Probanden zur Entwicklung eines SLC6A15 Biomarkers	27
4.1.1	Herstellung der Test-cDNA	27
4.1.2	Einführung in herkömmliche PCRs	28
4.1.3	MARS: RT-qPCR	28
4.1.3.1	RT-qPCR: Primerdesign	30
4.1.3.2	RT-qPCR: Test-PCR	31
4.1.4	Nested PCR	32
4.1.4.1	Nested PCR: Primerdesign	33
4.1.4.2	Nested PCR: PCR	33
4.1.4.3	Nested PCR: Gelelektrophorese	34
4.1.4.4	Nested PCR: RT-qPCR	34
4.1.5	Dex-Suppression	35

4.1.5.1	Dex-Suppression: Auswahlkriterien für die Probanden	35
4.1.5.2	Dex-Suppression: Fragebögen	36
4.1.5.3	Dex-Suppression: Ablauf des Experiments	36
4.1.5.4	Dex-Suppression: Messung von Cortisol und ACTH	37
4.1.5.5	Dex-Suppression: DNA-Extraktion	38
4.1.5.6	Dex-Suppression: RNA-Extraktion	38
4.2	Datenanalyse zum Zusammenhang zwischen Stresshormonhaushalt und rs1545843-	
	Risikogenotyp	38
4.2.1	MARS: Rs1545843 und Dex-/CRH-Test bei Aufnahme von depressiven Patienten	38
4.2.1.1	MARS: Ablauf des Dex-/CRH-Tests	39
4.2.1.2	MARS: Genotypisierung	39
4.2.1.3	MARS: Hardy-Weinberg-Prinzip (HWP)	39
4.2.1.4	MARS: GLM mit Messwiederholungen	40
4.2.2	Dex-Suppression: Rs1545843 und Cort-/ACTH-Ausschüttung nach Dex-Einnahme bei gesunden Probanden	41
4.2.2.1	Dex-Suppression: Genotypisierung	41
4.2.2.2	Dex-Suppression: GLM mit Messwiederholungen	41
5	Ergebnisteil	42
5.1	Etablierung der RT-qPCR bei MARS- und Dex-Suppression-Probanden zur Entwicklung eines SLC6A15 Biomarkers	42
5.1.1	MARS: Test-RT-qPCR	42
5.1.2	MARS: Nested PCR	43
5.1.2.1	Nested PCR: PCR /Gelelektrophorese	43
5.1.2.2	Nested PCR: RT-qPCR	45
5.1.3	Dex-Suppression	46
5.2	Datenanalyse zum Zusammenhang zwischen Stresshormonhaushalt und rs1545843-	
	Genotypen	47
5.2.1	MARS: Rs1545843 und Dex-/CRH-Test bei Aufnahme von depressiven Patienten	47
5.2.1.1	MARS: Genotypisierung	47
5.2.1.2	MARS: Deskriptive Statistik	47
5.2.1.3	MARS: GLM mit Messwiederholungen	49
5.2.2	Dex-Suppression: Rs1545843 und Cortisol-/ACTH-Ausschüttung nach Dex-Einnahme bei gesunden Probanden	51
5.2.2.1	Dex-Suppression: Genotypisierung	51
5.2.2.2	Dex-Suppression: Deskriptive Statistik	51
5.2.2.3	Dex-Suppression: GLM mit Messwiederholungen	52

6	Diskussion	54
6.1	Etablierung der RT-qPCR zur Entwicklung eines SLC6A15 Biomarkers	54
6.2	Datenanalyse zur Beurteilung des Stresshormonhaushaltes in Abhängigkeit des rs1545843-Risikogenotyps	59
7	Zusammenfassung	68
8	Literaturverzeichnis	69
9	Anhang	78
9.1	Datenanalyse zum Zusammenhang zwischen Stresshormonhaushalt und rs1545843-Risikogenotyp	78
9.1.1	MARS-Projekt	78
9.1.1.1	MARS: Aufteilung Risikogenotyp (AA) vs. nicht-Risikogenotyp (AG + GG)	79
9.1.1.2	MARS: Aufteilung AA vs. AG vs. GG	83
9.1.2	Dex-Suppression	88
9.1.2.1	Dex-Suppression: Aufteilung Risikogenotyp (AA) vs. nicht-Risikogenotyp (AG + GG)	89
9.1.2.2	Dex-Suppression: Aufteilung AA vs. AG vs. GG	93
10	Danksagung	97

1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACE	<i>angiotensin-converting enzyme</i> (Angiotensin-konvertierendes Enzym)
ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
AUC	<i>area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)
BDI	Beck-Depressions-Inventar
BDNF	<i>brain derived neurotropic factor</i> (vom Gehirn stammender neurotropher Faktor)
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CD4 ⁺ -Zellen	<i>cluster of differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen) 4-positive Zellen
cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre) DNA
CIDI	<i>Composite International Diagnostic Interview</i>
CNV	<i>copy number variation</i> (Kopierzahlvariation)
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CP	crossing point
CRH	<i>corticotropin-releasing hormone</i> (Corticoliberin)
CRHR1	CRH Rezeptor 1
Dex	Dexamethason
d.h.	das heißt
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DSM	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i> (diagnostischer und statistischer Leitfaden psychischer Störungen)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELS	<i>early life stress</i> (Frühkindlicher Stress)
et al.	<i>et altera</i>

EtBr	Ethidiumbromid
<i>FKBP5</i>	<i>FK506</i> bindendes Protein 5
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GLM	<i>general linear model</i> (allgemeines lineares Modell)
Glx	Glutamat + Glutamin
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HAM-D	<i>Hamilton Rating Scale for Depression</i> (Hamilton-Skala)
HAM-D21	<i>Hamilton Rating Scale for Depression</i> , Version mit 21 Fragen
¹ H-NMR	<i>proton nuclear magnetic resonance spectroscopy</i> (Protonen-Kernspinresonanzspektroskopie)
HPA-Achse	<i>hypothalamus-pituitary-adrenal-axis</i> (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse)
5-HT1A	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor, Typ 1A
HWE	<i>Hardy-Weinberg-equilibrium</i> (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht)
HWP	Hardy-Weinberg-Prinzip
ICD-10-Kriterien	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i> , 10. Auflage
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
i.v.	intravenös
KHK	koronare Herzkrankheit
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie
LD	<i>linkage disequilibrium</i> (Kopplungsungleichgewicht)
LPS	Lipopolysaccharid
MAO	Monoaminoxidase
MANOVA	multivariate ANOVA
MARS	<i>Munich Antidepressant Response Signature</i>
MDD	<i>major depressive disorder</i> (depressive Störung)
Min.	Minuten
ml	Milliliter

MPI	Max-Planck-Institut
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
MRT	Magnetresonanztomographie
NAA	N-Acetyl-Aspartat
NAAG	N-Acetylaspartyglutamat
NARI	norepinephrine reuptake inhibitor (selektiver Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer)
NaSSA	Noradrenerges und spezifisch serotonerges Antidepressivum
NEB	<i>New England Biolabs</i>
ng	Nanogramm
nt	Nukleotid
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
p.o.	<i>per os</i>
PP	Phasenprophylaktika
PTSD	<i>posttraumatic stress disorder</i> (posttraumatische Belastungsstörung)
p-Wert	<i>probability-value</i> (Signifikanzwert)
RIA	Radioimmunoassay
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rs	„ <i>reference SNP</i> “ <i>number</i> (Referenznummer der Einzelnukleotidpolymorphismen)
RT-qPCR	<i>real time quantitative PCR</i> (Echtzeit quantitative PCR)
s.	siehe
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
<i>SLC6A4</i>	<i>solute carrier family 6, member 4</i>
<i>SLC6A15</i>	<i>solute carrier family 6, member 15</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SNRI	<i>serotonin-norepinephrin reuptake inhibitor</i> (Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer)
s.o.	siehe oben
SPECT	<i>single photon emission computed tomography</i> (Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie)

SSRE	<i>selective serotonin reuptake enhancer</i> (selektiver Serotonin Wiederaufnahmeverstärker)
SSRI	<i>selective serotonin reuptake inhibitor</i> (selektiver Serotonin Wiederaufnahmehemmer)
T	Thymin
TATA	Thymin-Adenin-Thymin-Adenin
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	thermostabile Polymerase
<i>TBP</i>	TATA bindendes Protein
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TZA	Trizyklisches Antidepressivum
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter

2 Einleitung

Depressive Störungen (*major depressive disorder*, MDD) gehören zu den häufigsten psychiatrischen Erkrankungen weltweit - mit zunehmender Tendenz. Statistiken von Krankenkassen weisen auf, dass diese Diagnose inzwischen als Ursache von Krankschreibungen noch vor Volks- oder Zivilisationskrankheiten wie Diabetes mellitus und koronarer Herzerkrankung (KHK) steht. Außerdem stellt MDD einen ernstzunehmenden Risikofaktor für diverse Erkrankungen wie z.B. (zum Beispiel) Herzinfarkt, Bluthochdruck, Schlaganfall und Diabetes mellitus dar. Umso wichtiger sind neue Erkenntnisse bezüglich der Ursachen von MDD, besserer Diagnosemöglichkeiten, differentialdiagnostischer Abklärung und effektiverer Therapien. Die vorliegende Arbeit dient der Suche nach neuen Biomarkern und der Aufklärung der Pathophysiologie der MDD. Eine Einführung in Thematik, Zielsetzung, angewandte Methoden und deren Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

2.1 Depressive Störungen

MDD sind mit einer Lebenszeitprävalenz von 15-17 % (Prozent) sehr häufige, komplexe und teilweise erblich bedingte psychiatrische Erkrankungen (Ebmeier, Donaghey, & Steele, 2006; Levinson, 2006).

Sie werden in der Psychiatrie den affektiven Störungen zugeordnet, die sich durch klinisch relevante Veränderungen der Stimmungslage auszeichnen. Hauptsymptome einer MDD sind laut *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10)*, die von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, WHO) herausgegeben wurde: Niedergeschlagenheit, Interessenverlust, Freudlosigkeit, Antriebsmangel und erhöhte Ermüdbarkeit. Hinzu kommt eine hohe Selbstmordrate (2% der Patienten mit einer diagnostizierten MDD begehen Suizid) (Bostwick & Pankratz, 2000) (Butler et al., 2010) (et al = *et altera*).

Depressive Störungen spielen auch sozioökonomisch eine große Rolle. So führen diese Erkrankungen zu einer deutlich verminderten Teilnahme am gesellschaftlichen Leben und sind weltweit der häufigste Grund für Arbeitsunfähigkeit (Ebmeier et al., 2006) (Ustun, Ayuso-Mateos, Chatterji, Mathers, & Murray, 2004).

Es handelt sich folglich um eine Erkrankung mit weitreichenden Auswirkungen auf das individuelle Wohlbefinden der Patienten, ihr Leben in der Gesellschaft und die Gesellschaft als Ganzes (Arbeitsausfallkosten für die Wirtschaft, Sozialkosten für die Behandlung der Krankheit etc.).

Diagnostik

In der Diagnostik können MDD-Patienten meist keine eindeutigen biologischen Symptome zugeordnet werden, sodass es keinen sicheren Bluttest zur Diagnose einer depressiven Störung gibt. Stattdessen wird die Diagnose anhand von standardisierten Fragebögen (*Hamilton Rating Scale for Depression* (HAM-D), Beck-Depressions-Inventar (BDI) etc.), festgelegten Diagnosekriterien (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (DSM)-Kriterien in den USA und ICD-10-Kriterien in Europa) und Betrachtung von Krankheitsverlauf, Symptomatik und Erscheinungsbild des Patienten gestellt. Diese Komplexität und die Notwendigkeit der verbalen Kooperation des Patienten bei der Diagnosestellung erschweren die Rekrutierung repräsentativer und vergleichbarer Patientenkollektive in klinischen Studien.

Therapie

Bis heute ist die Therapie der MDD wegen ihrer so unterschiedlichen und noch nicht vollständig aufgeklärten Pathogenese schwierig. Nach einer gründlichen Abklärung möglicher organischer oder medikamentöser Ursachen für MDD kommen Psychotherapie, Psychopharmaka und physikalische Methoden zum Einsatz. Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (*selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI), Monoaminoxidase (MAO)-Hemmer und trizyklische Antidepressiva sind die überwiegend verordneten Psychopharmaka bei MDD. SSRI werden am häufigsten verwendet und haben im Vergleich zu anderen Antidepressiva die geringsten Nebenwirkungen. Dennoch sind SSRI mit teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen und einer Latenz von mehreren Wochen bis zum Eintritt der Wirkung belastet, was die Therapietreue der Patienten reduziert. Dies kann besonders bei Psychopharmaka aufgrund langer Ein- und Ausschleichphasen verheerend sein. Häufig werden Psychotherapie und Antidepressiva kombiniert. Trotz der Vielzahl an angewandten Therapien zeigen Patienten oft nur eine geringe oder keine Besserung ihrer Symptome oder erleiden in Kürze einen Rückfall (Hennings et al., 2009). So hat man festgestellt, dass nur 35-45% der mit herkömmlichen Antidepressiva behandelten Patienten wieder ihren ursprünglichen Gesundheitszustand erreichen (Entsuah, Huang, & Thase, 2001; Thase, Entsuah, & Rudolph, 2001).

Pathogenese

Die Pathogenese der MDD ist noch nicht vollständig geklärt. Sie ist einer großen Diversität von Einflussfaktoren unterworfen und wird daher oft als multifaktoriell und polygenetisch beschrieben.

Strukturelle Veränderungen

In postmortem neuropathologischen Studien wurde eine Abnahme des kortikalen Volumens, sowie der Glia-Zellen im präfrontalen Kortex, orbitalen Kortex und in der Amygdala bei MDD-Patienten festgestellt (Ongur, An, & Price, 1998; Rajkowska, 2000) (Manji, Drevets, & Charney, 2001; Manji et al., 2003). In bildgebenden Untersuchungen wurden bei MDD-Patienten vor allem Volumenveränderungen im Hippocampus beschrieben (Frodl et al., 2002) (Videbech & Ravnkilde, 2004) (Kohli et al., 2011) (M. C. Chen, Hamilton, & Gotlib, 2010). Inwieweit diese anatomischen Veränderungen für die Pathogenese eine Rolle spielen oder ob sie eine Folge von rezidivierenden depressiven Episoden sind, ist noch nicht vollständig geklärt.

Umwelteinflüsse

Es werden Umwelteinflüsse (Ota & Duman, 2012) wie traumatisierende Ereignisse in der Kindheit oder im späteren Leben (Kendler, 1995) und chronischer Stress (2-3fach erhöhtes Risiko für MDD) (Wang, 2005) mit MDD in Verbindung gebracht.

Grunderkrankungen und Medikamente

Depressive Störungen können im Rahmen einer anderen Grunderkrankung oder medikamentös induziert (z.B. durch Einnahme von Antikonvulsiva, Zytostatika, Glukokortikoide) auftreten. MDD kann mit anderen psychiatrischen Erkrankungen (z.B. Angststörungen), Schilddrüsenerkrankungen (Fountoulakis et al., 2006), Infektneigung, KHK, Hypocholesterinämie und niedrigen Folsäurewerten im Blut assoziiert sein. Außerdem können, z.B. stressbedingte Dysregulationen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (*hypothalamus-pituitary-adrenal-axis*, HPA-Achse) das Auftreten einer MDD begünstigen.

Hormonelle Veränderungen

In bestimmten Lebensphasen wie z.B. bei Frauen postnatal und in der Menopause bzw. (beziehungsweise) frühen Postmenopause scheint ein erhöhtes Risiko für eine MDD zu bestehen (Lokuge, Frey, Foster, Soares, & Steiner, 2011). Auch dem Beginn der Pubertät wird ein Einfluss auf die Pathogenese einer MDD zugeschrieben. Mädchen mit einer frühen Menarche haben demnach vermutlich ein erhöhtes Risiko im späteren Leben an einer MDD zu erkranken (Galvao et al., 2014).

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MDD spielt auch die **HPA-Achse** -oft als „Stresshormonachse“ bezeichnet. Sie wird durch somatische Stimuli wie Entzündungsreaktionen

(Straub, Buttgerit, & Cutolo, 2011) und Hunger (Ott et al., 2011), aber auch Stress (de Kloet, Joels, & Holsboer, 2005) aktiviert und löst dadurch neuronale und hormonelle Reaktionen sowie an den Stressor angepasste Verhaltensweisen aus.

Dabei führt ein Stressereignis auf endokriner Ebene innerhalb von Minuten zu einer Ausschüttung von Corticoliberin (corticotropic releasing hormone, CRH) aus dem Nucleus paraventricularis (Hypothalamus), das u.a. den Locus coeruleus zur Katecholaminausschüttung und den Vorderlappen der Hypophyse (Adenohypophyse) zur Ausschüttung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) anregt (Abbildung (Abb.) 1) (Valentino & Foote, 1988). ACTH wiederum führt zur Produktion und Sekretion von Glucocorticoiden (zu 95% Cortisol, Corticosteron) in der Nebennierenrinde. Der Cortisolspiegel im Blut steigt an, und bereitet den Körper für eine adäquate Reaktion auf den Stressor vor.

In peripheren Geweben (v.a. Muskulatur, Fettgewebe) wird über intrazelluläre Glukokortikoidrezeptoren eine gesteigerte selektive Genexpression vermittelt. Diese führt in der Zielzelle u.a. zum Eiweiß-Katabolismus. Die hierdurch entstehenden Aminosäuren gelangen in die Leber und werden dort, auch Cortisol-vermittelt, u.a. für die Glukoneogenese verwendet. Die entstandene Glukose steht nun dem Körper zur Energiegewinnung zur Verfügung. Die Glukoseaufnahme in periphere Zellen wird gehemmt. Außerdem steigert Cortisol die Lipolyse und erhöht somit die Konzentration freier Fettsäuren im Plasma. Bei stark erhöhten Cortisolkonzentrationen im Blut kommt es auch zu einer Aktivierung von Mineralocorticoidrezeptoren in der Niere und dadurch zu einer Erhöhung des Blutdrucks sowie der Kaliumausscheidung über den Urin. Auswirkungen auf die Blutzusammensetzung bestehen u.a. in einem Anstieg der Thrombozyten (erhöhte Thrombosegefahr) und einer Abnahme der Lymphozyten, was eine erhöhte Infektanfälligkeit zur Folge haben kann. Zentral wirkt Cortisol auch an Mineralocorticoidrezeptoren und intrazellulären Glucocorticoidrezeptoren (GR), die ein spezifisches Verteilungsmuster aufweisen (Reul & de Kloet, 1985). Glucocorticoidrezeptoren finden sich u.a. im Hippocampus, Amygdala und dem präfrontalen Cortex. Cortisol diffundiert durch die Zellmembran und bindet an den Glucocorticoidrezeptor im Zytosol. Dieser löst sich aus seiner Bindung mit Hitzeschockproteinen und ist damit aktiviert. Der Glucocorticoidrezeptor reguliert dann im Zellkern die Expression einer Vielzahl von Genen (Oakley & Cidlowski, 2013). Cortisol bewirkt außerdem eine negative Rückkopplung im Hypothalamus und der Hypophyse, wodurch die weitere CRH- und ACTH-Ausschüttung gedrosselt wird. So entsteht ein

regulatorischer Kreislauf, der zu einer kontrollierten Stressreaktion, ohne andauernde Erhöhung des Cortisolspiegels im Blut führt.

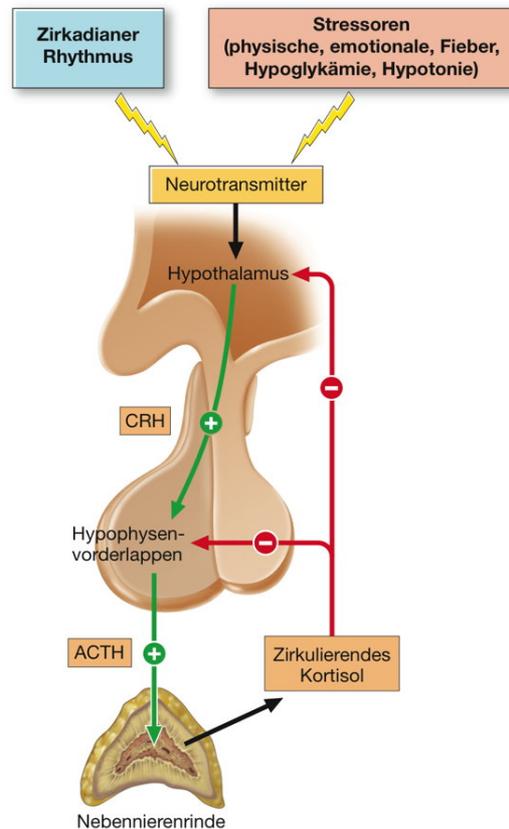


Abb. 1: Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse

aus Harrisons Innere Medizin, 18. Auflage, 2012

Eine Störung der HPA-Achsenregulation äußert sich in erhöhten Plasma-Cortisol- und Neuropeptidspiegeln (CRH und Vasopressin) in für die Stressadaptation wichtigen Regionen des Gehirns (de Kloet et al., 2005). Diese Dysregulation scheint in der Pathophysiologie von MDD eine wichtige Rolle zu spielen (Roy et al., 1987) (Pariante & Lightman, 2008).

Sie kann z.B. durch eine herabgesetzte Signalfunktion des Glukokortikoidrezeptors (Holsboer, 2000) (Holsboer, 2001; Pariante & Miller, 2001) oder einer Aktivierung von zentralen Neuropeptiden wie CRH und AVP entstehen und so zu einer dauerhaften Aktivierung der HPA-Achse führen. MDD-Patienten sind vor allem bei chronischem Verlauf deutlich höheren Cortisolspiegeln im Plasma ausgesetzt als Gesunde.

Bei akuter Depression kommt es nach erfolgreicher Therapie häufig zu einer Normalisierung der HPA-Achsen-Funktion (Ising et al., 2007; Ising et al., 2005).

Die Stresshormonachse wird durch diverse Faktoren, die noch nicht vollständig erforscht sind, beeinflusst. So unter anderem durch den Hippocampus, einer Hirnregion in der das in dieser Arbeit untersuchte Gen solute carrier family 6, member 15 (*SLC6A15*) besonders stark exprimiert wird (Inoue, Sato, Tohyama, Shimada, & Uhl, 1996) (Masson et al., 1996) (Lein et al., 2007) und in der sich eine hohe Dichte an Cortisolrezeptoren befindet.

Genetik

Aus genetischer Sicht gibt es noch viele offene Fragen zum Thema MDD. Man geht heute davon aus, dass 34-42% der MDD erblich bedingt sind (Ebmeier et al., 2006). Dabei ist die Erbllichkeit noch höher, wenn Schwere der MDD, frühes Auftreten und erhöhte Rückfallrate berücksichtigt werden. Es gibt jedoch kein bestimmtes „Depressions-Gen“ sondern diverse Gene, die in genetischen Studien einen Zusammenhang mit MDD gezeigt haben (Levinson, 2006). Im Rahmen von Assoziationsstudien wurden unter anderem folgende potentielle Kandidatengene beschrieben: vom Gehirn stammender neurotropher Faktor (brain-derived neurotropic factor, *BDNF*) (Sen, Duman, & Sanacora, 2008), solute carrier family 6 member 4 (*SLC6A4*, Serotonintransporter), angiotensin-converting enzyme (*ACE*) (Levinson, 2006), 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor, Typ 1A (*5-HT1A*, Serotoninrezeptor), Catechol-O-Methyltransferase (*COMT*, Katecholamin-abbauendes Enzym), FK506 bindendes Protein 5 (*FKBP5*, Glucocorticoidrezeptor) (Binder, 2009) und *SLC6A15* (neutraler Aminosäuretransporter) (Kohli et al., 2011). Dabei werden in den meisten Studien Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP), die die häufigste Art der genetischen Variation darstellen, innerhalb der jeweiligen Gene untersucht. SNPs bestehen aus einem einzelnen Basenunterschied im Genom, wobei in 2/3 der Fälle die Base Cytosin (C) durch Thymidin (T) ausgetauscht ist.

Die Ergebnisse dieser Studien konnten bis dato jedoch nicht in Metaanalysen bestätigt werden (Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric, 2012) (Bosker et al., 2011). Es gibt bisher keine Kandidatengene, die zweifelsfrei das Risiko an MDD zu erkranken erhöhen, einen wichtigen Pathomechanismus erklären oder Schlüsse auf den Therapieerfolg bestimmter Psychopharmaka erlauben (Tansey et al., 2012).

Eine besondere Herausforderung liegt darin, repräsentative Patientengruppen für Assoziationsstudien zusammenzustellen. Diese müssen sehr groß sein, um neue genetische Variationen zu identifizieren, die mit MDD assoziiert sind (Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric, 2012). Dass die Genexpression nicht nur von der Variabilität des Genoms,

sondern auch von Umwelteinflüssen und epigenetischen Faktoren abhängt, erschwert die Identifizierung von relevanten Kandidatengen durch reine genetische Assoziationsstudien.

Fazit

Nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung wird MDD als eine Erkrankung mit unterschiedlichen Subtypen, denen unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen, betrachtet (Krishnan & Nestler, 2008). Um diese Ursachen aufzuklären und gezielt therapeutisch darauf einzuwirken, bedarf es der Entwicklung leicht zugänglicher Biomarker, die eine differenzierte Diagnose mit darauf folgender „personalisierter“, und damit nebenwirkungsarmer, Therapie ermöglichen. Hierzu leistet diese Arbeit einen Beitrag, in dem sie die Genexpression von *SLC6A15* -einem potenziellen Kandidatengen für MDD- in Vollblut untersucht.

2.2 Biomarker in der Psychiatrie

Per Definition ist ein Biomarker ein Merkmal, das gemessen und evaluiert werden kann. Dieses Merkmal kann sowohl einen Indikator für einen physiologischen oder pathologischen Prozess als auch für die Reaktion des Organismus auf eine pharmakologische Intervention darstellen (Biomarkers Definitions Working, 2001).

Es gibt viele Ansätze zur Entwicklung von Biomarkern für MDD, jedoch gibt es bis heute keinen Labortest, der zuverlässige Informationen zu Diagnose, Prognose oder Beurteilung des Therapieerfolgs einer MDD liefert. Die einzigen Labortests, die im psychiatrischen Klinikalltag Relevanz haben, sind differentialdiagnostische Tests wie Vitamin B12 Blutspiegel und die Messung von Schilddrüsenwerten. Vitamin B12 ist essentiell für die Entwicklung des Nervensystems. Diverse Studien haben einen Zusammenhang zwischen Vitamin B12 Mangel und chronischer MDD bzw. Therapieversagen hergestellt (Mossner et al., 2007). Des Weiteren kann auch Hypothyreose MDD auslösen. Diese Labormessungen dienen also der organischen Abklärung und Differentialdiagnostik einer MDD.

Die lange Latenzzeit gebräuchlicher Psychopharmaka ist ein Grund dafür, dass die Therapie psychiatrischer Störungen derzeit noch nicht zufriedenstellend ist. In diesem Fall wäre es hilfreich mittels Biomarker ein frühes Ansprechen oder Nicht-Ansprechen auf gegebene Medikamente zu beurteilen, um dadurch die Latenzzeit bis zur Wirkung einer medikamentösen Therapie so gering wie möglich zu halten. Zusätzlich wäre es wünschenswert über Biomarker ein profunderes Verständnis der biologischen Mechanismen, die in die Pathogenese der MDD involviert sind, zu

erlangen. So könnten effektivere Medikamente mit weniger Nebenwirkungen und einer kürzeren oder gar keiner Latenzzeit bis zur Besserung der Symptome entwickelt werden. Im Folgenden werden die derzeit relevantesten mit MDD assoziierten biologischen Veränderungen, die in Zukunft zur Entwicklung von Biomarkern führen könnten, dargestellt.

2.2.1 Bildgebung

Veränderungen der Hirnaktivität bei MDD-Patienten wurden bereits zahlreich mittels Bildgebung beobachtet, sodass diese Technik das Potenzial besitzt, eines Tages als Biomarker in der klinischen Diagnostik verwendet zu werden.

Ein vielversprechendes bildgebendes Verfahren ist die funktionelle Magnetresonanztomographie (fMRT). Sie dient der Messung neuronaler Aktivitätsveränderungen sowie Änderungen der Perfusion bestimmter Hirnareale und erlaubt eine dreidimensionale Aufnahme des Gehirns.

Untersuchungen zeigten, dass beim Vorhalten eines Bildes, auf dem ein mit negativen Emotionen behaftetes Gesicht dargestellt ist, bei gesunden Probanden eine Verminderung der neuronalen Aktivität im limbischen System ausgelöst wird. Depressive Probanden hingegen zeigen im fMRT eine erhöhte Aktivität dieser Hirnregion als Reaktion auf ein solches Bild. Auch diese abnorme zerebrale Hyperaktivität bildet sich in der Regel nach erfolgreicher pharmakologischer Therapie zurück (Sheline et al., 2001).

In weiteren Untersuchungen mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (*single photon emission computed tomography*, SPECT) wurden bei MDD-Patienten Veränderungen des zerebralen Blutflusses und Glukosemetabolismus im limbischen System und präfrontalen Cortex festgestellt (Drevets, 2001). So gibt es Hinweise, dass die Hirnregionen, die nach heutigem Wissensstand für Emotionen und Stressantwort zuständig sind, bei depressiven Patienten stärker aktiviert sind als bei gesunden Probanden. Im Gegensatz dazu, weisen die auf Emotionalität hemmend wirkenden Regionen histologische Abnormalitäten auf, die auf eine verminderte Aktivität bei MDD-Patienten hinweisen könnte.

Mit Hilfe der fMRT könnten in Zukunft auch funktionelle Effekte von Psychopharmaka auf das Gehirn identifiziert werden (Borsook, Becerra, & Hargreaves, 2006). Derzeit findet die fMRT aus Kostengründen allerdings keine routinemäßige Anwendung als Biomarker im Klinikalltag.

2.2.2 Neuroendokrine Tests

In diversen Studien wurden bei MDD-Patienten in akuten depressiven Episoden erhöhte Cortisolkonzentrationen in Plasma und Urin (Sachar, 1967), eine gestörte Regulation der HPA-Achse (Holsboer, 2000) (Raison & Miller, 2003) und eine verminderte Thyreotropin-Ausschüttung in Reaktion auf das Hormon Protirelin festgestellt (Joyce & Paykel, 1989; Roy et al., 1987).

Dex-/CRH-Test

Ein Dexamethason (Dex)-Test (Dexamethason-Suppressionstest) ohne CRH Injektion wird schon seit Längerem in der endokrinologischen Diagnostik zum Ausschluss des Cushing-Syndroms angewendet. Seit den 70er Jahren wird dieser Test für die Erforschung von HPA-Achsendysregulationen und deren Bedeutung für die Pathogenese von MDD verwendet (Carroll, 1984).

1994 wurde erstmals ein Dexamethason-Test in Kombination mit einer intravenösen (i.v.) CRH-Applikation beschrieben (*combined dexamethasone suppression/corticotropin releasing hormone challenge test*, Dex-/CRH-Test) (Heuser, Yassouridis, & Holsboer, 1994). Bis heute gilt dieser als die sensitivste Methode zur Messung von Stresshormonspiegeln in Blut und wird daher von vielen Forschergruppen zur Untersuchung von Zusammenhängen zwischen HPA-Achsenfunktion und MDD verwendet (von Bardeleben & Holsboer, 1991) (Watson et al., 2002).

Dexamethason ist ein synthetisches Glucocorticoid und bindet im Körper an die gleichen Rezeptoren wie physiologisches Cortisol. Unter physiologischen Bedingungen wird dadurch eine negative Rückkopplung ausgelöst (siehe (s.) 2.1) und die Bildung körpereigenen Cortisols reduziert. Bei einer funktionierenden HPA-Achse (s. Abb. 1) wird durch diese Rückkopplung die Ausschüttung von CRH im Hypothalamus und ACTH in der Hypophyse so sehr gehemmt, dass die CRH-Injektion im Testverlauf nur zu einem geringen Anstieg des Cortisolwerts im Blut führt.

Bei MDD-Patienten konnte in Studien nach CRH-Injektion ein stärkerer Anstieg der Cortisol- und ACTH-Werte im Blut beobachtet werden als bei gesunden Probanden. Als Ursache hierfür wurden u.a. Störungen der negativen Rückkopplung bzw. Hypersekretion im paraventriculären Nucleus des Hypothalamus und der Hypophyse (de Kloet et al., 2005; Holsboer, 2000) durch eine herabgesetzte Sensitivität des Glukokortikoidrezeptors (Holsboer, 2000) beschrieben.

Ein einzelner Dex-/CRH-Test erlaubt keine Prognose für das Ansprechen einer Therapie bei MDD-Patienten. Bei wiederholten Dex/CRH-Tests wird eine frühe Normalisierung der HPA-Achsenaktivität innerhalb der ersten 2 Wochen nach Therapiebeginn als günstiger Faktor für ein gutes Ansprechen der Therapie angesehen (Holsboer, 2000; Ising et al., 2005). In diesem Fall

normalisiert sich die HPA-Achsenaktivität in der Regel bereits vor dem endgültigen Wiederherstellen der Euthymie (Ising et al., 2007). Eine ausbleibende Wiederherstellung der HPA-Achsenregulation gilt als schlechtes prognostisches Zeichen. Von einer im Dex/CRH-Test gemessenen HPA-Achsendysregulation kann allerdings nicht automatisch auf eine MDD geschlossen werden. Der Dex/CRH-Test dient folglich nicht der Diagnose, sondern hat ausschließlich prognostische Aussagekraft. Der Test ist derzeit nicht im psychiatrischen Klinikalltag etabliert, gilt jedoch in klinischen Studien als ein wertvolles Werkzeug zur Beurteilung der HPA-Achsenregulation (Hennings et al., 2009).

Da die beschriebenen endokrinologischen Veränderungen bisher nur bei einigen MDD-Patienten festgestellt werden konnten und diverse andere Faktoren die Pathogenese der MDD beeinflussen, sind aus diesen Studien bis dato keine verlässlichen Biomarker hervorgegangen.

2.2.3 Immunsystem

Veränderungen des Immunsystems und entzündliche Vorgänge bei Depressiven wurden in zahlreichen Studien beschrieben. So wurden bei MDD-Patienten erhöhte Zytokin-, akute-Phase-Protein-, Chemokin-, Zelladhäsionsmolekül- und Prostaglandinspiegel festgestellt (Raison, Capuron, & Miller, 2006). Bereits in sehr frühen Studien wurde ein Anstieg von T-Helfer-Zellen (cluster of differentiation 4-positive-Zellen, CD4+) bei MDD-Patienten beobachtet (Syvalahti, Eskola, Ruuskanen, & Laine, 1985) (Maes et al., 1992) (Muller, Hofschuster, Ackenheil, Mempel, & Eckstein, 1993). Später wurde zusätzlich eine erhöhte Rate an mononukleären Zellen im peripheren Blut von Depressiven beschrieben (Herbert & Cohen, 1993) (Seidel et al., 1996) (Rothermundt et al., 2001).

Im Bezug auf immunologische Biomarker für MDD liegt ein Forschungsschwerpunkt auf den von Immunzellen ausgeschütteten Zytokinen wie z. B. Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) (Miller, Maletic, & Raison, 2009).

Der bisher relevanteste immunologische Biomarker für MDD ist IL-6, ein in Monozyten und Makrophagen produziertes Zytokin. In mehreren Studien konnte bei depressiven Patienten ein Anstieg der IL-6-Produktion beobachtet werden (Mossner et al., 2007; Zorrilla et al., 2001). Des Weiteren wird die HPA-Achse unter anderem von IL-6 moduliert (Plata-Salaman, 1991). Ein peripherer Anstieg der IL-6-Produktion bei psychologischem oder physischem Stress wurde ebenfalls beobachtet (LeMay, Vander, & Kluger, 1990) (Salas, Evans, Levell, & Whicher, 1990) (Zhou, Kusnecov, Shurin, DePaoli, & Rabin, 1993) (Miyahara et al., 2000).

In Tierexperimenten zeigte sich, dass IL-1 und TNF- α zu einer erhöhten Serotoninwiederaufnahme in zerebralen Synapsen führt (Zhu, Blakely, & Hewlett, 2006). Ein erhöhter Spiegel dieser Zytokine im Blut von MDD-Patienten hätte demnach einen reduzierten Serotoninspiegel im Gehirn zur Folge. Diese Erkenntnisse werden von Studien gestützt, in denen ein Rückgang depressiver Symptome bei Patienten beobachtet werden konnte, die mit einem TNF- α -Antagonist (Infliximab, Etanercept) therapiert wurden (Raison et al., 2013; Tying et al., 2006).

All diese Studien zeigen, dass sowohl die angeborene als auch die adaptive (erworbene) Immunabwehr bei depressiven Patienten Veränderungen aufweist (Mossner et al., 2007), die möglicherweise zur Etablierung von verlässlichen immunologischen Biomarkern verwendet werden können.

2.2.4 Genexpression

Anhand von Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA)-Microarrays lässt sich die Genexpression von Tausenden von Genen eines Patienten gleichzeitig untersuchen. Mit dieser Methode wurden bereits einige Gene identifiziert, die möglicherweise mit MDD assoziiert sind (Kandidatengene). Unter Anderem wurden lymphoblastoide Zellen und postmortales zerebrales Gewebe von MDD-Patienten untersucht. Die Experimente mittels Microarrays zeigten, dass bestimmte Gene bei psychiatrischen Erkrankungen veränderte Genexpressionsmuster aufweisen, sodass Genexpressionsprofile als Biomarker verwendet werden können (Mirnics, Levitt, & Lewis, 2006).

Ebenso könnten MDD-Patienten aufgrund ihres Genexpressionsmusters in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden, um sie dadurch individuell, auf ihre Genexpression abgestimmt, behandeln zu können. Da diese Veränderungen der Genexpression bei Patienten im Gehirn nicht messbar sind, ist man auf die Gewinnung von peripherem Gewebe (z.B. Blut) angewiesen. Ob von den Genexpressionsmustern in der Peripherie Rückschlüsse auf die zentrale Genexpression gezogen werden können ist jedoch unklar. Dennoch könnten sie als Abbild des Immunsystems und der HPA-Achse wichtige Informationen als Biomarker liefern und möglicherweise sogar die Kenntnisse über zentrale Genexpressionsmuster erweitern. Die Genexpression variiert je nach Genotyp, wie z.B. bei *SLC6A15* und *FKBP5* (Mehta, Menke, & Binder, 2010). Genexpressionsmessungen als Biomarker müssen also unter Einbezug des Genotyps beurteilt werden.

Langfristiges Ziel ist es, durch einfache Blutentnahme und Beurteilung der Genexpression in Blutzellen eine personalisierte psychiatrische Therapie zu ermöglichen. Im Rahmen einiger Studien

wurden bereits Veränderungen der Boten-RNA(*messenger ribonucleic acid*, mRNA)-Expression von Kandidatengen in Vollblut gemessen. Allerdings sind aus diesem Bereich der Biomarkerforschung bisher keine für den Klinikalltag relevanten Biomarker entstanden (Uddin, 2014).

2.3 Die Rolle von SLC6A15 im zentralen Nervensystem (ZNS)

SLC6A15 gehört zu einer Untergruppe der SLC6 (solute carrier 6) Familie, die eine der größten Transportergruppen im menschlichen Organismus darstellt und von denen bislang 20 Transporter bekannt sind. Es handelt sich hierbei um Natrium und Chlorid abhängige Transporter (N. H. Chen, Reith, & Quick, 2004), die eine entscheidende Rolle im Abbau bzw. dem Transport von Neurotransmittern im Gehirn und dem Transport von Aminosäuren in epitheliale Zellen spielen. Da für eine der vier SLC6-Untergruppen -der auch *SLC6A15* zugehörig ist- lange nicht bekannt war, welche Substrate sie hat, wurde ihr der weitere Name *orphan transporter subfamily* (*orphan* ist englisch für Waise) verliehen.

SLC6A15 (in der Literatur gelegentlich auch „v7-3“ genannt) kodiert für einen Natrium abhängigen neutralen Aminosäuretransporter (Leucin, Isoleucin, Valin, Prolin, Methionin) (A. Broer et al., 2006) mit einer Präferenz für verzweigt-kettige Aminosäuren (Leucin, Isoleucin, Valin) (Takanaga, Mackenzie, Peng, & Hediger, 2005). Er befindet sich vor allem in der Zellmembran neuronaler Zellen (Farmer et al., 2000). Die stärkste Expression wurde im Bulbus olfactorius (Riechkolben), zerebralen Cortex (Hirnrinde), Cerebellum (Kleinhirn) und im Hippocampus (Inoue et al., 1996) (Masson et al., 1996) (Lein et al., 2007), einer für die Pathogenese der MDD wichtigen Hirnregion, festgestellt.

Experimente mit *SLC6A15*-Knockout-Mäusen ergaben, dass 15% des natriumabhängigen Prolin- und 40% des Leucintransports in kortikalen Synaptosomen durch diesen Transporter erfolgen. Da diese Knockout-Mäuse jedoch keine Verhaltensänderungen aufwiesen, wird eine Kompensation durch andere Aminosäuretransporter vermutet (Drgonova, Liu, Hall, Krieger, & Uhl, 2007).

Die von *SLC6A15* transportierten verzweigt-kettigen Aminosäuren sind wichtige Aminogruppendonatoren für die Synthese von Glutamat (Yudkoff, Daikhin, Nelson, Nissim, & Erecinska, 1996), dem wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter im Gehirn (Tapiero, Mathe, Couvreur, & Tew, 2002).

2.4 SLC6A15 und depressive Störungen

Grundlage dieser Doktorarbeit ist ein Paper von Kohli et al. (et al.), in dem zum ersten Mal in einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) der Zusammenhang zwischen *SLC6A15* und MDD bei unter 55-Jährigen beschrieben wurde (Kohli et al., 2011). Bei über 55-Jährigen ist MDD weniger genetisch als vaskulär oder kognitiv bedingt (Alexopoulos, 2006). Die Ergebnisse dieser genomweiten Fall-Kontroll-Studie (353 MDD-Patienten aus dem *Munich Antidepressant Response Signature* (www.mars-depression.de, MARS) Projekt (Hennings et al., 2009) und 366 Kontrollprobanden) wurden in einer Metaanalyse in fünf der sechs zusätzlich untersuchten unabhängigen Versuchsgruppen aus Europa und den USA bestätigt. Unter Einbeziehung der Metaanalyse ergibt sich so eine Gesamtstudiengröße von 15.089 Teilnehmern.



Abb. 2: Lage von *SLC6A15* auf Chromosom 12 (q21.31)

Der intergenische SNP rs1545843 (rs = *reference SNP*, also Referenznummer der Einzelnukleotidpolymorphismen) auf dem langen Arm von Chromosom 12 (12q21.31) (s. Abb. 2) zeigte in den Untersuchungen von Kohli et al. (2011) einen signifikanten Zusammenhang mit MDD. So war das Risiko an einer MDD zu erkranken bei Trägern des homozygoten AA Genotyps im Vergleich zu Trägern von mindestens einem G-Allel (GG + AG Genotyp) 1.42-fach höher. Das am nächsten gelegene Gen (287kb entfernt) zu diesem SNP ist *SLC6A15*.

Um den funktionellen Kontext des 12q21.31-Lokus weiter zu untersuchen, wurden genomweite Microarray-Daten (Genexpressionsprofile) dieses Lokus analysiert. Dazu wurden prämortale Hippocampuszellen von Patienten mit Temporallappenepilepsie untersucht. Sowohl der Risikogenotyp von rs1545843 als auch von rs1031681 (ein SNP in moderatem Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD) mit rs1545843) waren mit reduzierter hippocampaler Expression der langen *SLC6A15*-mRNA-Isoform assoziiert, was auf einen regulatorischen Einfluss dieser SNPs auf die *SLC6A15* Genexpression hindeutet. Diese Ergebnisse wurden durch HapMap-Daten von lymphoblastoiden Zelllinien (Stranger et al., 2005) und Expressionsdaten von Monozyten aus peripherem Blut (Heinzen et al., 2008) unterstützt. Auch hier war die Expression der langen Isoform bei Trägern des Risikogenotyps der beiden SNPs vermindert.

Schon in vorherigen Studien wurden Parallelen zwischen lymphozytärem und neuronalem Stoffwechsel festgestellt (Gladkevich, Kauffman, & Korf, 2004). Monozyten und B-Zellen im peripheren Blut können daher als „Stellvertreter“ der zerebralen (bzw. hippocampalen) Zellen verwendet werden.

Kohli et al. (2011) haben außerdem bildgebende Verfahren (Magnetresonanztomographie (MRT) und Protonen-Kernspinresonanzspektroskopie (proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, ¹H-NMR) zur Untersuchung der herabgesetzten neuronalen Integrität des Hippocampus (Frodl et al., 2002) (Videbech & Ravnkilde, 2004) bei Depressiven angewendet. Dabei wurde ein Einfluss des rs1545843-Genotyps auf das Volumen des Hippocampus (v.a. Cornu ammonis) festgestellt, womit diese Hirnregion im Zusammenhang mit der MDD Pathophysiologie steht.

Bei der ¹H-NMR-Spektroskopie wurde der Hippocampus-Stoffwechsel in Abhängigkeit der unterschiedlichen rs1545843-Genotypen betrachtet. Hierbei wurden gesunde, nicht-medizierte Probanden untersucht, da MDD und Medikamente neurochemische Prozesse beeinflussen können. Für SNP rs1031681 konnten bei Risikogenotypträgern niedrigere N-Acetyl-Aspartat- (NAA) und Glutamat + Glutamin (Glx)-Werte gemessen werden. NAA fördert als Vorläufer von N-Acetylaspartylglutamat (NAAG) die Glutamat-Ausschüttung. NAAG ist einer der häufigsten Neurotransmitter im Mammillarkörper des limbischen Systems. Auch bei gesunden Trägern des rs1545843-Risikogenotyps waren die NAA- und Glx-Level vermindert. Im Tiermodell wurden ebenfalls niedrigere NAA-Werte im Hippocampus von chronisch gestressten Tieren im Vergleich zu nicht gestressten Tieren festgestellt (Czeh et al., 2001).

Glutamat (Salz bzw. Ester der Glutaminsäure) ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im menschlichen Gehirn. Daher spielt *SLC6A15* als Transporter von Neurotransmitter-„Bausteinen“ (neutralen Aminosäuren) besonders für die Glutamatsynthese eine wichtige Rolle (S. Broer, 2006). Des Weiteren fanden die Autoren heraus, dass bereits gesunde *SLC6A15* Risikogenotypträger eine herabgesetzte neuronale Integrität und glutamaterge Signalübertragung im Hippocampus aufweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass bereits gesunde Träger des Riskogenotyps ein vermindertes Volumen des Hippocampus und eine herabgesetzte neuronale Integrität dieser Hirnregion aufweisen und sich beides bei rezidivierenden depressiven Episoden im Rahmen einer diagnostizierten MDD verstärkt (Li, Ge, Feng, & Su, 2013).

Auch erhöhte Cortisolspiegel im Blut von MDD-Patienten wurden mit reduzierten Volumina des Hippocampus in Verbindung gebracht (Knoops, Gerritsen, van der Graaf, Mali, & Geerlings, 2010).

So scheinen erhöhte Glukokortikoidwerte die Neuroprotektion und Neurogenese im Hippocampus zu hemmen (de Kloet et al., 2005). Die HPA-Achse steht also in engem Zusammenhang mit dem Hippocampus und damit auch mit dem *SLC6A15* Locus. Hierzu gibt es neben den in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen noch weitere Forschungsarbeiten (Schuhmacher et al., 2013).

Zuletzt wurde von Kohli et al. (2011) in einem etablierten Mausmodell für chronischen sozialen Stress (Schmidt et al., 2007) dessen Einfluss auf die Genexpression von *SLC6A15* im Hippocampus untersucht. Die *SLC6A15*-mRNA-Expression in der CA1-Region und Gyrus dentatus des Hippocampus war bei stressempfindlichen Mäusen 1.9-fach geringer als bei stressresistenten Mäusen. Eine verminderte Expression von *SLC6A15* steht bei Mäusen folglich im Zusammenhang mit erhöhter Stressempfindlichkeit was einen Risikofaktor für MDD darstellt (de Kloet et al., 2005). Diese Beobachtungen wurden in der gleichen Region des Hippocampus gemacht, in der bei Menschen mit dem rs1545843-Risikogenotyp die größte Volumen- und Integritätsabnahme festgestellt wurde.

Auch in anderen Studien wurden Zusammenhänge zwischen Stresshormonhaushalt und neuronaler Integrität, Volumen und Funktion des Hippocampus festgestellt (Sapolsky, Krey, & McEwen, 1986) (Sapolsky, Packan, & Vale, 1988) (Frodl & O'Keane, 2012). Studien von Kohli et al. (2011) und anderen Forschungsgruppen (Schuhmacher et al., 2013) (Quast et al., 2013) (Li et al., 2013) deuten darauf hin, dass *SLC6A15* und vor allem das SNP rs1545843 bei diesen Zusammenhängen eine Rolle spielt und daher möglicherweise ein neues Kandidatengen für MDD ist (Kohli et al., 2011).

3 Zielsetzung der Arbeit

Diese Arbeit gliedert sich in zwei Teile, einen klinisch-experimentellen Teil, der sich mit der Etablierung eines *SLC6A15* Biomarkers aus peripherem Blut befasst und einen statistischen Teil, der Zusammenhänge zwischen rs1545843-Genotypen und HPA-Achsenregulation betrachtet.

3.1 *SLC6A15*-mRNA-Expression in peripherem Blut als Biomarker für Depression

Die von Kohli et al. (2011) festgestellte Assoziation des SNPs rs1545843 mit reduzierter hippocampaler mRNA-Expression der langen *SLC6A15*-Isoform konnte durch Expressionsanalysen in lymphoblastoiden Zelllinien (HapMap-Daten) weiter unterstützt werden. In diesen aus B-Zellen gewonnenen Zelllinien war der rs1545843 Risikogenotyp ebenfalls mit verminderten *SLC6A15*-mRNA-Transkriptleveln assoziiert (Kohli et al., 2011).

Ziel war es, eine Methode zu etablieren mit der diese Veränderungen der Genexpression bei Risikogenotypträgern in peripherem Blut gemessen werden können. Dabei sollte mittels quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*real time quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR), einer in klinischen Laboratorien bereits etablierten Methode, die *SLC6A15*-mRNA-Expression in peripheren Blutzellen gemessen werden.

3.1.1 MARS: *SLC6A15* als Biomarker

Im Rahmen des MARS-Projekts (Hennings et al., 2009; Ising et al., 2009) wurden demographische Daten sowie Informationen zu Krankheitsbild, klinischem Verlauf und Dex-/CRH-Test von 842 depressiven Patienten nach Aufnahme in psychiatrische Kliniken erfasst. Bei 534 der MARS-Probanden wurde der rs1545843-Genotyp bestimmt. Langfristig sollte bei dieser Gruppe die *SLC6A15*-mRNA-Expression gemessen werden. Zunächst wurde jedoch mit Kontroll-RNA gearbeitet, um die Methode zu testen. Die Kontroll-RNA wurde aus peripherem Blut extrahiert und dann in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben. Diese diente als Matrize für eine RT-qPCR, in der jeweils die lange und die kurze *SLC6A15*-Isoform analysiert wurde. Für die lange Isoform wurden -wie bei Kohli et al. (2011)- Genotyp abhängige Veränderungen der *SLC6A15*-mRNA-Expression erwartet.

In dieser Arbeit wurde allerdings mit der RT-qPCR eine sensiblere und für den Klinikalltag brauchbarere Methode als die von Kohli et al. verwendeten Microarrays eingesetzt.

Anhand der Ergebnisse sollten außerdem Zusammenhänge zwischen *SLC6A15*-Expression und demographischen Daten, klinischen Daten, Therapieerfolg und Dex-/CRH-Testergebnissen hergestellt werden. So wäre es denkbar einen Biomarker für MDD zu entwickeln, der in Zukunft

bereits bei stationärer Aufnahme prognostische Hinweise und/oder Informationen über die bestgeeignete Pharmakotherapie liefert.

3.1.2 Dex-Suppression: Wirkung von Dex auf *SLC6A15*-mRNA-Expression

Für den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Dex-Suppressions-Versuch wurde 25 gesunden Probanden 1,5 mg des synthetischen Glukokortikoids Dexamethason („Dex“) verabreicht.

Ziel dieses Versuches war es herauszufinden, ob das Niveau von *SLC6A15*-mRNA in Blutzellen durch Dex verändert wird. Dadurch sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen *SLC6A15*-mRNA-Expression und HPA-Achse untersucht werden. Die Messungen der *SLC6A15*-mRNA-Expression wurden in diesem Versuch ebenfalls mit der in 3.1.1. beschriebenen RT-qPCR durchgeführt.

3.2 *Rs1545843*-Genotypabhängige endokrine Regulation

In einem etablierten Mausmodell wurde von Kohli et al. (2011) eine verminderte *SLC6A15*-Expression bei stressempfindlichen Mäusen beobachtet. Außerdem wurde bei Menschen mit dem *rs1545843*-Risikogenotyp eine verminderte *SLC6A15*-Expression in Hippocampus, lymphoblastoiden Zellen und peripheren Blutmonozyten sowie ein herabgesetztes hippocampales Volumen und neuronale Integrität festgestellt (Kohli et al., 2011). Zusammenhänge zwischen dem Volumen des Hippocampus und der HPA-Achse wurden auch in anderen Studien festgestellt (Knoops et al., 2010), was auf einen Einfluss von *SLC6A15* auf den Stresshormonhaushalt hindeutet (Schuhmacher et al., 2013).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in diesem Teil der Arbeit ein Zusammenhang zwischen *rs1545843*-Genotyp und Veränderungen der HPA-Achsenregulation untersucht. Im Rahmen einer statistischen Analyse wurden dabei die Plasmaspiegel der Stresshormone Cortisol und ACTH in Abhängigkeit der unterschiedlichen *rs1545843*-Genotypen im MARS-Projekt und beim Dex-Suppression-Versuch untersucht. Dadurch sollte die genotypabhängige HPA-Achsenregulation sowohl bei MDD-Patienten (MARS) als auch bei gesunden Probanden (Dex-Suppression) bestimmt werden.

3.2.1 MARS: *Rs1545843* und HPA-Achsenregulation

In diesem Teil der Arbeit wurden die Cortisol- und ACTH-Werte, die bei den MARS-Probanden im Rahmen des durchgeführten Dex-/CRH-Tests bestimmt wurden, statistisch ausgewertet. Dabei wurde der Verlauf der Cortisol- und ACTH-Werte zur Beurteilung der HPA-Achsenregulation verwendet. Als Prädiktor wurde der Genotyp, als Kovariablen Alter, Geschlecht, BMI (*body mass*

index), HAM-D21 (*Hamilton Rating Scale for Depression*, Version mit 21 Fragen), Vorepisoden und Subtyp der MDD verwendet. Die Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen rs1545843-Genotyp und HPA-Achsenregulation besteht, sollte mittels dieser Analyse bestätigt oder abgelehnt werden.

3.2.2 Dex-Suppression: Rs1545843 und HPA-Achsenregulation

Obwohl die Stichprobe sehr klein war, sollte die statistische Analyse der Stresshormonwerte der Dex-Suppressions-Probanden Auskunft über genotypabhängige HPA-Achsenregulation bei Gesunden geben.

4 Material- und Methodenteil

4.1 Etablierung der RT-qPCR bei MARS- und Dex-Suppression-Probanden zur Entwicklung eines SLC6A15 Biomarkers

Biomarker sind für eine erleichterte Diagnostik und Therapie im Klinikalltag wichtig. Um eine routinemäßige Anwendung zu ermöglichen und diese auch in der Praxis durchzusetzen, sollten möglichst einfache und billige Testverfahren gewählt werden. RT-qPCR ist bei anderen klinischen Fragestellungen gut etabliert und vergleichsweise günstig. Unter Berücksichtigung der derzeitigen Kenntnisse bezüglich des *SLC6A15* Gens, wurde diese Methode zur Entwicklung eines Biomarkers für MDD ausgewählt. Zunächst wurde die RT-qPCR mittels einiger Blutproben der MARS-Probanden etabliert, um dann im nächsten Schritt eine große Versuchsreihe mit den MARS-Probanden und anschließend mit den Dex-Suppression-Probanden durchzuführen.

4.1.1 Herstellung der Test-cDNA

Als Ausgangsmaterial für die RT-qPCR wurden cDNAs aus Blutzellen der MARS-Probanden und zum Vergleich cDNAs aus HeLa-Zellen verwendet.

HeLa-Zellen gehören zu der ältesten und in der Forschung am häufigsten verwendeten humanen Zelllinie. Es handelt sich dabei um Zervixkarzinom-Zellen die erstmals im Jahre 1951 der Patientin Henrietta Lacks („HeLa“-Zellen) entnommen wurden (Scherer, Syverton, & Gey, 1953) und damit die erste Zelllinie aus menschlichen Zellen darstellte. Diese Krebszellen erwiesen sich als besonders widerstandsfähig und produktiv.

Blut- und HeLa-Zellen wurden zunächst mit einer RNase-freien DNase behandelt, wodurch an Silikamembran gebundene DNA abgebaut wurde. Um RNA in cDNA umzuschreiben, wurden 500 Nanogramm (ng) RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 Mikroliter (μ l) für die reverse Transkription unter Verwendung des Superscript II Kits (Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

In unserem Versuch wurde die *SLC6A15*-Genexpression in HeLa-Zellen und humanen Blutzellen gemessen. Da bekannt ist, dass *SLC6A15* in HeLa-Zellen exprimiert wird, kann die Messung in HeLa-Zellen als Kontrolle verwendet werden. Für den Fall, dass die Messung in humanen Blutzellen nicht funktioniert, in HeLa-Zellen hingegen schon, kann daraus geschlossen werden, dass der Fehler nicht an der Methode liegt, sondern die Expression zellspezifisch ist.

Um auszuschließen, dass beim Pipettieren oder der cDNA-Herstellung ein Fehler unterlaufen ist, wurde zusätzlich die Expression eines Kontrollgens (in diesem Fall TATA bindendes Protein, *TBP*) untersucht.

4.1.2 Einführung in herkömmliche PCRs

PCR (Polymerasekettenreaktion) ermöglicht die exponentielle Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen (Matrizen oder im Englischen auch Template genannt). In einer einzelnen Reaktion können dadurch bis zu einer Million Vervielfältigungen (PCR-Produkte) hergestellt werden.

Im ersten Schritt wird dabei die DNA-Sequenz bei einer Temperatur von 95 Grad Celsius (°C) denaturiert (Auftrennung der Doppelstrang-DNA in zwei Einzelstränge). Danach wird die Temperatur auf 60°C gesenkt damit die Primer (kurze Oligonukleotidsequenzen) an die DNA-Einzelstränge binden können (Annealing). Zuletzt wird die Temperatur wieder auf 72°C erhöht, da bei dieser Temperatur die thermostabile (Taq)-Polymerase ihr Aktivitätsoptimum hat. Diese Polymerase wird aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen und ist hitzestabil. So übersteht sie den Denaturierungsschritt und ist für weitere PCR-Zyklen verfügbar. Aufgabe der Taq-Polymerase ist es, die gebundenen Primer durch Nukleotide, die komplementär zur Sequenz des Templates sind, zu verlängern, wodurch am Ende eines PCR-Zyklus doppelsträngige DNA vorliegt. Es wird folglich wieder die Ausgangssituation mit doppelsträngigen DNA-Sequenzen erreicht, sodass die PCR von vorn beginnen kann, das heißt (d.h.), die DNA-Doppelstränge werden bei 95°C denaturiert, gefolgt vom Binden der Primer usw.

4.1.3 MARS: RT-qPCR

Die RT-qPCR wurde mit dem LightCycler® 480 (Roche, Software Version: LCS480 1.5.0.39) durchgeführt. Im Vergleich zu herkömmlichen PCRs besteht ein Vorteil der RT-qPCR darin, dass die in den PCR-Zyklen gebildeten PCR-Produkte quantitativ in jedem Zyklus der laufenden PCR gemessen werden können und nicht erst am Ende der Amplifikation. Mittlerweile wird die RT-qPCR standardmäßig eingesetzt. Theoretisch könnte zwar mit einer einfachen Messung am Ende auf die ursprüngliche Menge an DNA in der Probe geschlossen werden, jedoch sind in der praktischen Umsetzung die Versuchsbedingungen nie so ideal, dass die Amplifizierung strikt exponentiell verläuft. Während zu Beginn einer PCR die Aktivität der Taq-Polymerase durch die geringe Menge an Template begrenzt wird, wird am Ende der PCR ihre Aktivität durch die ständigen Temperaturwechsel herabgesetzt. Außerdem verbinden sich gegen Ende der PCR zunehmend Templates untereinander anstatt mit den vorgesehenen Primern. Der Einfluss dieser

Faktoren macht es unmöglich mit einer einfachen Messung am Ende der PCR eine quantitative Aussage über die ursprüngliche Anzahl der vorliegenden DNA-Moleküle in einer Probe zu treffen. Die RT-qPCR ist hierzu jedoch in der Lage, da sie am Ende jedes PCR-Zyklus eine Messung durchführt.

Diese „Echtzeit“-Messung ist fluoreszenzbasiert (s. Abb. 3). Einzelsträngige *hydrolysis probes* (Roche) hybridisieren komplementär an die einzelsträngige Zielsequenz. Diese Proben enthalten jeweils einen „Reporter“ Farbstoff am 5'-Ende und einen „Quencher“ Farbstoff am 3'-Ende. Die räumliche Nähe von Reporter und Quencher verhindert ein Fluoreszenzsignal. Während der PCR-Reaktion wird durch die DNA-Polymerase die Sonde von der Zielsequenz verdrängt und so der Reporter vom Quencher getrennt. Dadurch wird das Fluoreszenzsignal des Reporter-moleküls nicht mehr supprimiert und kann detektiert werden. Die Zunahme der Intensität der Fluoreszenz ist somit proportional zu der Menge an gebildeten PCR-Produkten.

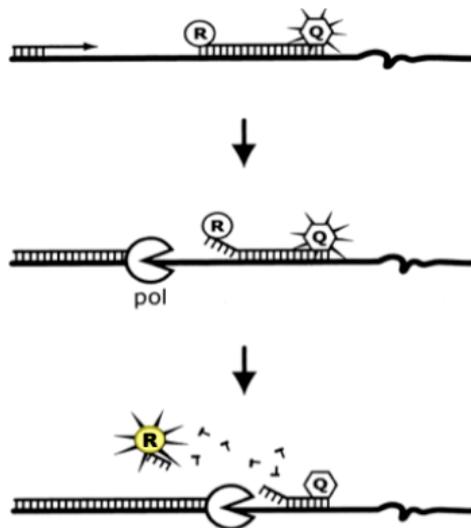


Abb. 3: RT-qPCR, Entstehung des Fluoreszenzsignals

R = Reporter, Q = Quencher, pol = DNA-Polymerase

Der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal signifikant vom Hintergrund unterschieden werden kann, wird als crossing point (CP) bezeichnet. Bei einer erfolgreichen RT-qPCR liegt dieser Wert zwischen 25 und 30. Aus den Fluoreszenzwerten und der Anzahl der durchgeführten PCR-Zyklen lässt sich die DNA-Menge zu Beginn des Experiments berechnen.

4.1.3.1 RT-qPCR: Primerdesign

Die Sequenz des *SLC6A15* Gens wurde auf der Homepage www.genome.ucsc.edu ermittelt. Anhand dieser DNA-Sequenz wurden Intron-überbrückende (intron-spanning) Primer für die lange Isoform beim Assay Design Center (www.universalprobelibrary.org) entworfen und bei Metabion International AG (München, Deutschland) bestellt (s. Abb. 4 und 5; Länge des überbrückten Introns: 1432 Nukleotide (nt)). Die lange Isoform des *SLC6A15*-Gens ist dabei von besonderer Relevanz, da vor allem die Expression dieser Isoform von dem SNP rs1545843 reguliert wird (Kohli et al., 2011).

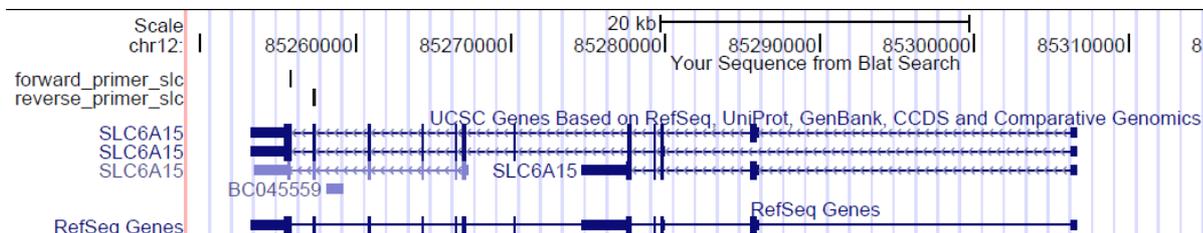


Abb. 4: Position der Primer für die RT-qPCR

Primer für die lange *SLC6A15*-Isoform, Vorwärts-Primer: „forward_primer_slc“, Rückwärts-Primer: „reverse_primer_slc“.

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	27	2244 - 2270	60	37	tgctaataagctagtggttggaatatgg
Right	25	2313 - 2337	59	40	ggatagctcagaaattcttcagatg

Amplicon (94 nt)

```
tgctaataagctagtggttggaatatgggattaagtcctcctggctataacgcattgattgaagataaggcatctgaagaatttctgagc
tatcc
```

Abb. 5: Sequenzen der entworfenen *SLC6A15*-Primer

„Left“ Primer = Rückwärts-Primer; „right“ Primer = Vorwärts-Primer ; Tm = Schmelztemperatur; %GC = prozentualer Anteil von GC-Basenpaaren an den Basenpaaren des jeweiligen Primers. (www.universalprobelibrary.org)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	26	1289 - 1314	59	38	ggctcttattttaagaatccactccttc
Right	25	1348 - 1372	59	36	tgttcaattggtgatgtcttccact
Amplicon (84 nt)					
ggctcttattttaagaatccactccttcatttataatgtgacgggaatgtggctctgacatagtggaagacatacacaattgaaca					

Abb. 6: Sequenzen der *TBP*-Primer

„Left“ Primer = Rückwärts-Primer; „right“ Primer = Vorwärts-Primer ; ; Tm = Schmelztemperatur; %GC = prozentualer Anteil von GC-Basenpaaren an den Basenpaaren des jeweiligen Primers. (www.universalprobelibrary.org)

PCR-Primer sollten idealerweise eine Länge von mindestens 20 Basenpaaren (*base pairs*, bp), eine mittlere Schmelztemperatur von 60° C und einen GC-Prozentanteil von (%GC) < 60 haben. Je kürzer die Primer, desto höher das Risiko, dass sie an mehrere Bereiche der DNA-Matrize gleichzeitig binden und so ungewollte DNA-Produkte entstehen. Guanin (G) und C binden stärker aneinander als Adenin (A) und T, da sie eine Wasserstoffbrückenbindung mehr zwischen sich ausbilden. Daher sollte der %GC unter 60 liegen um sicherzustellen, dass sich der DNA-Doppelstrang im Denaturierungsschritt vollständig trennt.

4.1.3.2 RT-qPCR: Test-PCR

Um zu überprüfen, ob die Primer und der Mastermix funktionieren und eine signifikante Vervielfältigung der DNA-Matrize möglich ist, wurde eine Test-PCR mit *TBP* als Kontrollgen durchgeführt.

Der zweifach konzentrierte Mastermix (LightCycler[®] 480 Probes Master, Roche Applied Science) bestand aus einem Reaktionspuffer, einem Deoxynukleotid-Mix, FastStart Taq DNA-Polymerase und Magnesiumchlorid. Es wurden cDNAs mit unterschiedlichen Konzentrationen verwendet, um dadurch die optimale cDNA-Konzentration für den Hauptversuch zu ermitteln. Drei Verdünnungen (1:20, 1:40 und 1:100) einer cDNA (12,5ng/μl) aus humanen Blutzellen und zwei Verdünnungen (1:20 und 1:40) einer HeLa-Zell-cDNA (2,5ng RNA/μl cDNA) wurden hergestellt. Die letzteren beiden Verdünnungen dienten dabei als Primerkontrolle (s. 4.1.2.). Wenn diese bei den HeLa-Zellen funktionieren, ist das auch bei den cDNA-Proben aus Blut anzunehmen.

Für eine PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden folgende Komponenten in je eine Vertiefung einer LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 pipettiert:

- 5 µl Lightcycler Mastermix 2x konzentriert (konz.)
- 0,5 µl Wasser PCR-grade
- 0,2 µl des 1/10 verdünnten forward primers (jeweils *SLC6A15* oder *TBP*)
- 0,2 µl des 1/10 verdünnten reverse primers (jeweils *SLC6A15* oder *TBP*)
- 0,1 µl der spezifischen Probe (#79 für *SLC6A15* und #67 für *TBP*)
- 4 µl cDNA (unterschiedliche Verdünnungen humaner Blut-cDNA oder HeLa-Zell-cDNA)

Um falsche Interpretationen zu vermeiden, wurden alle Proben zweimal getestet. Die LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 wurde mit einer speziellen Folie verschlossen und danach für 2 Minuten (Min.) bei 1500 g (g = Erdbeschleunigung) in einer Heraeus Multifuge 1 L-R zentrifugiert. Danach wurden die Proben im LightCycler® 480 zunächst für 5 Min. bei 95°C denaturiert, um die DNA im Anschluss in 45 PCR-Zyklen zu amplifizieren. In jedem dieser Zyklen wurden die Proben erst zur Denaturierung auf 95°C erhitzt (10 Sek.), dann für das Primer-Annealing auf 60°C heruntergekühlt (30 Sek.) und zuletzt wieder auf 72°C (1 Sek.) erhitzt, da bei dieser Temperatur die Taq-Polymerase ihr Aktivitätsoptimum hat. Am Ende des Versuches wurden die Proben in 30 Sek. auf 40°C heruntergekühlt.

4.1.4 Nested PCR

Die nested PCR („verschachtelte PCR“) kann für die Amplifikation sehr kleiner DNA-Mengen genutzt werden. Sie besteht aus zwei PCR-Schritten. Im ersten Schritt ist die zu amplifizierende DNA-Matrize (Amplikon) länger als der DNA-Abschnitt von Interesse. Dieses Amplikon wird in der ersten PCR-Runde amplifiziert und danach aufgereinigt. Im zweiten Schritt dient es als Matrize für die zweite PCR, bei der es sich in dieser Arbeit um eine RT-qPCR handelt. Bei dieser wird durch spezifische Primerbindung nur das gewünschte DNA-Stück amplifiziert. Die in der ersten PCR durch unspezifische Primerbindungen entstandenen Nebenprodukte werden dadurch nicht mehr vervielfältigt. So wird eine „doppelte“ PCR von der gewünschten DNA-Sequenz durchgeführt, um auch bei geringen DNA-Mengen ausreichend genetisches Material für weitere Experimente herzustellen. Da die nested PCR aus zwei PCRs besteht, ist diese Methode allerdings ungenauer und fehleranfälliger als eine einfache RT-qPCR.

4.1.4.1 Nested PCR: Primerdesign

Die Sequenz des *SLC6A15* Gens wurde wieder auf der Homepage www.genome.ucsc.edu ermittelt. Anhand der DNA-Sequenz wurden nested PCR-Primer für die lange Isoform beim Assay Design Center (www.universalprobelibrary.org) entworfen und bei Metabion bestellt (s. Abb. 7). Für die RT-qPCR wurden die im vorherigen Experiment entworfenen Primer für die lange *SLC6A15* Isoform verwendet (s. 4.1.3.1.).

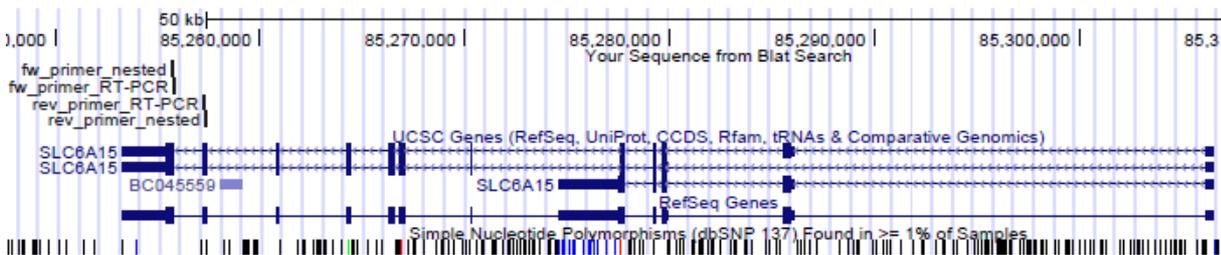


Abb. 7: Position der Primerpaare für die nested PCR

Primer für die lange *SLC6A15*-Isoform, „Fw_primer_nested“ und „rev_primer_nested“ (fw = forward, rev = reverse) sind die Primer für die erste PCR, „fw_primer_RT-qPCR“ und „rev_primer_RT-qPCR“ sind die Primer für die zweite PCR (RT-qPCR).

4.1.4.2 Nested PCR: PCR

Für die erste PCR der nested PCR wurde das GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®) benutzt. Der Mastermix bestand aus deoxynucleotid Triphosphaten (dNTP, jeweils 2mM), Titanium 10x Puffer, forward und reverse Primer (jeweils 10µM), Titanium-Taq-Polymerase (Clontech), molekularem Wasser und 5 µl cDNA. Die hergestellte HeLa-Zell cDNA und die aus humanen Blutzellen stammenden cDNAs dienten als Matrizen für die nested PCR: es wurde jeweils unverdünnte, 1:5 verdünnte und 1:10 verdünnte cDNA eingesetzt. Durch die unterschiedlichen Ansätze sollte festgestellt werden, bei welcher Menge an cDNA die beste Messung erfolgen kann.

Für eine Nested PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden folgende Komponenten in eine Vertiefung einer LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 pipettiert:

- 5 µl dNTPs (2 mM)
- 5 µl Titanium 10x buffer
- 1 µl eines 10µM (10 pmol/µl) forward primers (jeweils *SLC6A15* oder *TBP*)
- 1 µl eines 10µM (10 pmol/µl) reverse primers (jeweils *SLC6A15* oder *TBP*)
- 0,5 µl Titanium Taq-Polymerase (Clontech)

- 36,5 µl Wasser PCR-grade
- 5 µl cDNA (unterschiedliche Verdünnungen humaner Blut-cDNA oder HeLa-Zell-cDNA)

Der PCR-Ansatz wurde zunächst bei 95°C für 5 Min. inkubiert, um eventuell enthaltene Proteasen und Nukleasen zu deaktivieren. Nach dieser initialen Denaturierung wurde der PCR-Ansatz in jedem Zyklus zunächst für 15 Sek. auf eine Temperatur von 95°C erhitzt, um die DNA-Stränge zu denaturieren. Danach wurde für 15 Sek. auf 50°C abgekühlt. Dies ist die mit dem Tm Calculator von *New England Biolabs* (NEB) errechnete optimale *annealing*-Temperatur für die nested-Primer. Als letzter Schritt jedes Zyklus wurde für 15 Sek. auf eine Temperatur von 68°C erhitzt, da die verwendete Taq-Polymerase hier ihr Optimum hat. Nach 10 Zyklen wurde der PCR-Ansatz für 3 Min. bei 68°C inkubiert. Anschließend wurde der PCR-Ansatz aufgereinigt, um störende Komponenten wie nicht verbrauchte Nukleotide und Primer zu entfernen, wodurch das amplifizierte DNA-Fragment optimal weiterverarbeitet werden kann. Hierfür wurde das Agencourt® Ampure® XP Kit (Beckman Coulter, Massachusetts, USA) verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

4.1.4.3 Nested PCR: Gelelektrophorese

Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, um die amplifizierte DNA sichtbar zu machen und dadurch zu überprüfen, ob die Länge des DNA-Fragments mit der erwarteten Länge übereinstimmt. Die amplifizierten DNA-Stücke sind in diesem Versuchsschritt noch größer als der eigentlich gewünschte Abschnitt.

Ein Ethidiumbromid (EtBr) enthaltendes 2%iges Agarose-Fertiggel von Invitrogen™ wurde mit dem aufgereinigten PCR-Produkt, das mit 10x Blue Juice Gel Ladepuffer (Invitrogen™) gemischt war, beladen. Das Bild des Bandenmusters wurde mit der E-Box VX2 von Vilmer Lourmat erstellt.

4.1.4.4 Nested PCR: RT-qPCR

Für die zweite PCR der nested PCR wurde eine RT-qPCR (s. 4.1.3.) mit dem LightCycler® 480 (Roche Applied Science) durchgeführt. In Zweifachbestimmung wurden jeweils 10 µl für die RT-qPCR eingesetzt:

- 5 µl Lightcycler Mastermix 2x konz.
- 0,2 µl der Verdünnung 1µl forward primer (jeweils *SLC6A15* oder *TBP*) in 9µl Wasser
- 0,2 µl der Verdünnung 1µl reverse primer (jeweils *SLC6A15* oder *TBP*) in 9µl Wasser
- 0,1 µl spezifische Probe (#79 für *SLC6A15* und #67 für *TBP*)

- 4,5 µl cDNA (in jeweils unterschiedlichen Verdünnungen humane Blut-cDNA oder HeLa-Zell-cDNA)

Die LightCycler® 480 Multiwell Plate 384 wurde mit einer speziellen Folie verschlossen und für 2 Min. bei 1500g in einer Heraeus Multifuge 1 L-R zentrifugiert. Danach wurden die Proben in den LightCycler® 480 eingelegt und zunächst für 5 Min. bei 95°C denaturiert. Im Anschluss folgten 45 Amplifikationszyklen. In jedem dieser Zyklen wurden die Proben zunächst für 10 Sek auf 95°C erhitzt (Denaturierung), dann für 30 Sek. auf 60°C heruntergekühlt (Annealing) und zuletzt wieder für 1 Sek. auf 72°C erhitzt (Amplifizierung). Am Ende des Versuches wurden die Proben in 30 Sek. auf 40°C heruntergekühlt.

4.1.5 Dex-Suppression

In dieser Versuchsreihe sollte mittels der im Rahmen dieser Arbeit etablierten RT-qPCR die genotypabhängige *SLC6A15*-mRNA-Expression bei Gesunden in Reaktion auf Dex-Einnahme untersucht werden. Für die Dex-Suppressions-Versuchsreihe wurden 25 gesunde männliche Probanden rekrutiert. Alle Probanden wurden über potentielle Risiken des Versuchs aufgeklärt und unterschrieben eine schriftliche Einverständniserklärung.

4.1.5.1 Dex-Suppression: Auswahlkriterien für die Probanden

Folgende Kriterien wurden bei der Auswahl der Probanden für die Dex-Suppression-Versuchsreihe durch Befragung geprüft:

- Männlich
- Keine chronischen Erkrankungen
- Keine psychiatrischen Auffälligkeiten in der Vergangenheit oder der Familie
- Keine akuten Erkrankungen zum Zeitpunkt der Untersuchung
- Keine Drogenabhängigkeit
- Kaukasier

Alle Probanden haben mindestens 4 Stunden vor dem Versuch weder gegessen noch getrunken. Außerdem wurde von allen Probanden während der zwei Tage des Versuchs auf Rauchen, Alkohol und Kaffee verzichtet. Der Konsum von Marihuana oder anderen Drogen innerhalb der 2 Wochen vor dem Versuch war ein klares Ausschlusskriterium, wodurch sich die ursprüngliche Probandenzahl von 26 auf 25 verringert hat.

4.1.5.2 Dex-Suppression: Fragebögen

Psychiatrische Auffälligkeiten oder Erkrankungen der Probanden wurden anhand von, in der psychiatrischen Diagnostik etablierten, Fragebögen festgestellt. Dazu wurden folgende Fragebögen verwendet: HAM-D21, Beck Depression Inventory und Composite International Diagnostic Interview (CIDI). Anhand des HAM-D mit 21 Fragen (Hamilton, 1960) wurden in Fremdbeurteilung (Fragebogen wurde nicht vom Patienten selbst ausgefüllt) Symptome einer Depression inklusive Niedergeschlagenheit, Schuldgefühle, Suizidgedanken, Schlafstörungen, Interessensverlust an Aktivität und Arbeit, psychomotorische Retardierung, Agitation, Angst, somatische Symptome, Hypochondrie, Gewichtsverlust, Depersonalisation und Derealisation, paranoide Symptome, Manie und Zwang beurteilt. Ab 10 Punkten wird von einer leichten, ab 20 Punkten von einer mittelschweren und ab 30 Punkten von einer schweren Depression gesprochen.

Ein weiteres Werkzeug zur Feststellung depressiver Tendenzen der untersuchten Probanden war der BDI (Beck, Ward, Mendelson, Mock, & Erbaugh, 1961). Dieser Fragebogen, der vom Proband eigenhändig ausgefüllt wird, testet auf folgende Symptome: Gefühl der Hoffnungslosigkeit, Reizbarkeit, Schuldgefühle, das Gefühl bestraft zu werden, Müdigkeit, Gewichtsverlust und vermindertes Interesse an Sex. Die Cut-off-Werte dieses Tests sind wie folgt: 0-9: keine/minimale MDD, 10-18: leichte MDD, 19-29: mäßige MDD und 30-63: schwere MDD.

Das CIDI (Robins et al., 1988) ist ein umfassendes Interview mit Fragen, die sowohl ICD-10 als auch DSM-IV Kriterien berücksichtigen. Dieses Interview diente der Ergänzung von HAM-D21 und BDI in der Beurteilung des psychiatrischen Status der Probanden. Mittels CIDI kann objektiv geprüft werden, ob psychiatrische Erkrankungen vorliegen. Von Objektivität im Sinne der Gütekriterien für psychologische Tests kann gesprochen werden, da der Interviewer die Fragen exakt so vorlesen muss wie sie auf dem Bildschirm erscheinen. Er darf sie folglich nicht in seinen eigenen Worten ausdrücken, was zu Fehlern und verfälschten Antworten führen könnte.

4.1.5.3 Dex-Suppression: Ablauf des Experiments

Vor Beginn des Versuchs wurden von allen Probanden demographische Daten aufgenommen und anhand von Fragebögen psychiatrische Auffälligkeiten ausgeschlossen. Des Weiteren wurden Blutdruck, Puls, Gewicht und Größe der Probanden bestimmt.

Zu fünf verschiedenen Zeitpunkten wurde den Probanden Blut abgenommen. Die abgenommenen Blutröhrchen für die RNA-Extraktion wurden bei -20°C und solche, aus denen Cortisol oder ACTH bestimmt werden sollten, bei -80°C gelagert.

Die erste Blutentnahme erfolgte vor der Einnahme von 1,5mg Dex per os (p.o.) um 12:00 Uhr („0“), die nächsten 1, 3, 6 und 23 Stunden später (die letzte folglich um 11:00 Uhr am Folgetag, s. Tabelle (Tab.) 1). Zu jedem Messzeitpunkt wurde Blut in PaxGene Blood RNA-Röhrchen (Qiagen) abgenommen („mRNA“ in Tab. 1), aus denen später RNA für die *SLC6A15*-RT-qPCR isoliert wurde. Aus einem ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) Blutröhrchen, das nur vor Dex-Einnahme abgenommen wurde, wurde DNA isoliert, um den rs1545843-Genotyp zu bestimmen. EDTA verhindert die Koagulation der Blutprobe durch Komplexbildung von für die Gerinnung essentiellen Kalziumionen. Mittels der zu jedem Messzeitpunkt abgenommenen „Cort/ACTH“-Röhrchen erfolgte die Bestimmung der jeweiligen Cortisol- und ACTH-Werte. Die EDTA-Blutentnahme für das Blutbild diente dem weiteren Ausschluss möglicher Pathologien der Probanden.

Std. nach Einnahme von 1,5 mg Dex	0 (vor Dex-Gabe)	1	3	6	23
Blutbild	X				
DNA	X				
mRNA	X	X	X	X	X
Cort/ACTH	X	X	X	X	X

Tab. 1: Blutentnahme-Schema für Dex-Suppression

x = abgenommenes Blutröhrchen (Blutbild: 2,7 Milliliter (ml) EDTA Röhrchen; Cort/ACTH und DNA: 7,5 ml EDTA Röhrchen; mRNA: 2,5ml PaxGene®- Röhrchen)

4.1.5.4 Dex-Suppression: Messung von Cortisol und ACTH

Cortisol- und ACTH-Konzentrationen im Plasma jedes Probanden wurden von der klinischen Chemie des Max-Planck-Institutes (MPI) für Psychiatrie in München bestimmt. Die Cortisolkonzentration wurde unter Verwendung eines Radioimmunoassay (RIA) Kits (INC Biomedicals, Carlson, USA) mit einer maximalen Bestimmung von 0.3 ng/ml Plasma ermittelt.

Zur quantitativen Bestimmung der ACTH-Konzentration im Plasma wurde in einem Cobas 6000 (Roche) ein immunologischer in-vitro-Test durchgeführt. Hierfür wurden 50µl der jeweiligen Probe mit einem biotinylierten monoklonalen ACTH-spezifischem Antikörper und einem mit Ruthenium-Komplex markiertem monoklonalen ACTH-spezifischem Antikörper inkubiert. Nach Zugabe von Streptavidin-beschichteten Mikropartikeln wurde mit einem Modul für Immundiagnostik (e601-Modul von Roche) unter Anlegen von Spannung und Verwendung einer Chemilumineszenz gemessen. Sowohl bei der Cortisol- als auch bei der ACTH-Messung wurden alle Arbeitsschritte gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

4.1.5.5 Dex-Suppression: DNA-Extraktion

Die DNA wurde mittels des von Qiagen produzierten Generation Capture Column Kit extrahiert. Von jedem DNA-Vollblut-Röhrchen wurden 200 µl für die DNA-Extraktion verwendet. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

4.1.5.6 Dex-Suppression: RNA-Extraktion

RNA wurde von der klinischen Chemie des MPI für Psychiatrie in München aus dem in PaxGene® Blood RNA-Röhrchen (Qiagen) gesammelten Vollblut extrahiert. Diese Röhrchen stabilisieren intrazelluläre RNA. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

4.2 Datenanalyse zum Zusammenhang zwischen Stresshormonhaushalt und rs1545843-Risikogenotyp

Alle statistischen Analysen wurden unter Verwendung von SPSS für Windows (Version 20.0, SPSS, Chicago, USA) durchgeführt. Als signifikant wurden p-Werte (probability-value, Signifikanzwert) < 0,05 betrachtet. Qualitative demographische und klinische Daten der unterschiedlichen Genotypgruppen wurden anhand des χ^2 ("chiquadrat")-Tests nach Pearson miteinander verglichen.

Für die statistische Auswertung der ACTH- und Cortisolwerte zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten wurde sowohl bei der MARS- als auch bei der Dex-Suppression-Studie ein allgemeines lineares Modell (*general linear model*, GLM) mit Messwiederholungen und rs1545843-Genotyp als Zwischensubjektfaktor gerechnet.

Da Kohli et al. (2011) bei Trägern des rs1545843 AA Genotyps ein erhöhtes Risiko an MDD zu erkranken beobachtete, wurden Probanden mit dem Genotyp AA als Träger des Risikogenotyps bezeichnet. Der AG und GG Genotyp wurde als Nicht-Risikogenotyp angesehen. Um zu überprüfen, ob diese Einteilung zutreffend ist, wurde für die Auswertung der Cortisol- und ACTH-Werte bei beiden Probandengruppen zusätzlich in einem GLM mit Messwiederholungen mit den Genotypgruppen AA, AG und GG separat gerechnet (s. Anhang 9.1.1.2. und 9.1.2.2.).

4.2.1 MARS: Rs1545843 und Dex-/CRH-Test bei Aufnahme von depressiven Patienten

Im Rahmen des MARS Projekts wurde der Therapieerfolg bei MDD-Patienten untersucht (Hennings et al., 2009). 842 kaukasische depressive Patienten mit einzelnen oder wiederholten depressiven Episoden bzw. bipolarer Störung zwischen 18 und 75 Jahren wurden nach stationärer Aufnahme in psychiatrische Kliniken im Süden von Bayern untersucht und im klinischen Verlauf

beobachtet. Der Therapieerfolg wurde in Abhängigkeit von demografischen Faktoren, psychiatrischer Vorgeschichte und HPA-Achsendysregulation betrachtet. Zur Beurteilung der HPA-Achsenregulation wurden im Verlauf des Klinikaufenthaltes wiederholt Dex-/CRH-Tests durchgeführt. In dieser Arbeit werden jedoch ausschließlich die Ergebnisse des ersten Dex-/CRH-Tests nach Aufnahme in Abhängigkeit des rs1545843-Genotyps analysiert.

4.2.1.1 MARS: Ablauf des Dex-/CRH-Tests

Im MARS-Projekt wurde der im klinischen Verlauf der Probanden wiederholt durchgeführte Dex-/CRH-Test (innerhalb der ersten 10 Tage nach Aufnahme und vor Entlassung) zur Beurteilung eines Zusammenhangs zwischen HPA-Achsenregulation und Therapieerfolg verwendet. Er wurde nach dem von Heuser et al. beschriebenen Ablauf durchgeführt (Heuser et al., 1994):

Die Probanden nahmen um 23:00 Uhr 1.5 mg Dexamethason oral ein. Am darauf folgenden Tag wurde ihnen um 14:30 Uhr ein venöser Zugang gelegt. Um 15:00, 15:30, 15:45, 16:00 und 16:15 Uhr wurde in EDTA- und Trasylo-(Aprotinin)haltige Röhrchen (Bayer, Leverkusen, Deutschland) Blut abgenommen. Um 15:02 Uhr wurde über den venösen Zugang 100 Mikrogramm (μg) humanes CRH (Ferring, Kiel, Deutschland) appliziert. Die Blutabnahme um 15:00 Uhr war demnach noch nicht von CRH beeinflusst („baseline-Werte“: Dex-supprimierte ACTH- und Cortisolwerte vor CRH-Applikation). Die laborchemische Cortisol- und ACTH-Bestimmung wird nicht durch Dex verfälscht.

Die Probanden saßen während der gesamten Testdauer in einem stillen Raum ohne Menschenkontakt, Fernsehen oder anderen potenziellen Stressoren. In diesem Raum war eine Kamera installiert, wodurch mögliches Unwohlsein von den Probanden an den Untersucher kommuniziert werden konnte. Über den venösen Zugang konnte Blut durch ein Loch in der Wand zum Untersucher im Nachbarraum geleitet werden.

4.2.1.2 MARS: Genotypisierung

Die Genotypisierung der MARS-Patienten wurde im Labor des MPI für Psychiatrie in München durchgeführt. Die DNA wurde aus Vollblut isoliert und unter Verwendung des Human 610K und OmniExpress BeadChips von Illumina (Illumina Inc., San Diego, USA) genotypisiert. Alle Arbeitsschritte wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt.

4.2.1.3 MARS: Hardy-Weinberg-Prinzip (HWP)

Allelfrequenzen und -verteilungen bleiben unabhängig von ihrer absoluten Größe über Generationen hinweg konstant, es sei denn, sie werden bestimmten Evolutionseinflüssen

unterworfen, dies wird Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (*Hardy-Weinberg-equilibrium*, HWE) genannt. Es wurde 1908 von dem englischen Mathematiker Hardy und dem deutschen Arzt Weinberg erstmals beschrieben (Edwards, 2008):

$$p + q = 1$$

p = Allelfrequenz von A, q = Allelfrequenz von a

Genotypfrequenzen h (beim HWP konstant): $p^2 + 2pq + q^2 = 1$

$p^2 = h(AA)$, $2pq = h(Aa)$, $q^2 = h(aa)$

Das HWP kann als Werkzeug verwendet werden, um den Gleichgewichtszustand von Genotypenfrequenzen in einer Population zu beurteilen.

In dieser Arbeit wurde die „HapMap-CEU“ Population als Vergleichspopulation verwendet (s. Tab. 2 und 5). Ziel des International HapMap Projects ist die Kartographierung der Haplotypen des menschlichen Genoms, um dadurch genetische Variationsmuster des Menschen zu beschreiben. „CEU“ steht für *Utah residents with ancestry from Northern and Western Europe*. Da diese Gruppe einer deutschen Probandengruppe genetisch am ähnlichsten ist, wurde die CEU Population als Vergleichspopulation herangezogen.

Nach dem HWP ist die Kombination von Allelen zweier Loci zufällig, sodass die Häufigkeit der Kombination der Häufigkeit der individuellen Allele entspricht. Es kommt allerdings auch vor, dass Allele bevorzugt mit bestimmten Allelen vererbt werden und diese Kombination folglich häufiger existiert als nach dem HWP aufgrund der Frequenz der einzelnen Allele zu erwarten wäre. Dieses Prinzip wurde 1956 von Kimura beschrieben und als LD bezeichnet.

4.2.1.4 MARS: GLM mit Messwiederholungen

Ein GLM mit Messwiederholungen und dem rs1545843-Genotyp als Zwischensubjektfaktor wurde zur statistischen Auswertung der im Dex-/CRH-Test ermittelten Stresshormonwerte angewendet. Die Stresshormone Cortisol und ACTH wurden getrennt voneinander betrachtet. Es wurde getestet welche Kovariaten bei den jeweiligen Hormonen einen Effekt haben (s. Anhang 9.1.1., Tab. 9.1 und Tab. 9.2). Bei den Cortisolwerten zeigten die Kovariaten Geschlecht, BMI und Vorepisoden signifikante Effekte, bei ACTH war es der BMI. Diese Kovariaten wurden in den durchgeführten Varianzanalysen (*analysis of variance*, ANOVA) mit Messwiederholungen berücksichtigt.

4.2.2 Dex-Suppression: Rs1545843 und Cort-/ACTH-Ausschüttung nach Dex-Einnahme bei gesunden Probanden

Da die Gruppe der Dex-Suppression-Probanden sowohl in der Anzahl der Probanden, der Geschlechterverteilung und des durchgeführten Hormontests (Dex-Suppression versus Dex-/CRH-Test) von der Gruppe der MARS-Probanden abweicht, kann diese nicht als *Kontrollgruppe* angesehen werden.

4.2.2.1 Dex-Suppression: Genotypisierung

Die Genotypisierung der Dex-Suppressionsproben wurde von der klinischen Chemie des MPI für Psychiatrie in München unter Verwendung des Hybridization Probe Assays von Roche am LightCycler® 480 durchgeführt. Dazu wurde die DNA aus EDTA-Vollbluttröhrchen isoliert und die SNPs rs1545843 und rs1031681 genotypisiert. Diese beiden SNPs zeigten in bisherigen Studien den größten Zusammenhang mit MDD (Kohli et al., 2011).

4.2.2.2 Dex-Suppression: GLM mit Messwiederholungen

Auch beim Dex-Suppressionversuch wurde mittels eines GLM mit Messwiederholungen und dem rs1545843-Genotyp als Zwischensubjektfaktor die statistische Auswertung der Stresshormonwerte durchgeführt. Zuvor wurde überprüft welche Kovariaten bei welchen Stresshormonen einen Effekt haben (s. Anhang 9.1.2., Tab. 9.19 und 9.20). Da keine der getesteten Kovariaten einen Effekt zeigte, wurde die ANOVA mit Messwiederholungen ohne Kovariaten gerechnet. Wie auch beim MARS-Projekt wurden jeweils eine ANOVA zur statistischen Auswertung der Cortisolwerte und eine zur Analyse der ACTH-Werte durchgeführt.

5 Ergebnisteil

5.1 Etablierung der RT-qPCR bei MARS- und Dex-Suppression-Probanden zur Entwicklung eines SLC6A15 Biomarkers

5.1.1 MARS: Test-RT-qPCR

In diesem Versuch konnte die *SLC6A15*-Genexpression in humanen Blutzellen mit einer RT-qPCR nicht gemessen werden. Primer und cDNA wurden als mögliche Fehlerquellen ausgeschlossen. Unter Verwendung der Primer für die lange Isoform von *SLC6A15* wurde in HeLa-Zellen (cp ~ 27, s. Abb. 8) eine deutliche Genexpression beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Primer funktionsfähig waren. Die Experimente wurden jeweils mit Primern für *SLC6A15* und *TBP* als Kontrolle durchgeführt. Da für *TBP* (cp ~ 26, s. Abb.9) immer eine Expression gemessen wurde, sowohl in HeLa-Zellen als auch in humanem Blut, kommt eine mangelhafte Qualität der cDNA als mögliche Fehlerquelle nicht in Frage.

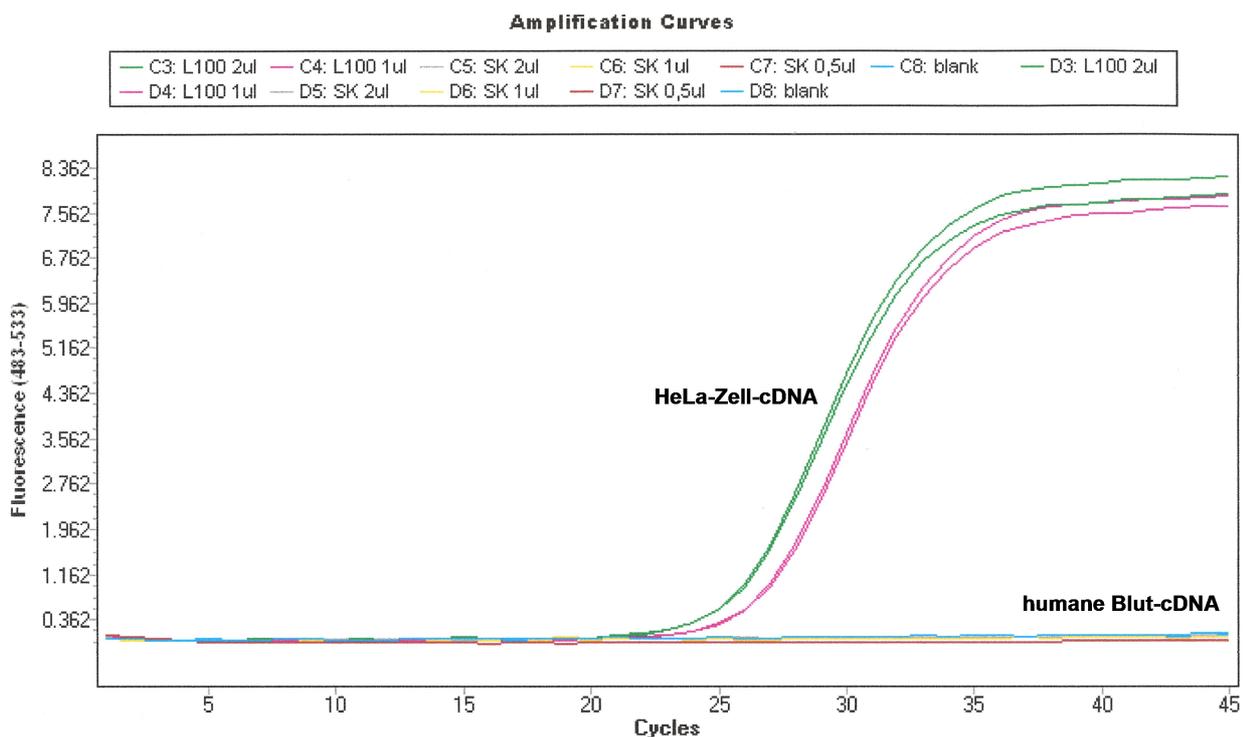


Abb. 8: Amplifizierungskurven der RT-qPCR, *SLC6A15*

RT-qPCR, in der die Expression der langen Isoform des *SLC6A15* Gens untersucht wurde. L100 = HeLa-Zell-cDNA, SK = humane Blut-cDNA

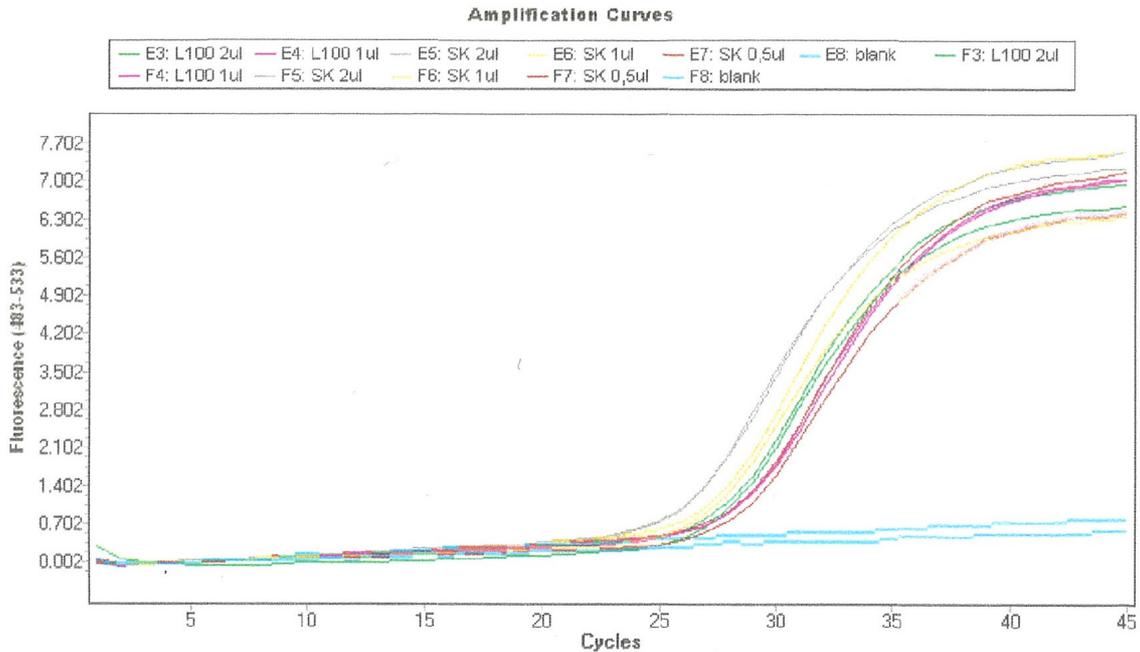


Abb. 9: Amplifizierungskurven der RT-qPCR, *TBP*

RT-qPCR, in der die Expression des Kontrollgens *TBP* untersucht wurde. L100 = HeLa-Zell-cDNA, SK = humane Blut-cDNA

5.1.2 MARS: Nested PCR

Da die Menge an gebildetem *SLC6A15*-Transkript zu klein war, um mit einer einfachen RT-qPCR in Blutzellen gemessen zu werden, wurde eine nested PCR (s. 4.1.4.), mit der bereits kleinste DNA-Mengen nachgewiesen werden können, durchgeführt. Diese Methode besteht aus zwei PCR-Schritten.

5.1.2.1 Nested PCR: PCR /Gelelektrophorese

Die Ergebnisse der nested PCR bestätigten die Resultate der in 5.1.1. durchgeführten RT-qPCR. Abb. 10 zeigt, dass die PCR mit HeLa-Zell-cDNA gut funktioniert hat und demnach eine klare Bande mit der gewünschten Länge vorhanden ist (Gelbild Nummer 9 und 13). Bei Verwendung der cDNA aus peripherem Blut hat die PCR allerdings nicht funktioniert, was durch das Fehlen einer scharfen Bande angezeigt wird (Gelbild Nummer 10-12 bzw. 14-16) In den getesteten Blutproben scheint der gesuchte DNA-Abschnitt (*SLC6A15* Locus) kaum oder gar nicht vorhanden zu sein.

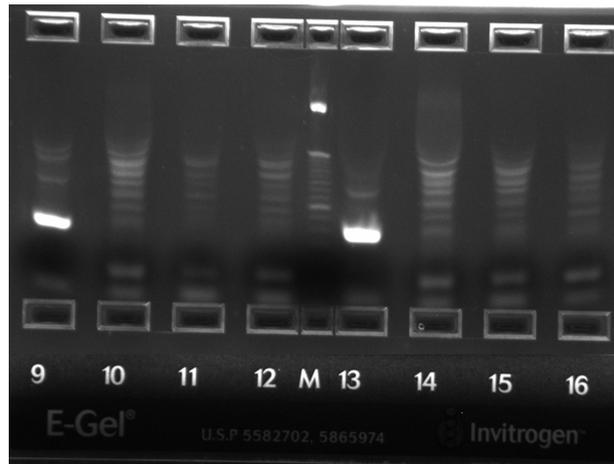


Abb. 10: Gelelektrophorese nach der nested PCR, *SLC6A15*

1 µl PCR-Produkt → 9: HeLa-Zell-cDNA, 10: Blut-cDNA unverdünnt 11: Blut-cDNA 1:5 verdünnt, 12: Blut-cDNA 1:10 verdünnt

M: Marker (50bp DNA ladder von Invitrogen™ cat# 10416-014)

5 µl PCR-Produkt → 13: HeLa_Zell-cDNA, 14: Blut-cDNA unverdünnt, 15: Blut-cDNA 1:5 verdünnt, 16: Blut-cDNA 1:10 verdünnt

Zur Kontrolle wurde das Experiment unter Verwendung der gleichen cDNAs mit den *TBP* Primern durchgeführt. In diesem Experiment hat die PCR sowohl bei den HeLa-Zell-cDNAs als auch bei den humanen Blut-cDNAs funktioniert (s. Abb.11).

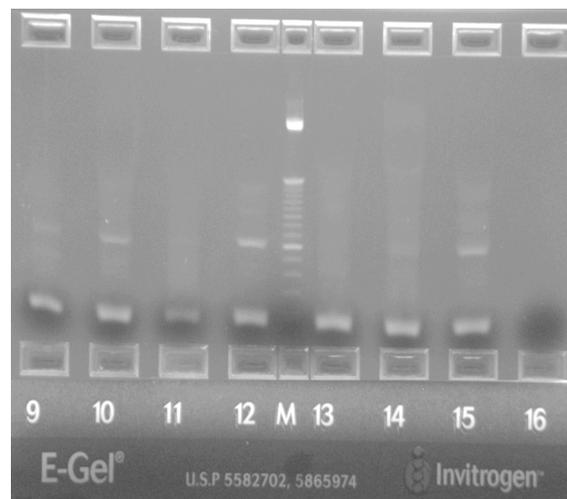


Abb. 11: Gelelektrophorese nach der nested PCR, *TBP*

1 µl PCR-Produkt → 9: HeLa-Zell-cDNA, 10: Blut-cDNA unverdünnt, 11: Blut-cDNA 1:5 verdünnt, 12: Blut-cDNA 1:10 verdünnt

M: Marker (50bp DNA ladder von Invitrogen™ cat# 10416-014)

5 µl PCR-Produkt → 13: HeLa_Zell-cDNA, 14: Blut-cDNA unverdünnt, 15: Blut-cDNA 1:5 verdünnt

5.1.2.2 Nested PCR: RT-qPCR

In dieser RT-qPCR (zweite PCR der nested PCR) konnte, wie auch in der in 5.1.1. durchgeführten RT-qPCR, keine ausreichende Expression der langen *SLC6A15*-Isoform in peripheren Blutzellen ($cp > 30$) gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurde bei Verwendung von HeLa-Zell-cDNA ein starkes Fluoreszenzsignal ($cp = 14,6$) beobachtet (s. Abb. 12). Bei der Verwendung von *TBP*-Primern konnte sowohl in der HeLa-Zell-cDNA ($cp = 20,7$) als auch in allen Verdünnungen der humanen Blut cDNA (durchschnittlicher $cp = 25,3$) ein Fluoreszenzsignal beobachtet werden (Abb. 13).

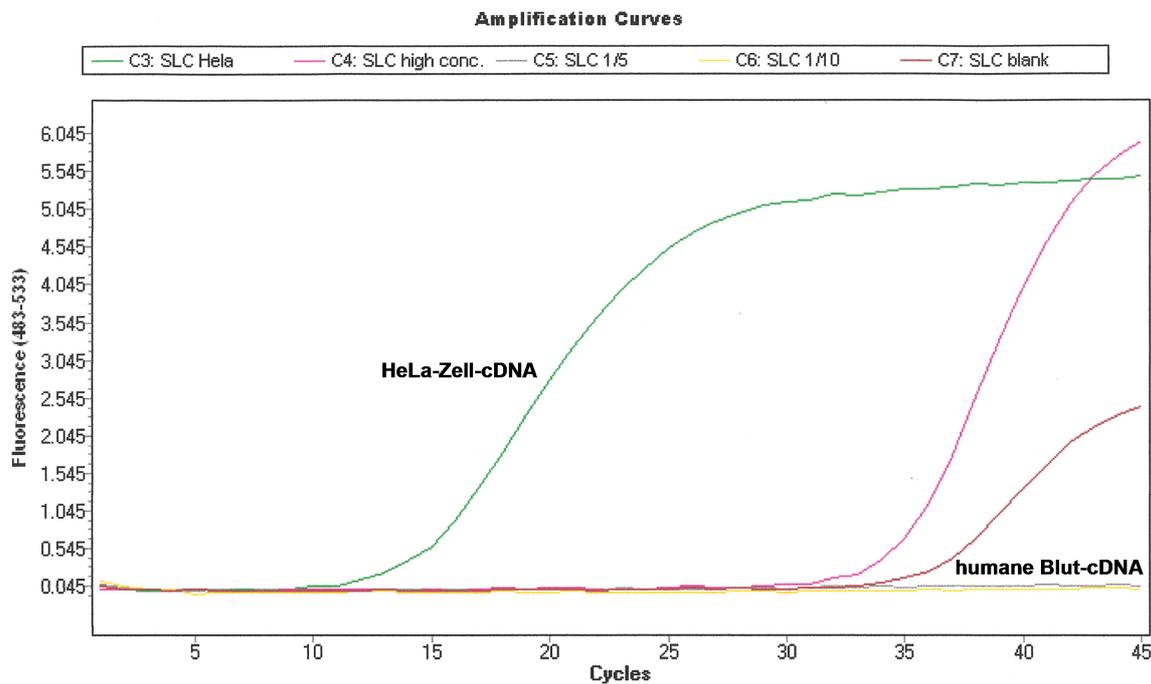


Abb. 12: Amplifizierungskurven der nested PCR (RT-qPCR), *SLC6A15*

RT-qPCR (zweite PCR der nested PCR), bei der die Expression der langen Isoform des *SLC6A15* Gens untersucht wurde. SLC Hela = HeLa-Zell cDNA, SLC high conc. = konzentrierte humane Blut-cDNA, SLC 1/5 = 1/5 Verdünnung der humanen Blut-cDNA, SLC 1/10 = 1/10 Verdünnung der humanen Blut-cDNA

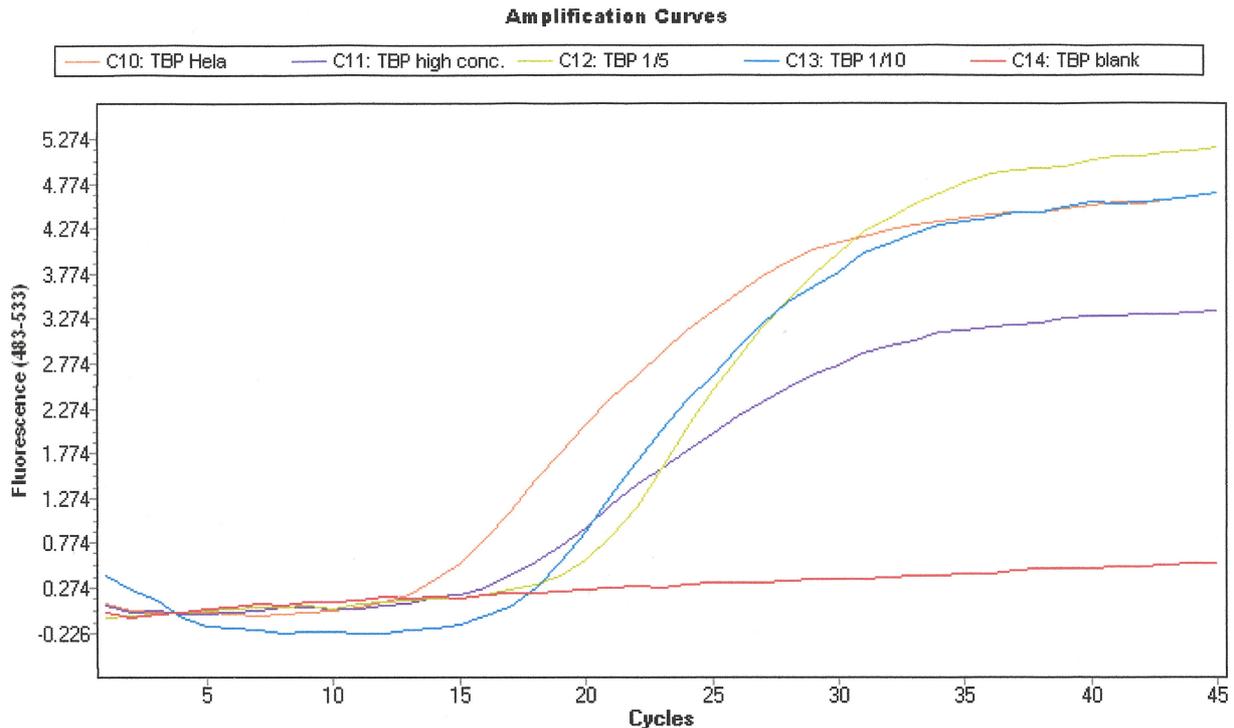


Abb. 13: Amplifizierungskurven der nested PCR (RT-qPCR), *TBP*

RT-qPCR (zweite PCR der nested PCR), in der die Expression des Kontrollgens *TBP* untersucht wurde. *TBP* Hela = HeLa-Zell-cDNA, *TBP* high conc. = konzentrierte humane Blut-cDNA, *TBP* 1/5 = 1/5 Verdünnung der humanen Blut-cDNA, *TBP* 1/10 = 1/10 Verdünnung der humanen Blut-cDNA *TBP* blank = Verdünnung ohne humane Blut-cDNA

Diese Ergebnisse zeigen, dass zu wenig *SLC6A15*-Genmaterial in peripherem Blut vorhanden ist, um es mit einer etablierten PCR-Methode messen zu können. Folglich konnten die in der Zielsetzung unter 3.1. beschriebenen RT-qPCR-Messungen der MARS- und Dex-Suppressionproben nicht durchgeführt werden und demnach kein *SLC6A15* Biomarker etabliert werden.

5.1.3 Dex-Suppression

Da in den vorherigen Versuchen mit humaner cDNA von MARS-Probanden deutlich wurde, dass rs1545843 weder mit einer RT-PCR noch mit einer nested PCR in humanen peripheren Blutzellen messbar ist, wurden die geplanten PCR-Messungen in peripherem Blut der Dex-Suppression-Probanden unterlassen. Die Daten und das Untersuchungsmaterial dieser Versuchsreihe wurden letztlich ausschließlich für die Datenanalyse verwendet.

5.2 Datenanalyse zum Zusammenhang zwischen Stresshormonhaushalt und rs1545843-Genotypen

Da bereits der Testdurchlauf für den geplanten Hauptversuch zur Etablierung eines *SLC6A15* Biomarkers in peripheren Blutzellen keine messbaren Ergebnisse erbrachte, wurde in dieser Arbeit ein zusätzlicher Schwerpunkt auf die statistische Auswertung der MARS- und Dex-Suppressionsproben gelegt (s. 3.2.). Dabei wurde der Einfluss des rs1545843-Genotyps auf die HPA-Achsenregulation betrachtet (Methoden s. 4.2.).

5.2.1 MARS: rs1545843 und Dex-/CRH-Test bei Aufnahme von depressiven Patienten

5.2.1.1 MARS: Genotypisierung

rs1545843	Genotyp	AA (%)	AG (%)	GG (%)	HWP	Anzahl der Proben
	MARS	27,3	45,7	27,0	1,000	311
	HapMap-CEU	23,0	49,6	27,4	1,000	226

Tab. 2: Genotypenverteilung des SNPs rs1545843 in den MARS-Patienten

Tab. 2 zeigt, dass die Genotypverteilung in den MARS-Patienten minimal von der in der HapMap-CEU-Population abweicht.

5.2.1.2 MARS: Deskriptive Statistik

Bei 311 MDD-Patienten des MARS-Projekts wurde im Labor des MPI für Psychiatrie in München der rs1545843-Genotyp bestimmt. Die demografischen, klinischen und Dex-/CRH-Test-Daten dieser Probanden wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. 148 der in die Studie einbezogenen Probanden waren männlich (47,6 %) und 163 weiblich (52,4 %). Die Diagnose MDD wurde durch ausgebildete Psychiater in Übereinstimmung mit den DSM-IV-Kriterien gestellt (Hennings et al., 2009). Im Durchschnitt hatten die Probanden 3 Vorepisoden und waren mit durchschnittlichen HAM-D21 Werten von 24 (Standardabweichung (SD) = 6,21) mittelgradig depressiv.

Das Durchschnittsalter der Patienten lag bei 48 Jahren. Der durchschnittliche BMI (body mass index) lag bei 25 (SD = 5,24).

267 der 311 Patienten (86 %) standen zum Zeitpunkt der Aufnahme bereits unter medikamentöser Behandlung. Tab. 3 zeigt die eingenommenen Medikamente, wobei zu beachten ist, dass einige Patienten mit mehreren Medikamenten gleichzeitig behandelt wurden. Neben Benzodiazepinen war

die Einnahme von noradrenergen und spezifisch serotonergen Antidepressiva (noradrenergic and specific serotonergic antidepressants, NaSSAs), SSRIs und Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (*serotonin-noradrenalin reuptake inhibitor*, SNRIs) am häufigsten zu beobachten.

Medikament	Anzahl der Probanden
NASSA	74 (23.8%)
SNRI	73 (23.5%)
SSRI	72 (23.2%)
TCA	46 (14.8%)
NARI	11 (3.5%)
SSRE	4 (1.3%)
andere Antidepressiva	10 (3.2%)
Neuroleptika	62 (19.9%)
Phasenprophylaktika	47 (15.1%)
Lithium	14 (4.5%)
Benzodiazepine	110 (35.4%)
Schlafmittel	89 (28.6%)

Tab. 3: Medikamenteneinnahme der Probanden bei Aufnahme

Häufigkeitsverteilungen:

Mit dem χ^2 Test nach Pearson wurde ein p-Wert von 0,13 berechnet. Demnach besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen Genotyp und Geschlecht (s. Tab. 4).

			Geschlecht		Gesamt
			Männlich	Weiblich	
Genotyp	Nicht-Risikogenotyp (AG und GG)	Anzahl	114	112	226
		% innerhalb von Genotyp	50,4%	49,6%	100,0%
	Risikogenotyp (AA)	Anzahl	34	51	85
		% innerhalb von Genotyp	40,0%	60,0%	100,0%
Gesamt		Anzahl	148	163	311
		% innerhalb von Genotyp	47,6%	52,4%	100,0%

Tab. 4: Verteilung von Geschlecht und rs1545843 Genotyp

5.2.1.3 MARS: GLM mit Messwiederholungen

Zunächst werden die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Cortisolwerte dargestellt. Der Mauchly-Test auf Sphärizität war signifikant ($\chi^2=637,489$, $p<0,01$; s. Anhang 9.1.1.1., Tab. 9.3). Dies spricht für eine Verletzung der Sphärizitätsannahme, d.h. die Varianzen der Differenzen zwischen jeweils zwei Faktorstufen sind inhomogen. In solchen Fällen werden Korrekturverfahren der Freiheitsgrade angewandt, wie in dieser Arbeit die „Greenhouse-Geisser“ Korrektur ($\epsilon=0,473$).

Nach Korrektur ergaben die Tests der Innersubjekteffekte einen signifikanten Haupteffekt des Messwiederholungsfaktors *Messzeitpunkte* ($F=8,613$; $p=0,001$; Innersubjekteffekte: s. Anhang 9.1.1.1., Tab. 9.4). Die Dex-Einnahme und CRH-Injektion hatten also einen Effekt auf den Cortisolspiegel im Blut der Probanden ($F=14,203$; $p=0,001$; Innersubjektkontraste: s. Anhang 9.1.1.1., Tab. 9.5). Eine signifikante Assoziation zwischen *Messzeitpunkte* und *Genotyp* wurde jedoch nicht beobachtet ($F=1,589$; $p=0,206$; Innersubjekteffekte: s. Anhang 9.1.1.1., Tab. 9.4), die Effekte der beiden Genotypen auf den Cortisolspiegel unterscheiden sich also nicht.

Um die zentrale Frage zu klären, ob sich die Cortisolwerte der Risikogenotypträger signifikant von denen der Nicht-Risikogenotypträger unterscheiden, wurden die Nicht-Messwiederholungsfaktoren berechnet (Tests der Zwischensubjekteffekte, s. Anhang 9.1.1.1., Tab. 9.6). Es bestand bei einem P-Wert $>0,05$ kein signifikanter Effekt für den Zwischensubjektfaktor *Genotyp* ($F=2,871$; $p=0,091$), und somit statistisch kein Einfluss des rs1545843-Genotyps auf die Cortisolwerte in peripherem Blut. Allerdings kann je nach Interpretation bei einem P-Wert $<0,1$ von einer statistischen Tendenz gesprochen werden.

Abb. 14 zeigt die nicht signifikant erniedrigten Cortisolwerte bei Risikogenotypträgern unter Berücksichtigung der Kovariaten Geschlecht ($F=4,404$; $p=0,037$), BMI ($F=4,606$; $p=0,033$) und Vorepisoden ($F=7,579$, $p=0,006$).

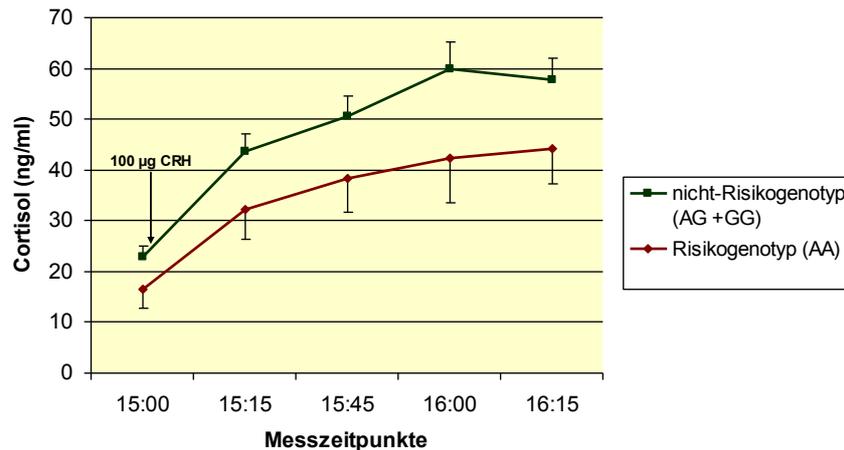


Abb. 14: Verlauf der Cortisolwerte im Dex-/CRH-Test

Nicht-Risikogenotyp vs. Risikogenotyp

Die Auswertung der ACTH-Werte ergab ähnliche Ergebnisse. Auch hier zeigte der Mauchly- Test, dass die Voraussetzung für Sphärizität nicht gegeben war ($\chi^2=809,471$; $p<0,05$; s. Anhang 9.1.1.1., Tab. 9.7). Nach Greenhouse-Geisser-Korrektur mit dem Faktor $\epsilon=0,455$ ergaben die Tests auf Innersubjekteffekte (s. Anhang 9.1.1.1., Tab. 9.8) einen signifikanten Haupteffekt des Messwiederholungsfaktors *Messzeitpunkte* ($F=23,396$; $p=0,001$), allerdings keine signifikante Assoziation von *Messzeitpunkte* mit *Genotyp* ($F=0,460$; $p=0,613$).

Wie in Abb. 15 dargestellt, zeigten die Tests auf Innersubjektkontraste (s. Anhang 9.1.1.1., Tab. 9.9) auch bei den ACTH-Werten einen linearen und steigenden Verlauf ($F=38,292$; $p=0,001$). Eine signifikante Assoziation von *Messzeitpunkte* mit *Genotyp* wurde nicht beobachtet ($F=0,628$; $p=0,429$).

Für ACTH ergaben die Tests der Zwischensubjekteffekte wie bei den Cortisolwerten keine signifikanten Unterschiede des ACTH-Wertverlaufs zwischen beiden Genotypgruppen ($F=0,754$; $p=0,386$, s. Anhang 9.1.1.1., Tab. 9.10). Die Kovariate BMI ($F=11,117$; $p=0,001$) hatte einen signifikanten Einfluss auf die ACTH-Werte.

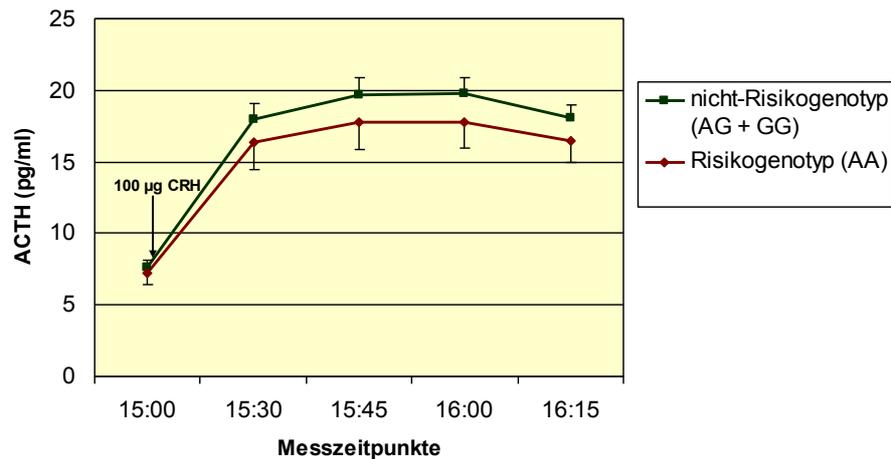


Abb. 15: Verlauf der ACTH -Werte im Dex-/CRH-Test

Nicht-Risikogenotyp vs. Risikogenotyp

5.2.2 Dex-Suppression: Rs1545843 und Cortisol-/ACTH-Ausschüttung nach Dex-Einnahme bei gesunden Probanden

5.2.2.1 Dex-Suppression: Genotypisierung

Die Genotypisierung der 26 Dex-Suppression-Probanden ergab eine von der Vergleichspopulation (HapMap-CEU) deutlich abweichende –jedoch im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (s. 4.2.1.3.) stehende- Genotypenverteilung mit mehr AG- und weniger AA- bzw. GG-Genotypen (s. Tab. 5). Das Verhältnis zwischen Risiko- und Nicht-Risikogenotyp des SNPs rs1545843 entspricht mit 19,2% zu 80,7% allerdings stärker der Referenz (23% Risiko- vs. 77% Nicht-Risikogenotyp).

rs1545843	Genotyp	AA (%)	AG (%)	GG (%)	HWP	Gesamtproben
	Dex-Suppr.	19,2	69,2	11,5	1,000	26
	HapMap-CEU	23,0	49,6	27,4	1,000	226

Tab. 5: Genotypenverteilung des SNPs rs1545843 in den Dex-Suppression Probanden

5.2.2.2 Dex-Suppression: Deskriptive Statistik

Die 26 Probanden dieser Studie waren im Durchschnitt 25 Jahre (SD = 2,81) alte gesunde Männer. Sowohl im BDI (2 Punkte), im HAM-D-21 (0 Punkte) als auch im CIDI wurde kein Verdacht auf eine psychiatrische Erkrankung festgestellt. Mit diesen standardmäßig verwendeten Diagnosefragebögen wurden folglich keine psychiatrischen Auffälligkeiten bei den Probanden diagnostiziert, was ein Ausschlusskriterium gewesen wäre. Vor Beginn der Studie lag die durchschnittliche Herzfrequenz bei 67 Schlägen/Min (SD = 5,56), der Blutdruck lag bei 121/78

mmHg (SD_{sys} = 10,09, SD_{dia} = 8,91) . 92% der Probanden waren bei einem mittleren BMI der gesamten Probandengruppe von 23,5 kg/m² (SD = 4,18) normalgewichtig.

5.2.2.3 Dex-Suppression: GLM mit Messwiederholungen

Zunächst werden die Ergebnisse der statistischen Analyse der Cortisolwerte dargestellt. Beim Dex-Suppression-Versuch lag die Voraussetzung für Sphärizität mit einem signifikanten Mauchly-Test auf Sphärizität ($\chi^2=76,158$, $p<0,05$; s. Anhang 9.1.2.1., Tab. 9.21) nicht vor. Die Freiheitsgrade wurden demnach nach Greenhouse-Geisser ($\epsilon=0,382$) korrigiert. Die Tests für Innersubjekteffekte (s. Anhang 9.1.2.1., Tab. 9.22) zeigten einen signifikanten Haupteffekt des Messwiederholungsfaktors *Messzeitpunkte* ($F=23,850$; $p=0,001$), demnach konnten Änderungen des Cortisolspiegels von einem Messzeitpunkt zum nächsten beobachtet werden. Eine signifikante Assoziation von *Messzeitpunkte* mit *Genotyp* ($F=1,090$; $p=0,332$) war in dieser Probandengruppe allerdings nicht vorhanden.

Bei den Tests der Innersubjektkontraste (s. Anhang 9.1.2.1., Tab. 9.23) ergab sich ebenfalls keine signifikante *Messzeitpunkte-Genotyp* Assoziation ($F=0,808$; $p=0,378$). Die Tests der Zwischensubjekteffekte (s. Anhang 9.1.2.1., Tab. 9.24) ergaben keinen signifikanten Einfluss des Genotyps auf den Cortisolspiegel ($F=1,285$; $p=0,269$).

In Abb. 16 werden graphisch die Mittelwerte der Cortisolwertverläufe dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Cortisolwerten nach Dex-Einnahme zwischen Trägern des rs1545843-Risikogenotyps und Probanden mit dem Nicht-Risikogenotyp.

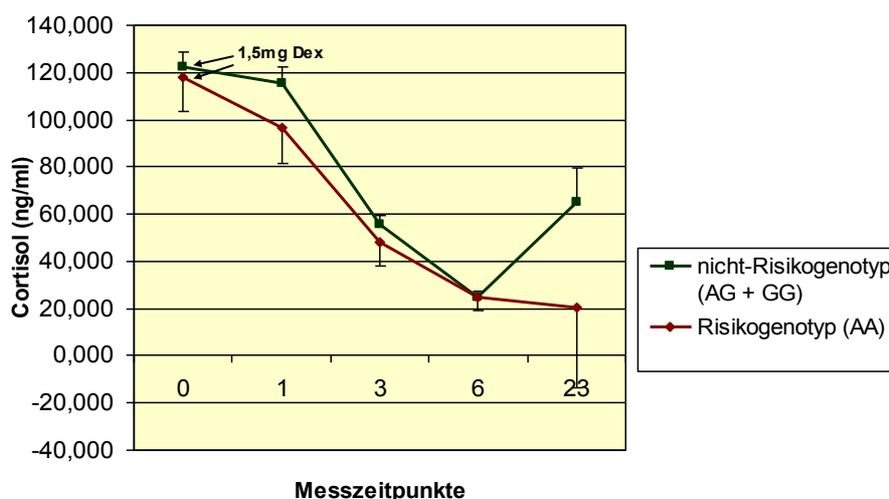


Abb. 16: Verlauf der Cortisolwerte nach Dex-Einnahme

Nicht-Risikogenotyp vs. Risikogenotyp

Bei der statistischen Auswertung der ACTH-Messungen war der Mauchly's Test auf Sphärizität ebenfalls signifikant ($\chi^2=151,290$; $p<0,05$; s. Anhang, 9.1.2.1., Tab. 9.25). Nach Greenhouse-Geisser-Korrektur der Freiheitsgrade ($\epsilon=0,471$) ergaben die Tests der Innersubjekteffekte (s. Anhang, 9.1.2.1., Tab. 9.26) einen signifikanten Haupteffekt des Messwiederholungsfaktors *Messzeitpunkte* ($F=17,462$; $p=0,001$), allerdings keine signifikante Assoziation von *Messzeitpunkte* mit *Genotyp* ($F=0,588$; $p=0,550$).

Die Tests der Innersubjektkontraste (s. Anhang, 9.1.2.1., Tab. 9.27) validierten diese Ergebnisse. Wie in Abb. 17 dargestellt, wurde ein linearer Verlauf der ACTH-Werte beobachtet ($p=0,001$; $F=24,943$). Die Assoziation *Messzeitpunkte-Genotyp* war erneut nicht signifikant ($p=0,528$; $F=0,410$). Die Tests der Zwischensubjekteffekte (s. Anhang, 9.1.2.1., Tab. 9.28) ergaben keinen Einfluss des rs1545843 Genotyps auf ACTH-Werte nach Dex-Einnahme in peripherem Blut ($F=0,973$; $p=0,334$).

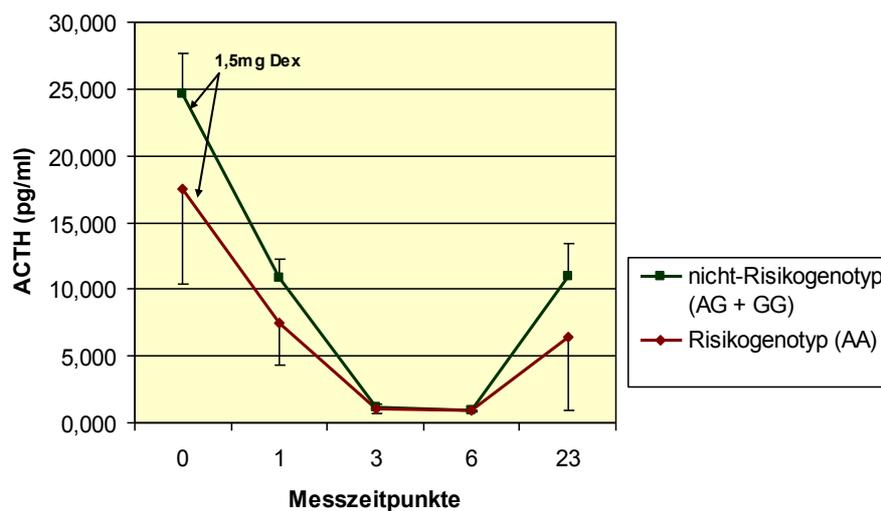


Abb. 17: Verlauf der ACTH-Werte nach Dex-Einnahme

Nicht-Risikogenotyp vs. Risikogenotyp

6 Diskussion

Das *SLC6A15* Gen, das für einen Natrium abhängigen neutralen Aminosäuretransporter im Gehirn kodiert, wurde vor Kurzem mit MDD in Verbindung gebracht. In einer genomweiten Assoziationsstudie zeigte der SNP rs1545843 eine signifikante Assoziation mit MDD (Kohli et al. 2011; s. 2.3.). Basierend auf diesen Untersuchungen wurden die Fragestellungen dieser Arbeit konzipiert, um dadurch weitere Erkenntnisse über dieses potenzielle Kandidatengen für MDD zu gewinnen.

6.1 Etablierung der RT-qPCR zur Entwicklung eines *SLC6A15* Biomarkers

MDD ist ein Krankheitsbild mit komplexer Pathogenese und den unterschiedlichsten Symptomen (s. 2.1.). Bisher basiert die Diagnose einer MDD auf Fragebögen und der klinischen Untersuchung durch den Psychiater. Laborwerte zur Diagnose einer MDD, und somit eine Möglichkeit zur objektiven Beurteilung, gibt es derzeit nicht. Neben der Diagnose stellt die Behandlung von depressiven Störungen ein weiteres Problem dar, da Psychopharmaka oft keine Wirkung zeigen. Eine patientenorientierte Medikation für den einzelnen MDD-Fall gibt es folglich nicht. Objektive Parameter zur Unterstützung der Diagnosestellung und personalisierten Therapie im Klinikalltag sind wünschenswert, daher liegt ein Schwerpunkt der psychiatrischen Forschung auf der Etablierung von Biomarkern. Aufgrund der Komplexität der Erkrankung ist es sinnvoll, Patienten in verschiedene Subgruppen zu unterteilen, z.B. anhand des Genotyps für einen SNP oder bestimmter Endophänotypen wie der Regulation der Stresshormonachse, und diese Subgruppen dann zu untersuchen.

Die Ergebnisse von Kohli et al. (2011) deuten darauf hin, dass eine Messung der *SLC6A15*-Genexpression in peripherem Vollblut wichtig für die Diagnose von depressiven Erkrankungen sein könnte. Ziel dieser Arbeit war es, diese Hypothese durch eine Messung der *SLC6A15*-Genexpression in peripheren Blutzellen mittels RT-qPCR zu überprüfen, um diese möglicherweise in Zukunft als Biomarker für MDD in der klinischen Diagnostik zu verwenden. Allerdings konnte die Hypothese durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche nicht bestätigt werden. Weder in der „Test-RT-qPCR“ (Methode s. 4.1.3., Ergebnisse s. 5.1.1.) noch in der nested PCR (Methode s. 4.1.4., Ergebnisse s. 5.1.2.) konnte eine messbare *SLC6A15*-Genexpression in peripherem Vollblut beobachtet werden. Der Testdurchlauf des Versuches lieferte folglich Ergebnisse, die zeigten, dass eine Etablierung der RT-qPCR Methode zur Entwicklung eines

Biomarkers basierend auf *SLC6A15*-mRNA in Vollblut nicht möglich ist. Es konnte weder die RT-qPCR-Messung der MARS-Proben noch die ursprünglich geplante Untersuchung des Einflusses von 1,5mg Dex (s. 4.1.5.) auf die *SLC6A15*-mRNA-Expression bei gesunden Probanden durchgeführt werden. *SLC6A15* konnte nicht gemessen werden, da es in Blutzellen deutlich niedriger exprimiert wird als in Lymphoblastoiden Zelllinien (LCL). Bei diesen Zellen handelt es sich ursprünglich um humane B-Lymphozyten, die durch *in vitro* Transfektion mit Epstein-Barr-Virus (EBV) in aktive proliferierende LCL umgewandelt werden. Sie stellen so und auch aufgrund ihrer niedrigen somatischen Mutationsrate (0,3%) (Mohyuddin et al., 2004) eine zuverlässige Quelle für genetisches Material dar (Sie, Loong, & Tan, 2009). In Vollblutproben befinden sich neben B-Lymphozyten auch viele weitere Blutzellen, deren mRNA isoliert wird und vermutlich eine geringere *SLC6A15*-Expression aufweist, als die von isolierten B-Lymphozyten, erst recht wenn sie in eine LCL umgewandelt wurden.

Durch die Verwendung von HeLa-Zellen und *TBP* als Kontrollgen sollten mögliche Fehler bei der cDNA-Herstellung, Primerwahl, RT-qPCR und nested PCR ausgeschlossen werden. Von *TBP* ist bekannt, dass es konstitutiv in allen Zellen exprimiert wird. Falls das Genprodukt nicht gemessen wird, kann angenommen werden, dass bei einem der Arbeitsschritte ein Fehler unterlaufen ist. Wenn hingegen eine *TBP*-, jedoch keine *SLC6A15*-Expression gemessen wird, so wird *SLC6A15* in diesen Zellen zu schwach oder gar nicht exprimiert, sodass es mit der verwendeten Methode nicht gemessen werden kann. Das war bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen der Fall. Folglich war auch die spätere Quantifizierung der *SLC6A15*-RT-qPCR nicht möglich, da sie relativ zum Kontrollgen ist.

Die untersuchten Blutproben wurden mittels PAXGene Blood RNA-Röhrchen (Qiagen) abgenommen. Diese sind weitaus effizienter als ihre Vorgänger (CPT™ tubes, Becton Dickinson). Sobald das Blut in die Röhrchen gelangt, werden alle Blutzellen lysiert und die RNA stabilisiert.

Es gibt eine Vielzahl von Genen, die in Assoziationsstudien mit MDD in Verbindung gebracht wurden (Levinson, 2006) (Goltser-Dubner, Galili-Weisstub, & Segman, 2010). Gene, die an der Entwicklung des ZNS und der Neurotransmission (z.B. *SLC6A15*) beteiligt sind, zeigten dabei besonders starke Assoziationen. Die meisten Studien wurden unter Verwendung von Microarrays durchgeführt und nicht mittels RT-qPCR. Microarrays sind bisher die beste Methode zur Erstellung von Genexpressionsprofilen. Allerdings ist es bei Microarrays erforderlich, dass die Ergebnisse zur Quantifizierung mit einer unabhängigen, sensitiven Methode wie der RT-qPCR validiert werden

(Provenzano & Mocellin, 2007). Dabei wird die Stärke der Genexpression mit der einer definierten Referenz (in diesem Experiment das Kontrollgen *TBP*) verglichen.

Studien, die die Expression von mRNA unterschiedlicher Kandidatengene in peripherem Blut von MDD-Patienten mittels RT-qPCR untersuchten (Belzeaux et al., 2010), unterstützten zwar die Annahme, dass Biomarker aus peripherem Blut gewonnen werden könnten, jedoch wurde bisher kein sensitiver RT-qPCR-Biomarker aus peripherem Blut für MDD entwickelt.

Kohli et al. haben für die Messungen der *SLC6A15*-Genexpression LCL (HapMap) und Monozyten benutzt. Zellen des Immunsystems könnten sich besonders gut für solche Untersuchungen eignen, da diese ein ähnliches Genexpressionsprofil wie Zellen des ZNS aufweisen (Gladkevich et al., 2004).

Aufgrund seiner schnellen Verfügbarkeit (einfache Blutentnahme) wurde in dieser Arbeit Vollblut als Ausgangsmaterial verwendet. Es ist möglich, dass die Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen in der Blutprobe die Genexpressionsmessungen beeinflusst hat. Außerdem ist es z.B. denkbar, dass die Zellzusammensetzung des Blutes bei MDD-Patienten anders ist als bei Gesunden. Ein verändertes Genexpressionsprofil wäre folglich auf die veränderte Zusammensetzung des Blutes und nicht auf die, der MDD zugrunde liegenden, pathogenetischen Prozesse zurück zu führen. (Mehta et al., 2010).

Peripheres Blut ist ein hochkomplexes System, da es im gesamten Körper zirkuliert und dadurch mit allen Organen und Geweben in Kontakt steht. Dieses System wird durch metabolische Veränderungen und Umweltfaktoren wie z. B. Stress, Neurotoxinen, Virusinfektionen, Hypoxie, Traumata oder Ernährung beeinflusst. Es gibt demnach unzählige Umwelteinflüsse, die zu einer veränderten Zusammensetzung, und dadurch möglicherweise veränderten Genexpression des peripheren Blutes führen können, die sowohl in dieser als auch in Kohlis Arbeit nicht berücksichtigt wurden.

Vielleicht hätte die RT-qPCR bei der Untersuchung von LCL oder spezifisch isolierten B-Lymphozyten messbare Ergebnisse erbracht. Allerdings ist ein Messverfahren, bei dem zunächst spezifische Zellen aus einer Blutprobe isoliert werden müssen, zu aufwändig und teuer, um im Klinikalltag Anwendung zu finden. Des Weiteren wird durch die längere Bearbeitungszeit der Blutproben und die für die Isolation notwendigen Arbeitsschritte die Genexpression verändert (Whitney et al., 2003). Bei der Verwendung von LCL besteht die Gefahr, dass die Genexpression durch die im Rahmen der Herstellung dieser Zelllinien notwendigen EBV-Transfektion verändert wird.

Aufgrund des Zieles dieser Arbeit, einen für die alltägliche MDD-Diagnostik- und Therapie brauchbaren Biomarker zu entwickeln, wurden diese Ansätze nicht weiter verfolgt.

Um die Ergebnisse der Assoziationsstudie von Kohli et al. zu validieren, wurden die gleichen Untersuchungen in sechs zusätzlichen unabhängigen Probandengruppen durchgeführt.

Kohli et al. haben in ihrer initial untersuchten Probandengruppe einen stärkeren Zusammenhang zwischen rs1545843 und MDD festgestellt, als in diesen Kontrollgruppen. Diese Beobachtung lässt sich möglicherweise auf das zuerst in der Verhaltensökonomie beschriebene Phänomen des *winner's curse*, Fluch des Gewinners, zurückführen (Bazerman & Samuelson, 1983). Es beschreibt ursprünglich die Beobachtung, dass sich der Gewinner einer Auktion im Nachhinein paradoxerweise häufig als eigentlicher Verlierer herausstellt, da er einen zu hohen Preis bezahlt hat. Lohmüller et al. haben den *winner's curse* in GWAS untersucht und dieses Phänomen als Ursache für die Schwierigkeiten bei der Replikation der Ergebnisse und für falsch-positive Ergebnisse dieser Studien beschrieben (Lohmueller, Pearce, Pike, Lander, & Hirschhorn, 2003). Die Tatsache, dass eine Studie –wie auch die von Kohli et al.- die erste ist, die einen Zusammenhang zwischen einem Gen und einer Erkrankung beschreibt, impliziert eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Bedeutung der beobachteten Ergebnisse überschätzt wurde. Andere Studien haben aus ähnlichen oder sogar den gleichen Ergebnissen keinen Zusammenhang zwischen Gen und Krankheit abgeleitet und folglich keine Publikation veröffentlicht. Lohmüller et al. führten die Ergebnisse von 23 der 25 untersuchten genetischen Assoziationsstudien auf den *winner's curse* zurück. Die Studie von Kohli et al. wurde in diesem Zusammenhang zwar nicht untersucht, dennoch könnte es sein, dass auch Kohlis Interpretation der Ergebnisse die Assoziation zwischen *SLC6A15* und MDD überbewertet hat. Dies würde die schwächere Assoziation in den Kontrollgruppen und die Schwierigkeiten beim Nachweis dieses Zusammenhangs im Rahmen dieser Arbeit erklären.

Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die Ergebnisse dieser Arbeit gehabt haben könnte, ist der Einsatz von Psychopharmaka, mit denen die MARS-Patienten behandelt wurden. Der Einfluss von Medikamenten auf die *SLC6A15*-Genexpression in peripherem Blut ist derzeit unklar.

Fazit/Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wie schwierig es derzeit noch ist, trotz der Fortschritte in der Messung von Genexpression, aus peripherem Vollblut einen Biomarker für MDD zu gewinnen.

Das liegt zum einen an der Wahl des richtigen Kandidatengens und zum anderen an der Heterogenität der Erkrankung.

Generell hat mRNA im Blut viel Potenzial für die Biomarker-Forschung. Zur Beurteilung des Krankheitsstadiums und des Therapieansprechens kann mRNA-Expression in Vollblut in einigen Fällen dienen, jedoch ist bisher kein Rückschluss auf die Pathophysiologie der MDD und damit keine Risikostratifizierung der Entstehung dieses Krankheitsbildes möglich. Vollblut-mRNA könnte für ausreichend exprimierte Transkripte als Biomarker dienen, aber nach heutigem Stand nicht für *SLC6A15*, da es eher neuronenspezifisch exprimiert wird (Mehta et al., 2010). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete RT-qPCR ist eine etablierte Methode mit hohem Qualitätsstandard, so dass messtechnische Probleme hier im Hintergrund stehen und es anzunehmen ist, dass die mRNA-Expression von *SLC6A15* in Vollblut nicht ausreichend hoch ist.

Versuche, bei denen die Blutproben mit einem Genexpressions-Inducer (z.B. Lipopolysaccharid (LPS)) *ex vivo* stimuliert werden und im Anschluss die Genexpression mittels RT-qPCR gemessen wird, könnten eventuell bessere Ergebnisse erzielen. In einer Studie von Spijker et al. wurden nach *ex vivo* LPS-Stimulation und Verwendung von Microarrays erstmals MDD-abhängige Veränderungen der Expression von sieben verschiedenen Genen in Vollblut festgestellt. Diese Ergebnisse wurden durch RT-qPCR validiert. *SLC6A15* zählte nicht zu den in dieser Studie untersuchten Genen (Spijker et al., 2010), allerdings wäre es möglich, dass nach *ex vivo* LPS-Stimulation und der dadurch verursachten Expressionsverstärkung ebenfalls MDD-abhängige Unterschiede in der Genexpression messbar sind (Spijker, van de Leemput, Hoekstra, Boomsma, & Smit, 2004; Spijker et al., 2010). Dieses Verfahren wäre jedoch vermutlich zu teuer für eine Anwendung im Klinikalltag.

Bei der MDD handelt es sich um eine genetisch sehr heterogene Erkrankung. Außerdem sind z.B. Einflüsse von Insertionen, Deletionen, Kopienzahlvariationen (*copy number variations*, CNV) und Variationen in nicht-kodierenden DNA-Sequenzen auf die Genexpression noch nicht grundlegend verstanden. Die Genexpression wird maßgeblich durch zum Teil erblich bedingte epigenetische Veränderungen beeinflusst.

Es sollte also auch weiter an der Rolle potentieller Kandidaten-Gene im menschlichen Organismus, deren veränderte Funktionen bei Patienten und den funktionellen Beziehungen zwischen ihnen, sprich wie sie interagieren und sich regulieren, geforscht werden (Jia, Kao, Kuo, & Zhao, 2011). Mit diesen Erkenntnissen könnten eines Tages Biomarker in die psychiatrische Diagnostik integriert werden,

mit denen sich Änderungen in der Funktion oder -Expression von Kandidatengenomen messen lassen, woraus sich Schlussfolgerungen für Diagnose, klinischen Verlauf und Therapie einer MDD ziehen ließen. Die beschriebenen Schwierigkeiten deuten jedoch darauf hin, dass einfache genetische Tests in naher Zukunft vermutlich nicht in der psychiatrischen Diagnostik etabliert werden (Couzin, 2008).

Langfristig müssten Biomarker entwickelt werden, die ein Kandidatengenom für MDD in Kombination mit weiteren Faktoren evaluieren, wie z.B. die Aktivität des Genoms, Umwelteinflüsse und die momentane Befindlichkeit des Patienten. So könnten homogenere Patientengruppen geschaffen werden.

6.2 Datenanalyse zur Beurteilung des Stresshormonhaushaltes in Abhängigkeit des rs1545843-Risikogenotyps

In diesem Teil der Arbeit wurde der Einfluss des funktionellen SNPs rs1545843, der circa (ca.) 690 kb von *SLC6A15* entfernt in einer intergenischen Region liegt, auf den Stresshormonhaushalt (Cortisol- und ACTH-Sekretion) bei MDD-Patienten des MARS-Projekts unter Verwendung des Dex-/CRH-Tests untersucht. Es wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen Genotyp und Regulation der Stresshormonachse festgestellt. Die Cortisolwerte der MARS-Probanden zeigten allerdings einen Trend für eine solche Assoziation. Zusätzlich wurde in einer gesunden Probandengruppe die rs1545843-Genotypabhängige Reaktion des Stresshormonhaushalts nach Dex-Stimulation untersucht. In dieser Probandengruppe konnte ebenfalls keine statistisch signifikante Assoziation beobachtet werden.

Die durchgeführten Versuche basieren vor allem auf den Daten der GWAS von Kohli et al. in der erstmalig ein Zusammenhang des rs1545843 SNPs mit MDD beschrieben wurde (Kohli et al., 2011).

Da bei MDD-Patienten mit erhöhten Cortisolspiegeln im Blut eine reduziertes Hippocampusvolumen beschrieben wurde (Knoops et al., 2010), wurden die möglichen Einflüsse der rs1545843-Genotypen auf die HPA-Achsenregulation untersucht. Demnach wurde in dieser Arbeit die möglicherweise Genotypabhängige Cortisol- und ACTH-Sekretion bei 311 MDD-Patienten aus dem MARS-Projekt unter Durchführung des Dex-/CRH-Tests (s. 4.2.1.1.) analysiert. Dazu wurde jeweils für Cortisol und ACTH eine ANOVA mit Messwiederholung mittels SPSS für Windows durchgeführt. Diese Methode wurde als die sensitivste statistische Methode betrachtet, da jeder einzelne Messzeitpunkt beim Dex-/CRH-Test in die Analyse mit einbezogen wird.

Die Tests der Zwischensubjekteffekte (s. Anhang 9.1.1.1., Tab. 9.6 und Tab. 9.10) zeigten keine signifikanten Effekte für den Zwischensubjektfaktor *Genotyp*. Bei den Cortisolwerten wurde allerdings eine statistische Tendenz ($p=0,091$) beobachtet. Erniedrigte Cortisolspiegel bei Risikogenotypträgern deuten darauf hin, dass der Risikogenotyp möglicherweise einen protektiven Effekt auf den Cortisolspiegel hat. Demnach könnte der Genotyp einen Einfluss auf die Spiegel von Cortisol jedoch nicht von ACTH im Blut der untersuchten MDD-Patienten haben. Eventuell bräuchte man eine größere Stichprobe, um einen signifikanten Unterschied nachzuweisen. Als Kovariaten (s. Anhang 9.1.1., Tab. 9.1 und Tab. 9.2) wurden bei der ANOVA mit Messwiederholung Geschlecht, BMI und Vorepisoden für Cortisol und BMI für ACTH berücksichtigt.

Des Weiteren wurde eine Gruppe von 25 gesunden männlichen Probanden (s. 4.1.5.) untersucht. Durch die Untersuchung dieser Probanden sollte die rs1545843-Genotypabhängige Cortisol- und ACTH-Sekretion nach Dex-Einnahme bei Gesunden gemessen werden.

Wie bereits bei den MARS-Patienten beobachtet, gab es keine signifikanten Unterschiede in der Stresshormonsekretion bei Trägern des Risikogenotyps (AA) und des Nicht-Risikogenotyps (AG und GG). Ein Trend war ebenfalls nicht zu erkennen. Demnach wurde keine Genotypabhängige HPA-Achsenreaktion auf die Gabe von Dexamethason bei Gesunden beobachtet.

In einer Fall-Kontrollstudie (248 MDD-Patienten und 172 gesunde Kontrollen) von Schuhmacher et al. wurden ebenfalls die Zusammenhänge zwischen dem rs1545843 SNP und der Cortisol- und ACTH-Sekretion unter Verwendung des Dex-/CRH-Tests analysiert. Zusätzlich wurden in dieser Studie kognitive Störungen bei Depressiven in Abhängigkeit des rs1545843 Genotyps untersucht.

Die Resultate dieser Analysen stimmten nur teilweise mit den Ergebnissen der vorgelegten Arbeit überein. So wurde bei MDD-Patienten, jedoch nicht bei gesunden Probanden, ein Zusammenhang zwischen rs1545843-Genotyp und Regulation der HPA-Achse beobachtet. MDD-Patienten mit dem Risikogenotyp (AA) zeigten im Vergleich zu den Patienten mit dem Nicht-Risikogenotyp (AG und GG) erhöhte Cortisol- und ACTH-Werte im Dex-/CRH-Test (Cortisol AUC (*area under the curve*): $p=0,04$, Cortisol max: $p=0,1$; ACTH AUC: $p=0,02$, ACTH max: $p=0,03$).

Diese Daten erweitern die Ergebnisse von Kohli et al. (Kohli et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Zusammenhang allerdings *nicht* beobachtet werden (siehe oben, s.o.). Eine Ursache für die konträren Ergebnisse dieser Arbeit mit der Studie von

Schuhmacher et al. (2013) könnte die Auswahl der MDD-Patientenkollektive sein. Während im Rahmen dieser Arbeit 311 MDD-Patienten aus dem MARS-Projekt (Hennings et al., 2009) untersucht wurden, rekrutierten Schuhmacher et al. (2013) 248 Patienten mit MDD von der psychiatrischen Station des Uniklinikums in Bonn. Ethnisch und demographisch sind die Patientengruppen allerdings vergleichbar (Kaukasier, 18-60 Jahre bei Schuhmacher et al. und 18-75 Jahre bei Kohli et al.). Bei beiden Patientenkollektiven handelt es sich um MDD-Patienten, die stationär in psychiatrische Kliniken aufgenommen wurden. Die Ausschlusskriterien von Schuhmacher und dem MARS-Projekt weisen ebenfalls keine gravierenden Unterschiede auf.

Die Befragung der Patienten anhand des HAM-D21 (Hamilton, 1960) Fragebogens wurde bei Schuhmacher et al. (2013) standardisiert an Tag 8 durchgeführt, um mögliche Confounder-Effekte durch Aufnahme, Prämedikation und Medikamentenumstellung zu reduzieren oder ganz zu vermeiden. Beim MARS-Projekt wurde die Befragung schon am ersten Tag nach Aufnahme durchgeführt, wodurch diese Effekte folglich nicht ausgeschlossen sind. Weitere Confounder-Effekte könnten in beiden Studien durch nicht ausreichend ausgeschlossene Komorbiditäten, wie z.B. Herz-Kreislauf- oder endokrinologische Erkrankungen, die einen Effekt auf die HPA-Achse haben, entstanden sein.

Beide Studien schlossen ausschließlich Patienten mit HAM-D21-Werten über 18 (ab 20 wird von einer mittelschweren MDD gesprochen) ein.

Die Durchführung des Dex-/CRH-Tests fand bei Schuhmacher et al. immer an Tag 7 nach Aufnahme statt, wohingegen dieser Test im MARS-Projekt innerhalb der ersten 10 Tage nach Aufnahme durchgeführt wurde. Beide Forschungsgruppen verwendeten das von Heuser et al. entwickelte Protokoll für den Dex-/CRH-Test (Heuser et al., 1994). Der einzige Unterschied in der Durchführung des Tests bestand darin, dass Schuhmacher et al. ein von Schering (Deutschland) hergestelltes CRH injizierte, wohingegen im MARS-Projekt CRH von Ferring (Kiel, Deutschland) verwendet wurde.

Bezüglich des SNPs rs1545843 wurden die Studienteilnehmer bei Schuhmacher et al. wie auch in der vorliegenden Arbeit in „AA“ Risikogenotyp und „AG“ bzw. „GG“ Nicht-Risikogenotypträger unterteilt. Diese Unterteilung basiert auf den Daten von Kohli et al., die ein erhöhtes MDD-Risiko für homozygote A-Allelträger im Vergleich zu Trägern von mindestens einem G-Allel zeigen (Kohli et al., 2011). Die Verteilung der drei möglichen Genotypen (AA, AG, GG) befand sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Schuhmacher et al. untersuchten einen Einfluss des SLC6A15-

Genotyps auf das Alter, Geschlecht, Erkrankungsalter, Vorepisoden, Medikation, Lorazepam-Einnahme, Komorbiditäten wie z.B. posttraumatischer Belastungsstörung (post traumatic stress disorder, PTSD) und baseline HAM-D21 der MDD-Patienten.

In dieser Arbeit wurde für die Kovariaten Geschlecht, BMI und Vorepisoden ein Effekt auf die Cortisolwerte festgestellt. Bei den ACTH-Werten wurde der BMI als Kovariate in die statistischen Analysen eingeschlossen. Schuhmacher et al. haben nicht auf den BMI als Kovariate getestet, was den Vergleich der Ergebnisse erschwert.

Zur statistischen Auswertung der Dex-/CRH-Testergebnisse wurde von Schuhmacher in SPSS eine MANOVA (multivariate ANOVA) ohne Berücksichtigung von Kovariaten gerechnet. Maximum- und AUC-Werte von Cortisol und ACTH wurden als abhängige Variablen und der Genotyp als Faktor gewählt.

In dieser Arbeit wurden zwei ANOVAs mit Messwiederholung in SPSS durchgeführt. Bei der ersten Analyse stellten die fünf Cortisolmessungen (s. Dex-/CRH-Test, 4.2.1.1.) die Innersubjektfaktoren und der Genotyp den Zwischensubjektfaktor dar. Bei der zweiten ANOVA wurden die ACTH-Werte analysiert. Beide Arbeitsgruppen wählten ein Signifikanzniveau von 0,05.

Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in der Therapie der MDD-Patienten liegen. In Studien wurde beschrieben, dass die Aktivität des Glukokortikoidrezeptors, der ein wichtiger Regulator der HPA-Achse ist, durch bestimmte Antidepressiva verändert wird (Herr, Tsolakidou, Yassouridis, Holsboer, & Rein, 2003). Zusätzlich wurde festgestellt, dass SSRI und SNRI bei Gesunden die ACTH- und Cortisolausschüttung im Körper erhöhen, während das trizyklische Antidepressivum (TZA) Mirtazapin die Ausschüttung hemmt. Bei MDD-Patienten wurde, unabhängig vom späteren Ansprechen auf die Pharmakotherapie, ebenfalls eine Wirkung von Antidepressiva auf die HPA-Achse beobachtet. SSRI und SNRI bewirken eine langsame Regulation der HPA-Achse, wohingegen nach TZA-Einnahme innerhalb einer Woche eine HPA-Achsennormalisierung mit einem Wiederanstieg der Cortisol- und ACTH-Werte nach einigen Wochen festgestellt wurde (Schule, 2007). Die Medikation der Probanden spielt also bei der Beurteilung des Dex/CRH-Tests eine wichtige Rolle.

Beim MARS-Projekt wurde keine standardisierte Therapie angestrebt sondern lediglich alle von den Patienten eingenommen Medikamente dokumentiert (s. Tab. 3; MARS-Projekt: Hennings et al., 2009). Einige Patienten waren auch mehrfach mediziert. Schuhmacher et al. hingegen haben

versucht, die Therapieeffekte so gering wie möglich zu halten, indem die Therapie auf ein Minimum beschränkt wurde. Innerhalb der ersten 4 Tage nach Aufnahme wurde die bestehende Therapie der MDD-Patienten beendet und eine weitestgehend standardisierte Therapie begonnen. Die Patienten erhielten entweder Citalopram, Mirtazapin oder Nortriptylin als Monotherapie. Zusätzlich wurden maximal 3mg Benzodiazepine (Lorazepam) als Komedikation erlaubt. Von Tag 4 bis mindestens Tag 8 war diese festgelegte Medikation vorgesehen, da in diesem Zeitraum unter anderem die Cortisol- und ACTH-Messungen durchgeführt wurden. Durch dieses Studiendesign sollte eine Verfälschung der Ergebnisse durch Medikation vermieden werden.

Im Idealfall bräuchte man MDD-Patienten die überhaupt nicht mediziert sind. Dadurch könnte man ausschließen, dass die Ergebnisse durch die Gabe von Medikamenten beeinflusst wurden. Dies ist aus ethischen Gründen jedoch nicht möglich.

Neuste Studien zur Genetik psychiatrischer Störungen konzentrieren sich verstärkt auf Umweltfaktoren und deren Einfluss auf die Entstehung von Erkrankungen wie MDD. Sowohl in dieser Arbeit als auch in der Studie von Schuhmacher et al. wurden Umweltfaktoren allerdings nicht berücksichtigt.

Bei komplexen psychiatrischen, aber auch somatischen Erkrankungen wird heute nicht mehr von einer ausschließlich genetischen Ätiologie, sondern von einem Zusammenspiel von Genen und Umweltfaktoren, wie z.B. belastenden Lebensereignissen oder früheren Kindheitstraumata, ausgegangen. Eine Vielzahl von Studien deutet darauf hin, dass die Anfälligkeit für umweltbedingte Erkrankungen bzw. das Expositionsverhalten durch genetische Faktoren beeinflusst wird (Kendler & Baker, 2007). Des Weiteren wurden epigenetische Veränderungen der DNA durch DNA-Methylierung und/oder Histonmodifikationen nach Exposition mit bestimmten Umweltfaktoren beobachtet. Dabei sind die Effekte von Genen und Umweltfaktoren bei der Entstehung von MDD multiplikativ, nicht additiv (Uher, 2008).

Im Bereich der MDD-Forschung wurden bisher größtenteils Interaktionen zwischen Genen des Serotoninsystems (v.a. Serotonin-Transporter) und Umweltfaktoren untersucht. Caspi et al. z.B. beobachteten einen Zusammenhang zwischen dem kurzen Allel (S-Allel) des *5-HTTLPR* Längenpolymorphismus in der Promotorregion des Serotonintransportergens und MDD, allerdings nur in Kombination mit belastenden Lebensereignissen bzw. Misshandlungen in der Kindheit (Caspi et al., 2003) (Caspi, Hariri, Holmes, Uher, & Moffitt, 2010). Die Wahrscheinlichkeit im Laufe des Lebens an einer MDD zu erkranken wird am stärksten durch Stress im Kindesalter (*early life stress*, ELS) beeinflusst (Nugent, Tyrka, Carpenter, & Price, 2011). Allerdings ist ELS nicht

der einzige Risikofaktor für eine bestimmte psychiatrische Erkrankung, sondern ist meist in Kombination mit bestimmten genetischen Varianten für die Entstehung eines Krankheitsbildes verantwortlich.

Gen x Umwelt und *Gen x Gen x Umwelt* Interaktionen sind eine mögliche Erklärung dafür, warum zum einen Kandidatengenstudien schwer zu replizieren sind und warum zum anderen die Ergebnisse von Kohli und Schuhmacher in dieser Arbeit nicht validiert werden konnten. Nicht einzelne Gene oder genetische Polymorphismen sind für das Auftreten einer MDD verantwortlich, sondern ein Zusammenspiel von genetischen und umweltbedingten Faktoren, das in den wenigsten Assoziationsstudien bisher berücksichtigt wurde. In dieser Arbeit hätten unter Berücksichtigung bestimmter Umweltfaktoren möglicherweise signifikante Assoziationen mit MDD beobachtet werden können.

HPA-Achsendysregulationen werden sowohl mit MDD in Verbindung gebracht als auch als Folge von ELS beschrieben (Gillespie, Phifer, Bradley, & Ressler, 2009; Pariante & Lightman, 2008). So wurden für die Art und Dauer des ELS, das Alter der Betroffenen zum Zeitpunkt des ELS, die vergangene Zeit seit dem traumatisierenden Ereignis und zusätzliche Stressereignisse Auswirkungen auf den Stresshormonhaushalt beschrieben (Heim & Nemeroff, 2001).

Die meisten Studien auf diesem Gebiet haben sich mit Interaktionen zwischen Umweltfaktoren und Genen der CRH-Regulation und Glukokortikoidfunktion beschäftigt.

Interaktionen zwischen Polymorphismen des *CRHR1* (CRH Rezeptor 1)-Gens und Kindesmissbrauch erhöhen beispielsweise die Wahrscheinlichkeit für depressive Symptome im Erwachsenenalter (Bradley et al., 2008). Bei den zwei signifikantesten Polymorphismen (rs7209436 und rs110402) im *CRHR1*-Gen war nach Korrektur für multiples Testen in Kombination mit Kindesmissbrauch ein Allel mit jeweils besonders schweren, das andere Allel mit besonders leichten Verläufen von MDD assoziiert. Diese sogenannten Risikoallele und protektiven Allele ermöglichen Prognosen ob im Kindesalter misshandelte Personen im Erwachsenenalter eine MDD entwickeln oder nicht. Bei leichten Formen des Kindesmissbrauchs oder keinem Missbrauch im Kindesalter wurden keine Effekte der Genotypen auf das Auftreten bzw. die Schwere einer MDD beobachtet (Bradley et al., 2008).

In einer Studie von Tyrka et al. wurde die Interaktion von *CRHR1*-Polymorphismen und Kindesmissbrauch und deren Vorhersagekraft für die Cortisolausschüttung im Dex-/CRH-Test bei Gesunden untersucht. Die Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von Bradley, da bei Trägern

der Risikogenotypen der SNPs rs110402 und rs242924 (jeweils G/G), die Missbrauch in der Kindheit erfahren haben, erhöhte Cortisolwerte im Dex-/CRH-Test gemessen wurden (Tyrka et al., 2009). Die Ergebnisse von Bradley könnten folglich auf eine Dysregulation der HPA-Achse zurückzuführen sein.

Die Interaktion von Genen und Umweltfaktoren könnte die bisher kontroverse Beurteilung des Dex-/CRH-Tests als diagnostisches oder prognostisches Werkzeug erklären (Mokhtari, Arfken, & Boutros, 2013). So wurde beispielsweise in einer Studie bei weiblichen Patienten eine stärkere Korrelation der Plasma-ACTH-Spiegel mit ELS als mit der Schwere von MDD festgestellt (Heim et al., 2000). Der Dex-/CRH-Test wäre unter Einbeziehung von traumatischen Ereignissen im Kindesalter der Probanden für den Einsatz im Klinikalltag möglicherweise von größerer Relevanz.

Da sowohl Zusammenhänge von ELS mit Dysregulationen der HPA-Achse als auch mit dem Auftreten einer MDD beschrieben wurden, sind traumatische Erlebnisse im Kindesalter ein Confounder, der weder im Rahmen dieser Arbeit noch in der Studie von Schuhmacher et al. berücksichtigt wurde. Diesbezüglich waren keine umfassenden Informationen zu den MARS-Patienten vorhanden, daher wurde ELS nicht in die durchgeführten Analysen eingeschlossen. Falls diese Informationen zugänglich gewesen wären, hätten dadurch möglicherweise signifikante Assoziationen beobachtet werden können. Allerdings wäre eine weitaus größere Stichprobe nötig gewesen, da für die Beurteilung von Gen-Interaktionen, z.B. mit Umweltfaktoren, ein 4x größeres Probandenkollektiv notwendig ist als für die alleinige Beurteilung von Genmerkmalen oder Umweltfaktoren (Smith & Day, 1984).

Bisher lag der Forschungsschwerpunkt im Bereich Gen x Umweltinteraktionen auf negativen Umwelteinflüssen wie ELS und traumatisierenden Erlebnissen im Erwachsenenalter. Allerdings wurde festgestellt, dass auch ein positives Umfeld (sozialer Rückhalt etc.) einen großen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit hat im Laufe des Lebens eine MDD zu entwickeln (Nugent et al., 2011). In zukünftigen Studien sollten neben negativen daher auch positive Umweltfaktoren untersucht werden.

Sowohl in den Studien von Kohli et al., Schuhmacher et al. als auch in dieser Arbeit wurden keine positiven Umweltfaktoren berücksichtigt. Möglicherweise hat der rs1545843 Risikogenotyp (A/A) nur in Kombination mit negativen Umweltfaktoren negative Eigenschaften bezüglich der Entwicklung einer MDD. Das Vorhandensein von positiven Umwelteinflüssen könnte die negativen Effekte des Risikogenotyps verhindern.

Fazit

Um signifikante Aussagen über den Effekt eines einzelnen SNPs treffen zu können, braucht man mehrere tausend Probanden und damit weitaus größere Stichproben als die von Kohli et al., Schuhmacher et al. und die in dieser Arbeit untersuchten Probandengruppen. In sehr großen Probandenkollektiven wird eine ausreichende Teststärke (0,8-1) erzielt, um signifikante genetische Assoziationen detektieren zu können.

Darüber hinaus ist die Betrachtung bestimmter Endophänotypen sinnvoll. In diesem Studiendesign wurde die Reaktion des Körpers auf die Einnahme von Dex und CRH als Endophänotyp gewählt. Der Dex-/CRH-Test unterliegt allerdings Einflüssen, die die HPA-Achse verändern. Sowohl ELS als auch Medikamente spielen eine große Rolle bei der Regulation der HPA, sodass diese Faktoren folglich im Studiendesign berücksichtigt werden müssen. Eventuell wären bei den Untersuchungen des *SLC6A15* Gens signifikante Ergebnisse beobachtet worden, wenn bestimmte Umweltfaktoren und/oder weitere Genvarianten berücksichtigt worden wären.

Die Medikation der Probanden hat in dieser Studie möglicherweise den Effekt des Genotyps maskiert und dadurch zu den von Kohli et al. und Schuhmacher et al. abweichenden ACTH- und Cortisolwerten im Dex-/CRH-Test bei MDD-Patienten geführt.

Selbst beim Fokus auf bestimmte Endophänotypen ist es bei genetischen Assoziationsstudien schwierig signifikante Effekte von einzelnen SNPs zu beobachten.

Ausblick

Zukünftige Studien zu ähnlichen Fragestellungen zeichnen sich vermutlich durch ein sehr komplexes Studiendesign aus. Zum einen sollten Endophänotypen und deren Einflussfaktoren berücksichtigt werden, zum anderen sollten negative und positive ELS inklusive Alter, Geschlecht, Entwicklungsphase bei Auftreten des ELS und parallel auftretende ELS ebenfalls nicht vernachlässigt werden. Mögliche Interaktionen zwischen rs1545843 und anderen genetischen Polymorphismen und deren Interaktion mit Umweltfaktoren sollten zusätzlich untersucht werden.

Metaanalysen, die die Interaktionen zwischen Genetik und Umweltfaktoren und deren Einfluss auf die Diagnose MDD (Risch et al., 2009) untersuchen, wurden bereits durchgeführt, allerdings keine, die ausschließlich ELS als Umweltfaktoren betrachten (Nugent et al., 2011) oder die sich mit dem Kandidatengen *SLC6A15* beschäftigen. Zukünftige Forschungsprojekte sollten unter Berücksichtigung der erwähnten Aspekte die Erstellung umfassender und vergleichbarer

Studiendesigns zu rs1545843 und anderen SNPs ermöglichen. Obwohl die Verwirklichung mit einem großen Aufwand verbunden sein wird, könnten dadurch wichtige Erkenntnisse auf den Gebieten der MDD-Genetik und Biomarkerentwicklung erlangt werden.

Ähnliches gilt für die Analyse des Dex-Suppressionsversuchs. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, müssten ELS, Gen x Gen- und Gen x Gen x Umweltinteraktionen berücksichtigt werden. Um bei einer solchen Analyse statistische Signifikanz zu erreichen, muss eine größere Stichprobe untersucht werden. In zukünftigen Metaanalysen wäre es interessant, neben den Zusammenhängen zwischen *SLC6A15*, Umweltfaktoren und Stresshormonhaushalt auch Informationen zu deren Auswirkungen auf die HPA-Achse bei Gesunden zu erhalten.

7 Zusammenfassung

Depressive Störungen (MDD) sind durch genetische und endokrine Veränderungen charakterisiert. In einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) wurde der Einfluss des Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs1545843 auf die Expression des *SLC6A15* Gens bei MDD-Patienten untersucht. Dabei wurde unter Verwendung von Microarrays bei Risikogenotyp Trägern (AA) eine verminderte *SLC6A15*-Expression festgestellt. In anderen Studien wurde eine Hyperaktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren(HPA)-Achse bei MDD-Patienten festgestellt, was auf eine erhöhte Stresshormonbelastung bei MDD hindeutet.

Basierend auf diesen Daten wurde im Rahmen der vorgelegten Arbeit die *SLC6A15*-Expression mittels RT-qPCR untersucht, um weitere Informationen über dieses Gen zu gewinnen und seine Verwendbarkeit als zukünftigen Biomarker für MDD zu beurteilen.

Außerdem wurden Genotyp abhängige Veränderungen des adrenocorticotropen Hormon (ACTH) und Cortisolblutspiegels im *dexamethasone/corticotrophin-releasing hormone test* (Dex/CRH-Test) bei 311 unipolar depressiven Patienten des *Munich Antidepressant Response Signature* (MARS) - Projekts untersucht. Bei einer Gruppe von 25 gesunden männlichen Probanden wurde die Genotyp abhängige Stresshormonreaktion nach einmaliger Dex-Einnahme näher betrachtet. Abschließend wurde durch eine Varianzanalyse mit Messwiederholungen in SPSS die Hypothese, rs1545843-Risikogenotypträger (AA) wiesen eine erhöhte Stressvulnerabilität auf, überprüft.

Die RT-qPCR ergab keine im Vollblut messbaren Mengen an *SLC6A15*-mRNA-Transkript (CP >30). Daher konnte keine Methode zur Messung der *SLC6A15* Genexpression etabliert werden, um diese als künftigen Biomarker für die psychiatrische Diagnostik zu verwenden. Die im Dex-/CRH-Test gemessenen ACTH- und Cortisolwerte bei MDD-Patienten zeigten keine rs1545843 Genotypabhängigkeit. Bei der statistischen Analyse der Cortisolwertmessungen wurde ein statistischer Trend ($p=0,09$) beobachtet, der allerdings mit erhöhten Stresshormonleveln bei *Nicht*-Risikogenotypträgern (AG, GG) in eine unerwartete Richtung geht. Die Auswertung der Stresshormonlevel bei Gesunden nach Dex-Einnahme zeigte ebenfalls keine rs1545843-Genotyp abhängige HPA-Achsenregulation.

Die Beurteilung möglicher Kandidatengene für MDD, die in GWAS identifiziert wurden, ist schwierig. Um signifikante Ergebnisse zu erhalten sind weitaus größere Kohorten notwendig als die, die in den bisherigen Assoziationsstudien bezüglich rs1545843 untersucht wurden. Zusätzlich müssen Umweltfaktoren, Medikation und Gen x Gen Interaktionen in künftigen Studiendesigns berücksichtigt werden, um valide Aussagen treffen zu können.

8 Literaturverzeichnis

- Alexopoulos, G. S. (2006). The vascular depression hypothesis: 10 years later. *Biol Psychiatry*, 60(12), 1304-1305. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.09.006
- Bazerman, M. H., & Samuelson, W. F. (1983). I Won the Auction but Dont Want the Prize. *Journal of Conflict Resolution*, 27(4), 618-634. doi: Doi 10.1177/0022002783027004003
- Beck, A. T., Ward, C. H., Mendelson, M., Mock, J., & Erbaugh, J. (1961). An inventory for measuring depression. *Arch Gen Psychiatry*, 4, 561-571.
- Belzeaux, R., Formisano-Treziny, C., Loundou, A., Boyer, L., Gabert, J., Samuelian, J. C., Feron F., Naudin J., Ibrahim, E. C. (2010). Clinical variations modulate patterns of gene expression and define blood biomarkers in major depression. *J Psychiatr Res*, 44(16), 1205-1213. doi: 10.1016/j.jpsychires.2010.04.011
- Binder, E. B. (2009). The role of FKBP5, a co-chaperone of the glucocorticoid receptor in the pathogenesis and therapy of affective and anxiety disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 34 Suppl 1, S186-195. doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.05.021
- Biomarkers Definitions Working, G. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*, 69(3), 89-95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989
- Borsook, D., Becerra, L., & Hargreaves, R. (2006). A role for fMRI in optimizing CNS drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 5(5), 411-424. doi: 10.1038/nrd2027
- Bosker, F. J., Hartman, C. A., Nolte, I. M., Prins, B. P., Terpstra, P., Posthuma, D., van Veen, T., Willemsen, G., DeRijk, R. H., de Geus, E. J., Hoogendijk, W. J., Sullivan, P. F., Penninx, B. W., Boomsma, D. I., Snieder, Nolen, W. A. (2011). Poor replication of candidate genes for major depressive disorder using genome-wide association data. *Mol Psychiatry*, 16(5), 516-532. doi: 10.1038/mp.2010.38
- Bostwick, J. M., & Pankratz, V. S. (2000). Affective disorders and suicide risk: a reexamination. *Am J Psychiatry*, 157(12), 1925-1932.
- Bradley, R. G., Binder, E. B., Epstein, M. P., Tang, Y., Nair, H. P., Liu, W., Gillespie, C. F., Berg, T., Evces, M., Newport, D. J., Stowe, Z. N., Heim, C. M., Nemeroff, C. B., Schwartz, A., Cubells, J. F., Ressler, K. J. (2008). Influence of child abuse on adult depression: moderation by the corticotropin-releasing hormone receptor gene. *Arch Gen Psychiatry*, 65(2), 190-200. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2007.26
- Broer, A., Tietze, N., Kowalczyk, S., Chubb, S., Munzinger, M., Bak, L. K., & Broer, S. (2006). The orphan transporter v7-3 (slc6a15) is a Na⁺-dependent neutral amino acid transporter (BOAT2). *Biochem J*, 393(Pt 1), 421-430. doi: 10.1042/BJ20051273
- Broer, S. (2006). The SLC6 orphans are forming a family of amino acid transporters. *Neurochem Int*, 48(6-7), 559-567. doi: 10.1016/j.neuint.2005.11.021
- Butler, A. W., Breen, G., Tozzi, F., Craddock, N., Gill, M., Korszun, A., Maier, W., Middleton, L. T., Mors, O., Owen, M. J., Perry, J., Preisig, M., Rice, J. P., Rietschel, M., Jones, L., Farmer, A. E., Lewis, C. M., McGuffin, P. (2010). A genomewide linkage study on suicidality in major depressive disorder confirms evidence for linkage to 2p12. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 153B(8), 1465-1473. doi: 10.1002/ajmg.b.31127
- Carroll, B. J. (1984). Dexamethasone suppression test for depression. *Adv Biochem Psychopharmacol*, 39, 179-188.
- Caspi, A., Hariri, A. R., Holmes, A., Uher, R., & Moffitt, T. E. (2010). Genetic Sensitivity to the Environment: The Case of the Serotonin Transporter Gene and Its Implications for Studying Complex Diseases and Traits. *American Journal of Psychiatry*, 167(5), 509-527. doi: DOI 10.1176/appi.ajp.2010.09101452

- Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R. (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, *301*(5631), 386-389. doi: 10.1126/science.1083968
- Chen, M. C., Hamilton, J. P., & Gotlib, I. H. (2010). Decreased hippocampal volume in healthy girls at risk of depression. *Arch Gen Psychiatry*, *67*(3), 270-276. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.202
- Chen, N. H., Reith, M. E., & Quick, M. W. (2004). Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflügers Arch*, *447*(5), 519-531. doi: 10.1007/s00424-003-1064-5
- Couzin, J. (2008). Science and commerce. Gene tests for psychiatric risk polarize researchers. *Science*, *319*(5861), 274-277. doi: 10.1126/science.319.5861.274
- Czeh, B., Michaelis, T., Watanabe, T., Frahm, J., de Biurrun, G., van Kampen, M., Bartolomucci, A., Fuchs, E. (2001). Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(22), 12796-12801. doi: 10.1073/pnas.211427898
- de Kloet, E. R., Joels, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, *6*(6), 463-475. doi: 10.1038/nrn1683
- Drevets, W. C. (2001). Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol*, *11*(2), 240-249.
- Drgonova, J., Liu, Q. R., Hall, F. S., Krieger, R. M., & Uhl, G. R. (2007). Deletion of v7-3 (SLC6A15) transporter allows assessment of its roles in synaptosomal proline uptake, leucine uptake and behaviors. *Brain Res*, *1183*, 10-20. doi: 10.1016/j.brainres.2007.09.001
- Ebmeier, K. P., Donaghey, C., & Steele, J. D. (2006). Recent developments and current controversies in depression. *Lancet*, *367*(9505), 153-167. doi: 10.1016/S0140-6736(06)67964-6
- Edwards, A. W. (2008). G. H. Hardy (1908) and Hardy-Weinberg equilibrium. *Genetics*, *179*(3), 1143-1150. doi: 10.1534/genetics.104.92940
- Entsuah, A. R., Huang, H., & Thase, M. E. (2001). Response and remission rates in different subpopulations with major depressive disorder administered venlafaxine, selective serotonin reuptake inhibitors, or placebo. *J Clin Psychiatry*, *62*(11), 869-877.
- Farmer, M. K., Robbins, M. J., Medhurst, A. D., Campbell, D. A., Ellington, K., Duckworth, M., Brown, A. M., Middlemiss, D. N., Price, G.W., Pangalos, M. N. (2000). Cloning and characterization of human NTT5 and v7-3: two orphan transporters of the Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporter gene family. *Genomics*, *70*(2), 241-252. doi: 10.1006/geno.2000.6387
- Fountoulakis, K. N., Kantartzis, S., Siamouli, M., Panagiotidis, P., Kaprinis, S., Iacovides, A., & Kaprinis, G. (2006). Peripheral thyroid dysfunction in depression. *World J Biol Psychiatry*, *7*(3), 131-137. doi: 10.1080/15622970500474739
- Frodl, T., Meisenzahl, E. M., Zetsche, T., Born, C., Groll, C., Jager, M., Leinsinger, G., Bottlender, R., Hahn, K., Moller, H. J. (2002). Hippocampal changes in patients with a first episode of major depression. *Am J Psychiatry*, *159*(7), 1112-1118.
- Frodl, T., & O'Keane, V. (2012). How does the brain deal with cumulative stress? A review with focus on developmental stress, HPA axis function and hippocampal structure in humans. *Neurobiol Dis*. doi: 10.1016/j.nbd.2012.03.012
- Galvao, T. F., Silva, M. T., Zimmermann, I. R., Souza, K. M., Martins, S. S., & Pereira, M. G. (2014). Pubertal timing in girls and depression: a systematic review. *J Affect Disord*, *155*, 13-19. doi: 10.1016/j.jad.2013.10.034

- Gillespie, C. F., Phifer, J., Bradley, B., & Ressler, K. J. (2009). Risk and resilience: genetic and environmental influences on development of the stress response. *Depress Anxiety*, *26*(11), 984-992. doi: 10.1002/da.20605
- Gladkevich, A., Kauffman, H. F., & Korf, J. (2004). Lymphocytes as a neural probe: potential for studying psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *28*(3), 559-576. doi: 10.1016/j.pnpbp.2004.01.009
- Goltser-Dubner, T., Galili-Weisstub, E., & Segman, R. H. (2010). Genetics of unipolar major depressive disorder. *Isr J Psychiatry Relat Sci*, *47*(1), 72-82.
- Hamilton, M. (1960). A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *23*, 56-62.
- Heim, C., & Nemeroff, C. B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol Psychiatry*, *49*(12), 1023-1039.
- Heim, C., Newport, D. J., Heit, S., Graham, Y. P., Wilcox, M., Bonsall, R., Miller, A. H., Nemeroff, C. B. (2000). Pituitary-adrenal and autonomic responses to stress in women after sexual and physical abuse in childhood. *JAMA*, *284*(5), 592-597.
- Heinzen, E. L., Ge, D., Cronin, K. D., Maia, J. M., Shianna, K. V., Gabriel, W. N., Welsh-Bohmer, K. A., Hulette, C. M., Denny, T. N., Goldstein, D. B. (2008). Tissue-specific genetic control of splicing: implications for the study of complex traits. *PLoS Biol*, *6*(12), e1. doi: 10.1371/journal.pbio.1000001
- Hennings, J. M., Owashi, T., Binder, E. B., Horstmann, S., Menke, A., Kloiber, S., Dose, T., Wollweber, B., Spieler, D., Messer, T., Lutz, R., Kunzel, H., Bierner, T., Pollmacher, T., Pfister, H., Nickel, T., Sonntag, A., Uhr, M., Ising, M., Holsboer, F., Lucae, S. (2009). Clinical characteristics and treatment outcome in a representative sample of depressed inpatients - findings from the Munich Antidepressant Response Signature (MARS) project. *J Psychiatr Res*, *43*(3), 215-229. doi: 10.1016/j.jpsychires.2008.05.002
- Herbert, T. B., & Cohen, S. (1993). Depression and immunity: a meta-analytic review. *Psychol Bull*, *113*(3), 472-486.
- Herr, A. S., Tsolakidou, A. F., Yassouridis, A., Holsboer, F., & Rein, T. (2003). Antidepressants differentially influence the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor in vitro. *Neuroendocrinology*, *78*(1), 12-22. doi: 71701
- Heuser, I., Yassouridis, A., & Holsboer, F. (1994). The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *J Psychiatr Res*, *28*(4), 341-356.
- Holsboer, F. (2000). The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*, *23*(5), 477-501. doi: 10.1016/S0893-133X(00)00159-7
- Holsboer, F. (2001). Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *Journal of Affective Disorders*, *62*(1-2), 77-91. doi: Doi 10.1016/S0165-0327(00)00352-9
- Inoue, K., Sato, K., Tohyama, M., Shimada, S., & Uhl, G. R. (1996). Widespread brain distribution of mRNA encoding the orphan neurotransmitter transporter v7-3. *Brain Res Mol Brain Res*, *37*(1-2), 217-223.
- Ising, M., Horstmann, S., Kloiber, S., Lucae, S., Binder, E. B., Kern, N., Kunzel, H. E., Pfennig, A., Uhr, M., Holsboer, F. (2007). Combined dexamethasone/corticotropin releasing hormone test predicts treatment response in major depression - a potential biomarker? *Biol Psychiatry*, *62*(1), 47-54. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.07.039
- Ising, M., Kunzel, H. E., Binder, E. B., Nickel, T., Modell, S., & Holsboer, F. (2005). The combined dexamethasone/CRH test as a potential surrogate marker in depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *29*(6), 1085-1093. doi: 10.1016/j.pnpbp.2005.03.014

- Ising, M., Lucae, S., Binder, E. B., Bettecken, T., Uhr, M., Ripke, S., Kohli, M. A., Hennings, J. M., Horstmann, S., Kloiber, S., Menke, A., Bondy, B., Rupprecht, R., Domschke, K., Baune, B. T., Arolt, V., Rush, A. J., Holsboer, F., Muller-Myhsok, B. (2009). A genomewide association study points to multiple loci that predict antidepressant drug treatment outcome in depression. *Arch Gen Psychiatry*, *66*(9), 966-975. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.95
- Jia, P., Kao, C. F., Kuo, P. H., & Zhao, Z. (2011). A comprehensive network and pathway analysis of candidate genes in major depressive disorder. *BMC Syst Biol*, *5 Suppl 3*, S12. doi: 10.1186/1752-0509-5-S3-S12
- Joyce, P. R., & Paykel, E. S. (1989). Predictors of drug response in depression. *Arch Gen Psychiatry*, *46*(1), 89-99.
- Kendler, K. S. (1995). Genetic epidemiology in psychiatry. Taking both genes and environment seriously. *Arch Gen Psychiatry*, *52*(11), 895-899.
- Kendler, K. S., & Baker, J. H. (2007). Genetic influences on measures of the environment: a systematic review. *Psychol Med*, *37*(5), 615-626. doi: 10.1017/S0033291706009524
- Knoops, A. J., Gerritsen, L., van der Graaf, Y., Mali, W. P., & Geerlings, M. I. (2010). Basal hypothalamic pituitary adrenal axis activity and hippocampal volumes: the SMART-Medea study. *Biol Psychiatry*, *67*(12), 1191-1198. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.01.025
- Kohli, M. A., Lucae, S., Saemann, P. G., Schmidt, M. V., Demirkan, A., Hek, K., Wolf, C., Ising, M., Schreiber, S., Czisch, M., Muller, M. B., Uhr, M., Bettecken, T., Becker, A., Schramm, J., Rietschel, M., Maier, W., Bradley, B., Ressler, K. J., Nothen, M. M., Cichon, S., Craig, I. W., Breen, G., Lewis, C. M., Hofman, A., Tiemeier, H., van Duijn, C. M., Holsboer, F., Muller-Myhsok, B., Binder, E. B. (2011). The neuronal transporter gene SLC6A15 confers risk to major depression. *Neuron*, *70*(2), 252-265. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.005
- Krishnan, V., & Nestler, E. J. (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, *455*(7215), 894-902. doi: 10.1038/nature07455
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., Boe, A. F., Boguski, M. S., Brockway, K. S., Byrnes, E. J., Chen, L., Chen, L., Chen, T. M., Chin, M. C., Chong, J., Crook, B. E., Czaplinska, A., Dang, C. N., Datta, S., Dee, N. R., Desaki, A. L., Desta, T., Diep, E., Dolbeare, T. A., Donelan, M. J., Dong, H. W., Dougherty, J. G., Duncan, B. J., Ebbert, A. J., Eichele, G., Estin, L. K., Faber, C., Facer, B. A., Fields, R., Fischer, S. R., Fliss, T. P., Frensley, C., Gates, S. N., Glattfelder, K. J., Halverson, K. R., Hart, M. R., Hohmann, J. G., Howell, M. P., Jeung, D. P., Johnson, R. A., Karr, P. T., Kawal, R., Kidney, J. M., Knapik, R. H., Kuan, C. L., Lake, J. H., Laramée, A. R., Larsen, K. D., Lau, C., Lemon, T. A., Liang, A. J., Liu, Y., Luong, L. T., Michaels, J., Morgan, J. J., Morgan, R. J., Mortrud, M. T., Mosqueda, N. F., Ng, L. L., Ng, R., Orta, G. J., Overly, C. C., Pak, T. H., Parry, S. E., Pathak, S. D., Pearson, O. C., Puchalski, R. B., Riley, Z. L., Rockett, H. R., Rowland, S. A., Royall, J. J., Ruiz, M. J., Sarno, N. R., Schaffnit, K., Shapovalova, N. V., Sivasay, T., Slaughterbeck, C. R., Smith, S. C., Smith, K. A., Smith, B. I., Sodt, A. J., Stewart, N. N., Stumpf, K. R., Sunkin, S. M., Sutram, M., Tam, A., Teemer, C. D., Thaller, C., Thompson, C. L., Varnam, L. R., Visel, A., Whitlock, R. M., Wohnoutka, P. E., Wolkey, C. K., Wong, V. Y., Wood, M., Yaylaoglu, M. B., Young, R. C., Youngstrom, B. L., Yuan, X. F., Zhang, B., Zwingman, T. A., Jones, A. R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, *445*(7124), 168-176. doi: 10.1038/nature05453
- LeMay, L. G., Vander, A. J., & Kluger, M. J. (1990). The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. *Physiol Behav*, *47*(5), 957-961.
- Levinson, D. F. (2006). The genetics of depression: a review. *Biol Psychiatry*, *60*(2), 84-92. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.08.024

- Li, M., Ge, T., Feng, J., & Su, B. (2013). SLC6A15 rs1545843 and Depression: Implications From Brain Imaging Data. *Am J Psychiatry*, *170*(7), 805. doi: 10.1176/appi.ajp.2013.12111458
- Lohmueller, K. E., Pearce, C. L., Pike, M., Lander, E. S., & Hirschhorn, J. N. (2003). Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet*, *33*(2), 177-182. doi: 10.1038/ng1071
- Lokuge, S., Frey, B. N., Foster, J. A., Soares, C. N., & Steiner, M. (2011). Depression in women: windows of vulnerability and new insights into the link between estrogen and serotonin. *J Clin Psychiatry*, *72*(11), e1563-1569. doi: 10.4088/JCP.11com07089
- Maes, M., Stevens, W., DeClerck, L., Bridts, C., Peeters, D., Schotte, C., & Cosyns, P. (1992). Immune disorders in depression: higher T helper/T suppressor-cytotoxic cell ratio. *Acta Psychiatr Scand*, *86*(6), 423-431.
- Major Depressive Disorder Working Group of the Psychiatric, G. C. (2012). A mega-analysis of genome-wide association studies for major depressive disorder. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/mp.2012.21
- Manji, H. K., Drevets, W. C., & Charney, D. S. (2001). The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*, *7*(5), 541-547. doi: 10.1038/87865
- Manji, H. K., Quiroz, J. A., Sporn, J., Payne, J. L., Denicoff, K., N, A. G., A. Gray N, Zarate, C. A., Jr., Charney, D. S. (2003). Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. *Biol Psychiatry*, *53*(8), 707-742.
- Masson, J., Pohl, M., Aidouni, Z., Giros, B., Hamon, M., & el Mestikawy, S. (1996). The two orphan Na⁺/Cl⁻-dependent transporters Rxt1 and V-7-3-2 have an overlapping expression pattern in the rat central nervous system. *Receptors Channels*, *4*(4), 227-242.
- Mehta, D., Menke, A., & Binder, E. B. (2010). Gene expression studies in major depression. *Curr Psychiatry Rep*, *12*(2), 135-144. doi: 10.1007/s11920-010-0100-3
- Miller, A. H., Maletic, V., & Raison, C. L. (2009). Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry*, *65*(9), 732-741. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.11.029
- Mirnic, K., Levitt, P., & Lewis, D. A. (2006). Critical appraisal of DNA microarrays in psychiatric genomics. *Biol Psychiatry*, *60*(2), 163-176. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.02.003
- Miyahara, S., Komori, T., Fujiwara, R., Shizuya, K., Yamamoto, M., Ohmori, M., & Okazaki, Y. (2000). Effects of repeated stress on expression of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor mRNAs in rat hypothalamus and midbrain. *Life Sci*, *66*(6), PL93-98.
- Mohyuddin, A., Ayub, Q., Siddiqi, S., Carvalho-Silva, D. R., Mazhar, K., Rehman, S., Firasat, S., Dar, A., Tyler-Smith, C., Mehdi, S. Q. (2004). Genetic instability in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *Biochim Biophys Acta*, *1670*(1), 81-83.
- Mokhtari, M., Arfken, C., & Boutros, N. (2013). The DEX/CRH test for major depression: A potentially useful diagnostic test. *Psychiatry Res*. doi: 10.1016/j.psychres.2012.09.032
- Mossner, R., Mikova, O., Koutsilieri, E., Saoud, M., Ehli, A. C., Muller, N., Mikova, O., Koutsilieri, E., Saoud, M., Ehli, A. C., Muller, N., Fallgatter, A. J., Riederer, P. (2007). Consensus paper of the WFSBP Task Force on Biological Markers: biological markers in depression. *World J Biol Psychiatry*, *8*(3), 141-174. doi: 10.1080/15622970701263303
- Muller, N., Hofschuster, E., Ackenheil, M., Mempel, W., & Eckstein, R. (1993). Investigations of the cellular immunity during depression and the free interval: evidence for an immune activation in affective psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *17*(5), 713-730.

- Nugent, N. R., Tyrka, A. R., Carpenter, L. L., & Price, L. H. (2011). Gene-environment interactions: early life stress and risk for depressive and anxiety disorders. *Psychopharmacology (Berl)*, *214*(1), 175-196. doi: 10.1007/s00213-010-2151-x
- Oakley, R. H., & Cidlowski, J. A. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J Allergy Clin Immunol*, *132*(5), 1033-1044. doi: 10.1016/j.jaci.2013.09.007
- Ongur, D., An, X., & Price, J. L. (1998). Prefrontal cortical projections to the hypothalamus in macaque monkeys. *J Comp Neurol*, *401*(4), 480-505.
- Ota, K. T., & Duman, R. S. (2012). Environmental and pharmacological modulations of cellular plasticity: Role in the pathophysiology and treatment of depression. *Neurobiol Dis*. doi: 10.1016/j.nbd.2012.05.022
- Ott, V., Friedrich, M., Prilop, S., Lehnert, H., Jauch-Chara, K., Born, J., & Hallschmid, M. (2011). Food anticipation and subsequent food withdrawal increase serum cortisol in healthy men. *Physiol Behav*, *103*(5), 594-599. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.04.020
- Pariante, C. M., & Lightman, S. L. (2008). The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends Neurosci*, *31*(9), 464-468. doi: 10.1016/j.tins.2008.06.006
- Pariante, C. M., & Miller, A. H. (2001). Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry*, *49*(5), 391-404.
- Plata-Salaman, C. R. (1991). Immunoregulators in the nervous system. *Neurosci Biobehav Rev*, *15*(2), 185-215.
- Provenzano, M., & Mocellin, S. (2007). Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR. *Adv Exp Med Biol*, *593*, 66-73. doi: 10.1007/978-0-387-39978-2_7
- Quast, C., Cuboni, S., Bader, D., Altmann, A., Weber, P., Arloth, J., Roh, S., Bruckl, T., Ising, M., Kopczak, A., Erhardt, A., Hausch, F., Lucae, S., Binder, E. B. (2013). Functional Coding Variants in SLC6A15, a Possible Risk Gene for Major Depression. *PLoS One*, *8*(7), e68645. doi: 10.1371/journal.pone.0068645
- Raison, C. L., Capuron, L., & Miller, A. H. (2006). Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends Immunol*, *27*(1), 24-31. doi: 10.1016/j.it.2005.11.006
- Raison, C. L., & Miller, A. H. (2003). When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry*, *160*(9), 1554-1565.
- Raison, C. L., Rutherford, R. E., Woolwine, B. J., Shuo, C., Schettler, P., Drake, D. F., Haroon, E., Miller, A. H. (2013). A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: the role of baseline inflammatory biomarkers. *JAMA Psychiatry*, *70*(1), 31-41. doi: 10.1001/2013.jamapsychiatry.4
- Rajkowska, G. (2000). Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry*, *48*(8), 766-777.
- Reul, J. M., & de Kloet, E. R. (1985). Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, *117*(6), 2505-2511. doi: 10.1210/endo-117-6-2505
- Risch, N., Herrell, R., Lehner, T., Liang, K. Y., Eaves, L., Hoh, J., Griem, A., Kovacs, M., Ott, J., Merikangas, K. R. (2009). Interaction between the serotonin transporter gene (5-HTTLPR), stressful life events, and risk of depression: a meta-analysis. *JAMA*, *301*(23), 2462-2471. doi: 10.1001/jama.2009.878
- Robins, L. N., Wing, J., Wittchen, H. U., Helzer, J. E., Babor, T. F., Burke, J., Farmer, A., Jablenski, A., Pickens, R., Regier, D. A., et al. (1988). The Composite International Diagnostic Interview. An epidemiologic Instrument suitable for use in conjunction with

- different diagnostic systems and in different cultures. *Arch Gen Psychiatry*, 45(12), 1069-1077.
- Rothermundt, M., Arolt, V., Fenker, J., Gutbrodt, H., Peters, M., & Kirchner, H. (2001). Different immune patterns in melancholic and non-melancholic major depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 251(2), 90-97.
- Roy, A., Pickar, D., Paul, S., Doran, A., Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1987). CSF corticotropin-releasing hormone in depressed patients and normal control subjects. *Am J Psychiatry*, 144(5), 641-645.
- Sachar, E. J. (1967). Corticosteroids in depressive illness. II. A longitudinal psychoendocrine study. *Arch Gen Psychiatry*, 17(5), 554-567.
- Salas, M. A., Evans, S. W., Levell, M. J., & Whicher, J. T. (1990). Interleukin-6 and ACTH act synergistically to stimulate the release of corticosterone from adrenal gland cells. *Clin Exp Immunol*, 79(3), 470-473.
- Sapolsky, R. M., Krey, L. C., & McEwen, B. S. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev*, 7(3), 284-301.
- Sapolsky, R. M., Packan, D. R., & Vale, W. W. (1988). Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: in vitro demonstration. *Brain Res*, 453(1-2), 367-371.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T., & Gey, G. O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*, 97(5), 695-710.
- Schmidt, M. V., Sterlemann, V., Ganea, K., Liebl, C., Alam, S., Harbich, D., Greetfeld, M., Uhr, M., Holsboer, F., Muller, M. B. (2007). Persistent neuroendocrine and behavioral effects of a novel, etiologically relevant mouse paradigm for chronic social stress during adolescence. *Psychoneuroendocrinology*, 32(5), 417-429. doi: 10.1016/j.psyneuen.2007.02.011
- Schuhmacher, A., Lennertz, L., Wagner, M., Hofels, S., Pfeiffer, U., Guttenthaler, V., Maier, W., Zobel, A., Mossner, R. (2013). A variant of the neuronal amino acid transporter SLC6A15 is associated with ACTH and cortisol responses and cognitive performance in unipolar depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16(1), 83-90. doi: 10.1017/S1461145712000223
- Schule, C. (2007). Neuroendocrinological mechanisms of actions of antidepressant drugs. *J Neuroendocrinol*, 19(3), 213-226. doi: 10.1111/j.1365-2826.2006.01516.x
- Seidel, A., Arolt, V., Hunstiger, M., Rink, L., Behnisch, A., & Kirchner, H. (1996). Major depressive disorder is associated with elevated monocyte counts. *Acta Psychiatr Scand*, 94(3), 198-204.
- Sen, S., Duman, R., & Sanacora, G. (2008). Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and antidepressant medications: meta-analyses and implications. *Biol Psychiatry*, 64(6), 527-532. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.05.005
- Sheline, Y. I., Barch, D. M., Donnelly, J. M., Ollinger, J. M., Snyder, A. Z., & Mintun, M. A. (2001). Increased amygdala response to masked emotional faces in depressed subjects resolves with antidepressant treatment: an fMRI study. *Biol Psychiatry*, 50(9), 651-658.
- Sie, L., Loong, S., & Tan, E. K. (2009). Utility of lymphoblastoid cell lines. *J Neurosci Res*, 87(9), 1953-1959. doi: 10.1002/jnr.22000
- Smith, P. G., & Day, N. E. (1984). The design of case-control studies: the influence of confounding and interaction effects. *Int J Epidemiol*, 13(3), 356-365.
- Spijker, S., van de Leemput, J. C., Hoekstra, C., Boomsma, D. I., & Smit, A. B. (2004). Profiling gene expression in whole blood samples following an in-vitro challenge. *Twin Res*, 7(6), 564-570. doi: 10.1375/1369052042663878

- Spijker, S., Van Zanten, J. S., De Jong, S., Penninx, B. W., van Dyck, R., Zitman, F. G., Smit, J. H., Ylstra, B., Smit, A. B., Hoogendijk, W. J. (2010). Stimulated gene expression profiles as a blood marker of major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, *68*(2), 179-186. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.03.017
- Stranger, B. E., Forrest, M. S., Clark, A. G., Minichiello, M. J., Deutsch, S., Lyle, R., Hunt, S., Kahl, B., Antonarakis, S. E., Tavare, S., Deloukas, P., Dermitzakis, E. T. (2005). Genome-wide associations of gene expression variation in humans. *PLoS Genet*, *1*(6), e78. doi: 10.1371/journal.pgen.0010078
- Straub, R. H., Buttgereit, F., & Cutolo, M. (2011). Alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in systemic immune diseases - a role for misguided energy regulation. *Clin Exp Rheumatol*, *29*(5 Suppl 68), S23-31.
- Syvalahti, E., Eskola, J., Ruuskanen, O., & Laine, T. (1985). Nonsuppression of cortisol in depression and immune function. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *9*(4), 413-422.
- Takanaga, H., Mackenzie, B., Peng, J. B., & Hediger, M. A. (2005). Characterization of a branched-chain amino-acid transporter SBAT1 (SLC6A15) that is expressed in human brain. *Biochem Biophys Res Commun*, *337*(3), 892-900. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.09.128
- Tansey, K. E., Guipponi, M., Perroud, N., Bondolfi, G., Domenici, E., Evans, D., Hall, S. K., Hauser, J., Henigsberg, N., Hu, X., Jerman, B., Maier, W., Mors, O., O'Donovan, M., Peters, T. J., Placentino, A., Rietschel, M., Souery, D., Aitchison, K. J., Craig, I., Farmer, A., Wendland, J. R., Malafosse, A., Holmans, P., Lewis, G., Lewis, C. M., Stensbol, T. B., Kapur, S., McGuffin, P., Uher, R. (2012). Genetic predictors of response to serotonergic and noradrenergic antidepressants in major depressive disorder: a genome-wide analysis of individual-level data and a meta-analysis. *PLoS Med*, *9*(10), e1001326. doi: 10.1371/journal.pmed.1001326
- Tapiero, H., Mathe, G., Couvreur, P., & Tew, K. D. (2002). II. Glutamine and glutamate. *Biomed Pharmacother*, *56*(9), 446-457.
- Thase, M. E., Entsuah, A. R., & Rudolph, R. L. (2001). Remission rates during treatment with venlafaxine or selective serotonin reuptake inhibitors. *Br J Psychiatry*, *178*, 234-241.
- Tyring, S., Gottlieb, A., Papp, K., Gordon, K., Leonardi, C., Wang, A., Lalla, D., Woolley, M., Jahreis, A., Zitnik, R., Cella, D., Krishnan, R. (2006). Etanercept and clinical outcomes, fatigue, and depression in psoriasis: double-blind placebo-controlled randomised phase III trial. *Lancet*, *367*(9504), 29-35. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67763-X
- Tyrka, A. R., Price, L. H., Gelernter, J., Schepker, C., Anderson, G. M., & Carpenter, L. L. (2009). Interaction of childhood maltreatment with the corticotropin-releasing hormone receptor gene: effects on hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity. *Biol Psychiatry*, *66*(7), 681-685. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.05.012
- Uddin, M. (2014). Blood-Based Biomarkers in Depression: Emerging Themes in Clinical Research. *Mol Diagn Ther*. doi: 10.1007/s40291-014-0108-1
- Uher, R. (2008). The implications of gene-environment interactions in depression: will cause inform cure? *Mol Psychiatry*, *13*(12), 1070-1078. doi: 10.1038/mp.2008.92
- Ustun, T. B., Ayuso-Mateos, J. L., Chatterji, S., Mathers, C., & Murray, C. J. (2004). Global burden of depressive disorders in the year 2000. *Br J Psychiatry*, *184*, 386-392.
- Valentino, R. J., & Foote, S. L. (1988). Corticotropin-releasing hormone increases tonic but not sensory-evoked activity of noradrenergic locus coeruleus neurons in unanesthetized rats. *J Neurosci*, *8*(3), 1016-1025.
- Videbech, P., & Ravnkilde, B. (2004). Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry*, *161*(11), 1957-1966. doi: 10.1176/appi.ajp.161.11.1957

- von Bardeleben, U., & Holsboer, F. (1991). Effect of age on the cortisol response to human corticotropin-releasing hormone in depressed patients pretreated with dexamethasone. *Biol Psychiatry*, 29(10), 1042-1050.
- Wang, J. (2005). Work stress as a risk factor for major depressive episode(s). *Psychol Med*, 35(6), 865-871.
- Watson, S., Gallagher, P., Del-Estal, D., Hearn, A., Ferrier, I. N., & Young, A. H. (2002). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in patients with chronic depression. *Psychol Med*, 32(6), 1021-1028.
- Whitney, A. R., Diehn, M., Popper, S. J., Alizadeh, A. A., Boldrick, J. C., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2003). Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4), 1896-1901. doi: 10.1073/pnas.252784499
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nelson, D., Nissim, I., & Erecinska, M. (1996). Neuronal metabolism of branched-chain amino acids: flux through the aminotransferase pathway in synaptosomes. *J Neurochem*, 66(5), 2136-2145.
- Zhou, D., Kusnecov, A. W., Shurin, M. R., DePaoli, M., & Rabin, B. S. (1993). Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*, 133(6), 2523-2530.
- Zhu, C. B., Blakely, R. D., & Hewlett, W. A. (2006). The proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha activate serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology*, 31(10), 2121-2131. doi: 10.1038/sj.npp.1301029
- Zorrilla, E. P., Luborsky, L., McKay, J. R., Rosenthal, R., Houldin, A., Tax, McCorkle, R., Seligman, D. A., Schmidt, K. (2001). The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav Immun*, 15(3), 199-226. doi: 10.1006/brbi.2000.0597

9 Anhang

9.1 Datenanalyse zum Zusammenhang zwischen Stresshormonhaushalt und rs1545843-Risikogenotyp

9.1.1 MARS-Projekt

Tab. 9.1: Test auf signifikante Kovariaten für Cortisol-Messungen:

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Konstanter Term	38193,409	1	38193,409	2,971	,086
Alter	356,135	1	356,135	,028	,868
Geschlecht	56613,471	1	56613,471	4,404	,037
bmi_00	59205,437	1	59205,437	4,606	,033
HMD17_00	17715,629	1	17715,629	1,378	,242
Vorepi	97428,194	1	97428,194	7,579	,006
Genotyp	41191,230	1	41191,230	3,204	,075
Fehler	3174991,937	247	12854,218		

Tab. 9.2: Test auf signifikante Kovariaten für ACTH-Messungen:

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Konstanter Term	8364,008	1	8364,008	9,922	,002
Geschlecht	1751,465	1	1751,465	2,078	,151
bmi_00	8730,305	1	8730,305	10,357	,001
Vorepi	538,098	1	538,098	,638	,425
HMD17_00	2553,460	1	2553,460	3,029	,083
Alter	833,912	1	833,912	,989	,321
Genotyp	695,372	1	695,372	,825	,365
Fehler	209052,323	248	842,953		

9.1.1.1 MARS: Aufteilung Risikogenotyp (AA) vs. nicht-Risikogenotyp (AG + GG)

Cortisolwerte

Tab. 9.3: Mauchly-Test auf Sphärizität (MARS, Cortisolwerte, AA vs. AG + GG)

Mauchly-Test auf Sphärizität^a

Innersubjekteffekt	Mauchly-W	Approximiertes Quadrat	Chi-	df	Sig.	Epsilon ^b		
						Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Untergrenze
Messzeitpunkte	,076	637,489		9	,000	,473	,484	,250

Prüft die Nullhypothese, daß sich die Fehlerkovarianz-Matrix der orthonormalisierten transformierten abhängigen Variablen proportional zur Einheitsmatrix verhält.

a. Design: Konstanter Term + Geschlecht + bmi_00 + Vorepi + Genotyp

Innersubjektdesign: Messzeitpunkte

b. Kann zum Korrigieren der Freiheitsgrade für die gemittelten Signifikanztests verwendet werden. In der Tabelle mit den Tests der Effekte innerhalb der Subjekte werden korrigierte Tests angezeigt.

Tab. 9.4.: Tests der Innersubjekteffekte (MARS-Cortisolwerte, AA vs. AG + GG)

Tests der Innersubjekteffekte

Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Sphärizität angenommen	17935,909	4	4483,977	8,613	,000	,033
	Greenhouse-Geisser	17935,909	1,893	9476,478	8,613	,000	,033
	Huynh-Feldt	17935,909	1,937	9257,834	8,613	,000	,033
	Untergrenze	17935,909	1,000	17935,909	8,613	,004	,033
Messzeitpunkte Geschlecht	Sphärizität angenommen	7053,956	4	1763,489	3,387	,009	,013
	* Greenhouse-Geisser	7053,956	1,893	3726,974	3,387	,037	,013
	Huynh-Feldt	7053,956	1,937	3640,984	3,387	,036	,013
	Untergrenze	7053,956	1,000	7053,956	3,387	,067	,013
Messzeitpunkte bmi_00	Sphärizität angenommen	8421,065	4	2105,266	4,044	,003	,016
	* Greenhouse-Geisser	8421,065	1,893	4449,289	4,044	,020	,016
	Huynh-Feldt	8421,065	1,937	4346,634	4,044	,019	,016
	Untergrenze	8421,065	1,000	8421,065	4,044	,045	,016

	Sphärizität angenommen	18691,212	4	4672,803	8,976	,000	,035
Messzeitpunkte * Vorepi	Greenhouse- Geisser	18691,212	1,893	9875,543	8,976	,000	,035
	Huynh-Feldt	18691,212	1,937	9647,692	8,976	,000	,035
	Untergrenze	18691,212	1,000	18691,212	8,976	,003	,035
Messzeitpunkte	Sphärizität angenommen	3308,400	4	827,100	1,589	,175	,006
Genotyp *	Greenhouse- Geisser	3308,400	1,893	1748,001	1,589	,206	,006
	Huynh-Feldt	3308,400	1,937	1707,670	1,589	,206	,006
	Untergrenze	3308,400	1,000	3308,400	1,589	,209	,006
Fehler(Messzeitpunkte)	Sphärizität angenommen	518507,698	996	520,590			
	Greenhouse- Geisser	518507,698	471,277	1100,220			
	Huynh-Feldt	518507,698	482,407	1074,835			
	Untergrenze	518507,698	249,000	2082,360			

Tab. 9.5.: Tests der Innersubjektkontraste (MARS, Cortisolwerte, AA vs. AG + GG)

Tests der Innersubjektkontraste

Quelle	Messzeitpunkte	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Linear	14894,977	1	14894,977	14,203	,000	,054
	Quadratisch	1980,276	1	1980,276	4,669	,032	,018
	Kubisch	310,792	1	310,792	,804	,371	,003
	Ordnung 4	749,864	1	749,864	3,365	,068	,013
Messzeitpunkte Geschlecht *	Linear	6048,808	1	6048,808	5,768	,017	,023
	Quadratisch	372,766	1	372,766	,879	,349	,004
	Kubisch	,805	1	,805	,002	,964	,000
Messzeitpunkte bmi_00 *	Ordnung 4	631,577	1	631,577	2,834	,094	,011
	Linear	6503,357	1	6503,357	6,201	,013	,024
	Quadratisch	615,864	1	615,864	1,452	,229	,006
	Kubisch	501,869	1	501,869	1,298	,256	,005
Messzeitpunkte * Vorepi	Ordnung 4	799,975	1	799,975	3,590	,059	,014
	Linear	15231,467	1	15231,467	14,524	,000	,055
	Quadratisch	2970,605	1	2970,605	7,004	,009	,027
	Kubisch	444,475	1	444,475	1,149	,285	,005
Messzeitpunkte *	Ordnung 4	44,665	1	44,665	,200	,655	,001
	Linear	2150,328	1	2150,328	2,050	,153	,008

Genotyp	Quadratisch	663,530	1	663,530	1,564	,212	,006
	Kubisch	128,832	1	128,832	,333	,564	,001
	Ordnung 4	365,711	1	365,711	1,641	,201	,007
	Linear	261126,121	249	1048,699			
Fehler(Messzeitpunkte)	Quadratisch	105609,933	249	424,136			
	Kubisch	96282,724	249	386,678			
	Ordnung 4	55488,920	249	222,847			

Tab. 9.6.: Tests der Zwischensubjekteffekte (MARS, Cortisolwerte, AA vs. AG + GG)

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Konstanter Term	192537,764	1	192537,764	15,009	,000	,057
Geschlecht	65874,338	1	65874,338	5,135	,024	,020
bmi_00	64564,218	1	64564,218	5,033	,026	,020
Vorepi	98885,144	1	98885,144	7,709	,006	,030
Genotyp	36830,352	1	36830,352	2,871	,091	,011
Fehler	3194169,078	249	12827,988			

ACTH-Werte

Tab. 9.7.: Mauchly-Test auf Sphärizität (MARS, ACTH-Werte, AA vs. AG + GG)

Mauchly-Test auf Sphärizität^a

Maß: MASS_1

Innersubjekteffekt	Mauchly-W	Approximiertes Chi-Quadrat	df	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Untergrenze
Messzeitpunkte	,059	809,471	9	,000	,455	,461	,250

Prüft die Nullhypothese, daß sich die Fehlerkovarianz-Matrix der orthonormalisierten transformierten abhängigen Variablen proportional zur Einheitsmatrix verhält.

a. Design: Konstanter Term + bmi_00 + Genotyp

Innersubjekt-design: Messzeitpunkte

b. Kann zum Korrigieren der Freiheitsgrade für die gemittelten Signifikanztests verwendet werden. In der Tabelle mit den Tests der Effekte innerhalb der Subjekte werden korrigierte Tests angezeigt.

Tab. 9.8: Tests der Innersubjekteffekte (MARS, ACTH-Werte, AA vs. AG + GG)

Tests der Innersubjekteffekte

Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Sphärizität angenommen	4577,067	4	1144,267	23,396	,000	,075
	Greenhouse-Geisser	4577,067	1,821	2513,226	23,396	,000	,075
	Huynh-Feldt	4577,067	1,845	2480,839	23,396	,000	,075
	Untergrenze	4577,067	1,000	4577,067	23,396	,000	,075
Messzeitpunkte bmi_00	Sphärizität angenommen	1255,971	4	313,993	6,420	,000	,022
	* Greenhouse-Geisser	1255,971	1,821	689,642	6,420	,002	,022
	Huynh-Feldt	1255,971	1,845	680,755	6,420	,002	,022
	Untergrenze	1255,971	1,000	1255,971	6,420	,012	,022
Messzeitpunkte Genotyp	Sphärizität angenommen	90,034	4	22,509	,460	,765	,002
	* Greenhouse-Geisser	90,034	1,821	49,437	,460	,613	,002
	Huynh-Feldt	90,034	1,845	48,800	,460	,616	,002
	Untergrenze	90,034	1,000	90,034	,460	,498	,002
Fehler(Messzeitpunkte)	Sphärizität angenommen	56148,022	1148	48,909			
	Greenhouse-Geisser	56148,022	522,682	107,423			
	Huynh-Feldt	56148,022	529,506	106,039			
	Untergrenze	56148,022	287,000	195,638			

Tab. 9.9: Tests der Innersubjektkontraste (MARS, ACTH-Werte, AA vs. AG + GG)

Tests der Innersubjektkontraste

Quelle	Messzeitpunkte	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Linear	2672,873	1	2672,873	38,292	,000	,118
	Quadratisch	1560,171	1	1560,171	16,764	,000	,055
	Kubisch	303,313	1	303,313	14,295	,000	,047
	Ordnung 4	40,710	1	40,710	3,525	,061	,012
Messzeitpunkte	* Linear	832,594	1	832,594	11,928	,001	,040

bmi_00	Quadratisch	302,876	1	302,876	3,254	,072	,011
	Kubisch	106,938	1	106,938	5,040	,026	,017
	Ordnung 4	13,563	1	13,563	1,174	,279	,004
	Linear	43,838	1	43,838	,628	,429	,002
Messzeitpunkte	* Quadratisch	44,902	1	44,902	,482	,488	,002
Genotyp	Kubisch	,105	1	,105	,005	,944	,000
	Ordnung 4	1,189	1	1,189	,103	,749	,000
	Linear	20033,055	287	69,802			
Fehler(Messzeitpunkte)	Quadratisch	26710,819	287	93,069			
	Kubisch	6089,763	287	21,219			
	Ordnung 4	3314,387	287	11,548			

Tab. 9.10: Tests der Zwischensubjekteffekte (MARS, ACTH-Werte, AA vs. AG + GG)

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	Df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Konstanter Term	48162,700	1	48162,700	56,142	,000	,164
bmi_00	9537,113	1	9537,113	11,117	,001	,037
Genotyp	646,792	1	646,792	,754	,386	,003
Fehler	246208,349	287	857,869			

9.1.1.2 MARS: Aufteilung AA vs. AG vs. GG

Cortisolwerte

Tab. 9.11: Mauchly-Test auf Sphärizität (MARS, Cortisolwerte, AA vs. AG vs. GG)

Mauchly-Test auf Sphärizität^a

Innersubjekteffekt	Mauchly-W	Approximiertes Chi-Quadrat	df	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Untergrenze
Messzeitpunkte	,076	635,034	9	,000	,473	,486	,250

Prüft die Nullhypothese, daß sich die Fehlerkovarianz-Matrix der orthonormalisierten transformierten abhängigen Variablen proportional zur Einheitsmatrix verhält.

a. Design: Konstanter Term + bmi_00 + Vorepi + Geschlecht + RS1545843

Innersubjekt-design: Messzeitpunkte

b. Kann zum Korrigieren der Freiheitsgrade für die gemittelten Signifikanztests verwendet werden. In der Tabelle mit den Tests der Effekte innerhalb der Subjekte werden korrigierte Tests angezeigt.

Tab. 9.12: Tests der Innersubjekteffekte (MARS, Cortisolwerte, AA vs. AG vs. GG)

Tests der Innersubjekteffekte

Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Sphärizität angenommen	18897,184	4	4724,296	9,060	,000	,035
	Greenhouse-Geisser	18897,184	1,893	9982,128	9,060	,000	,035
	Huynh-Feldt	18897,184	1,946	9712,328	9,060	,000	,035
	Untergrenze	18897,184	1,000	18897,184	9,060	,003	,035
Messzeitpunkte bmi_00	Sphärizität angenommen	8464,578	4	2116,145	4,058	,003	,016
	* Greenhouse-Geisser	8464,578	1,893	4471,275	4,058	,020	,016
	Huynh-Feldt	8464,578	1,946	4350,424	4,058	,019	,016
	Untergrenze	8464,578	1,000	8464,578	4,058	,045	,016
Messzeitpunkte * Vorepi	Sphärizität angenommen	18792,827	4	4698,207	9,010	,000	,035
	Greenhouse-Geisser	18792,827	1,893	9927,003	9,010	,000	,035
	Huynh-Feldt	18792,827	1,946	9658,693	9,010	,000	,035
	Untergrenze	18792,827	1,000	18792,827	9,010	,003	,035
Messzeitpunkte Geschlecht	Sphärizität angenommen	7079,153	4	1769,788	3,394	,009	,014
	* Greenhouse-Geisser	7079,153	1,893	3739,446	3,394	,037	,014
	Huynh-Feldt	7079,153	1,946	3638,376	3,394	,036	,014
	Untergrenze	7079,153	1,000	7079,153	3,394	,067	,014
Messzeitpunkte RS1545843	Sphärizität angenommen	4519,901	8	564,988	1,083	,372	,009
	* Greenhouse-Geisser	4519,901	3,786	1193,782	1,083	,363	,009
	Huynh-Feldt	4519,901	3,891	1161,516	1,083	,363	,009
	Untergrenze	4519,901	2,000	2259,950	1,083	,340	,009
Fehler(Messzeitpunkte)	Sphärizität angenommen	517296,198	992	521,468			
	Greenhouse-Geisser	517296,198	469,489	1101,828			
	Huynh-Feldt	517296,198	482,531	1072,047			

Untergrenze	517296,198	248,000	2085,872			
-------------	------------	---------	----------	--	--	--

Tab. 9.13: Tests der Innersubjektkontraste (MARS, Cortisolwerte, AA vs. AG vs. GG)

Tests der Innersubjektkontraste

Quelle	Messzeitpunkte	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Linear	15660,875	1	15660,875	14,893	,000	,057
	Quadratisch	2110,195	1	2110,195	4,967	,027	,020
	Kubisch	312,150	1	312,150	,808	,369	,003
	Ordnung 4	813,965	1	813,965	3,644	,057	,014
Messzeitpunkte bmi_00	Linear	6527,550	1	6527,550	6,208	,013	,024
	* Quadratisch	622,423	1	622,423	1,465	,227	,006
	Kubisch	510,312	1	510,312	1,322	,251	,005
Messzeitpunkte * Vorepi	Ordnung 4	804,294	1	804,294	3,600	,059	,014
	Linear	15315,992	1	15315,992	14,565	,000	,055
	Quadratisch	3004,227	1	3004,227	7,072	,008	,028
	Kubisch	425,451	1	425,451	1,102	,295	,004
Messzeitpunkte Geschlecht	Ordnung 4	47,157	1	47,157	,211	,646	,001
	Linear	6066,828	1	6066,828	5,769	,017	,023
	* Quadratisch	376,699	1	376,699	,887	,347	,004
Messzeitpunkte RS1545843	Kubisch	1,086	1	1,086	,003	,958	,000
	Ordnung 4	634,539	1	634,539	2,840	,093	,011
	Linear	2492,966	2	1246,483	1,185	,307	,009
	* Quadratisch	922,422	2	461,211	1,086	,339	,009
Fehler(Messzeitpunkte)	Kubisch	651,080	2	325,540	,843	,432	,007
	Ordnung 4	453,433	2	226,716	1,015	,364	,008
	Linear	260783,483	248	1051,546			
	Quadratisch	105351,041	248	424,803			
	Kubisch	95760,476	248	386,131			
	Ordnung 4	55401,198	248	223,392			

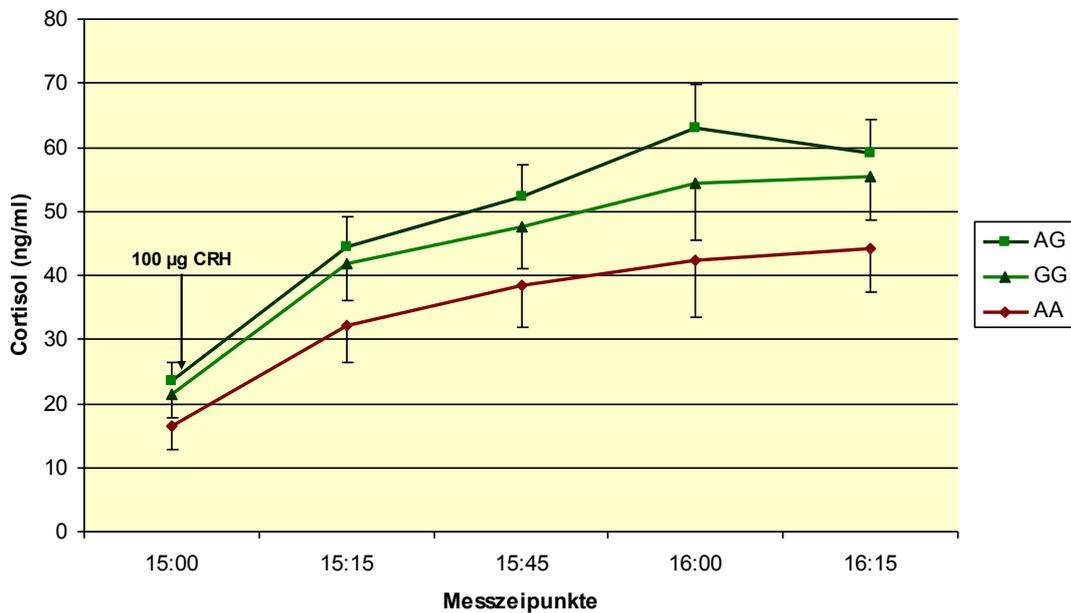
Tab. 9.14: Tests der Zwischensubjekteffekte (MARS, Cortisolwerte, AA vs. AG vs. GG)

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Konstanter Term	204212,597	1	204212,597	15,876	,000	,060
bmi_00	64827,528	1	64827,528	5,040	,026	,020
Vorepi	99641,936	1	99641,936	7,746	,006	,030
Geschlecht	66079,543	1	66079,543	5,137	,024	,020
RS1545843	40905,159	2	20452,580	1,590	,206	,013

Fehler	3190094,271	248	12863,283			
--------	-------------	-----	-----------	--	--	--

Abb. 9.1: Profildiagramm (MARS, Cortisolwerte, AA vs. AG vs. GG)



ACTH-Werte

Tab. 9.15: Mauchly-Test auf Sphärizität (MARS, ACTH-Werte, AA vs. AG vs. GG)

Mauchly-Test auf Sphärizität^a

Innersubjekteffekt	Mauchly-W	Approximiertes Chi-Quadrat	df	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Untergrenze
Messzeitpunkte	,058	807,824	9	,000	,453	,460	,250

Prüft die Nullhypothese, daß sich die Fehlerkovarianz-Matrix der orthonormalisierten transformierten abhängigen Variablen proportional zur Einheitsmatrix verhält.

a. Design: Konstanter Term + bmi_00 + RS1545843

Innersubjektdesign: Messzeitpunkte

b. Kann zum Korrigieren der Freiheitsgrade für die gemittelten Signifikanztests verwendet werden. In der Tabelle mit den Tests der Effekte innerhalb der Subjekte werden korrigierte Tests angezeigt.

Tab. 9.16: Tests der Innersubjekteffekte (MARS, ACTH-Werte, AA vs. AG vs. GG)

Tests der Innersubjekteffekte

Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Sphärizität angenommen	4665,371	4	1166,343	23,883	,000	,077

	Greenhouse-Geisser	4665,371	1,811	2576,055	23,883	,000	,077
	Huynh-Feldt	4665,371	1,841	2534,085	23,883	,000	,077
	Untergrenze	4665,371	1,000	4665,371	23,883	,000	,077
	Sphärizität angenommen	1255,200	4	313,800	6,426	,000	,022
Messzeitpunkte bmi_00	* Greenhouse-Geisser	1255,200	1,811	693,078	6,426	,002	,022
	Huynh-Feldt	1255,200	1,841	681,786	6,426	,002	,022
	Untergrenze	1255,200	1,000	1255,200	6,426	,012	,022
	Sphärizität angenommen	370,346	8	46,293	,948	,476	,007
Messzeitpunkte RS1545843	* Greenhouse-Geisser	370,346	3,622	102,246	,948	,430	,007
	Huynh-Feldt	370,346	3,682	100,580	,948	,431	,007
	Untergrenze	370,346	2,000	185,173	,948	,389	,007
	Sphärizität angenommen	55867,711	1144	48,835			
Fehler(Messzeitpunkte)	Greenhouse-Geisser	55867,711	517,961	107,861			
	Huynh-Feldt	55867,711	526,540	106,104			
	Untergrenze	55867,711	286,000	195,342			

Tab. 9.17: Tests der Innersubjektkontraste (MARS, ACTH-Werte, AA vs. AG vs. GG)

Tests der Innersubjektkontraste

Quelle	Messzeitpunkte	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Linear	2749,388	1	2749,388	39,444	,000	,121
	Quadratisch	1578,411	1	1578,411	16,968	,000	,056
	Kubisch	296,100	1	296,100	14,083	,000	,047
	Ordnung 4	41,472	1	41,472	3,579	,060	,012
Messzeitpunkte bmi_00	Linear	822,145	1	822,145	11,795	,001	,040
	* Quadratisch	309,223	1	309,223	3,324	,069	,011
	Kubisch	110,166	1	110,166	5,240	,023	,018
Messzeitpunkte RS1545843	Ordnung 4	13,667	1	13,667	1,180	,278	,004
	Linear	141,434	2	70,717	1,015	,364	,007
	* Quadratisch	150,574	2	75,287	,809	,446	,006
Fehler(Messzeitpunkte)	Kubisch	76,482	2	38,241	1,819	,164	,013
	Ordnung 4	1,856	2	,928	,080	,923	,001
Fehler(Messzeitpunkte)	Linear	19935,458	286	69,704			

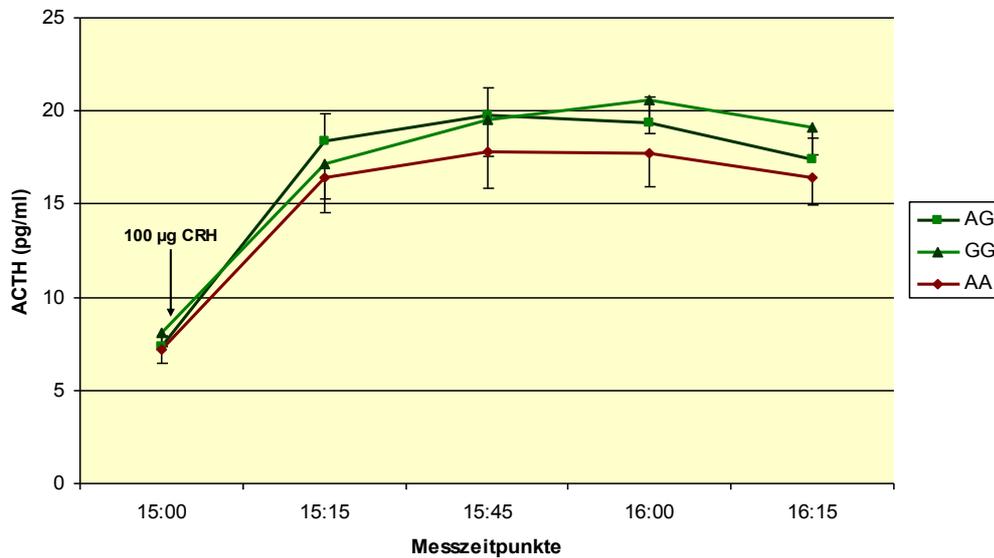
Quadratisch	26605,147	286	93,025			
Kubisch	6013,386	286	21,026			
Ordnung 4	3313,720	286	11,586			

Tab. 9.18: Tests der Zwischensubjekteffekte (MARS, ACTH-Werte, AA vs. AG vs. GG)

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Konstanter Term	49051,889	1	49051,889	56,991	,000	,166
bmi_00	9509,728	1	9509,728	11,049	,001	,037
RS1545843	695,171	2	347,586	,404	,668	,003
Fehler	246159,969	286	860,699			

Abb 9.2: Profildiagramm (MARS, ACTH-Werte, AA vs. AG vs. GG)



9.1.2 Dex-Suppression

Tab. 9.19: Test auf signifikante Kovariaten für Cortisol-Messungen:

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Konstanter Term	2498,587	1	2498,587	,779	,392
BP_sys	608,379	1	608,379	,190	,670
BP_diast	139,303	1	139,303	,043	,838
BMI	2160,129	1	2160,129	,674	,425
Puls	,762	1	,762	,000	,988
Größe	2195,366	1	2195,366	,685	,422
Gewicht	2138,663	1	2138,663	,667	,428
Age	120,463	1	120,463	,038	,849

BDI	3410,719	1	3410,719	1,064	,320
HAMD	24,882	1	24,882	,008	,931
Genotyp	899,389	1	899,389	,281	,605
Fehler	44882,986	14	3205,928		

Tab. 9.20: Test auf signifikante Kovariaten für ACTH-Messungen:

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	Df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Konstanter Term	,494	1	,494	,002	,962
BP_sys	14,451	1	14,451	,070	,795
BP_diast	7,056	1	7,056	,034	,856
BMI	1,329	1	1,329	,006	,937
Puls	337,565	1	337,565	1,641	,221
Größe	,238	1	,238	,001	,973
Gewicht	1,573	1	1,573	,008	,932
Age	31,337	1	31,337	,152	,702
BDI	1,872	1	1,872	,009	,925
HAMD	19,716	1	19,716	,096	,761
Genotyp	201,429	1	201,429	,979	,339
Fehler	2880,103	14	205,722		

9.1.2.1 Dex-Suppression: Aufteilung Risikogenotyp (AA) vs. nicht-Risikogenotyp (AG + GG)

Cortisolwerte:

Tab. 9.21: Mauchly-Test auf Sphärizität (Dex-Suppression, Cortisolwerte, AA vs. AG + GG)

Mauchly-Test auf Sphärizität^a

Innersubjekteffekt	Mauchly-W	Approximiertes Chi-Quadrat	df	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Untergrenze
Messzeitpunkte	,029	76,158	9	,000	,382	,422	,250

Prüft die Nullhypothese, daß sich die Fehlerkovarianz-Matrix der orthonormalisierten transformierten abhängigen Variablen proportional zur Einheitsmatrix verhält.

a. Design: Konstanter Term + Genotyp

Innersubjekt-design: Messzeitpunkte

b. Kann zum Korrigieren der Freiheitsgrade für die gemittelten Signifikanztests verwendet werden. In der Tabelle mit den Tests der Effekte innerhalb der Subjekte werden korrigierte Tests angezeigt.

Tab. 9.22: Tests der Innersubjekteffekte (Dex-Suppression, Cortisolwerte, AA vs. AG + GG)

Tests der Innersubjekteffekte

Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Sphärizität angenommen	93090,799	4	23272,700	23,850	,000	,509
	Greenhouse-Geisser	93090,799	1,530	60851,563	23,850	,000	,509
	Huynh-Feldt	93090,799	1,688	55143,501	23,850	,000	,509
	Untergrenze	93090,799	1,000	93090,799	23,850	,000	,509
Messzeitpunkte Genotyp	Sphärizität angenommen	4255,202	4	1063,800	1,090	,366	,045
	* Greenhouse-Geisser	4255,202	1,530	2781,539	1,090	,332	,045
	Huynh-Feldt	4255,202	1,688	2520,622	1,090	,337	,045
	Untergrenze	4255,202	1,000	4255,202	1,090	,307	,045
Fehler(Messzeitpunkte)	Sphärizität angenommen	89771,323	92	975,775			
	Greenhouse-Geisser	89771,323	35,185	2551,378			
	Huynh-Feldt	89771,323	38,828	2312,051			
	Untergrenze	89771,323	23,000	3903,101			

Tab. 9.23: Tests der Innersubjektkontraste (Dex-Suppression, Cortisolwerte, AA vs. AG + GG)

Tests der Innersubjektkontraste

Quelle	Messzeitpunkte	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Linear	74818,801	1	74818,801	48,278	,000	,677
	Quadratisch	8030,773	1	8030,773	5,679	,026	,198
	Kubisch	9752,061	1	9752,061	11,855	,002	,340
	Ordnung 4	489,163	1	489,163	4,190	,052	,154
Messzeitpunkte Genotyp	Linear	1252,941	1	1252,941	,808	,378	,034
	* Quadratisch	918,844	1	918,844	,650	,428	,027
	Kubisch	2068,632	1	2068,632	2,515	,126	,099
Fehler(Messzeitpunkte)	Ordnung 4	14,784	1	14,784	,127	,725	,005
	Linear	35643,915	23	1549,735			
	Quadratisch	32521,905	23	1413,996			
	Kubisch	18920,332	23	822,623			

Tab. 9.24: Tests der Zwischensubjekteffekte (Dex-Suppression, Cortisolwerte, AA vs. AG + GG)

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Konstanter Term	320670,465	1	320670,465	108,201	,000	,825
Genotyp	3809,096	1	3809,096	1,285	,269	,053
Fehler	68164,156	23	2963,659			

ACTH-Werte

Tab. 9.25: Mauchly-Test auf Sphärizität (Dex-Suppression, ACTH-Werte, AA vs. AG + GG)

Mauchly-Test auf Sphärizität^a

Innersubjekteffekt	Mauchly-W	Approximiertes Chi-Quadrat	df	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Untergrenze
Messzeitpunkte	,001	151,290	9	,000	,471	,534	,250

Prüft die Nullhypothese, daß sich die Fehlerkovarianz-Matrix der orthonormalisierten transformierten abhängigen Variablen proportional zur Einheitsmatrix verhält.

a. Design: Konstanter Term + Genotyp

Innersubjekt-design: Messzeitpunkte

b. Kann zum Korrigieren der Freiheitsgrade für die gemittelten Signifikanztests verwendet werden. In der Tabelle mit den Tests der Effekte innerhalb der Subjekte werden korrigierte Tests angezeigt.

Tab. 9.26: Tests der Innersubjekteffekte (Dex-Suppression, ACTH-Werte, AA vs. AG + GG)

Tests der Innersubjekteffekte

Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Sphärizität angenommen	3616,359	4	904,090	17,462	,000	,432
	Greenhouse-Geisser	3616,359	1,884	1919,941	17,462	,000	,432
	Huynh-Feldt	3616,359	2,135	1693,623	17,462	,000	,432
	Untergrenze	3616,359	1,000	3616,359	17,462	,000	,432
Messzeitpunkte Genotyp	Sphärizität angenommen *	121,794	4	30,448	,588	,672	,025
	Greenhouse-Geisser	121,794	1,884	64,661	,588	,550	,025
	Huynh-Feldt	121,794	2,135	57,039	,588	,570	,025
	Untergrenze	121,794	1,000	121,794	,588	,451	,025

	Sphärizität angenommen	4763,269	92	51,775			
Fehler(Messzeitpunkte)	Greenhouse-Geisser	4763,269	43,322	109,950			
	Huynh-Feldt	4763,269	49,111	96,989			
	Untergrenze	4763,269	23,000	207,099			

Tab. 9.27: Tests der Innersubjektkontraste (Dex-Suppression, ACTH-Werte, AA vs. AG + GG)

Tests der Innersubjektkontraste

Quelle	Messzeitpunkte	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Linear	1460,835	1	1460,835	24,943	,000	,520
	Quadratisch	2128,183	1	2128,183	16,953	,000	,424
	Kubisch	24,464	1	24,464	1,427	,244	,058
	Ordnung 4	2,877	1	2,877	,492	,490	,021
Messzeitpunkte Genotyp	Linear	24,004	1	24,004	,410	,528	,018
	* Quadratisch	91,748	1	91,748	,731	,401	,031
	Kubisch	5,963	1	5,963	,348	,561	,015
	Ordnung 4	,079	1	,079	,013	,909	,001
Fehler(Messzeitpunkte)	Linear	1347,016	23	58,566			
	Quadratisch	2887,298	23	125,535			
	Kubisch	394,416	23	17,149			
	Ordnung 4	134,538	23	5,849			

Tab. 9.28: Tests der Zwischensubjekteffekte (Dex-Suppression, ACTH-Werte, AA vs. AG + GG)

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta- Quadrat
Konstanter Term	4524,211	1	4524,211	28,398	,000	,553
Genotyp	154,984	1	154,984	,973	,334	,041
Fehler	3664,211	23	159,314			

9.1.2.2 Dex-Suppression: Aufteilung AA vs. AG vs. GG

Cortisolwerte

Tab. 9.29: Mauchly-Test auf Sphärizität (Dex-Suppression, Cortisolwerte, AA vs. AG vs. GG)

Mauchly-Test auf Sphärizität^a

Innersubjekteffekt	Mauchly-W	Approximiertes Chi-Quadrat	df	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse- Geisser	Huynh-Feldt	Untergrenze
Messzeitpunkte	,028	73,234	9	,000	,380	,440	,250

Prüft die Nullhypothese, daß sich die Fehlerkovarianz-Matrix der orthonormalisierten transformierten abhängigen Variablen proportional zur Einheitsmatrix verhält.

a. Design: Konstanter Term + rs1545843

Innersubjektdesign: Messzeitpunkte

b. Kann zum Korrigieren der Freiheitsgrade für die gemittelten Signifikanztests verwendet werden. In der Tabelle mit den Tests der Effekte innerhalb der Subjekte werden korrigierte Tests angezeigt.

Tab. 9.30: Tests der Innersubjekteffekte (Dex-Suppression, Cortisolwerte, AA vs. AG vs. GG)

Tests der Innersubjekteffekte

Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta- Quadrat
Messzeitpunkte	Sphärizität angenommen	96611,048	4	24152,762	23,750	,000	,519
	Greenhouse- Geisser	96611,048	1,522	63485,605	23,750	,000	,519
	Huynh-Feldt	96611,048	1,760	54888,376	23,750	,000	,519
	Untergrenze	96611,048	1,000	96611,048	23,750	,000	,519
Messzeitpunkte rs1545843	Sphärizität angenommen	4534,115	8	566,764	,557	,810	,048
	* Greenhouse- Geisser	4534,115	3,044	1489,742	,557	,649	,048
	Huynh-Feldt	4534,115	3,520	1288,001	,557	,673	,048
	Untergrenze	4534,115	2,000	2267,058	,557	,581	,048
Fehler(Messzeitpunkte)	Sphärizität angenommen	89492,410	88	1016,959			
	Greenhouse- Geisser	89492,410	33,479	2673,080			
	Huynh-Feldt	89492,410	38,723	2311,091			
	Untergrenze	89492,410	22,000	4067,837			

Tab. 9.31: Tests der Innersubjektkontraste (Dex-Suppression, Cortisolwerte, AA vs. AG vs. GG)

Tests der Innersubjektkontraste

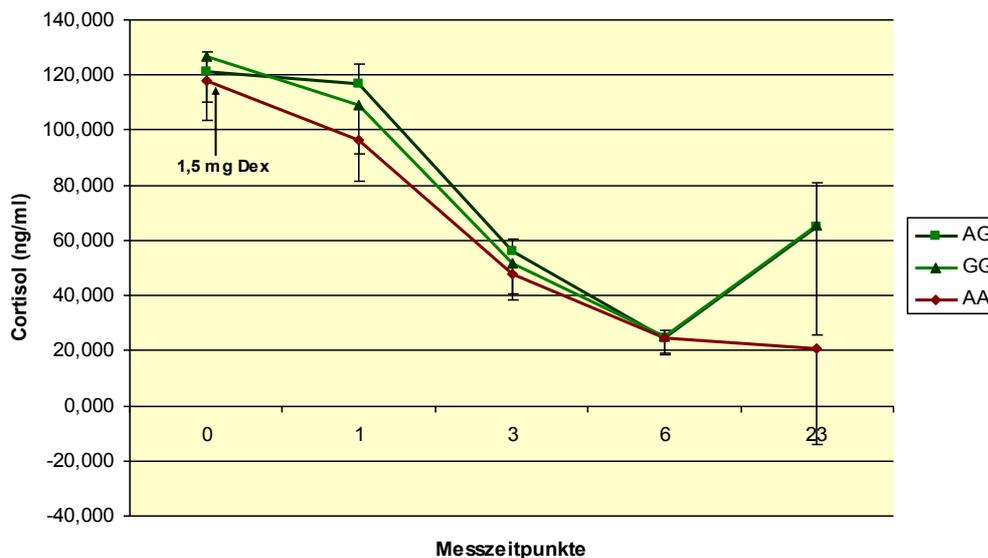
Quelle	Messzeitpunkte	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Linear	71981,789	1	71981,789	44,429	,000	,669
	Quadratisch	11939,973	1	11939,973	8,118	,009	,270
	Kubisch	12272,765	1	12272,765	14,354	,001	,395
	Ordnung 4	416,520	1	416,520	3,416	,078	,134
Messzeitpunkte rs1545843	* Linear	1253,308	2	626,654	,387	,684	,034
	* Quadratisch	1084,824	2	542,412	,369	,696	,032
	* Kubisch	2178,461	2	1089,230	1,274	,300	,104
Fehler(Messzeitpunkte)	Ordnung 4	17,522	2	8,761	,072	,931	,006
	Linear	35643,548	22	1620,161			
	Quadratisch	32355,925	22	1470,724			
	Kubisch	18810,503	22	855,023			
	Ordnung 4	2682,434	22	121,929			

Tab. 9.32: Tests der Zwischensubjekteffekte (Dex-Suppression, Cortisolwerte, AA vs. AG vs. GG)

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Konstanter Term	358358,819	1	358358,819	115,686	,000	,840
rs1545843	3824,371	2	1912,186	,617	,548	,053
Fehler	68148,880	22	3097,676			

Abb. 9.3: Profildiagramm (Dex-Suppression, Cortisolwerte, AA vs. AG vs. GG)



ACTH-Werte

Tab. 9.32: Mauchly-Test auf Sphärizität (Dex-Suppression, ACTH-Werte, AA vs. AG vs. GG)

Mauchly-Test auf Sphärizität^a

Innersubjekteffekt	Mauchly-W	Approximiertes Chi-Quadrat	df	Sig.	Epsilon ^b		
					Greenhouse- Geisser	Huynh-Feldt	Untergrenze
Messzeitpunkte	,001	144,632	9	,000	,461	,547	,250

Prüft die Nullhypothese, daß sich die Fehlerkovarianz-Matrix der orthonormalisierten transformierten abhängigen Variablen proportional zur Einheitsmatrix verhält.

a. Design: Konstanter Term + rs1545843

Innersubjektdesign: Messzeitpunkte

b. Kann zum Korrigieren der Freiheitsgrade für die gemittelten Signifikanztests verwendet werden. In der Tabelle mit den Tests der Effekte innerhalb der Subjekte werden korrigierte Tests angezeigt.

Tab. 9.33: Tests der Innersubjekteffekte (Dex-Suppression, ACTH-Werte, AA vs. AG vs. GG)

Tests der Innersubjekteffekte

Quelle		Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta- Quadrat
Messzeitpunkte	Sphärizität angenommen	3818,159	4	954,540	18,009	,000	,450
	Greenhouse- Geisser	3818,159	1,845	2069,225	18,009	,000	,450
	Huynh-Feldt	3818,159	2,190	1743,795	18,009	,000	,450
	Untergrenze	3818,159	1,000	3818,159	18,009	,000	,450
Messzeitpunkte rs1545843	Sphärizität angenommen	220,753	8	27,594	,521	,838	,045
	* Greenhouse- Geisser	220,753	3,690	59,818	,521	,707	,045
	Huynh-Feldt	220,753	4,379	50,410	,521	,737	,045
	Untergrenze	220,753	2,000	110,377	,521	,601	,045
Fehler(Messzeitpunkte)	Sphärizität angenommen	4664,309	88	53,004			
	Greenhouse- Geisser	4664,309	40,595	114,900			
	Huynh-Feldt	4664,309	48,171	96,829			
	Untergrenze	4664,309	22,000	212,014			

Tab. 9.34: Tests der Innersubjektkontraste (Dex-Suppression, ACTH-Werte, AA vs. AG vs. GG)

Tests der Innersubjektkontraste

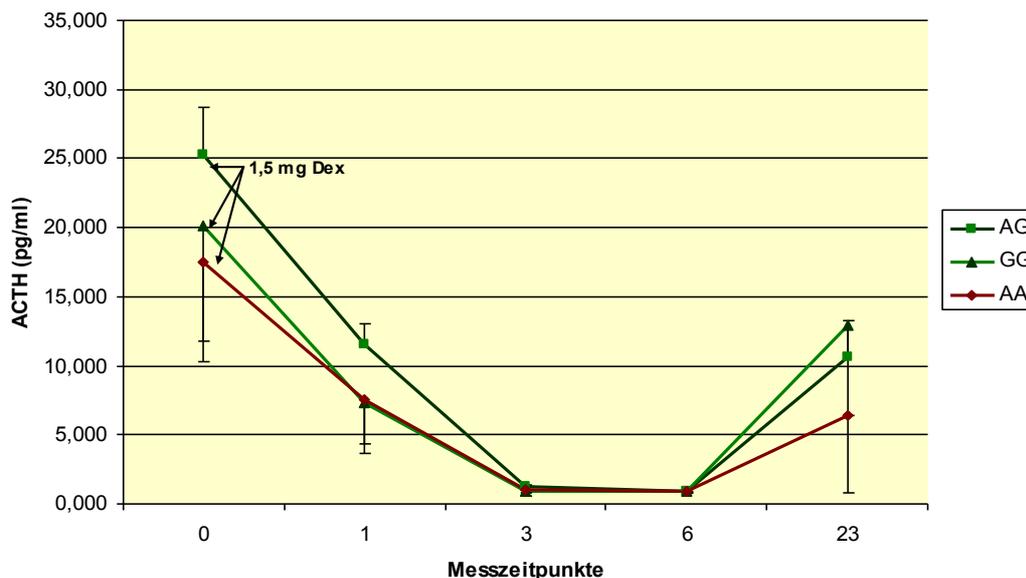
Quelle	Messzeitpunkte	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Messzeitpunkte	Linear	1254,253	1	1254,253	22,012	,000	,500
	Quadratisch	2531,831	1	2531,831	19,292	,000	,467
	Kubisch	31,761	1	31,761	1,773	,197	,075
	Ordnung 4	,314	1	,314	,053	,819	,002
Messzeitpunkte rs1545843	* Linear	117,431	2	58,715	1,030	,373	,086
	Quadratisch	91,853	2	45,927	,350	,709	,031
	Kubisch	6,183	2	3,092	,173	,843	,015
Fehler(Messzeitpunkte)	Ordnung 4	5,286	2	2,643	,450	,644	,039
	Linear	1253,590	22	56,981			
	Quadratisch	2887,193	22	131,236			
	Kubisch	394,196	22	17,918			
	Ordnung 4	129,331	22	5,879			

Tab. 9.35: Tests der Zwischensubjekteffekte (Dex-Suppression, ACTH-Werte, AA vs. AG vs. GG)

Tests der Zwischensubjekteffekte

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	Partielles Eta-Quadrat
Konstanter Term	4917,143	1	4917,143	29,756	,000	,575
rs1545843	183,737	2	91,869	,556	,581	,048
Fehler	3635,458	22	165,248			

Abb. 9.4: Profildiagramm (Dex-Suppression, ACTH-Werte, AA vs. AG vs. GG)



10 Danksagung

Ich danke Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Ernst J. Rummeny für seine Übernahme des Vorsitzes für die vorliegende Arbeit an der Fakultät für Medizin der TU München.

Herrn Prof. Dr. med. Müller-Myhsok danke ich für seine Unterstützung als betreuender Hochschullehrer.

Insbesondere danke ich Frau Dr. Dr. med. univ. Elisabeth Binder für das interessante Thema der vorliegenden Dissertation, sowie für die langjährige Unterstützung und wissenschaftliche Betreuung. Trotz ihrer zahlreichen sonstigen Aufgaben stand sie immer schnell und geduldig für ein Update und meine zahlreichen Fragen zur Verfügung. Ohne diesen Austausch wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht so motiviert erfolgt.

Den Mitarbeitern der AG Binder am Max-Planck-Institut (MPI) für Psychiatrie danke ich für die Einarbeitung in wissenschaftliches Arbeiten ebenso wie für die Einweisung in die selbstständige Durchführung der im Labor durchgeführten Versuche. Hier gilt ein besonderer Dank Monika Rex-Haffner für ihre allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und Beantwortung meiner Fragen und Carina Quast für ihre Erstkorrektur meiner Arbeit und diverse hilfreiche Anregungen.

Prof. Dr. Christian Warnecke und Sascha Kilburg, die mir in technischen Fragen rund um SPSS zur Seite standen und durch ihr Nachfragen meinen Einblick in die Thematik geschärft haben, danke ich.

Auch danke ich Madita Beintner, die meine Zeit am MPI für Psychiatrie mit viel Spaß und Freude bereichert hat.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, für die stetige geistige und finanzielle Förderung während meines Studiums, ohne die eine Verwirklichung dieser Arbeit und vieles Weitere nicht möglich gewesen wäre; außerdem meinen Freunden und meinem Freund, die so viel Abwechslung und Spaß in mein Leben bringen und mich stets unterstützt haben.